

**Aus dem  
Institut für Experimentelle und Klinische  
Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Tübingen  
Abteilung Klinische Pharmakologie  
Leiter: Professor Dr. M. Schwab**

**Die kritische Rolle von EPO auf das Überleben,  
die Funktionalität und die neuronale Differenzierung  
von mesenchymalen Stammzellen  
unter neurotoxischen Bedingungen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Anna-Lisa Schmitt  
aus  
Ludwigsburg  
2013**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. H. Gleiter

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungen

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Arbeitshypothese .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>7</b>
3.1. Material .....	7
3.1.1 Primärantikörper	7
3.1.2 Sekundärantikörper	11
3.1.3 Phycerythrin (PE) konjugierte Antikörper	12
3.1.4 Molekularbiologische und biochemische Kits	12
3.1.5 Chemikalien	14
3.1.6 Zusätzliches Material	16
3.2 Methoden.....	18
3.2.1 Präparation des Knochenmarks	18
3.2.2 Die Isolierung von hMSC und ihre Zellkultur	18
3.2.3 Feststellung der Eigenschaften von hMSC anhand der Differenzierungsfähigkeiten in vitro und durch FACS Analyse	19
3.2.4 Die Inkubation der Zellen unter Hypoxie, Glutamat, EPO und CRD Fzd722	
3.2.5 Erfassung der Zytotoxizität mittels LDH-Aktivität	23
3.2.6 Quantifizierung von ACh im Zellkulturüberstand der hMSC	23
3.2.7 Multiplex Analyse der Zytokin Freisetzung von Kokulturen aus murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC) mit PC12-Zellen aus Ratten	24
3.2.8 Quantifizierung des Abeta <sub>1-42</sub> im Kulturüberstand der mMSC und APPsw-PC12 Zellkulturen	25
3.2.9 Immunzytochemische Analyse	25
3.2.10 Western Blot Analyse	27
3.2.11 Glutamin Synthetase (GS) Aktivität	28
3.2.12 Aufbereitung der cDNA und ihre Quantifizierung mittels (Real time)-PCR	29
3.2.13 Bestimmung der mRNA von Beta-Tubulin-III bei hMSC	32
3.2.14 Messung von intrazellulärem Calcium	32
3.2.15 Statistische Analysen	33
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>

4.1. Die Differenzierungsfähigkeit von hMSC .....	34
4.1.1 Adipogene Differenzierung	34
4.1.2 Osteogene Differenzierung	34
4.1.3 Chondrogene Differenzierung	34
4.2 Komposition von Antigenen bei hMSC unter dem Einfluss von EPO und Hypoxie.....	35
4.2.1 EPO-Wirkung auf die Expression des EPO-Rezeptors (EPOR)	36
4.2.2 Die Wirkung von EPO auf die Expression von Beta Tubulin III	36
4.2.3 Die Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP) unter EPO Einwirkung	37
4.2.4 Die Wirkung von EPO auf die GS-Expression	39
4.2.5 Die Wirkung von EPO auf die Produktion von GLAST	40
4.3 EPO als Schutz gegenüber Glutamat (G) und Hypoxie; LDH Aktivität ...	42
4.3.1 EPO und die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH) unter Inkubation mit Glutamat (G)	42
4.3.2 Beeinflussung der Glutamin-Synthetase Aktivität unter Konfrontation mit Glutamat durch EPO	43
4.3.3 Die Wirkung von EPO auf die Expression von Synaptophysin	46
4.3.4 Freisetzung von Acetylcholin (ACh) unter EPO Einfluss	47
4.3.5 Apoptose unter Einwirkung von EPO	49
4.3.6 Die Wirkung von EPO auf die Anzahl der NeuN-positiven Zellen	52
4.4 Proteinexpressionsmuster von hMSC unter Gabe von EPO und Antagonisten der Wnt3a-Signalkette .....	54
4.4.1 Synaptophysin- Expression unter EPO-Einfluss	56
4.4.2 Die Wirkung von EPO auf die Produktion von Cholinacetyltransferase (ChAT)	56
4.4.3 Einwirkung auf die Produktion des Leukämie-inhibierenden-Faktors (LIF) durch EPO-Administration	57
4.4.4 Expression des EPO-Rezeptors (EPOR) und EPO	57
4.4.5 Expression des Sauren Gliafaserproteins (GFAP) unter EPO-Einwirkung	58
4.4.6 Die Wirkung von EPO auf die Expression des Glutamat-Aspartat-Transporters (GLAST)	59
4.4.7 Nephrilysin Expression unter EPO-Einfluss	59
4.4.8 EPO und die Expression von Wnt3a	60
4.4.9 Die Wirkung von EPO auf die Expression von Beta-Catenin	61
4.5 qPCR .....	61
4.5.1 EPO und die Expression des muskarinergen M1-Rezeptors (M1R)	62

4.5.2 EPO und die Expression des muskarinergen M2-Rezeptors (M2R)	63
Auch die Expression des M2R zeigte unter hypoxischen Bedingungen eine Reduktion. Eine zusätzliche Gabe von EPO führte zu einer gesteigerten mRNA Produktion (vgl. Abb. 11, H +EPO mit H).	63
4.5.3 EPO und die Expression des muskarinergen M3-Rezeptors (M3R)	64
4.5.4 Die Wirkung von EPO auf die Expression des Nerven-Wachstumsfaktors (NGF)	65
4.5.5 Einfluss von EPO auf die Expression von Beta-Tubulin III	66
4.6 Veränderung der intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> - Konzentration/Calcium(Ca <sup>2+</sup> ) durch EPO-Exposition; Ca <sup>2+</sup> -Imaging-Technik	67
a) nach Behandlung mit EPO und Acetylcholin	68
b) bei der hypoxischen Kontrollgruppe	68
c) Nach Atropin-Gabe	68
d) Direktvergleich der einzelnen Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen	70
4.7 Interleukin Freisetzung der Kokultur von mMSC mit APPsw-PC12 Zellen	70
4.7.1 Die Wirkung von EPO auf die Produktion des Interleukin 6 (IL-6)	71
4.7.2 Einfluss der EPO Exposition auf die Produktion des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktors (GM-CSF)	73
4.8 Analyse der Abeta1-42-Produktion mittels ELISA	75
a) bei APPsw-PC 12-Zellen	75
b) bei der Kokultivierung von mMSC- und APPsw-PC 12-Zellen	75
<b>5. Diskussion</b>	<b>77</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>102</b>
8.1 Bilderverzeichnis	102
8.2 Tabellenverzeichnis	104
<b>9. Danksagung</b>	<b>105</b>

### **Abkürzungen**

Abeta	Amyloid-Beta
ACH	Acetylcholin
AD	Alzheimer´s Disease
APP	amyloid precursor protein
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMPC	bone marrow precursor cells
BMP	bone morphogenetic protein
CD	Cluster of differentiation
ChAT	Cholin Acetyl Transferase
DNA	deoxyribonucleic acid
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetin Rezeptor
FACS	fluorescence-activated cell sorting
G	Glutamat
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamat Aspartat Synthetase Transporter
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GS	Glutamat Synthetase
GvHR	graft versus host reaction
H	Hypoxie
HLA	human leukocyte antigen
hMSC	human mesenchymal stem cells
IL	Interleukin
JAK2	Janus-Thyrosin-Kinase 2
LDH	Laktatdehydrogenase
LIF	leukemia inhibitory factor
MHC	major human histocompatibility complex

## Abkürzungen

---

mMSC	murine mesenchymal stem cells
MS	Multiple Sklerose
MSC	mesenchymal stem cells
M1-3R	muskarinerner M1-M3 Rezeptor
N	Normoxie
NGF	nerve growth factor
PCR	polymerase chain reaction
PD	Parkinson's Disease
PDGF	platelet derived growth factor
PE	Phycerythrin
PLA	human processed lipoaspirate cells
RBC	red blood cells
RNA	ribonucleic acid
SGZ	Subgranuläre Zone
SVZ	Subventrikuläre Zone
TGF	tumor growth factor
TNF	tumor necrosis factor

## **1. Einleitung**

Die Alterung der modernen Gesellschaft schreitet deutlich voran. Während laut dem statistischen Bundesamt im Jahre 1990 die mittlere Lebenserwartung für Frauen noch bei 78 Jahren und für Männer bei 72 Jahren lag, beträgt sie heute schon 81,6 Jahre für Frauen und 76 Jahre für Männer. Gleichwohl steigt die Prävalenz, an einer neurodegenerativen Erkrankung (Alzheimer, Parkinson, Multipler Sklerose) zu erkranken, mit zunehmendem Alter an.

Während die altersspezifische Prävalenz der Alzheimer-Demenz bei den 65- bis 69-Jährigen bei 1,5 Prozent liegt, erreicht sie bei den über 90-Jährigen Patienten die 30-Prozent-Marke [1].

Laut einer Schätzung des statistischen Bundesamtes werden im Jahre 2050 ca. 2,3 Millionen Menschen in Deutschland an Alzheimer erkranken (Daten aus der Gesundheits-Berichterstattung des Bundes (Berlin 2006)).

Ein Grund dafür ist, dass man bis heute nicht in der Lage ist, neurodegenerative Erkrankungen ursächlich, sondern lediglich symptomatisch zu behandeln. In den USA werden jährlich mehr als 60 Milliarden Dollar zur Behandlung von Alzheimer Patienten ausgegeben. Innovative Therapiemaßnahmen und ein verzögerter Krankheitsausbruch könnten laut Untersuchungen des Robert Koch Instituts diese Kosten allein um die Hälfte reduzieren ([www.rki.de](http://www.rki.de)).

Im Allgemeinen wird Neurodegeneration als irreversibler, meist langsam progredienter Nervenzelluntergang betrachtet, bis hin zu einer massiven Hirnatrophie. Charakteristisch für die Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington etc.) sind vor allem neurologische Symptome (häufig Demenz) begleitet von spezifischen histologischen Schädigungsmustern.

Bei Alzheimer ist dieser Nervenzelluntergang vergesellschaftet mit einer Einlagerung von Alzheimerfibrillen in den Nervenzellen. Der Grundbaustein dieser Fibrillen, das Tauprotein, wird im Falle der Alzheimer Krankheit übermäßig mit Phosphat beladen, was letztlich zu Störungen von Stabilisierungs- und Trans-

portprozessen an den Mikrotubuli führt und die Zelle absterben lässt. Weiterhin typisch ist eine so genannte Plaques-Ablagerung zwischen den Nervenzellen. Plaques haben einen Beta-Amyloidkern [2,3]. Sehr oft finden sich auch Amyloidablagerungen in den Gefäßen betroffener Patienten [4-6]. Diese führen über Schädigung der Gefäße dann letztlich zu einem Zelluntergang aufgrund einer Hypoxie [7].

Noch bis ins Ende des 20. Jahrhunderts galt die Neubildung von Nervenzellen im Gehirn als ausgeschlossen. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass eine Vermehrung neuronaler Stammzellen und eine darauffolgende Migration in bestimmte Regionen bis ins hohe Alter stattfinden [8, 9].

Das heute aktuelle Konzept der Stammzelltherapie basiert auf der Hauptidee, einerseits die Parenchymzellen eines erkrankten Empfängerorgans zu schützen und andererseits diejenigen Zellen, welche schon einen unwiderruflichen Schaden erlitten und ihre Funktion eingebüßt haben, zu ersetzen. Als mögliche Kandidaten zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen zeigen aus dem Knochenmark isolierte mesenchymale Stammzellen verschiedenste protektive Eigenschaften gegenüber der Neurodegeneration, mehr noch besitzen sie die Fähigkeit, sich in funktionell spezialisierte Nervenzellen zu differenzieren [10]. So konnten MSC erfolgreich in Modellen zerebraler Ischämie und bei Morbus Parkinson [11] angewendet werden. Der Nutzen dieser MSC in der Parkinsontherapie kann vermutlich auf deren Fähigkeit, sich in Dopamin-produzierende Neuronen zu differenzieren [12]. Hierbei bleibt zu vermuten, dass das Potential der MSC nicht darauf beschränkt ist, sich lediglich in einen spezialisierten Neuronentyp zu differenzieren. Dieser Tatsache ist es geschuldet, dass eine Erforschung und Evaluierung von Umgebungsbedingungen, welche MSC dazu veranlassen, sich in einen anderen Neuronentyp zu differenzieren, einen hohen wissenschaftlichen Wert und damit eine Steigerung des potentiellen therapeutischen Nutzens mit sich bringt.

Da die erfolgreiche Implantation von Stammzellen in ein erkranktes Organ nicht nur voraussetzt, dass die Stammzellen in dem erkrankten Gewebe und den dort vorherrschenden Umgebungsbedingungen überleben müssen, sondern dass

auch ihre Fähigkeit, erkrankte Zellen zu schützen oder in ihrer Funktion zu ersetzen, spielt die Reaktion der Stammzellen auf die pathologischen Umgebungsbedingungen – spezifisch für Erkrankung und Organ – eine entscheidende Rolle und muss daher mit in die Überlegungen eingeschlossen werden.

In vielen neurodegenerativen Erkrankungen spielen daher neben weiteren Faktoren vor allem Glutamat und eine lokale Hypoxie eine entscheidende Rolle, das pathologische Milieu aufrechtzuerhalten und damit die Krankheit zu verstärken. Eine Hypoxie z. B. verstärkt die Bildung von Amyloid beta (A $\beta$ ) und erhöht damit die Wahrscheinlichkeit, eine Alzheimer Erkrankung (AD) zu entwickeln [13]. Die Rolle der Hypoxie wird auch im Zusammenhang mit einer Demyelinisierung von Axonen in der Multiplen Sklerose (MS) [14] sowie bei der Reduzierung dopaminerger Aktivität von Neuronen untersucht und diskutiert [15].

Zusätzlich hierzu tritt eine Hypoxie nach Zelltransplantation ein und beeinflusst entscheidend das Überleben der implantierten Zellen in der ersten kritischen Posttransplantationsphase. Eine Vorbehandlung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen und damit eine Konditionierung auf die pathologischen Umgebungsbedingungen vor der Zelltransplantation kann das Überleben und die therapeutischen Effekte der implantierten Zellen verbessern [16]. Die vorherrschende Rolle von Glutamat (Glu) in der Pathophysiologie vieler neurodegenerativer Erkrankungen hängt mit seinen exzitotoxischen Effekten als üblichem Mechanismus der neuronalen Schädigung in Alzheimer, Parkinson, Ischämie, Neurotrauma und Multipler Sklerose zusammen [17].

Ein bekannter Faktor, der verschiedene neuronale Zelltypen sowohl vor Hypoxie als auch vor einer Glutamat-vermittelten Zytotoxizität schützt, ist Erythropoetin (EPO). Die protektive Wirkung von EPO konnte in einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen sowohl in experimentellen Arbeiten als auch in klinischen Studien gezeigt werden. EPO induziert und verbessert die Neurogenese und vermittelt eine Neuroprotektion in experimentellen Modellen von Ischämie und Schlaganfall [18]. Weiterhin konnte ein anti-inflammatorischer Effekt im Zentralnervensystem (ZNS) von Tieren mit einer Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der MS, gezeigt werden

[19]. Bei MS-Patienten selbst konnte die Administration von EPO die motorische Funktion verbessern [20]. Die Möglichkeit, durch EPO einen frühen und späten apoptotischen Zelluntergang zu verhindern, welcher in vitro durch Abeta Toxizität vermittelt wird, steigert den therapeutischen Nutzen von EPO in der Behandlung der Alzheimer Erkrankung [21]. Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass EPO dopaminerge Neuronen schützt und damit das neurologische und motorische Outcome in einem Rattenmodell der Parkinson Erkrankung verbessert [22]. Zusätzlich zu den beschriebenen Effekten scheint EPO in vitro in der Lage zu sein, den durch Hypoxie eingeleiteten Zelltod von neuronalen Vorläuferzellen umzukehren [23] und sogar unterstützend bzw. synergistisch zu MSC die postischämische Neurogenese in einem Rattenmodell des Schlaganfalls zu potenzieren [24].

Obwohl all diese Erkenntnisse eine entscheidende Rolle für EPO als neuroprotektiven Faktor nahelegen, ist der Mechanismus der positiven Wirkung auf therapeutische Zellen, wie z. B. MSC, noch völlig im Dunkeln. Zieht man die Tatsache in Betracht, dass MSC, die in neurodegeneratives Gewebe eingebracht werden, einer Hypoxie (entweder durch die Erkrankung selbst oder durch die Operation verursacht) und einer Glutamattoxizität (aufgrund der Erkrankung) ausgesetzt sind, ist es interessant zu untersuchen, inwieweit der Einfluss von EPO das Überleben, die Differenzierung und die protektiven Eigenschaften der MSC beeinflusst. Unsere Arbeit konnte hierbei zeigen, dass EPO ein essentieller Faktor in der cholinergen Neuronen-ähnlichen Differenzierung von MSC ist und gleichzeitig in der Vermittlung neuroprotektiver Eigenschaften, ähnlich wie der Glutamat Transporter GLAST und das Glutamat metabolisierende Enzym Glutamat-Synthase (GS), eine wesentliche Rolle spielt.

Aufgrund dessen sollte eine zusätzliche Gabe von EPO als therapeutische Substanz beim Versuch einer Stammzelltherapie in neurodegenerativen Erkrankungen erwogen und weiter untersucht werden.

## **2. Arbeitshypothese**

Der Erfolg einer Transplantation von mesenchymalen Stammzellen in neurodegeneratives Gewebe kann durch folgende Faktoren beeinflusst werden:

- a) hypoxische Bedingungen,
- b) überhöhte extrazellulären Glutamat- und
- c) schädliche Aβ-Konzentrationen.

Deshalb wird in vorliegender Arbeit untersucht,

1) ob EPO in der Lage ist, MSC vor diesen schädigenden Noxen zu schützen. Hierfür sollen die zu untersuchenden Zellen mit Glutamat (G) behandelt werden, um toxische Umgebungsbedingungen zu erreichen. Das Maß des Zelluntergangs wird anhand der LDH Freisetzung mit und ohne EPO Zugabe evaluiert. Weiterhin soll die Apoptoserate unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen nach EPO-Gabe über eine TUNEL-Färbung quantifiziert werden.

2) Zur Klärung der genaueren Wirkungsweise der erreichbaren Neuroprotektion durch EPO soll untersucht werden, ob EPO ein neuroprotektives Milieu schaffen kann, indem es eine erhöhte Expression und/oder Aktivität des Glutamatransporters (GLAST) oder der Glutamat-Synthetase (GS) fördert und/oder die Konzentration von inflammatorischen Zytokinen oder Aβ reduziert. Hierfür werden unter den entsprechenden neurotoxischen Umgebungsbedingungen immunhistochemische Färbungen gegen GLAST und GS durchgeführt, um die Expression mit und ohne EPO-Einfluss evaluieren zu können. Eine Bestimmung der Gesamtexpression kann durch Westernblot und densitometrische Verfahren erreicht werden. Eine Bestimmung der Aktivität der GS kann in entsprechenden Aktivitäts-Essays gemessen werden. Zur Bestimmung der Interleukin- und Aβ-Konzentrationen sollen fluoreszenzmikroskopische Verfahren und ELISA angewendet werden.

3) Im Weiteren soll in der Arbeit untersucht werden, wie EPO unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen eine Differenzierung von MSC beein-

flusst. Hierzu werden Kulturen von hMSC unter verschiedensten Umgebungsbedingungen kultiviert und unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit EPO kokultiviert. Danach sollen durch immunhistochemische und proteinbiochemische Methoden die klassischen Marker der unterschiedlichen Differenzierung bestimmt werden.

4) In diesem Zusammenhang soll untersucht werden, ob EPO in der Lage ist, eine Proliferation und Differenzierung in Neuronen-ähnliche cholinerge Zellen zu induzieren. Hierzu werden, wie oben beschrieben, hMSC kultiviert und dann über immunhistochemische und proteinbiochemische Verfahren  $\beta$ -Tubulin, NeuN, ChAT, M1R, M2R und M3R als Zeichen einer neuronalen Differenzierung nachgewiesen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1 Primärantikörper**

anti-Beta-III-Tubulin clone TUJ1(mouse monoclonal)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany
anti-Beta-Catenin (rabbit polyclonal)	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
anti-ChAT (anti-Choline Acetyltransferase) (rabbit polyclonal)	Biozol, Eching, Germany
anti-EPOR (= EPO receptor) (rabbit polyclonal)	Santa Cruz, CA, USA
anti EPOR (= EPO receptor) (polyclonal rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, Heidel- berg, Germany
anti EPO (mouse monoclonal)	AbD Serotec, Oxford, UK
anti-GFAP (= Glial fibrillary acidic pro- tein) (mouse monoclonal)	Progen, Heidelberg, Germany
anti-GLAST (= Glutamate transporter) (rabbit polyclonal)	Abcam,Cambridge, UK
anti-GLAST (rabbit polyclonal)	Chemicon International, Nürnberg, Germany
anti-GS (Glutamine Synthetase) (rab- bit polyclonal)	Sigma, Taufkirchen, Germany
anti-GAPDH (=Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase) (rabbit polyclonal)	US Biological,Swampscott, MA, USA
anti-Leukemia-inhibitory factor (LIF) (goat polyclonal)	Santa Cruz Biotechnology, Heidel- berg, Germany

anti-human NeuN (neuronal nuclei-specific protein) (mouse monoclonal)	Chemicon International, Nürnberg, Germany
anti-Nephrilysin (mouse monoclonal)	R&D Systems, USA
anti-Wnt3a (rabbit polyclonal)	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany

**Tabelle 1:** Verwendete Primärantikörper bei Westernblot und Immunfluoreszenzanalysen

### **3.1.1.2 Erklärung und Anwendung**

*pab* = Polyklonale Antikörper sind verschiedene Antikörper, produziert von unterschiedlichen B-Zell Klonen.

*mab* = Monoklonale Antikörper besitzen eine einzige, identische Antigenbindungsstelle und sind komplett identische Antikörper, welche von einem bestimmten B-Zell Klon produziert wurden.

*Anti-human NeuN (neuronal nuclei-specific protein)* = ist ein Antikörper, der mit neuronalen Zellen eine Bindung eingeht. Die immunhistochemische Färbung findet sich vorrangig im Zellkern, weniger stark vereinzelt im Zytoplasma. Antikörper gegen NeuN werden Identifizierung von Neuronen in Primärkulturen, aber auch nach Transplantationen eingesetzt [25].

*Anti- Beta-III-Tubulin clone TUJ1* = Tubulin bildet in den Zellen den Hauptbestandteil der Mikrotubuli, welche als Strukturelemente bei der Mitose, an intrazellulären Transportvorgängen und beim Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind. Dieser Antikörper regiert spezifisch auf das Beta-III-Tubulin, welches typisch ist für Neuronen, nicht aber für Gliazellen [26].

*Anti-Beta-Catenin* = geht eine Verbindung mit dem intrazellulären Beta-Catenin ein [27], welches ursprünglich mit dem Cadherin der Proteine, die für die Zelladhäsion verantwortlich sind [28, 29], in Verbindung gesetzt wurde. Im weiteren

Verlauf fand man eine Beteiligung des Beta-Catenins bei intrazellulären Signalt-ransduktionswegen, allen voran den Wnt-Signalweg [30].

*Anti-ChAT (Choline Acetyltransferase)* = ChAT ist bei der Produktion des Transmitters Acetylcholin in cholinergen Neuronen (und anderen nicht neuronalen Zellen [31, 32]) unmittelbar beteiligt [33]. Dieser Antikörper markiert cholinerge Neuronen im menschlichen Gehirn und im zentralen Nervensystem, und zwar am Zellkörper, den Dendriten und Axonen [34].

*Anti-EPOR (= EPO receptor)* = Antikörper, welcher den EPO-Rezeptor bindet und diesen letztlich sichtbar macht [35]. Erst durch die Interaktion des EPO mit diesem Rezeptor werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, welche dann z. B. die Erythropoese als Folge haben [36].

*Anti EPO* = Antikörper, welcher das intrakorporale EPO bindet und erkennbar macht [37].

*Anti-GFAP (= Glial fibrillary acidic protein)* = GFAP ist eines der Hauptintermediärfilamente von adulten Astrozyten [38]. GFAP wird prinzipiell als Marker zur Darstellung von Neuronen verwendet [39]. Der Antikörper bindet gegen das gliale Intermediärfilament Protein von Astrozyten und anderen Gliazellen. Es ist zusätzlich bei der Suche nach Tumoren im ZNS (Astrozytome, Gangliome, Medulloblastome etc.) [40, 41] einsetzbar.

*Anti-GLAST (= Glutamate transporter)* = GLAST ist einer der 5 spezifischen Glutamattransporter [42], wobei GLAST spezifisch an Gliazellen zu finden ist [43-46]. Der Antikörper bindet diesen Glutamattransporter und macht ihn sichtbar [47].

*Anti-GS (=Glutamine Synthetase)* = Das Enzym Glutaminsynthetase findet sich hauptsächlich in Astrozyten [48]. Hier hat es die Aufgabe, das für die Neuronen

toxische, durch die Astrozyten aufgenommene Glutamat zusammen mit Ammoniak in Glutamin umzuwandeln [49].

*Anti-GAPDH (=Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)* = GAPDH ist ein zelluläres Protein, welches auch als „Hausmeisterprotein“ der Zelle bezeichnet wird [50]. Beispiele für seine Beteiligung bei diversen Zellvorgängen sind: DNA-Reparatur [51], Membran Fusion und Transport [52, 53] und Zelltod [54-60]. Der Antikörper färbt das Protein.

*Anti-Leukemia-inhibitory factor (LIF)* = LIF ist ein pleiotropes Zytokin der Interleukin-6 Familie, welches auf die verschiedensten Zellen und deren Aktivität Einfluss hat [61]. So wird es bei In-vitro-Experimenten mit embryonalen Stammzellen oft verwendet, um die Pluripotenz der Zellen aufrechtzuerhalten [62, 63]. Zellen, die LIF produzieren, sind z. B. Neurone, Megakaryozyten, Makrophagen, Adipozyten, Hepatozyten, Osteoblasten und Myoblasten [64].

*Anti-human NeuN (neuronal nuclei-specific protein)* = NeuN ist ein Protein, das im Zellkern und Zytoplasma der meisten Neurone zu finden ist [65]. Der Antikörper färbt den Zellkern der meisten neuronalen Zellen [66].

*Anti-Nepriylisin* = Ein Enzym auf der Zelloberfläche, welches als Ektoenzym die Peptidhydrolyse auf der Zelloberfläche katalysiert [67]. Nepriylisin ist in der Lage, die Menge des neurotoxischen Beta-Amyloid z. B. bei Alzheimer drastisch zu reduzieren [68, 69].

*Anti-Wnt3a* = Wnt3a wird hauptsächlich von hippocampalen Stamm- und Progenitorzellen produziert. Es scheint nicht nur bei der postsynaptischen Differenzierung [70], sondern auch bei der Neurogenese im Hippocampus und in der subventrikulären Zone als ein intrinsischer Faktor eine große Rolle zu spielen [71].

### **3.1.2 Sekundärantikörper**

anti-Cy (Carbocyanine) 3- conjugated (goat anti-mouse)	Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK
anti-Cy3- conjugated (goat anti-rabbit)	Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK
anti-FITC ( Fluorescein isothiocyanate) - conjugated goat anti-rabbit IgG;	Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK
anti-FITC-conjugated goat antimouse IgG	Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK
AP (Alkaline-Phosphatase) – conjugated	
-goat anti-rabbit	Tropix, Bedford, MA, USA
-goat anti-mouse	Tropix, Bedford, MA, USA
- rabbit-anti-sheep	Tropix, Bedford, MA, USA
- rabbit anti-guinea pig	Tropix, Bedford, MA, USA

**Tabelle 2:** Verwendete Sekundärantikörper bei den Westernblot und Immunfluoreszenzanalysen

*Anti-Cy (Carbocyanine) 3- conjugated* = Sekundärantikörper. Cy3 färbt Oligonukleotide entweder am 5' oder am 3' Ende [72]. Wird als immunhistochemischer Marker zur Kontrolle verwendet.

*Anti-FITC (Fluorescein isothiocyanate)* = FITC geht als Sekundärantikörper mit vielen Proteinen eine Verbindung ein [73] und wird als immunhistochemischer Marker zur Kontrolle verwendet.

*AP (Alkaline-Phosphatase) – conjugated* = Sekundärantikörper, der sich in Leber, Plazenta, Niere und Knochen findet. Kaputtes oder krankes Gewebe setzt dieses Enzym frei, sodass die Blutkonzentration Auskunft z. B. über die Größe des Leberschadens geben kann [74].

### **3.1.3 Phycerythrin (PE) konjugierte Antikörper**

Anti-human-	
-CD14	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD29	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD34	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD43	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD44	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD45	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD59	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD73	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD90	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD105	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD106	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD117	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD133	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD146	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-CD166	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
-HLA Klasse I und II	BD Biosciences, Heidelberg, Germany

**Tabelle 3:** Auflistung der Phycerythrin (PE) konjugierten Antikörper

### **3.1.4 Molekularbiologische und biochemische Kits**

Alkalische Phosphatase Kit, Prozedur 85	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany
Amplex Red Acetylcholine/ Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217)	Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Apo-ONE <sup>®</sup> Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega, Mannheim, Germany
Beadlyte Mouse Multi-Cytokin	Upstate; Lake Placid, NY, USA

Beadmaster TM Kit	
CDP-Star	Tropix, Bedford, MA, USA
Cell-Differentiation-Kit (adipogenic and chondrogenic differentiation)	Lonza, Wuppertal, Germany
CellTiter-Glo <sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim, Germany
CytoTox 96 Non- Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Mannheim, Germany
Enzyme-linked immunosorbent assay (hAmyloid $\beta$ 42 ELISA)	The GENETICS Company, Zürich, Switzerland
Fix Perm Cell Permeabilization Kit	Invitrogen, Darmstadt, Germany
In-Situ-Cell-Death-Detection-Kit	Roche, Mannheim, Germany
Platinum-SYBR Green-qPCR Supermix	Invitrogen, Darmstadt, Germany
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
<b>PCR Primer</b>	
AMV-Reverse-Transkriptase	PEQ-Lab, Erlangen, Germany
Oligo (dT) Primer	Invitrogen, Darmstadt, Germany
Oligo (dT) 15 Primer	Promega, Mannheim, Germany
Superscript II	Invitrogen, Darmstadt, Germany
Random-Primer	Promega, Mannheim, Germany

**Tabelle 4:** Auflistung der molekularbiologischen und biochemischen Kits

### **3.1.5 Chemikalien**

ACh (Acetylcholin)	Sigma, München, Germany
Albumin 1 %;	Sigma, München, Germany
Alcian Blau 8GX 1 %	Serva, Heidelberg, Germany
$\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium)	BioWhittaker, Lonza, Wuppertal, Germany
$\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium)	PAA Cölbe, Germany
Amphotericin B,	Sigma, München, Germany
Ascorbic acid	Sigma, München, Germany
Atropine sulfate	Sigma, München, Germany
$\beta$ -Glycerolphosphate	Sigma, München, Germany
CDP-Star (Chemiluminescent Substrate )	Tropix Applied Biosystems Weiterstadt, Germany
CRD-Fzd7 (cystein rich domain of the frizzled 7 protein) (mouse)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany
Dexamethason	Sigma, München, Germany
DMEM suppl. (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom, Berlin, Germany
Desoxyribonucleotides	Lonza, Wuppertal, Germany
Erythropoetin (human recombinant)	Neorecormon , Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany
FCS (fetal calf serum)	Cambrex Bio Science, Wiesbaden, Germany
FCS 10 % (fetal calf serum)	Lonza, Wuppertal, Germany
Ficoll 5,7 %	Biotest AG, Dreieich, Germany
G-418-BC (Disulfate/aminoglycoside antibiotic)	Biochrom, Berlin, Germany
Hematoxylin	Sigma, München, Germany
HBSS (H 8264, Hanks-Balanced Salt Solution)	Sigma, München, Germany

Isobutylmethylxanthin	Sigma, München, Germany
Isopropanol 60 %	Bio Whittaker, Verviers, Belgium
Isopropanol 99 %	Sigma, München, Germany
Indomethacin	Sigma, München, Germany
Insulin	Sigma, München, Germany
Ultra glutamine 1	Lonza, Wuppertal, Germany
Ribonucleotides	Lonza, Wuppertal, Germany
Lymphoflot	Biotest AG, Dreieich, Germany
Na-Diatrizoat 9,1 %	Biotest AG, Dreieich, Germany
Methanol	MERCK, Darmstadt, Germany
Oil-red-O	Biotest, Dreieich AG, Germany
Oil-red-O powder	Sigma, Taufkirchen, Germany
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Tropix Applied Biosystems Weiterstadt, Germany
Penicillin	Lonza, Wuppertal, Germany
Penicillin	Sigma, Taufkirchen, Germany
Silicon paste " Baysilone"	BAYER, Leverkusen, BAYER, Leverkusen, Germany
Sodium hydrogen	Biotest, Dreieich AG, Germany
Streptomycin	Lonza, Wuppertal, Germany
Streptomycin sulfate	Sigma, Taufkirchen, Germany
Triton X 100, 0,1 %	Sigma, Taufkirchen, Germany
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma, Taufkirchen, Germany
Trypsin/EDTA	Lonza, Wuppertal, Germany
Vectashield mounting medium with DAPI	Vector Laboratories Burlingame, CA, USA

**Tabelle 5:** Auflistung der Chemikalien

### **3.1.6 Zusätzliches Material**

<b>Geräte</b>	
Axioskop	Carl Zeiss AG, Jena, Germany
Deckgläser	
- 18 x 18 mm	LANGENBRINK, Teningen, Germany
- 24 x 60 mm	LANGENBRINK, Teningen, Germany
Durchflußzytometer	BD, Heidelberg, Germany
Eismaschine	ZIEGERA, Germany
Fluoreszenzmikroskop BX 51	OLYMPUS, Hamburg, Germany
Fluoreszenzreader	GENios Plus, Tecan, Crailsheim Germany
FACScan	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Gefrierschrank Liebherr -25°C	LIEBHERR, Germany
Gefrierschrank -80°C	Forma Scientific, Dreieich, Germany
Kühlschrank 4°C	LIEBHERR, Germany
Kryoboxen -80°C fest	VETTER, Ravensburg, Germany
Luminex-100 System	Luminex Corporation, Austin, Texas, USA
Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I System	Roche, Mannheim, Germany
Lumineszenz-Detektor Wallac Multi- Label Counter 1420	International Equipment Trading USA
MX 3000P Messgerät	Stratagene, La Jolla, Ca, USA
Magnetrührer	MONOTHERM, USA
Neubauer – Kammer 0,1 mm Tiefe	Neubauer, Germany
Pipettenspitzen	
- 1000 µl	BRAND, Wertheim, Germany
- 200 µl	BRAND, Wertheim, Germany
- 10 µl	BRAND, Wertheim, Germany

Pipetten	
- 5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
- 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
- 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
pH-Meter 540 GLP	WTW, Weilheim, Germany
Reinraumwerkbank Lamin Air HLB 124	HERÄUS, Hanau, Germany
Schüttelwasserbad	JULABO, Seelbach, Germany
UV-Spektrometer Ultrospec 3100	AMERSHAM PHARMABIOTECH, United Kingdom
Vortex Mixer VM-300	NEOLAB, Heidelberg, Germany
Wasserbad 37°C	Eigenbau PCI Uni Tübingen, Germany
Wasserfiltrieranlage Simplicity 185	MILLIPORE, Schwalbach, Germany
96-well-plate'-Lesegerät	Sunrise, Tecan, Crailsheim, Germany
Zellinkubator TypB 5060 EC CO <sub>2</sub>	HERÄUS, Hanau, Germany
Zellinkubator C42; CO <sub>2</sub> & O <sub>2</sub> Steuerung	LABOTECT, Göttingen, Germany
Zellzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Germany
Zentrifuge für Eppendorffgefäße	Eppendorf, Hamburg, Germany
Zellkulturschalen	
- 10 cm ø, steril	NUNC, Langenselbold, Germany
- 6 cm ø, steril	NUNC, Langenselbold, Germany
- 6 cm ø, steril	BD Falcon, Heidelberg, Germany
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Corning Inc. Schiphol-Rijk, the Netherlands

**Tabelle 6:** Auflistung der zusätzlichen Materialien

### **3.2 Methoden**

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Tübingen genehmigt. Die Untersuchungen an menschlichem Knochenmark wurde durch den Ethikausschuss der Universität Tübingen genehmigt.

#### **3.2.1 Präparation des Knochenmarks**

Unter sterilen Bedingungen wurde das Knochenmark von 5 gesunden menschlichen Spendern, bestehend aus 2 weiblichen und 3 männlichen, entnommen.

Das Alter der Spender lag zwischen 16 und 74 Jahren.

Die Entnahme geschah nach Einwilligung der Patienten bei orthopädischen Operationen.

Von jedem Donor wurden 5 ml Marksubstanz mit einer sterilen heparinisierten Injektionsspritze aspiriert. Aus jeder Spenderprobe wurden die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) isoliert, charakterisiert und jeweils als einzelne MSC Population in der Studie untersucht.

Die Darstellung der Ergebnisse wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt.

#### **3.2.2 Die Isolierung von hMSC und ihre Zellkultur**

Zur Isolierung der hMSC aus dem Knochenmarksmaterial, wurde die Dichte-Gradienten-Technik, nach Colter et al. [75], angewendet:

Knochenmark (5 ml) wurde in 10 ml phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS; Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) resuspendiert und auf 15 ml Lymphoflot (Na-Diatrizoat 9,1 % (w/v), Ficoll 5,7 % (w/v); Biotest AG, Dreieich, Deutschland) aufgebracht.

Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation (1000 g). Nach Ernte der mononuklearen Zellen folgte eine zweimalige Reinigung mit PBS. In einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurden die Zellen angesät.

Die einzelnen Kulturen wurden daraufhin bei 37°C, mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem Anteil von 5 % an CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium  $\alpha$ -MEM beinhaltete Desoxyribonukleotide, Ribonukleotide, Ultra Glutamin 1, 100 I.U./ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin sowie 10 % FCS. Nach 24 Stunden wurden die nicht adhärenen Zellen entfernt.

Die adhärenen Zellen wurden für weitere Versuche kultiviert und charakterisiert.

### **3.2.3 Feststellung der Eigenschaften von hMSC anhand der Differenzierungsfähigkeiten in vitro und durch FACS Analyse**

Anhand von In-vitro-Differenzierung-Assays wurden MSC in ihren verschiedene Charaktereigenschaften und deren Funktionen unterschieden [76]. Es konnte die grundsätzliche Differenzierung in 3 verschiedene mesenchymale Differenzierungsrichtungen erfasst werden: adipogene, osteogene und chondrogene.

Dazu wurden die jeweiligen MSC 21 Tage lang entweder mit adipogenem, osteogenem oder normalem (Kontroll-)Medium kultiviert [77].

#### a) Adipogene Differenzierung

Um eine adipogene Differenzierung zu erreichen, wurde ein handelsübliches Differenzierungs-Kit verwendet. Dazu wurden in Kulturflaschen 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> angesiedelt und unter Zugabe des normalen Mediums kultiviert.

Nachdem eine Subkonfluenz erreicht worden war, wurde das vorhandene Medium gegen adipogenes und Kontrollmedium ausgetauscht.

Das adipogene Medium beinhaltete hierbei DMEM und 20 % FCS, mit 1,0  $\mu$ M Dexamethason, 0,5 mM Isobutylmethylxanthin, 0,2 mM Indomethacin und 0,01 mg/ml Insulin. Die Zellen wurden für weitere 3 Wochen kultiviert. Um die intra-

zelluläre Anhäufung von Fett und die In-vitro-Adipogenese in den Zellen sichtbar zu machen, wurden nach 21 Tagen die Zellkulturen mit ‚Oil-red-O‘ markiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und in 2 ml 10 % Formalin 30 Minuten lang inkubiert.

Nach der Entfernung des Formalins, wurden die Zellen mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und 2 ml 60 % Isopropanol für 2 Minuten zugegeben.

Das Isopropanol wurde ausgewaschen und 2 ml einer filtrierten Lösung von ‚Oil-red-O‘, bestehend aus ‚Oil-red-O‘ Stammlösung (300 mg ‚Oil-red-O‘ Puder und 100 ml 99 % Isopropanol) und entionisiertem Wasser auf die Zellen gegeben. Dieser Ansatz wurde 5 Minuten inkubiert.

Die Zellkulturen wurden danach mit Leitungswasser gespült und mit 2 ml Hämatoxylin gefärbt.

### b) Osteogene Differenzierung

Das osteogene Medium beinhaltete normales Medium mit 10<sup>-8</sup>M Dexamethason, 0,2 mM Ascorbinsäure und 10 mM β-Glycerolphosphat.

Die Zellen wurden nach dem Erreichen einer Subkonfluenz jeweils für 3 Wochen in osteogenem oder Kontrollmedium kultiviert.

Sowohl die osteogen differenzierten Zellen als auch die undifferenzierten Kontrollkulturen wurden zytochemisch auf Alkalische Phosphatase wie folgt gefärbt:

Nach Entfernung des Mediums wurden die Kulturen zweimalig mit PBS gewaschen und 2 ml Zitrat Fixativ (12,5 ml Zitrat-Lösung, 32,5 ml Aceton und 4 ml 37 % Formaldehyd) wurden für 1 Minute hinzugegeben. Es folgte eine 30-minütige Phase bei der die Kulturen mit 2 ml alkalischer Färbelösung (0,5 ml Natrium Nitrit, 0,5 ml alkalische Lösung, 22,5 ml entionisiertes Wasser und 0,5 ml Naphthol AS-BI Alkaline-Lösung) inkubiert wurden.

Die Zellkulturen wurden danach zweimalig gewaschen und mit 2 ml Hämatoxylin gegengefärbt.

c) Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung konnte unter Verwendung eines handelsüblichen Differenzierung Kits erreicht werden.

Die  $25 \times 10^4$  Zellen wurden in einem 15 ml Röhrchen aufgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 200 g wurden 1 ml Alpha-MEM und 0,5 ml chondrogenes Medium hinzugegeben. Diese Mischung wurde alle 3–4 Tage erneuert. Die Zellsuspensionen wurden in den Röhrchen inkubiert, wo sie ein Pellet ausbildeten.

Nach 14 Tagen wurde dieses herausgenommen, auf eine Glasplatte gequetscht und mit 1%igem Alcian Blau 8GX in 3 % Essigsäure (pH 2,5) gefärbt.

d) FACS-Analyse

Die durchflusszytometrische (FACS) Analyse wurde mittels FACScan und der BD CellQuest Pro Software (Erfahrungswert seit ca. 2 Jahren) durchgeführt. Nachdem die Zellen subkonfluent ( $1 \times 10^6$  Zellen) waren, wurden sie mit Trypsin/EDTA von den Kulturflaschen abgelöst und mit PBS gewaschen.

Jede Probe beinhaltete eine Zellsuspension mit  $5 \times 10^5$  Zellen in FACS-Puffer (PBS + 1 % Albumin aus Rinderserum + 0,1 % FCS). Die PE konjugierten Antikörper (Anti-human-CD14, -CD29, -CD34, -CD43, -CD44, -CD45, -CD59, -CD73, -CD90, -CD105, -CD106, -CD117, -CD133, -CD146, -CD166, HLA Klasse I, HLA Klasse II) wurden hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten und zweimaligem Waschen zeigten die hMSC folgende Eigenschaften an den Epitopen der Zelloberfläche:

Sie verhielten sich positiv gegenüber: CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD146, CD166 und HLA Klasse I.

Negativ zeigten sie sich gegenüber: CD14, CD34, CD43, CD45, CD133 und HLA Klasse II.

### **3.2.4 Die Inkubation der Zellen unter Hypoxie, Glutamat, EPO und CRD Fzd7**

Um die neurogene Differenzierung der hMSC zu untersuchen, wurden die Zellen mit DMEM, versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 100 mM Pyruvat, kultiviert. Die Kulturen wurden unter normoxischen Bedingungen in einem Inkubator mit 90 % Sauerstoff und einer 10 % CO<sub>2</sub> Anreicherung bei 37°C in luftfeuchter Atmosphäre kultiviert.

Nach dem Erreichen der für die Versuche benötigten Zellzahl in der dritten Passage wurden die hMSC für darauffolgende immunzytochemische Untersuchungen qPCRs, Western Blots, Messung der GS und LDH Aktivität, sowie Untersuchungen zu Ach- und Abeta<sub>1-42</sub>-Vorkommen, angesät.

Vor Beginn dieser Untersuchungen wurde das Kulturmedium gegen DMEM, jeweils mit oder ohne 5 U/ml rekombinantem Erythropoetin  $\beta$  und/oder Glutamat (1 mM), ersetzt. Zur Untersuchung des Wnt-Signalweges und seiner Blockade wurde das CRD-Fzd7 Fusionsprotein von Mäusen verwendet. Das Fzd7 von Mäusen zeigt eine 99%ige Homologie zum menschlichen CRD.

Nach einer einstündigen Vorinkubation mit CRD Fzd7 (500 ng/ml), wurde das mit Glu und EPO versetzte Medium zugegeben und für weitere 48 Stunden inkubiert.

Um den Effekt der Zusätze des Mediums unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen zu untersuchen, wurde ein Teil der Kulturen bei 10 % CO<sub>2</sub> (unter normoxischen Bedingungen) und der andere Teil bei 10 % CO<sub>2</sub>, 1 % O<sub>2</sub> und 89 % N<sub>2</sub> (Hypoxie) jeweils für 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

### **3.2.5 Erfassung der Zytotoxizität mittels LDH-Aktivität**

Um die Überlebensfähigkeit der MSC und die schädlichen Effekte von Hypoxie und/oder Glu auf die Zellen zu erfassen, wurden die MSC auf 96-Well-Mikrotiterplatten angezüchtet. Die LDH Konzentration des Zellkulturüberstandes wurde mittels des ‚CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity‘- Assays erfasst:

50 µl des Zellkulturüberstandes, jeder Probe wurde auf eine separate Well aufgebracht, mit 50 µl Substrat Mix vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die enzymatische Spaltung von Tetrazoliumsalz in ein rotes Formazan-Produkt wurde durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung angehalten. Die Absorption wurde bei 490 nm mittels eines ‚96-well-plate‘-Lesegeräts erfasst.

Eine Quantifizierung fand durch den Einsatz einer Standardkurve von LDH-Aktivitäten zwischen 0 und 800 U/ml in DMEM statt. Zur Normierung der Ergebnisse, verwendete man den Absorptionswert einer Kontrollkultur.

### **3.2.6 Quantifizierung von ACh im Zellkulturüberstand der hMSC**

Die hMSC wurden zusammen mit Cholin-freiem HBSS, versetzt mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 100 mM Pyruvat, auf 96-Well-Mikrotiterplatten kultiviert. Der Zellüberstand (100 µl) wurde entnommen und nach den Angaben des Herstellers mit dem ‚Amplex Red Acetylcholin/Acetylcholinesterase Assay Kit‘ gemessen. In einem ersten Reaktionsschritt wandelt Acetylcholinesterase ACh in Cholin um, dieses wird daraufhin durch eine Cholinoxidase zu Betain und Wasserstoffperoxid oxidiert.  $H_2O_2$  reagiert mit der ‚Amplex Red‘-Lösung 1:1. Das Reaktionsprodukt ist der fluoreszierende Stoff Resorufin. Die Fluoreszenz wurde mittels eines Fluoreszenzreaders erfasst. Nach 1 Stunde Inkubation mit Amplex red und Reaktionslösung wurden bei 550 nm Excitation und bei 595 nm Emission erfasst. Eine Standardkurve wurde im Bereich von 1–100 nM erstellt und parallel zu den Proben analysiert. Das Datenmaterial wurde von störenden Hintergrundeffloreszenzen durch Subtraktion der Ergebnisse von Ach-freien Proben korrigiert.

### **3.2.7 Multiplex Analyse der Zytokin Freisetzung von Kokulturen aus murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC) mit PC12-Zellen aus Ratten**

APPsw-PC12 Zellen sind durch eine Mutation im Amyloidvorläuferprotein (APPsw) vermehrt in der Lage Abeta zu produzieren [78]. Durch eine Kokultivierung z. B. mit mMSC werden demnach Alzheimer-ähnliche Umgebungsbedingungen geschaffen.

Vor einer Kokultivierung wurden die APPsw-PC12 (PC12SWQ8) Zellen von Ratten in DMEM, versetzt mit 10 % FCS, 5 % Pferdeserum, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 100 mM Pyruvat und G-418-BC, angezüchtet.

Die aus dem Knochenmark von 3 weiblichen Mäusen (Alter: 6 Wochen) gewonnenen mesenchymalen Stammzellen wurden in einem Medium aus Alpha MEM, versetzt mit 10 % FCS und Antibiotika/Antimykotika (100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycinsulfat, 0,25 mg/ml Amphotericin B) kultiviert. Die multipotenten Fähigkeiten der mMSC wurden jeweils durch eine adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierungsfähigkeit erfasst.

Die APPsw-PC12 Zellen wurden in Petrischalen à 6 cm ( $2 \times 10^6$  Zellen/Platte) ausgesät und 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden  $3 \times 10^5$  Zellen, der mMSC, zu den APPsw-PC12 –Kulturen zugegeben.

Die Monokulturen der mMSC- und APPsw-PC12-Zellen sowie ihre Kokulturen wurden jeweils mit oder ohne Zugabe von EPO (5 U/ml) unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen für 48 Stunden inkubiert.

Nach diesem Zeitraum wurde der Zellüberstand bei 350 g für 8 Minuten und bei 4°C zentrifugiert und bei -80°C eingefroren.

Die Mehrfachanalyse der Zytokine wurde, wie schon in vorhergehenden Veröffentlichungen beschrieben, durchgeführt [79]:

50 ml Medium, wurden aus jeder Kulturschale entnommen, um diese auf das Vorhandensein von Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), GM-CSF, Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF $\alpha$ ) zu untersuchen.

Die Quantifizierung dieser Zytokine wurde gemäß den Herstellerangaben, mittels ‚Beadlyte Mouse Multi-Cytokin Beadmaster TM Kit‘ und einem ‚Luminex-100 System‘ gewährleistet. Die Zytokinkonzentration der Überstände in den Zellkulturen wurden über eine logistische (10-Parameter)-Regression aus ihrer jeweiligen Standardnormalverteilung abgeleitet.

### **3.2.8 Quantifizierung des Abeta<sub>1-42</sub> im Kulturüberstand der mMSC und APPsw-PC12 Zellkulturen**

Es wurden 50  $\mu$ l desselben Zellkulturüberstandes, aus welchem auch die Bestimmung der Zytokine stattfand, entnommen. Mit einem hochsensitiven ‚enzyme-linked immunosorbent assay‘ wurde dieser gemäß den Angaben des Herstellers (The GENETICS Company, Zürich) analysiert.

### **3.2.9 Immunzytochemische Analyse**

Für die immunzytochemische Untersuchungen, wurden hMSC ( $2,5 \times 10^5$ ) auf Deckgläsern, in Petrischalen für 21 Tage unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gezüchtet und verwendet.

Nach Fixation mit -20°C kaltem Methanol wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Primärantikörpern (verdünnt in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primärantikörper wurden folgendermaßen verdünnt:

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Herstellernachweise</b>
EPOR	1:50	rabbit polyclonal	Santa Cruz, California, USA

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Herstellernachweise</b>
GFAP	1:10	mouse monoclonal	Progen, Heidelberg, Germany
Beta III Tubulin (TUJ1)	1:250	mouse monoclonal	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Germany
GLAST	1:100	rabbit polyclonal	Cambridge, UK
EPO	1:75	mouse monoclonal	AbD Serotec, Oxford, UK
Synaptophysin	1:50	rabbit polyclonal	US Biological, Swampscott, MA, USA
GS	1:100	rabbit polyclonal	Sigma, Taufkirchen, Germany
anti-human neuronal nuclei-specific protein (NeuN)	1:25	mouse monoclonal	Chemicon International, Nürnberg, Germany

**Tabelle 7:** Verdünnung der Primärantikörper in PBS zur immunzytochemischen Untersuchung

Die Zellen wurden zweimalig mit PBS gewaschen und mit den Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur für eine Stunde im Dunkeln inkubiert:

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Herstellernachweise</b>
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-conjugated	1:100	goat anti-rabbit IgG	Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK)
-"	1:100	goat anti- mouse IgG	-"
Cy3- conjugated	1:800	goat anti- mouse IgG	-"
-"	1:800	anti-rabbit IgG	-"

**Tabelle 8:** Verdünnung der Sekundärantikörper in PBS zur immunzytochemischen Untersuchung

Nachdem sie zweimalig mit PBS-Triton (0,1 % Triton X-100) gewaschen wurden, bedeckte man die Proben mit ‚Vectashield mounting medium‘, welches 4'6-Diamidono-2-Phenylindol (DAPI) enthält. Die Proben wurden daraufhin mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

### **3.2.10 Western Blot Analyse**

Western Blots wurden aus den Lysaten von  $2,5 \times 10^5$  Zellen durchgeführt. Um die Proteinkonzentrationen zu bestimmen, wurde der Bradford Assay benutzt [80]. Für jede Bahn wurden 50 µg Proteine dem SDS-PAGE unterworfen und in einem 12,5%igen Gel durch Tank-Blotter auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen aufgebracht.

Die Membranen wurden in einem 0,66 % (v/w) I-Block mit PBS für 1,5 Stunden verriegelt und über Nacht mit den folgenden Antikörpern bei 4°C im I-Block inkubiert

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Herstellernachweise</b>
ChAT	1:1000	Biozol, Eching, Deutschland
Synaptophysin	1:100	US Biological, MA, USA
Wnt3a rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany
Leukämie-inhibierender-Faktor (LIF)	1:200	Santa Cruz Biotechnology
EPOR	1:300	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
Neprilysin	1:1000	R&D Systems USA
GLAST	1:5000	Chemicon International, Nürnberg, Germany
Beta-Catenin	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
GFAP mouse	1:1000	Progen, Heidelberg, Germany
GAPDH	1:1000	Chemicon, Temecula, CA

**Tabelle 9:** Verwendete Antikörper beim Western Blot

Um die Bindung von Primärantikörpern (siehe Tabelle 9) sichtbar zu machen, wurden die Membranen für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Alkalischer-Phosphatase konjugiertem ‚goat anti-rabbit‘-, ‚anti-mouse‘- oder ‚rabbit-anti-sheep‘- sowie ‚anti-guinea pig‘-Sekundärantikörpern inkubiert. Diese wurden 1:10 000 in PBS zusammen verdünnt. Danach wurden sie als Chemolumineszenz-Substrat für 1 Stunde im Dunkeln CDP-Star ausgesetzt. Die Signalintensitäten wurden mit einem CCD-Kamerasystem aufgenommen. Sub-saturierte Bilder wurden semi-quantitativ mittels Densitometrie und unter Verwendung der TINA Software (Version 2,09 g, Raytest, Straubenhardt, Germany) ausgewertet. Die Daten wurden anhand der densitometrischen Werte der normoxischen Kontrollgruppen normiert und in Prozentzahlen ausgedrückt.

### **3.2.11 Glutamin Synthetase (GS) Aktivität**

Die Zellen (ca.  $3 \times 10^4$  pro Kulturschale) wurden einmalig mit dem (eiskalten) PBS gewaschen und durch Zugabe von 125 ml 50 mM Imidazol/HCl- Puffer (pH 7,2) lysiert.

Nach einem Frier-Tau-Zyklus bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurden für die Proteinbestimmung, 25  $\mu\text{l}$  der Lysate auf einzelne 96-er Mikrotiterplatten aufgetragen.

Die übrigen 100  $\mu\text{l}$  der Lysate, wurden für den Assay zur Bestimmung der Aktivität der Glutamin Synthetase (GS) verwendet.

Die GS Aktivität wurde indirekt über die Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase Aktivität bestimmt, und zwar im Anschluss an die Bildung eines Komplexes zwischen den Reaktionsprodukten G-Mono-Hydroxamat und Eisenchlorid.

Unter Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  der Reaktionsmischung (50 mM Imidazol/HCl Puffer pH 7,2, 2 mM  $\text{MnCl}_2$ , 25 mM Natriumarsenat, 0,16 mM ADP, 50 mM L-Glutamin und 25 mM  $\text{NH}_2\text{OH-HCl}$ ) wurde die Reaktion gestartet und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 2 Stunden inkubiert.

Durch Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Stopp-Lösung (0,37 M  $\text{FeCl}_3$ , 0,67 M HCl und 0,2 M Trichlor Essigsäure) beendete man die Reaktion.

Die ausgefällten Proteine wurden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 15 000 g (4°C) entfernt und die Absorption des Überstandes wurde bei 540 nm gemessen. Es wurden 10 Standardreihen von G-Mono-Hydroxamat gelöst in Lysepuffern im Bereich zwischen 0 und 5 µmol erstellt. Alle wurden gleichwertig behandelt.

Die Aktivität der GS wurde bestimmt basierend auf einem Standardwert von 1 U, als eine Anzahl von Enzymen die benötigt werden, um 1 mmol  $\gamma$ -Mono-Hydroxamat pro Minute zu produzieren. Die erhaltenen Daten, angegeben in U/mg Protein/min, wurden anhand den normoxischen und hypoxischen Kontrollgruppen sowie der An-oder Abwesenheit von 1 mM Glu normiert.

### **3.2.12 Aufbereitung der cDNA und ihre Quantifizierung mittels (Real time)-PCR**

Die RNA der hMSC wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits gewonnen. Abgesehen von der Bestimmung der mRNA des Beta-Tubulin-III, wurde die reverse Transkription der kompletten RNA mit Hilfe des Superscript II und Oligo (dT) Primern durchgeführt. Die gesamte RNA (360 ng) wurde in einer 20 ml-Reaktion rückwärts transkribiert. 1 ml dieses Reaktionsgemisches wurde genutzt um eine quantitative Real-time PCR (qPCR) durchzuführen. Für diesen Zweck benutzte man den Platinum-SYBR Green-qPCR Supermix (Invitrogen), 0,6 mM ‚Forward-‘ (sense, s) und ‚Reverse-‘ (antisense, as) Primer, sowie 100 nM 6-carboxy-X-Rhodamin (ROX).

Oligonukleotide Primer für die jeweils unterschiedlichen Gene wurden mittels der ‚Primer3 Software‘, hergestellt.

Folgende Primer wurden verwendet:

<b>gene</b>	<b>direction</b>	<b>5' – 3' sequence</b>
M1R	S	TGCTGACCTCATCATCGGTA
	As	CGGAGAAGTAGCGGTCAAAGC
	s*	TCCAATTATGGCTGGGAAAG
M2R	S	GGCCATTCCAAAGATGAGAA
	As	ACAATCTTGCGGGCTACAATATT
	s*	GGCTCTGGTACTTGCAGCTC
M3R	S	GCCTGTGCCGATCTGATTAT
	As	GGCCTCGTGATGGAAAAGTA
	s*	AGAAATGAGAAAAATGTGGGAAAA
β <sub>2</sub> Microglobulin	S	TTTCATCCATCCGACATTGA
	As	CCTCCATGATGCTGCTTACA
NGF	S	TCCGGACCCAATAACAGTTT
	As	CAGTGTCAAGGGAATGCTGA

Eigens für muskarinerge Rezeptoren wählte man Primer, die innerhalb des Exons lagen, damit die Quantifizierung aller Transkriptionen auf jeden Fall gewährleistet werden konnten (muskarinerge Rezeptoren zeigen unterschiedliche Spaltvariationen am 5'UTR Ende).

Um der genomischen Verunreinigung durch die Präparation entgegenzuwirken, wurden 3 zusätzliche ‚Sense-Primer‘ verwendet. Diese waren kompatibel mit den Introns der muskarinergen Rezeptorgenen (durch einen Stern gekennzeichnet). Sie wurden zusammen mit den zugehörigen ‚Antisense-Primern‘ bei der PCR verwendet.

Zur Vervielfältigung der Beta-II Mikroglobuline und nerve growth factor (NGF)-Transkripte, verwendete man dem Intron angrenzende Primer.

Die PCR wurde an einem MX 3000P Messgerät durchgeführt.

Folgendes Protokoll wurde dazu verwendet:

- a) 2 Minuten 50°C
- b) 2 Minuten 95°C
- c) 50 Zyklen über 15 Sekunden bei 95°C
- d) Sowie über 30 Sekunden bei 60°C

$C_T$ -Werte wurden innerhalb der exponentiellen Phase der PCR gesetzt und eine Normalisierung auf Beta-II Mikroglobulin wurde für jede Probe durchgeführt, um Delta  $C_T$  Werte zu erhalten. Eine Schmelzkurve des Produkts wurde aufgenommen, um die Singularität des Amplifikats zu bestätigen. Die korrekte Länge des Produkts wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

Die vollständig entnommene RNA sowie die qPCR-Reaktion wurden auf genomische Verunreinigungen getestet (zusätzliche Primer, die sich an die Intronregionen anlagerten). Die Ergebnisse zeigten keine signifikante genomische Kontamination jeglicher RNA-Präparate.

### **3.2.13 Bestimmung der mRNA von Beta-Tubulin-III bei hMSC**

500 ng der gesamten RNA wurden mit der ‚AMV-Reversen-Transkriptase, ‚Random-Primern‘ und ‚Oligo‘ (dT) 15 Primer für die Bestimmung der mRNA durch quantitative PCR verwendet. Mit dem ‚Light Cyclers Fast Start DNA Master SYBR Green I System‘ wurde die real time PCR in einem ‚Light Cyclers 2.0‘ durchgeführt. Über 45 Zyklen wurde die PCR mit 2 ml des reversen Transkriptase Produkts zusammen mit 10 ml PCR Mix, durchgeführt. Nach einer 10-minütigen Phase der Polymerase-Aktivierung bei 95°C folgten 45 PCR-Zyklen (Denaturierung bei 95°C für 5s, Anlagerung bei 63°C für 10 s und Verlängerung bei 72°C für 9 s). Eine Schmelzkurvenanalyse wurde zum Nachweis eines einheitlichen PCR-Produktes durchgeführt.

Folgende Primer wurden für die  $\beta$ -Tubulin-III mRNA Analyse verwendet:

5'-CCA TTC TGG TGG ACC TGG AGC CTG GAA-3' (sense)

5'-GCT GGA AGC CCT GCA GGC AGT CAC AAT-3' (antisense)

Datenpunkte werden dargestellt als relative Expressionsraten, bezogen auf den Mittelwert der normoxischen Kontrollgruppen.

### **3.2.14 Messung von intrazellulärem Calcium**

Die Funktion von Acetylcholinrezeptoren bei MSC wurde durch eine bildhafte Darstellung von Calcium untersucht. Bei der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung wurde ein ‚Axioskop‘ der Firma Zeiss verwendet. Dieses fand sich ausgestattet mit einem ‚Imaging‘-System von Visitron Systems sowie der ‚Metafluor 6.2 Imaging Software‘.

hMSC der hypoxischen Kontrollgruppen (48 stündige Inkubation, unter hypoxischen Bedingungen) sowie die für 48 Stunden mit EPO (5 U/ml) behandelten Kulturen, wurden mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivem fluoreszierenden Farbstoff Fura-2 bestückt. In einer Lösung mit 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM

MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 30 mM Glukose, 2 mM Fura-2 Acetoxymethylester und 0,04 % Pluronic, wurden die Ansätze für 20–30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Fluoreszente Signale wurden vor und nach Gabe von Acetylcholin (Sigma, Germany) gemessen, wobei die höchste Acetylcholinkonzentration der Lösungen bei 10 mM lag. In Kontrollexperimenten wurde der muskarinerge ACh Antagonist Atropinsulfat in einer Konzentration von 500 nM verwendet.

### **3.2.15 Statistische Analysen**

Alle Ergebnisse zu hMSC, die für diese Untersuchungen aus den 5 verschiedenen Spendern gewonnen worden waren, wurden mittels eines ‚Student-t-Tests‘ für Einzelvgl. ausgewertet. Um einen Mehrfachvergleich darzustellen, wurde mit einer Varianzanalyse der ‚Bonferroni’s Test‘ angewendet.

Die Untersuchungen wurden einzeln, mit einer Wiederholung von 3–6 Durchgängen pro Probe und Umgebungsbedingungen, an den unterschiedlichen Spendermaterialien durchgeführt. Die gesamten Ergebnisse wurden dann statistischen Analysen zugeführt.

In den Diagrammen sind die einzelnen Untersuchungsergebnisse eines jeden Versuchsansatzes zusammengefasst.

Eines der mindestens 3 verschiedenen Experimente zu Western Blots wurde als repräsentativ für die gesamte Versuchsreihe bestimmt und findet sich zusammen mit den zugehörigen densitrometrischen Ergebnissen und den immunfluoreszenten Abbildungen.

Das Datenmaterial wird, als Mittelwert ± SEM dargestellt, p<0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Die Differenzierungsfähigkeit von hMSC**

#### **4.1.1 Adipogene Differenzierung**

Nachdem die Zellen 21 Tage mit adipogenem Medium kultiviert wurden, färbte man diese mit ‚Oil red O‘. Eine adipogene Differenzierung wurde anhand der Bildung von Fettvakuolen erkennbar. (Abb. 1, Reihe a, wobei die roten Tropfen Fettvakuolen darstellen).

#### **4.1.2 Osteogene Differenzierung**

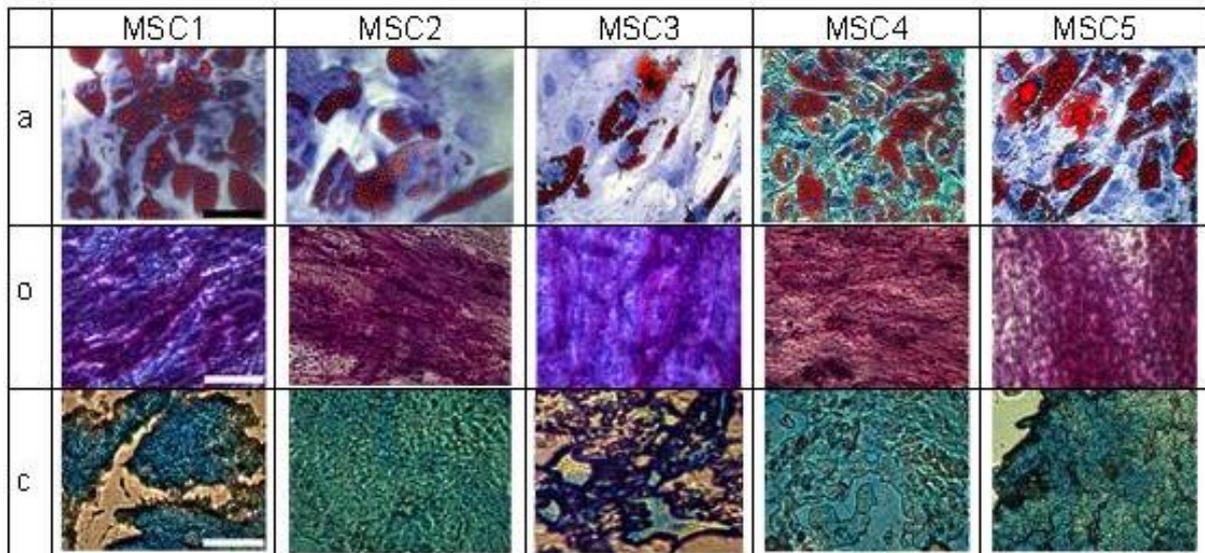
Nach 21-tägiger Kultivierung mit osteogenem Medium und Färbung auf Alkalische Phosphatase konnte bei den Zellen eine osteogene Differenzierung (Abb. 1, Reihe o) festgestellt werden.

#### **4.1.3 Chondrogene Differenzierung**

Eine nur 14-tägige Behandlung mittels chondrogenem Medium erbrachte chondrozytäre Pellets, wobei die Alzianblau-Färbung die Mucopolysaccharide von blau zu blau-grün veränderte (Abb. 1, Reihe c).

Mittels FACS-Analyse zeigten die MSC folgende Oberflächenmarker:

- a) sie waren negativ für CD14, CD34, CD43, CD45, CD133, und HLA Klasse II;
- b) sie waren positiv für CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD146, CD166 und HLA Klasse I.



**Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme adulter hMSC, von 5 verschiedenen Spendern**

**a) adipogene Differenzierung**, Tag 21.

Färbung ‚Oil-red-O‘ und Hämatoxylin Gegenfärbung (Skala: 100 µm). Rote Punkte entsprechen Fettvakuolen.

**o) osteogene Differenzierung** Tag 21.

Färbung mit Alkalischer Phosphatase und Hämatoxylin Gegenfärbung (Skala: 50 µm). Positive Zellen zeigen sich pink bis violett.

**c) chondrogene Differenzierung** Tag 14

Mukopolysaccharide zeigen sich blau bis blaugrün (Skala: 50 µm).

(Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group),

## **4.2 Komposition von Antigenen bei hMSC unter dem Einfluss von EPO und Hypoxie**

Bei allen immunzytochemischen Analysen wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt.

#### **4.2.1 EPO-Wirkung auf die Expression des EPO-Rezeptors (EPOR)**

##### **a) bei normoxischen Umgebungsbedingungen**

Unter normoxischen Bedingungen wurde EPOR nur sehr schwach (Abb. 2a, grün dargestellt) exprimiert. Auch eine Zugabe von EPO veränderte diese schwache Ausprägung nicht (Abb. 2b, grün dargestellt). Unter diesen Bedingungen konnte jedoch die Entstehung Neuronen-ähnlicher Zellen festgestellt werden (Abb. 2b, Pfeil).

##### **b) bei hypoxischen Umgebungsbedingungen**

Die Entwicklung von EPOR wurde entscheidend durch hypoxische Verhältnisse verstärkt (Abb. 2c grün dargestellt). Auch hier führte die Applikation von EPO unter Hypoxie zu einer vermehrten Bildung der neuronartigen Zellen, die sich zu so genannten „Cluster“ zusammenschlossen (Abb. 2d, zentraler Cluster). Diese „Cluster“ wiesen eine erhöhte Dichte des EPOR auf (Abb. 2d, grün dargestellt).

#### **4.2.2 Die Wirkung von EPO auf die Expression von Beta Tubulin III**

##### **a) bei normoxischen Umgebungsbedingungen**

Unter normoxischen Bedingungen zeigte sich die Mehrheit der Zellen in der Lage, Beta-Tubulin III zu exprimieren (Abb. 2a + b, rot dargestellt; Abb. 2e + f, grün dargestellt).

##### **b) bei hypoxischen Umgebungsbedingungen**

Unter hypoxischen Bedingungen wiesen vor allem die auf EPOR positiven Zellen eine Expression von Beta-Tubulin III auf (Abb. 2c, Pfeil für EPOR, rot für Beta-Tubulin III; Abb. 2g, grün dargestellt).

Nach Gabe von EPO zeigten sich die „Cluster“ nicht nur vermehrt positiv auf EPOR, sondern auch auf Beta-Tubulin III (Abb. 2d, rot dargestellt; Abb. 2h, grün dargestellt).

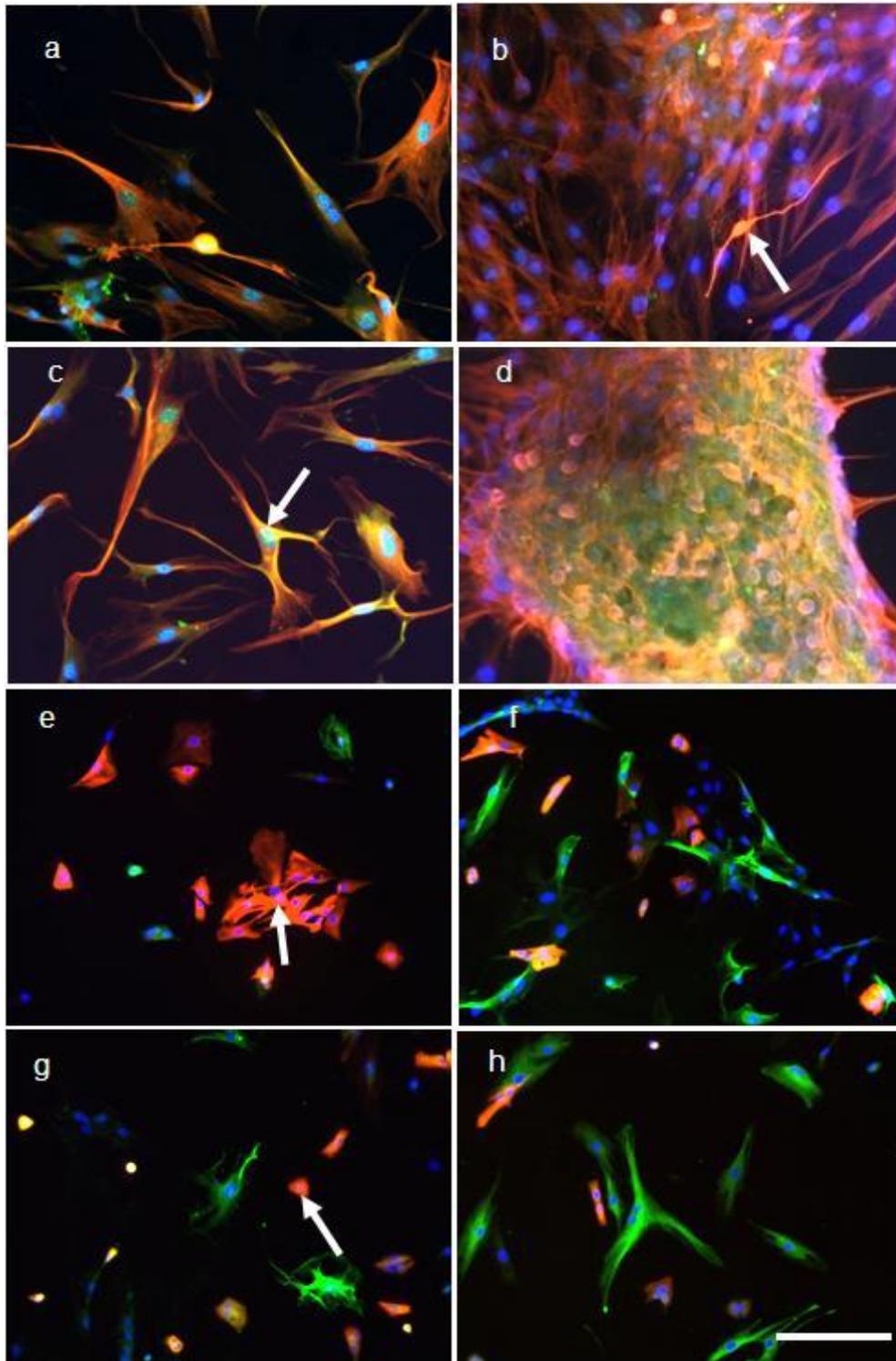
#### **4.2.3 Die Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP) unter EPO Einwirkung**

##### a) bei normoxischen Bedingungen

Nur eine sehr geringe Anzahl der hMSC exprimierte GFAP unter normoxischen Bedingungen (Abb. 2e, rot dargestellt). Auch unter Zugabe von EPO änderte sich dieser Zustand nicht (vgl. Abb. 2f mit Abb. 2e, rot dargestellt). Unter normoxischen Bedingungen zeigte sich ein polygonales Zellbild (Abb. 2e, Pfeil).

##### b) bei hypoxischen Bedingungen

Die hypoxischen Zellkulturen exprimierten GFAP vergleichbar zu den normoxischen Kulturen (vgl. Abb. 2g mit Abb. 2e + f jeweils rot). Eine Zugabe von EPO reduzierte die Anzahl der GFAP-positiven Zellen deutlich (vgl. Abb. 2h mit Abb. 2g, rot). Das Aussehen der GFAP positiven Zellen unter Hypoxie veränderte sich im Vergleich zur normoxischen Kulturen. Es zeigte sich ein rundes, undifferenziertes Zellbild (vgl. Abb. 2g Pfeil mit Abb. 2e Pfeil).



**Abb. 2: Expression von EPOR, Beta-Tubulin-III und GFAP unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen** EPOR (grün in a-d), Beta-Tubulin-III (rot in a-d, grün in e-h), GFAP (rot in e-h), Zellkerne gefärbt mit DAPI (blau) (Skala 100µm) a und e) Normoxie; b und f) Normoxie mit EPO-Gabe; c und g) Hypoxie; d und h) Hypoxie mit EPO-Gabe (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

#### **4.2.4 Die Wirkung von EPO auf die GS-Expression**

##### **a) bei normoxischen Bedingungen**

HMSC waren unter normoxischen Bedingungen in der Lage, endogenes EPO zu produzieren (Abb. 3a, rot). Man fand auch eine erhöhte GS-Produktion (Pfeil Abb. 3a, grün). Eine Zugabe von EPO unter normoxischen Bedingungen erhöhte, verglichen mit der Kontrollkultur, die Anzahl der EPO-positiven Zellen (vgl. Abb. 3a mit Abb. 3b, rot). Parallel dazu stieg die Produktion von GS nach einer Gabe von EPO an (vgl. Abb. 3a mit Abb. 3b, grün bzw. gelb). Es zeigt sich eine intensive gelbe Färbung, die aus einer Mischung zwischen dem roten EPO und dem grünen GS entsteht.

##### **b) bei hypoxischen Bedingungen**

Hypoxische Kulturen wiesen vor allem bei den GS positiven Zellen eine vermehrte endogenen EPO Produktion auf (Abb. 3c, Pfeile, rot). Die Gabe von EPO unter hypoxischen Bedingungen führte bei einer Mehrzahl der Zellen zu einer erhöhten GS Expression (Abb. 3d, gelb und grün). Vor allem die EPO positiven Zellen, waren dabei an der gesteigerten Expression beteiligt (Abb. 3d Pfeil, rot).

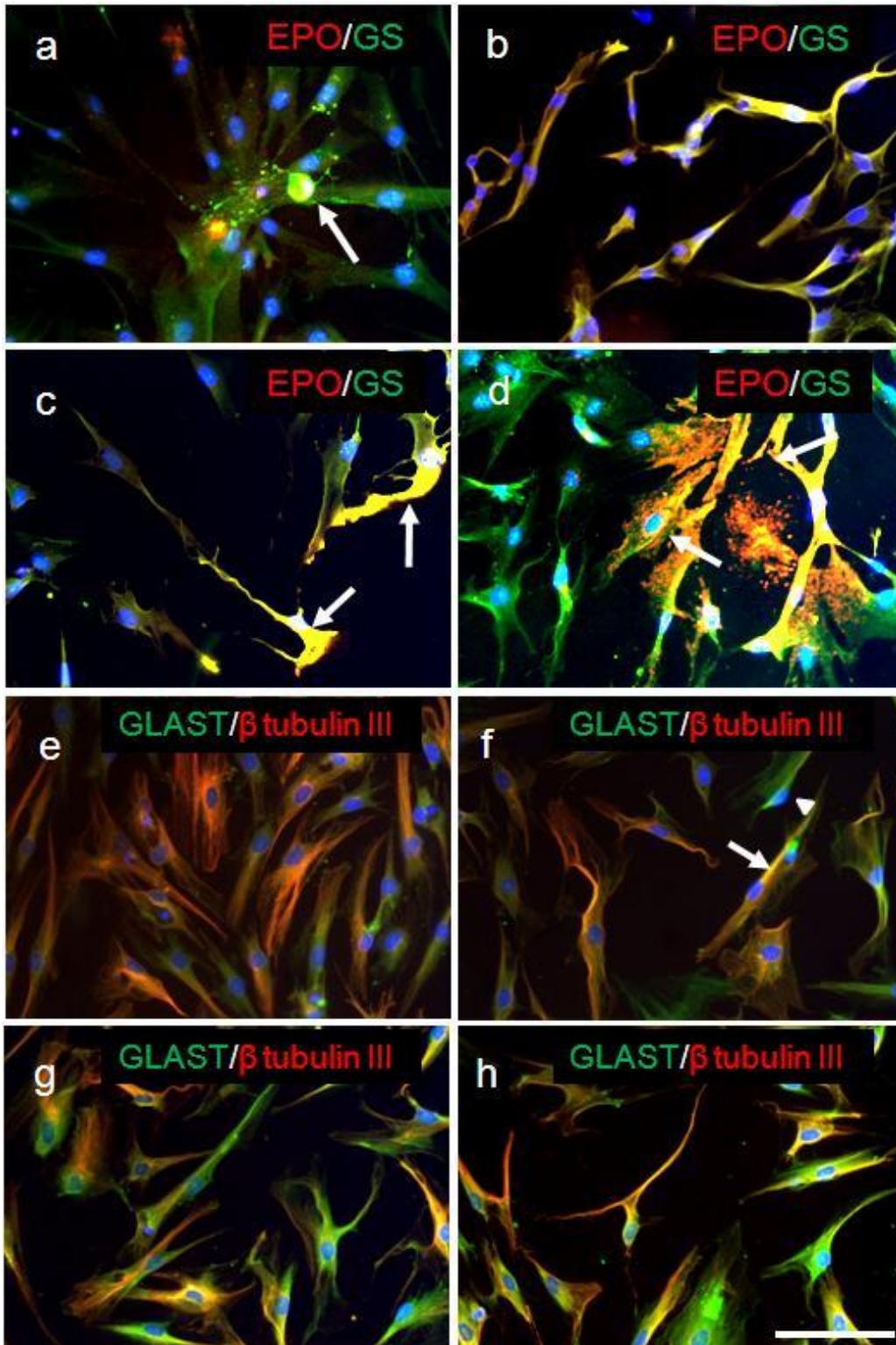
#### **4.2.5 Die Wirkung von EPO auf die Produktion von GLAST**

##### **a) bei normoxischen Bedingungen**

Unter normoxischen Bedingungen zeigte sich eine sehr geringe Expression von GLAST (Abb. 3e, grün) durch die Beta Tubulin III positiven Zellen (Abb. 3e, rot). Nach Zugabe von EPO wurde eine, wenn auch sehr geringe Steigerung, in der GLAST Produktion ersichtlich (vgl. Abb. 3f mit Abb. 3e, grün). Hierbei fand man sowohl bei Beta Tubulin III positiven (Pfeil Abb. 3f) als auch in Beta Tubulin III negativen MSC (Pfeilkopf in Abb. 3f), eine GLAST Expression (Abb. 3f, grün).

##### **b) bei hypoxischen Bedingungen**

Hypoxie führte, im Vergleich zur normoxischen Kontrollkultur, zu einer wesentlichen Steigerung der GLAST Expression (vgl. Abb. 3g mit Abb. 3e, grün). Die Zellen waren unter diesen Bedingungen auch stärker positiv für GLAST als die Zellen bei Normoxie unter Gabe von EPO (vgl. Abb. 3g mit Abb. 3f, grün). Eine weitere Steigerung wurde unter zusätzlicher EPO Gabe erreicht. Dieser Ansatz zeigte im Vergleich zu den anderen Kulturen die stärkste GLAST Expression (vgl. Abb. 3h mit Abb. 3e, 3f und 3g, grün).



**Abb. 3: Einfluss von Hypoxie und EPO auf den Glutamat-metabolisierenden Phänotyp der hMSC GS** (grün in a-d), EPO (rot in a-d), GLAST (grün in e-h), Zellkerne gefärbt mit DAPI (blau), Skala 100µm. a und e) Normoxie; b und f) Normoxie mit EPO-Gabe; c und g) Hypoxie; d und h) Hypoxie mit EPO-Gabe (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

### **4.3 EPO als Schutz gegenüber Glutamat (G) und Hypoxie; LDH Aktivität**

#### **4.3.1 EPO und die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH) unter Inkubation mit Glutamat (G)**

Um toxische Umgebungsbedingungen zu erreichen, wurden die Zellen mit Glutamat (G) behandelt. Das Maß, des dadurch provozierten Zellunterganges, wurde anhand der LDH Freisetzung gemessen. EPO hatte unter allen Bedingungen einen positiven Einfluss auf den Zelluntergang (vgl. Abb. 4a und Abb. 4b).

##### **a) bei normoxischen Umgebungsbedingungen**

Durch eine exogene Zugabe von Glutamat (+G) zeigte sich, im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne diese Gabe (-G), ein um etwa 23 U/ml gesteigerter LDH Anstieg (vgl. Abb. 4a, +G mit -G).

Versetzte man die mit Glu inkubierten Zellen jeweils mit EPO, so fielen die LDH Werte stark ab (vgl. Abb. 4a, +G mit +G +EPI und mit +G +E).

Bei näherer Untersuchung zeigte sich, dass bei einer Zellkultur mit eintägiger Vorinkubation der Zellen mit EPO, die Ausgangswerte der Kontrollkultur ohne Zugabe von Glu erreicht wurden (vgl. Abb. 4a, +G +EPI mit -G).

Eine zeitgleiche Gabe von EPO mit dem Glu senkte die LDH Konzentration nicht (vgl. Abb. 4a, +G +E mit -G). Die LDH Konzentration der Kultur mit gleichzeitig verabreichtem EPO zeigte sich gleich, wie bei Kulturen nach Vorinkubation mit EPO (vgl. Abb. 4a, +G +E mit +G +EPI).

##### **b) bei hypoxischen Umgebungsbedingungen**

Unter hypoxischen Bedingungen allein, zeigten sich gesteigerte LDH-Werte, im Vergleich zur normoxischen Kontrollkultur (vgl. Abb. 4a und Abb. 4b, -G).

Bei einer zusätzlichen Inkubation der Zellen mit Glutamat und Hypoxie fand sich ein massiver Anstieg der LDH Freisetzung (vgl. Abb. 4b, +G mit -G). Dieser

Wert lag über demjenigen der normoxischen Kontrolle (vgl. +G in Abb. 4a und Abb. 4b).

Die Gabe von EPO führte zu einer massiven Senkung der LDH Freisetzung (vgl. Abb. 4b, +G +EPI und +G +E mit +G). Die LDH Konzentrationen lagen jedoch höher als bei den zugehörigen normoxischen Kulturen (vgl. Abb. 4a und Abb. 4b, +G +EPI und +G +E). Zur hypoxischen Kontrollkultur zeigte sich keine Differenz (vgl. Abb. 4b, +G +EPI und +G +E mit -G). Die 24 stündige Vorinkubation mit EPO führte zu der stärksten Minderung bei der LDH Freisetzung. Auch Kulturen mit gleichzeitiger Gabe von EPO und Glu zeigten einen signifikanten Abfall der LDH-Freisetzung im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle mit Glu (vgl. Abb. 4b, +G +EPI mit +G +E). Insgesamt zeigte sich der Einfluss des EPO auf die LDH Freisetzung eindrucksvoller bei den hypoxischen Kulturen, da es hier zu einer sehr starken Verminderung derselben kam. Im Direktvergleich der jeweiligen Kulturansätze mit den niedrigsten LDH Werten zeigte sich aber unter normoxischen Bedingungen die geringste LDH Freisetzung (vgl. Abb. 4a und Abb. 4b, +G +E mit +G +EPI).

### **4.3.2 Beeinflussung der Glutamin-Synthetase Aktivität unter Konfrontation mit Glutamat durch EPO**

#### **a) bei normoxischen Umgebungsbedingungen**

Die Inkubation der Zellen mit Glu führte bei den Kulturen zu einer gesteigerten Glutamin-Synthetase (GS) Aktivität (vgl. Abb. 4c, +G mit -G). Es war eine Steigerung auf etwa 95 % (+G) Aktivität von ehemals 50 % (-G) zu vermerken. Eine zusätzliche Gabe von EPO steigerte die GS Aktivität der normoxischen Kulturen unter Exposition von Glutamat um weitere 100 % (vgl. Abb. 4c, +G mit +G +E und +G +EPI). Betrachtet man die normoxische Kontrolle ohne Zugabe von Glutamat, so zeigte sich eine Steigerung der GS Aktivität von ungefähr 150 Prozent (vgl. Abb. 4c, -G mit +G +E und +G +EPI).

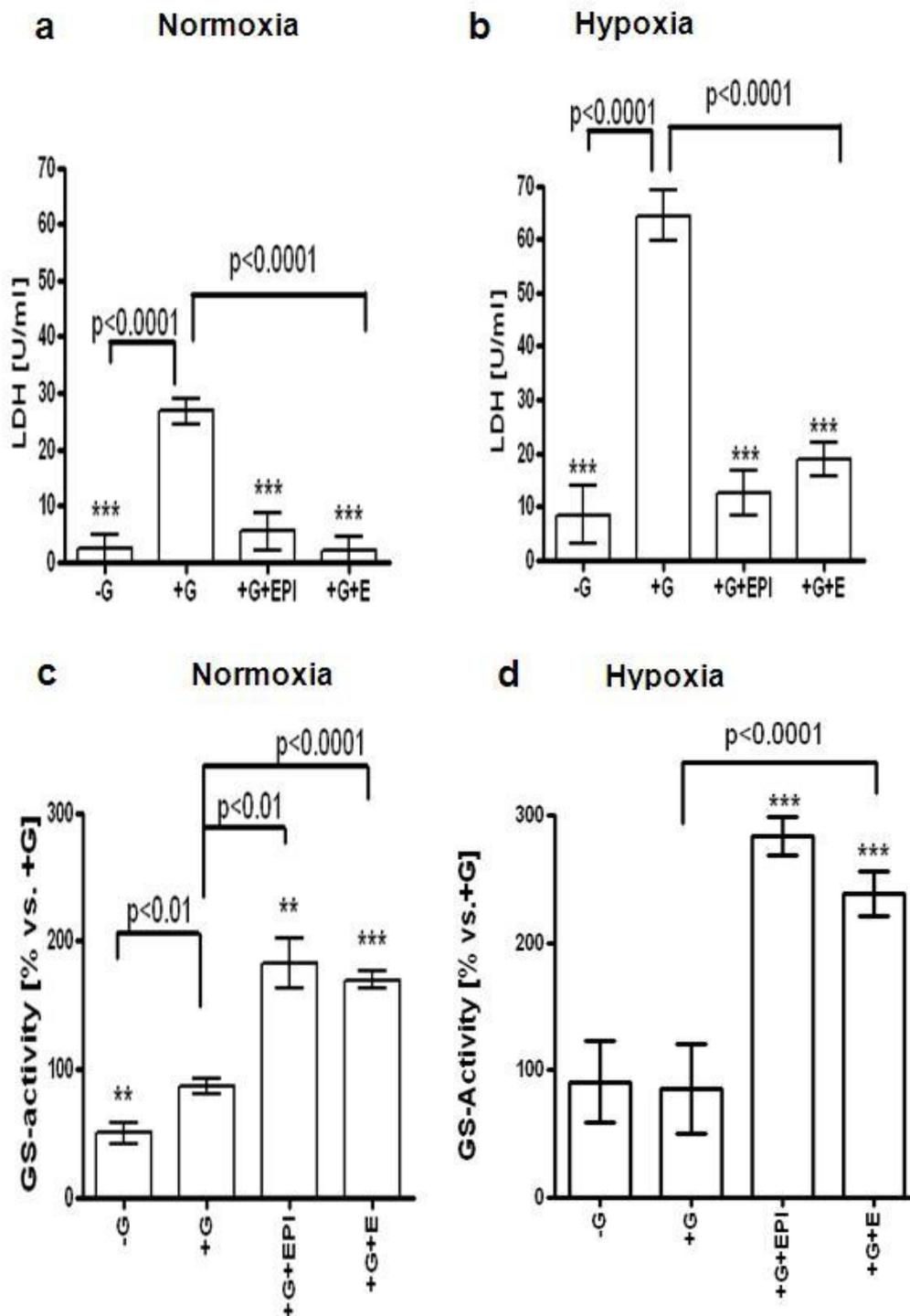
Betrachtet man beide Ansätze der mit Glutamat und EPO behandelten Kulturen, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der jeweiligen GS Aktivität. Es zeigte sich, dass die mit EPO vorinkubierten Zellen eine um etwa 10 Pro-

zentpunkte höhere GS Aktivität hatten, als die Zellen, denen EPO parallel zu Glutamat gegeben wurde (vgl. Abb. 4c, +G +EPI mit +G +E).

### b) bei hypoxischen Umgebungsbedingungen

Betrachtet man die Ausgangswerte der GS Aktivität der hypoxischen Kulturen ohne Zugabe von Glu, so zeigt sich prinzipiell ein höherer Ausgangswert, wie bei der zugehörigen normoxischen Kultur (vgl. –G in Abb. 4c und Abb. 4d). Die Aktivität der GS änderte sich durch Gabe von Glutamat bei den hypoxischen Zellkulturen nur unmerklich (vgl. +G mit –G in Abb. 4d).

Versetzte man diesen Ansatz jedoch mit EPO so konnte eine massive Steigerung in der GS Aktivität von ca. 150 bis 200 % erfasst werden (vgl. Bild Abb. 4d, +G mit +G +E und +G +EPI). Diese Spitzenwerte lagen noch einmal um ca. 50 bis 100 % über den erreichten Werten der korrespondierenden normoxischen Kulturen (vgl. Abb. 4c und Abb. 4d, +G +E und +G +EPI Normoxia mit +G +E und +G +EPI Hypoxia). Hier fand man bei den mit EPO vorinkubierten Zellen die Tendenz zu höheren Werte als bei denjenigen, denen EPO und Glu parallel verabreicht wurde (Abb. 4c). Der Unterschied war bei Hypoxie mit ca. 50 % deutlicher erkennbar als unter normoxischen Bedingungen (vgl. Abb. 4d und Abb. 4c, +G +EPI mit +G +E).



**Abb. 4: LDH Freisetzung und GS Aktivität bei humanen MSC unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und Gabe von Glutamat (G)**

+G (unter Zugabe von Glutamat), -G (keine Zugabe von Glutamat), +G +EPI (24h Vorinkubation mit EPO bevor Zugabe von Glutamat), +G +E (gleichzeitige Gabe von EPO und Glutamat) a) und c) Normoxie; b und d) Hypoxie (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

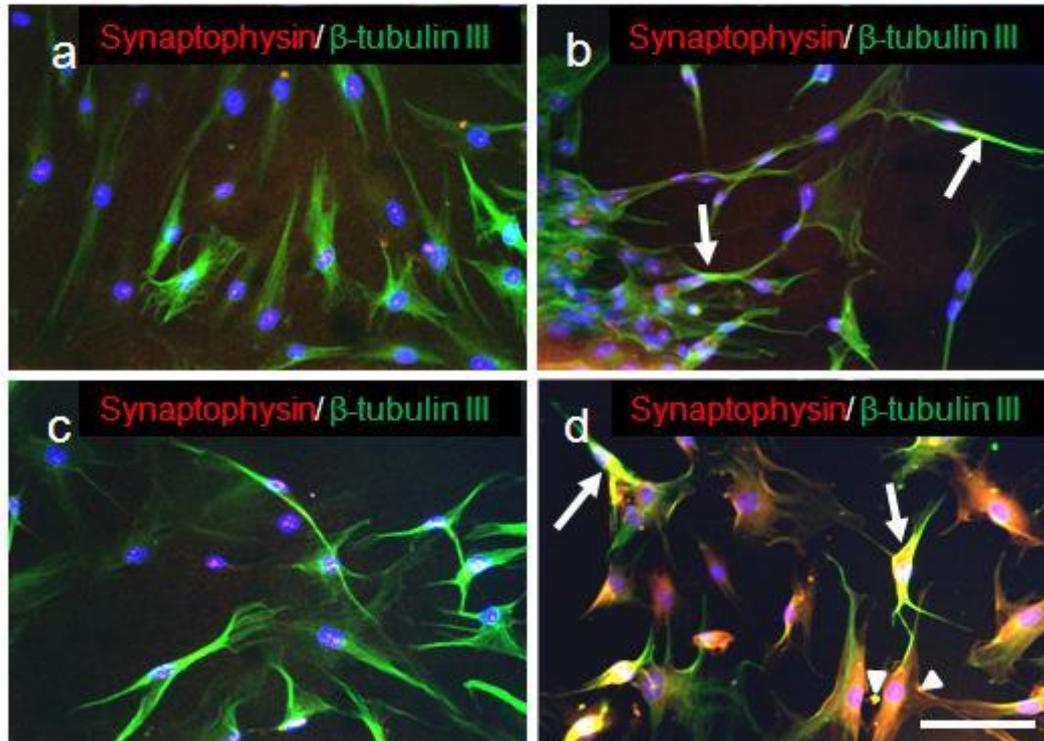
### **4.3.3 Die Wirkung von EPO auf die Expression von Synaptophysin**

#### **a) bei normoxischen Umgebungsbedingungen**

Unter normoxischen Kontrollbedingungen zeigten sich hMSC hauptsächlich als Beta-Tubulin III positive Zellen (Abb. 5a, grün). Von diesen Zellen war nur eine sehr geringe Anzahl in der Lage Synaptophysin zu exprimieren (Abb. 5a, rot). Durch eine Zugabe von EPO zeigte sich nicht nur ein Anstieg der Beta-Tubulin III positiven Zellen (vgl. Abb. 5a und Abb. 5b, grün). Es fand sich, im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe, vermehrt Synaptophysin in Zellkörpern und Ausläufern (vgl. Abb. 5a und Abb. 5b, rot). Auch die Zelldichte nahm unter einer zusätzlichen Gabe von EPO deutlich zu (vgl. Abb. 5a und Abb. 5b, Färbung der Zellkerne durch DAPI in blau). Es zeigte sich ein leichter Anstieg der Synaptophysin positiven Zellen nach EPO-Gabe bei Normoxie (vgl. Abb. 5b, Pfeile).

#### **b) bei hypoxischen Umgebungsbedingungen**

Vergleicht man die beiden Kontrollgruppen, so zeigt sich bei den hypoxischen Kulturen eine minimal gesteigerte Intensität der Synaptophysin Expression (vgl. Abb. 5a und Abb. 5c, rot). Die Anzahl der Beta-Tubulin III positiven Zellen erscheint gleich (vgl. Abb. 5a und Abb. 5c, grün), wohingegen die Gesamtzellzahl vermindert ist (vgl. Abb. 5a und Abb. 5c, blau). Versetzte man die Kulturen zusätzlich mit EPO, so fand sich eine stärkere Synaptophysin Expression (vgl. Abb. 5c und Abb. 5d, rot). Offenbar wurde durch Gabe von EPO die Bildung von Synaptophysin stark angeregt. Vor allem im Bereich der einzelnen Zellkontakte zeigten sich hierbei Synaptophysin Vesikel (Pfeil-köpfe in Abb. 5d). Hinsichtlich der zugehörigen normoxischen Kultur unter Zugabe von EPO fand sich hier eine deutlich stärkere Expression von Synaptophysin (vgl. Abb. 5b und Abb. 5d, rot). Es zeigte sich ein Anstieg der Synaptophysin-positiven Zellen nach EPO-Gabe bei Hypoxie (vgl. Abb. 5d, Pfeile).



**Abb. 5: Synaptophysin Expression bei humanen MSC unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und Gabe von EPO**

Synaptophysin (rot in a-d), Beta-Tubulin-III (grün in a-d), Zellkerne gefärbt mit DAPI (blau), Pfeile = synaptophysin-positive Zellen, Pfeilköpfe = Synaptophysinvesikel; Skala 100µm

a) Normoxie; b) Normoxie und EPO-Gabe; c) Hypoxie; d) Hypoxie und EPO-Gabe (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

#### **4.3.4 Freisetzung von Acetylcholin (ACh) unter EPO Einfluss**

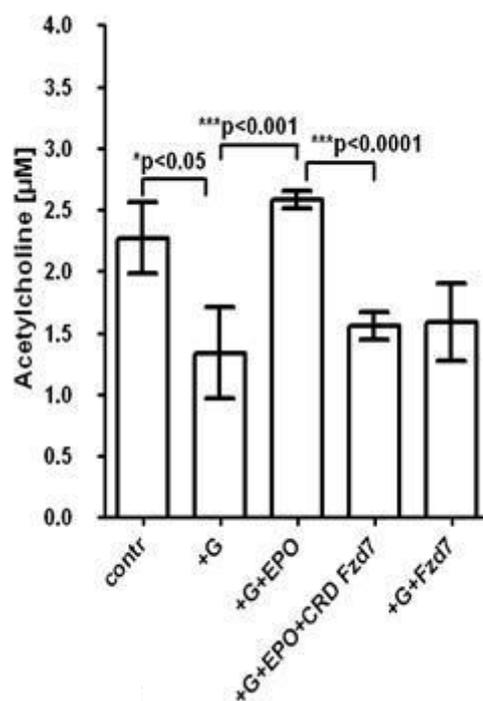
##### a) unter normoxischen Bedingungen

Eine Inkubation von Zellen mit Glutamat führte bei den normoxischen Kulturen zu einer verminderten ACh-Freisetzung (vgl. Abb. 6, +G mit Contr.). Durch eine gleichzeitige Applikation von EPO wurde diese Reduktion der ACh-Produktion wieder aufgehoben (vgl. Abb. 6, +G +EPO mit +G). Bei Zugabe von EPO wurden höhere Werte wie bei der normoxischen Kontrollkultur gefunden (vgl. Abb. 6, +G +EPO mit Contr.).

b) unter Zugabe von CRD Fzd7

Inkubierte man die mit Glutamat behandelten Zellen zusätzlich mit CRD Fzd7, so fand sich im Vergleich zu den lediglich mit Glu behandelten Zellen keine Änderung bei der Ach-Freisetzung (Abb. 6, +G +CRD Fzd7 mit +G). Im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe zeigte sich dieser Wert erniedrigt (vgl. Abb. 6, +G +CRD Fzd7 mit Contr.). Versetzte man diesen Ansatz zusätzlich mit EPO, so änderte sich in der Ach-Freisetzung nichts. Die Werte blieben konstant (vgl. Abb. 6, +G +CRD Fzd7+ EPO mit +G +CRD Fzd7).

Eine Inkubation der Kulturen mit CRD Fzd7 führte zu einem signifikanten Abfall der Ach-Konzentration. Die Spitzenwerte der mit Glutamat und EPO behandelten Kulturen konnte bei Weitem nicht erreicht werden (vgl. Abb. 6, +G +CRD Fzd7+EPO mit +G +EPO).



**Abb. 6: Darstellung der ACh Freisetzung in hMSC unter normoxischen Bedingungen und Gabe von EPO**

Contr. (Normoxische Kontrolle); +G (Inkubation der Kulturen mit Glutamat für 48h); +G +EPO (Inkubation der Kulturen mit EPO und Glutamat); +G +EPO +CRD Fzd7 (Zugabe des Antagonisten der Wnt3a Signalkette 1h vor Inkubation der Kulturen mit EPO und Glutamat) +G+CRD Fzd7 (Zugabe des Antagonisten der Wnt3a Signalkette 1h vor Inkubation der Zellen mit Glutamat) (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

#### **4.3.5 Apoptose unter Einwirkung von EPO**

In Apoptose befindliche Zellen werden mittels TUNEL (terminal desoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay) gefärbt [81]. Die Apoptoserate wurde durch eine Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen, bezogen auf die Zahl der TUNEL-positiven Zellen unter normoxischen Kontrollbedingungen (100 % Wert) dargestellt.

##### **a) unter normoxischen Bedingungen**

Unter normoxischen Bedingungen wird die Apoptoserate nach Gabe von EPO deutlich gesenkt (vgl. Abb. 7, N mit N +EPO).

Konfrontierte man die normoxischen Zellen mit CRD Fzd7, so zeigte sich, verglichen mit der Kontrollkultur, eine Steigerung der TUNEL-positiven Zellen um etwa das Sechsfache (vgl. Abb. 7, N +CRD Fzd7 mit N). Hinsichtlich der mit EPO behandelten Zellen findet sich demnach ein Anstieg um fast 700 % (vgl. Abb. 7, N +CRD Fzd7 mit N +EPO).

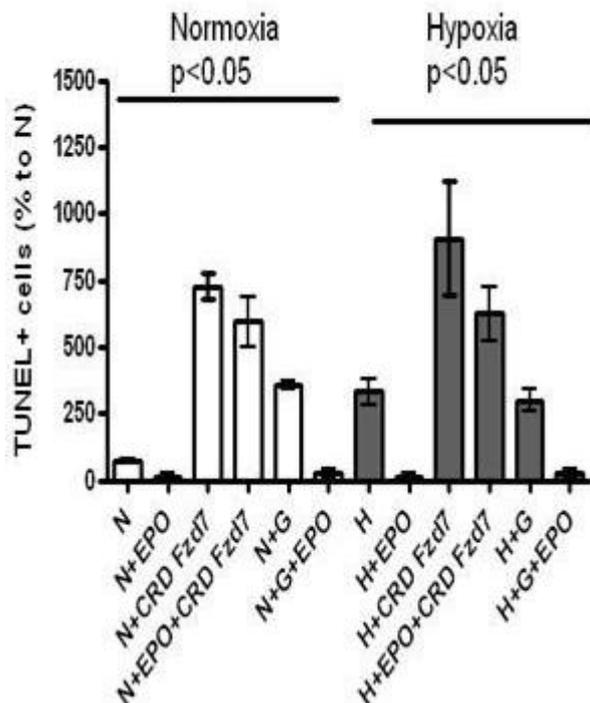
Eine Zugabe von EPO zu diesem Ansatz führte zu keiner Minderung der Apoptoserate (vgl. Abb. 7, N +CRD Fzd7 +EPO mit N +CRD Fzd7). Die Werte der Kontrollkultur wurden nicht erreicht (vgl. Abb. 7, N +CRD Fzd7 +EPO mit N). Zu den normoxischen Kulturen unter Zugabe von EPO bestand eine Differenz von ca. 600 % (vgl. Abb. 7, N +CRD Fzd7 +EPO mit N +EPO).

Inkubierte man normoxische Kulturen mit Glutamat, so zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen (vgl. Abb. 7, N +G mit N). Werte der mit CRD Fzd7 inkubierten Zellen wurden jedoch nicht erreicht. Die mit Glutamat behandelten Zellen befanden sich ca. 450 % darunter (vgl. Abb. 7, N +G mit N +CRD Fzd7).

Fügte man diesem Ansatz EPO hinzu, so konnte hier eine drastische Senkung der Apoptoserate festgestellt werden (vgl. Abb. 7, N +G +EPO mit N +G). Die Werte waren denjenigen der normoxischen Kontrollen unter Zugabe von EPO vergleichbar (vgl. Abb. 7, N +G +EPO mit N +EPO).

### b) bei hypoxischen Bedingungen unter Zugabe von CRD Fzd7

Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich eine deutlich erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den normoxischen Kontrollkulturen (vgl. Abb. 7, H mit N). Eine Gabe von EPO verminderte die Apoptoserate deutlich (vgl. Abb. 7, H mit H +EPO). Die Belastung der Zellen mit CRD Fzd7 führte zu einem noch massiveren Anstieg der TUNEL-positiven Zellen als unter Normoxie (vgl. Abb. 7, N mit N +CRDFzd7 und H mit H +CRDFzd7). Zusätzliche Gabe von EPO bei den mit CRD Fzd7 belasteten Zellen verminderte die Apoptoserate vergleichsweise nicht (vgl. Abb. 7, H + EPO + CRD Fzd7 mit H +CRD Fzd7). Es wurden dabei ähnliche Werte wie im Bereich der korrespondierenden normoxischen Kultur erreicht (vgl. Abb. 7, H + EPO + CRD Fzd7 mit N +EPO +CRD Fzd7). Die Gabe von Glutamat zeigte in den hypoxischen Kulturen eine ebenfalls im Vergleich zu den normoxischen Kontrollkulturen erhöhte Apoptoserate (vgl. Abb. 7, H +G mit N). Vergleicht man sie mit der hypoxischen Kontrollkultur, so ist sie gleich (vgl. Abb. 7, H +G mit H). Im Vergleich zur korrespondierenden normoxischen Kultur ist der Wert in der hypoxischen Kultur gleich geblieben (vgl. Abb. 7, H +G mit N +G). Die zusätzliche Gabe von EPO reduziert hier, ähnlich wie bei den normoxischen Kulturen, die Apoptoserate deutlich (vgl. Abb. 7 H +G +EPO mit N + G +EPO). Es finden sich auch im Vergleich zur hypoxischen Kontrollkultur ohne Glutamat deutlich verminderte Werte (vgl. Abb. 7, H +G +EPO mit H).



**Abb. 7: Quantifizierung von TUNEL-positiven Zellen in hMSC**

Werte nach 48 h Inkubation von hMSC unter Normoxie und Exposition von Glutamat.

N (Normoxie); N +EPO (Normoxie und EPO); N +CRD Fzd7(Normoxie unter Zugabe des Antagonisten der Wnt3a Signalkette); N +EPO +CRD Fzd7 (Normoxie unter Zugabe des Antagonisten der Wnt3a Signalkette 1h vor Inkubation der Kulturen mit EPO); N +G (Normoxie unter Zugabe von Glutamat); N +G +EPO (Normoxie unter Zugabe von Glutamat 1h vor Inkubation der Kulturen mit EPO), H (Hypoxie); H +EPO (Hypoxie und EPO); H +CRD Fzd7 (Hypoxie unter Zugabe des Antagonisten der Wnt3a Signalkette) H +EPO +CRD Fzd7 (Hypoxie unter Zugabe des Antagonisten der Wnt3a Signalkette 1h vor Inkubation der Kulturen mit EPO); H +G (Normoxie unter Zugabe von Glutamat); H +G +EPO(Hypoxie unter Zugabe von Glutamat 1h vor Konfrontation der Kulturen mit EPO). Der 100 % Wert entspricht hier der normoxischen Bedingung (N). (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

#### **4.3.6 Die Wirkung von EPO auf die Anzahl der NeuN-positiven Zellen**

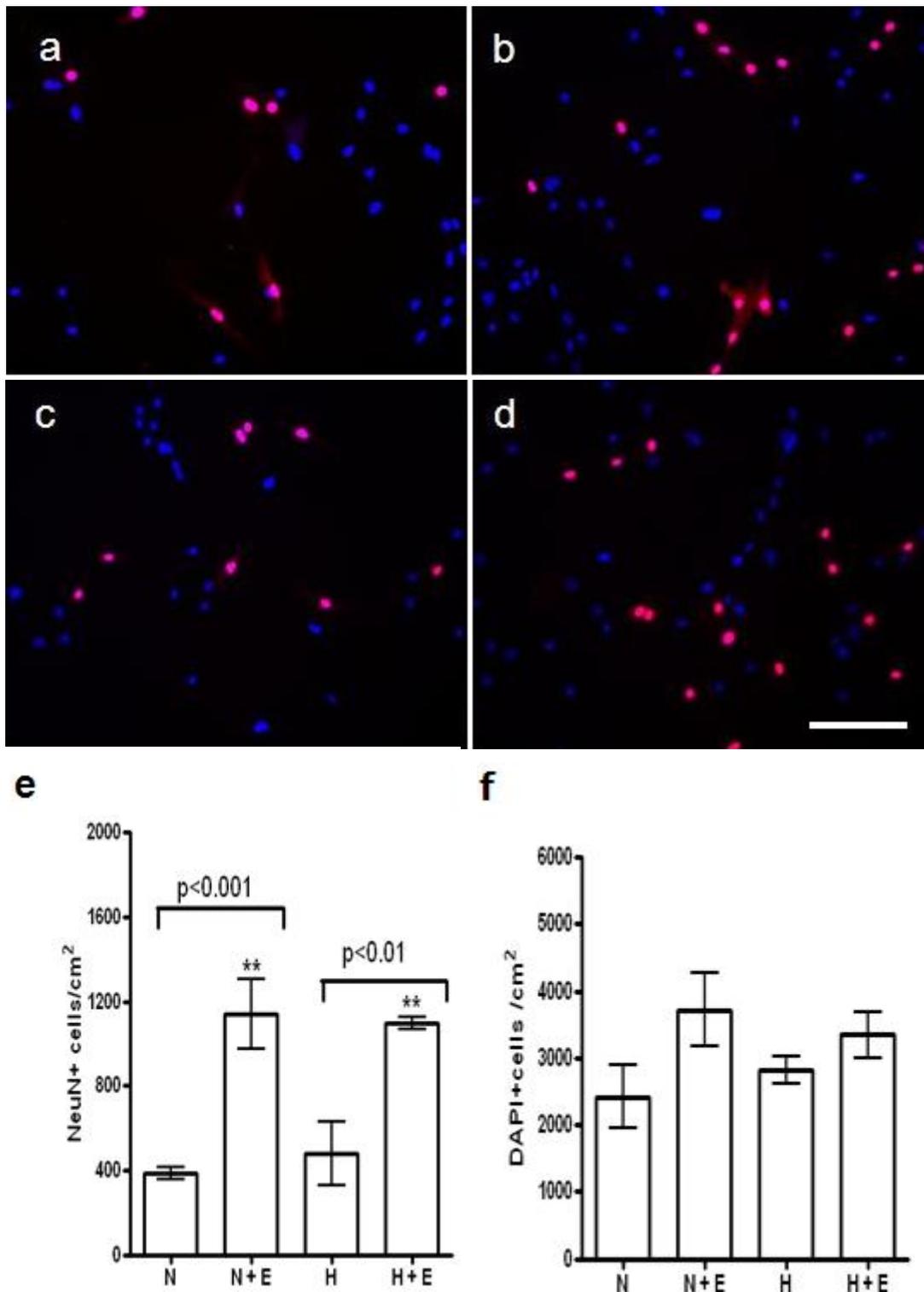
##### a) bei normoxischen Bedingungen

Unter Normoxie führte die Exposition von Zellen mit EPO zu einer erhöhten Anzahl an NeuN-positiven Zellen (vgl. rote und pinkfarbene Zellen in der Abb. 8a, Abb. 8b und Abb. 8e, Neu N mit N + E).

##### b) unter hypoxischen Bedingungen

Im Vergleich zu den normoxischen Kontrollgruppen (vgl. Abb. 8a und Abb. 8c, NeuN mit H) führte Hypoxie nicht zu bemerkenswerten Veränderungen in der Anzahl der NeuN-positiven Zellen.

Unter Zugabe von EPO unter Hypoxie, wurde auch ein starker Anstieg von NeuN-positiven Zellen, im Vergleich zu den mit EPO behandelten Zellen unter Normoxie, beobachtet (vgl. Abb. 8c, Abb. 8d und Abb. 8e, H +E mit H und N). Um zu zeigen, dass der Anstieg der NeuN-positiven Zellen nicht aus einer durch EPO induzierten Gesamtzellzahl herrührt, geschweige denn auf seine positive Wirkung auf das Überleben der Zellen zurückzuführen ist, wurden die Zellen in Kultur, nach Färbung der Kerne mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), quantifiziert. Weder unter normoxischen, noch unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich nach Gabe von EPO eine signifikant veränderte Anzahl an Zellen (vgl. Abb. 8f, N mit N +E, H mit H +E).



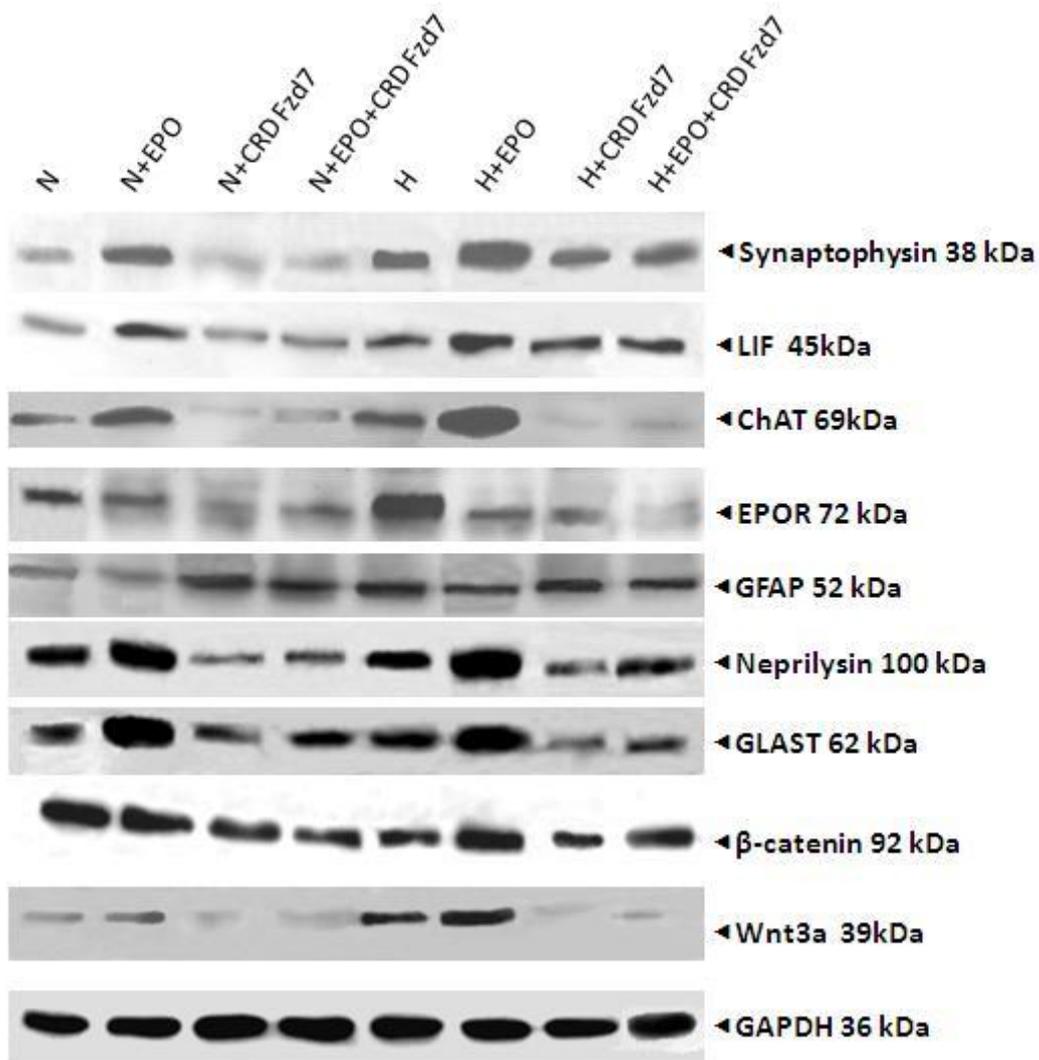
**Abb. 8: Anzahl der Neu-N (rot) und DAPI (blau) positiven Zellen**

a) Normoxie b) Normoxie und EPO c) Hypoxie d) Hypoxie und EPO; Skala 100µm

e) Quantifizierung der Neu-N positiven Zellen pro cm², f) : Quantifizierung der Gesamtzellzahl anhand der DAPI positiven Zellen pro cm² (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

#### **4.4 Proteinexpressionsmuster von hMSC unter Gabe von EPO und Antagonisten der Wnt3a-Signalkette**

In der folgenden densitometrischen Analyse der aus dem Western Blot erhaltenen Daten wird immer eine normoxische Zellkultur als Referenz mit dem Wert 100 % gesehen. Alle weiteren Angaben beziehen sich in jeweiligen Prozentzahlen auf diese 100 %.



**Abb. 9: Western Blot Analyse des Wnt3a, Beta-Catenin, Neprilysin, LIF, GLAST sowie glialen (GFAP) und synaptischen (Synaptophysin) Markern.**

N-Normoxie, H-Hypoxie, N+E/H+E-mit EPO behandelt, N+EPO+CRD Fzd7/H+EPO+CRD Fzd7 unter der Anwesenheit von CrdFzd7 mit EPO behandelt (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

		<b>N+EPO</b>	<b>N+CRD Fzd7</b>	<b>N+EPO+ CRD Fzd7</b>
<b>Protein</b>	<b>N</b>	% zur normoxischen Kontrolle		
<i>Synaptophysin</i>	100	324	171	160
<i>ChAT</i>	100	169	34	47
<i>LIF</i>	100	194	105	149
<i>EPOR</i>	100	135	111	122
<i>GFAP</i>	100	109	254	257
<i>GLAST</i>	100	259	84	110
<i>Neprilysin</i>	100	148	37	52
<i>Wnt3a</i>	100	169	49	95
<i>β-Catenin</i>	100	93	72	80,7
		<b>H+EPO</b>	<b>H+CRD Fzd7</b>	<b>H+EPO+ CRD Fzd7</b>
<b>Protein</b>	<b>H</b>	% zur normoxischen Kontrolle		
<i>Synaptophysin</i>	299	498	291	334
<i>ChAT</i>	156	226	22	52
<i>LIF</i>	193	246	206	176
<i>EPOR</i>	223	119	104	72
<i>GFAP</i>	237	168	216	156
<i>GLAST</i>	142	223	63	77
<i>Neprilysin</i>	92	161	54	88
<i>Wnt3a</i>	348	510	51	41
<i>β-Catenin</i>	59	97	45	71

**Tabelle 10: Densitometrische Untersuchung der durch Western Blot erfassten Proteinmengen der hMSC.** Werte angegeben als Prozentteil der zugehörigen normoxischen Kontrollgruppen.

#### **4.4.1 Synaptophysin- Expression unter EPO-Einfluss**

In der Western Blot Analyse zeigte sich die Fähigkeit der hMSC zur Produktion des vesikulären Zellmarkers Synaptophysin (Abb. 9, Tabelle 10).

Durch eine zusätzliche Gabe von EPO unter normoxischen Bedingungen konnte die Expression von Synaptophysin um das Dreifache erhöht werden (vgl. Tabelle 10, N mit N +EPO). Im Vergleich zu den normoxischen Zellkulturen führte alleine eine Kultur unter hypoxischen Bedingungen zu einer Verdreifachung der Synaptophysinproduktion (vgl. Tabelle 10, H mit N). Unter Zugabe von EPO steigerte sich dieser Wert noch einmal um 200 % (vgl. Tabelle 10, H mit H +EPO). Man erreichte also den 5-fachen Wert im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe ohne EPO (vgl. Tabelle 10, H +EPO mit N). Unter normoxischen Umgebungsbedingungen zeigte sich sowohl unter Gabe von EPO als auch unter alleiniger Konfrontation der Zellen mit CRD Fzd7 ein relativ geringer Anstieg in der Synaptophysin Produktion (vgl. Tabelle 1, N+ CRD Fzd7 mit N +EPO +CRD Fzd7 mit N).

Unter Hypoxie zeigte sich nach Konfrontation mit CRD Fzd7 mit/oder ohne EPO jeweils ein verdoppelter Prozentsatz in der Synaptophysinproduktion im Vergleich zur Normoxie (vgl. Tabelle 10, H +CRD Fzd7 und H +EPO +CRD Fzd7 mit N +CRD Fzd7 und N +EPO +CRD Fzd7).

#### **4.4.2 Die Wirkung von EPO auf die Produktion von Cholinacetyltransferase (ChAT)**

Es konnte gezeigt werden, dass eine Gabe von EPO eine gesteigerte Produktion des Acetylcholin bildenden Transmitters Cholinacetyltransferase zur Folge hat (vgl. Abb. 9, Tabelle 10). Wurde unter Normoxie zusätzlich EPO verabreicht, so steigerte sich die ChAT Produktion im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 10, N +EPO mit N). Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich, verglichen mit der normoxischen Kontrollgruppe (ohne EPO), eine um etwa die Hälfte gesteigerte Produktion von ChAT (vgl. Tabelle 10, H mit N). Auch hier fand eine deutliche Steigerung der Produktion nach Gabe von

EPO statt (vgl. Tabelle 10, H+EPO mit H). Stellt man die gemessenen Werte mit den normoxischen Kontrollgruppen gegenüber, so zeigt sich hier eine um 100 % gesteigerte Produktion (vgl. Tabelle 10, H +EPO mit N). Insgesamt verminderte die Konfrontation der Kulturen mit CRD Fzd7 die ChAT Produktion deutlich, wobei die jeweilige Gabe von EPO diese geringe Produktion insgesamt nur gering steigern konnte (vgl. Tabelle 10, N+CRD Fzd7 mit N und N +EPO +CRD Fzd7 mit N, sowie H +CRDFzd7 mit H und H +EPO +CRDFzd7 mit H).

### **4.4.3 Einwirkung auf die Produktion des Leukämie-inhibierenden-Faktors (LIF) durch EPO-Administration**

Anhand der Western Blot Analyse zeigte sich eine deutliche Steigerung der LIF-Produktion sowohl unter hypoxischen Bedingungen als auch unter Zugabe von EPO (vgl. Abb. 9, Tabelle 10). Bei den normoxischen Kulturen fand man nach Gabe von EPO eine um das Doppelte gesteigerte Produktion des LIF (vgl. Tabelle 10, N +EPO mit N). Unter Hypoxie zeigte sich ebenfalls eine Steigerung der Produktion von LIF um das Doppelte (vgl. Tabelle 10, H mit N). Versetzte man eine hypoxische Zellkultur mit EPO, so steigerte sich die Produktion des LIF um weitere 50 Prozentpunkte (vgl. Tabelle 10, H +EPO mit H). Konfrontierte man die normoxischen und hypoxischen Kulturen jeweils mit CRD Fzd7, so änderte sich die LIF-Produktion im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollkulturen nur unwesentlich (vgl. Tabelle 10, N +CRD Fzd7 mit N und H +CRD Fzd7 mit H). Die Gabe von EPO führte im Falle von Normoxie zu einer minimalen Steigerung der LIF Expression (vgl. Tabelle 10, N +EPO +CRD Fzd7 mit N +CRD Fzd7), im Falle von Hypoxie tendenziell eher zu einer Abnahme der LIF-Expression (vgl. Tabelle 10, H +EPO +CRD Fzd7 mit H +CRD Fzd7).

### **4.4.4 Expression des EPO-Rezeptors (EPOR) und EPO**

Durch die Analyse der Western Blots zeigte sich ein auf den EPOR steigernden Effekt durch hypoxische Bedingungen (Abb. 9, Tabelle 10, N mit H). Alleinige

Gabe von EPO und die Kombination mit Hypoxie hingegen hatte nur wenig Einfluss (vgl. Abb. 9, Tabelle 10, N mit N + EPO und H mit H + EPO).

Wurden die normoxischen Kulturen mit EPO versetzt, so zeigte sich eine geringe Steigerung der EPOR-Expression (vgl. Tabelle 10, N +EPO mit N).

Unter Hypoxie zeigte sich, im Hinblick auf die normoxische Kontrollgruppe, eine um das Doppelte gesteigerte Expression des EPOR (vgl. Tabelle 10, H mit N).

Versetzte man die hypoxischen Kulturen jedoch mit EPO, so zeigte sich keine Steigerung der Expression des EPOR (vgl. Tabelle 10, H +EPO mit H). Konfrontierte man die Kulturen unter Hypoxie und Normoxie mit CRD Fzd7 Zellen, so zeigte sich verglichen mit der normoxischen Kontrollgruppe keine wesentliche Steigerung in der Expression des EPOR (vgl. Tabelle 10, N +CRD Fzd7 mit N und H +CRD Fzd7 mit H). Unter Normoxie fand sich nach Gabe von EPO unter CRD Fzd7 Konfrontation eine minime Steigerung in der Expression des EPOR (vgl. Tabelle 10, N +EPO +CRD Fzd7 mit N). Unter Hypoxie hingegen wandelte sich diese Kombination sowie die alleinige Zugabe von Fzd7 in eine verminderte Expression des EPOR im Vergleich zu Hypoxie um (vgl. Tabelle 10, H +EPO +CRD Fzd7 mit H).

### **4.4.5 Expression des Sauren Gliafaserproteins (GFAP) unter EPO-Einwirkung**

Es zeigte sich sowohl unter hypoxischen Bedingungen, sowie unter Anwesenheit von CRD Fzd7 eine vermehrte Expression von GFAP. Eine Zugabe von EPO verminderte diese nur unter hypoxischen Bedingungen (vgl. Abb. 9, Tabelle 10, H + CRD Fzd7 mit H +EPO + CRD Fzd7 und N + CRD Fzd7 mit N + EPO + CRD Fzd7). Versetzte man die normoxischen Kulturen mit EPO, so zeigte sich keine wesentliche Expression des GFAP (vgl. Tabelle 10, N +EPO mit N). Unter hypoxischen Bedingungen fand sich im Vergleich zu den normoxischen Kulturen eine um deutlich gesteigerte Expression von GFAP (vgl. Tabelle 10, H mit N). Gab man diesem Ansatz EPO hinzu, so wurde die GFAP-Expression abgeschwächt (vgl. Tabelle 10, H +EPO mit H). Konfrontierte man die normoxischen und hypoxischen Kulturen mit CRD Fzd7, so zeigte sich, im Vergleich mit

den Kontrollkulturen, eine erhöhte Expression von GFAP im Vergleich zur normoxischen Kontrollkultur (vgl. Tabelle 10, N +CRD Fzd7 mit N und H +CRD Fzd7 mit N). Versetzte man die Kultur unter Normoxie mit EPO, so änderte sich das Ergebnis nicht (vgl. Tabelle 10, N +EPO +CRD Fzd7 mit N +CRD Fzd7). Gab man den hypoxischen Kulturen zusätzlich EPO hinzu, so verminderte sich die GFAP-Produktion im Vergleich zur hypoxischen Kontrollkultur (vgl. Tabelle 10, H +EPO +CRD Fzd7 mit H +CRD Fzd7).

#### **4.4.6 Die Wirkung von EPO auf die Expression des Glutamat-Aspartat-Transporters (GLAST)**

Die Expression von GLAST wird vor allem unter Zugabe von EPO, aber auch unter hypoxischen Bedingungen gesteigert (vgl. Abb. 9, Tabelle 10). Nach Zugabe von EPO unter Normoxie fand sich eine deutlich gesteigerte Expression von GLAST (vgl. Tabelle 10, N +EPO mit N). Auch unter Hypoxie zeigte sich, hinsichtlich der normoxischen Kontrolle, eine gesteigerte Expression von GLAST (vgl. Tabelle 10, H mit N). Versetzte man diesen Ansatz mit EPO, so zeigte sich, ein zusätzlicher Anstieg (vgl. Tabelle 10, H +EPO mit H). Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie wurde die GLAST Expression nach Konfrontation der Kulturen mit CRD Fzd7 deutlich reduziert (vgl. Tabelle 10, N +CRD Fzd7 mit N und H +CRD Fzd7 mit N). Gab man der normoxischen Kultur jedoch EPO hinzu, so steigerte sich die GLAST Expression auf Werte vergleichbar zu den Ausgangswerten der Kontrollkultur (vgl. Tabelle 10, N +EPO +CRD Fzd7 mit N). Versetzte man der hMSC CRD Fzd7-Kultur unter Hypoxie EPO, so zeigte sich keine Steigerung in der Expression von GLAST (vgl. Tabelle 10, H +EPO +CRD Fzd7 mit H +CRD Fzd7).

#### **4.4.7 Neprilysin Expression unter EPO-Einfluss**

Unter Zugabe von EPO konnte eine gesteigerte Expression der Endopeptidase Neprilysin festgestellt werden (vgl. Abb. 9, Tabelle 10).

Gab man bei normoxischen Bedingungen EPO hinzu, so konnte eine Steigerung in der Neprilysin Expression gefunden werden (vgl. Tabelle 10, N +EPO mit N). Unter hypoxischen Bedingung veränderte sich die Neprilysin-Expression hinsichtlich der normoxischen Kontrollgruppe nur geringfügig (vgl. Tabelle 10, H mit N). Gab man EPO zu, so zeigte sich hier eine deutliche Steigerung (vgl. Tabelle 10, H +EPO mit H und N).

Sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie führte eine Konfrontation der Kulturen mit CRD Fzd7 zu einer verminderten Expression von Neprilysin-Produktion (vgl. Tabelle 10, N +CRD Fzd7 mit N und H +CRD Fzd7 mit H), wobei eine Gabe von EPO jeweils nur zu einem minimalen Anstieg in der Expression führte (vgl. Tabelle 10, N +CRD Fzd7+ EPO mit N und N +CRD Fzd7 sowie mit H +CRD Fzd7 +EPO mit H und H +CRD Fzd7).

### **4.4.8 EPO und die Expression von Wnt3a**

Eine gesteigerte Wnt3a-Expression wurde gefördert durch hypoxische Verhältnisse und die Zugabe von EPO (vgl. Abb. 9, Tabelle 10).

Eine Steigerung in der Expression von Wnt 3a wurde unter Zugabe von EPO unter Normoxie erreicht (vgl. Tabelle 10, N +EPO mit N).

Allein der Vergleich der hypoxischen Kultur mit der normoxischen Kontrollkultur zeigte einer um 150 % gesteigerte Expression des Wnt 3as (vgl. Tabelle 10, H mit N). Versetzte man die hypoxische Kultur noch mit EPO, so steigerte sich die Exprimierung um ein Vielfaches (vgl. Tabelle 10, H +EPO mit H und N). Die Konfrontation der hypoxischen und normoxischen Kulturen führte gleichermaßen zu einer verminderten Wnt3a Expression (vgl. Tabelle 10, N +CRD Fzd7 mit H und N sowie H +CRD Fzd7 mit H und N), wobei im Fall der normoxischen Kultur nach Zugabe von EPO eher noch eine Steigerung festzustellen war (vgl. Tabelle 10, N +EPO +CRD Fzd7 mit N +CRD Fzd7), unter Hypoxie hingegen zeigte sich sogar tendenziell eher eine, wenn auch geringe, Reduzierung in der Wnt 3a Expression (vgl. Tabelle 10, H +EPO +CRD Fzd7 mit H +CRD Fzd7).

#### **4.4.9 Die Wirkung von EPO auf die Expression von Beta-Catenin**

Eine Zugabe von EPO hatte unter hypoxischen Bedingungen einen positiven Einfluss auf die Expression von Beta-Catenin (vgl. Abb. 9, Tabelle 10). Versetzte man eine normoxische und hypoxische Kultur mit EPO, so fand sich ein minimaler Abfall in der Expression des Beta-Catenins (vgl. Tabelle 10, N +EPO mit N und H +EPO mit H). Die Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen zeigte eine deutlich verminderte Expression des Beta-Catenins. Nach Konfrontation der normoxischen und hypoxischen Kulturen mit CRD Fzd7 fand sich eine deutlich verringerte Expression des Beta-Catenin, wobei diese im Falle der hypoxischen Kultur deutlicher ausgeprägt war (vgl. Tabelle 10, N +CRD Fzd7 mit N und H +CRD Fzd7 mit H). Die Zugabe von EPO zu den jeweiligen Kulturen zeigte bei der normoxischen Kultur keine wesentliche Veränderung in der Beta-Catenin Expression (vgl. Tabelle 10, N +CRD Fzd7+ EPO mit N +CRD Fzd7), im Falle der hypoxischen Kultur konnte eine Steigerung festgestellt werden (vgl. Tabelle 10, H +CRD Fzd7 +EPO mit H +CRD Fzd7).

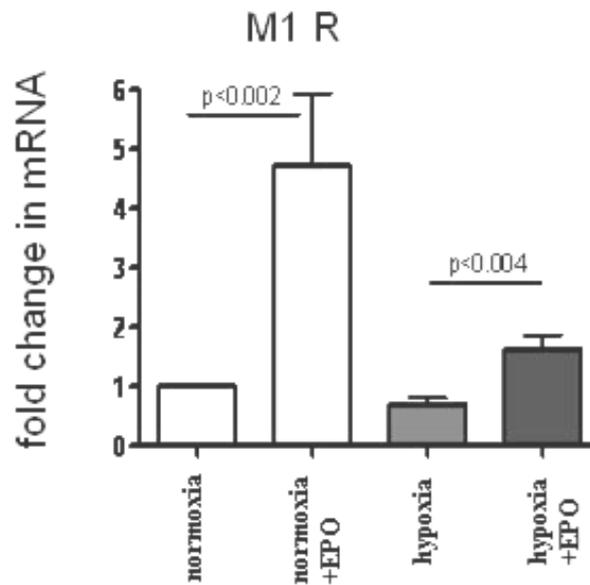
#### **4.5 qPCR**

Durch eine qPCR wurden die hMSC auf die Produktion der mRNA von muskarinergen Rezeptoren (M1R-M3R), NGF und Beta-Tubulin III untersucht. Sowohl bei M1R-M3R und NFG wurde als „housekeeping transcript“ Beta-II Mikroglobulin verwendet.

Alle Daten wurden in Relation zu den normoxischen Kontrollkulturen bewertet. Der mittlere Cycle of threshold (Ct)-Wert des Beta-II-Mikroglobulin Transkripts lag bei  $18.15 \pm 0.68$ . Es zeigten sich zwischen den einzelnen Kulturen dabei keine Unterschiede in Beta-II-Mikroglobulin Expression.

Von 5 Untersuchungsergebnissen jeweils voneinander unabhängiger Proben wurde der Mittelwert als  $\pm$ S.E.M (Standard Error of means= Standardabweichung der Mittelwerte) dargestellt. Die Untersuchung wurde als eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um die Ergebnisse der einzelnen Proben mit ihren zugehörigen Kontrollkulturen zu vergleichen wurde der Student-t-Test verwendet.

#### 4.5.1 EPO und die Expression des muskarinergen M1-Rezeptors (M1R)



**Abb. 10: Expression von M1 mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO**

(Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

##### a) unter normoxischen Bedingungen

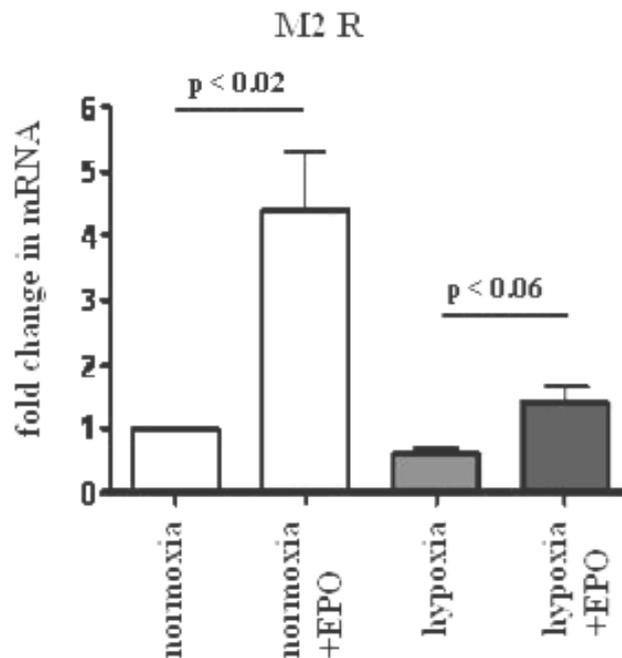
Eine Gabe von EPO führte zu einer ca. 4,5 fachen Steigerung in der M1R Expression (vgl. Abb. 10, N +EPO mit N).

##### b) unter hypoxischen Bedingungen

Eine Zugabe von EPO führte zu einer gesteigerten Expression. Hinsichtlich der hypoxischen Kontrollkultur zeigte sich eine Verdopplung dieser Ausgangswerte (vgl. Abb. 10, H +EPO mit H).

#### **4.5.2 EPO und die Expression des muskarinergen M2-Rezeptors (M2R)**

Sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen führte die zusätzliche Gabe von EPO zu einer vermehrten Expression des M2R (siehe Abb. 11).



**Abb. 11: Expression von M2 mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO**

(Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group),

##### a) unter normoxischen Bedingungen

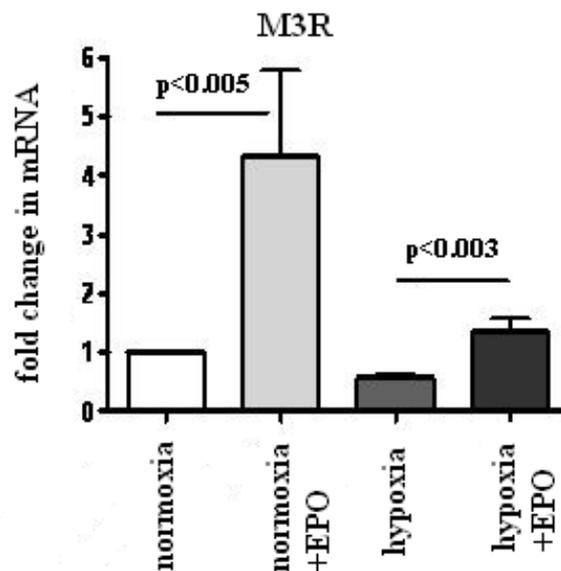
Konfrontierte man eine normoxischen Kultur mit EPO, so zeigte sich im Vergleich zur Kontrollkultur eine um etwa vierfache Steigerung der M2R Expression (vgl. Abb. 11, N +EPO mit N).

##### b) unter hypoxischen Bedingungen

Auch die Expression des M2R zeigte unter hypoxischen Bedingungen eine Reduktion. Eine zusätzliche Gabe von EPO führte zu einer gesteigerten mRNA Produktion (vgl. Abb. 11, H +EPO mit H).

#### **4.5.3 EPO und die Expression des muskarinergen M3-Rezeptors (M3R)**

Vergleichbar zum M2R fand sich bei der mRNA Expression von M3R eine Steigerung durch Zugabe von EPO (siehe Abb. 12).



**Abb. 12: Expression von M3 mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO**

(Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group),

##### a) unter normoxischen Bedingungen

Ähnlich wie bei M2R, führte eine Gabe von EPO unter normoxischen Bedingungen zu einer Steigerung der M3R mRNA (vgl. Abb. 11 und Ab. 15, N +EPO mit N). Im Vergleich zur normoxischen Kontrollkultur fand sich eine um etwa vierfache Erhöhung (vgl. Abb. 12c, N +EPO mit N).

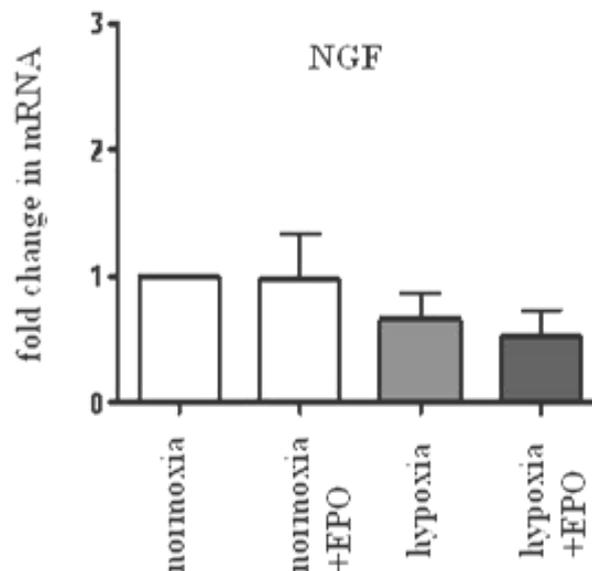
##### b) unter hypoxischen Bedingungen

Unter Hypoxie zeigte sich tendenziell eine Verminderung in der Expression des M3R (vgl. Bild 8c, H mit N). Ein Anstieg der Werte auf das Niveau der normoxischen Kontrollgruppe wurden in etwa erreicht durch Gabe von EPO (vgl. Abb. 12, H +EPO mit N). Auch hier zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei der Expression der mRNA von M2R (vgl. Abb. 11 mit Abb. 12, H +EPO). Ähnlich wie

beim M2R war die Expression des M3R jedoch deutlich geringer als diejenige der normoxischen Kultur unter Zugabe von EPO (vgl. Abb. 12, H +EPO mit N +EPO).

#### **4.5.4 Die Wirkung von EPO auf die Expression des Nerven-Wachstumsfaktors (NGF)**

Weder Hypoxie noch EPO scheint einen signifikanten Effekt auf die Produktion des NGF zu haben (siehe Abb. 13).



**Abb. 13: Expression von NGF mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO**

(Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

##### a) unter normoxischen Bedingungen

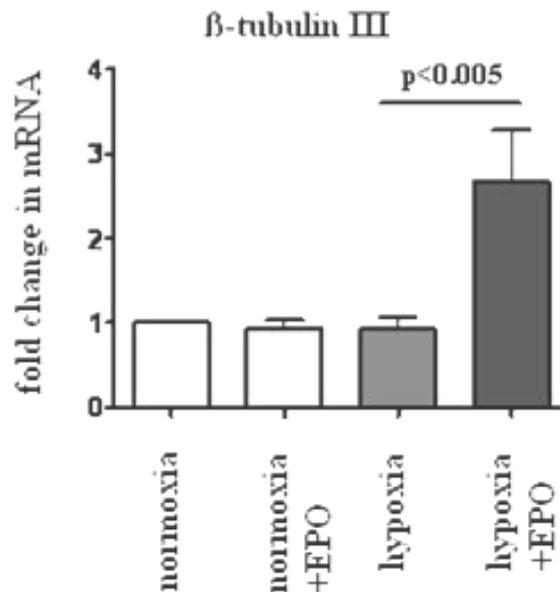
Es zeigte sich keine wesentliche Veränderung der NGF Expression unter Zugabe von EPO (vgl. Abb. 13, N +EPO mit N).

##### b) unter hypoxischen Bedingungen

Auch Hypoxie und die zusätzliche Gabe von EPO hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die NGF Expression (vgl. Abb. 13, H und H +EPO).

#### **4.5.5 Einfluss von EPO auf die Expression von Beta-Tubulin III**

Die Veränderungen der mRNA Expression des Beta-III-Tubulins wurden mit Bezug auf die Mittelwerte der normoxischen Kulturen berechnet (siehe Abb. 14). Eine Kombination von Hypoxie und EPO scheint sich positiv auf die Produktion von Beta-Tubulin III auszuwirken.



**Abb. 14: Expression von  $\beta$ -Tubulin-III mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO**  
(Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

##### a) unter normoxischen Bedingungen

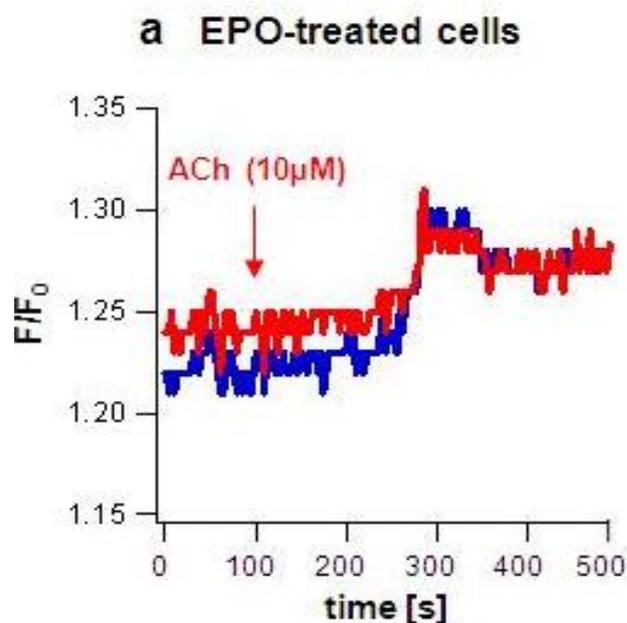
Die Expression des Beta-Tubulin III änderte sich nicht bei den normoxischen Kulturen nach Gabe von EPO (vgl. Abb. 14, N +EPO mit N).

##### b) unter hypoxischen Bedingungen

Unter hypoxischen Bedingungen und EPO Gabe zeigte sich eine Steigerung der Beta-Tubulin III Expression (vgl. Abb. 14, H mit N). Es findet sich zu der hypoxischen Kontrolle eine um das 2,5 fache gesteigerte Exprimierung von Beta-Tubulin III (vgl. Abb. 14, H +EPO mit N und mit H).

#### **4.6 Veränderung der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>- Konzentration/Calcium(Ca<sup>2+</sup>) durch EPO-Exposition; Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Technik**

Um die Änderungen intrazellulärer Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup> unter dem Einfluss von EPO zu untersuchen, wurden 3 Probenansätze verwendet. Als Kontrollgruppe wurde eine hypoxische Kultur ohne Zugabe von EPO verwendet. Eine Endkontrolle stellte eine mit EPO und Atropin behandelte Kultur dar. Es wurden 16 repräsentative Messungen durchgeführt, von denen 2 in der unten stehenden Grafik dargestellt sind.



**Abb. 15a: Darstellung intrazellulärer Calcium Freisetzung von hMSC, ausgelöst durch ACh unter hypoxischen Bedingungen und unter Zugabe von EPO**

Fura-2- beladene hMSC, die mit EPO behandelt wurden und hypoxischen Umgebungsbedingungen kultiviert worden waren, wurden mit ACh (10 µm für 30 Sekunden) konfrontiert, während man die intrazellulären Calcium Freisetzung darstellte ( $F/F_0$  (a-c) ist das Verhältnis der Fura-2-Fluoreszenz bei 353 und 390 nm). Die Mehrzahl der Zellen (hier sind 2 von 16 repräsentativen Messung dargestellt, wobei jede Farbe das Calcium Signal einer einzelnen Zelle darstellt), die unter Hypoxie mit EPO konfrontiert worden waren, reagierte auf ACh mit einem Anstieg ihres intrazellulären Calcium Spiegels.

(Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

### a) nach Behandlung mit EPO und Acetylcholin

Acetylcholin ist dafür bekannt, durch Aktivierung von muskarinergen Rezeptoren die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme zu fördern.

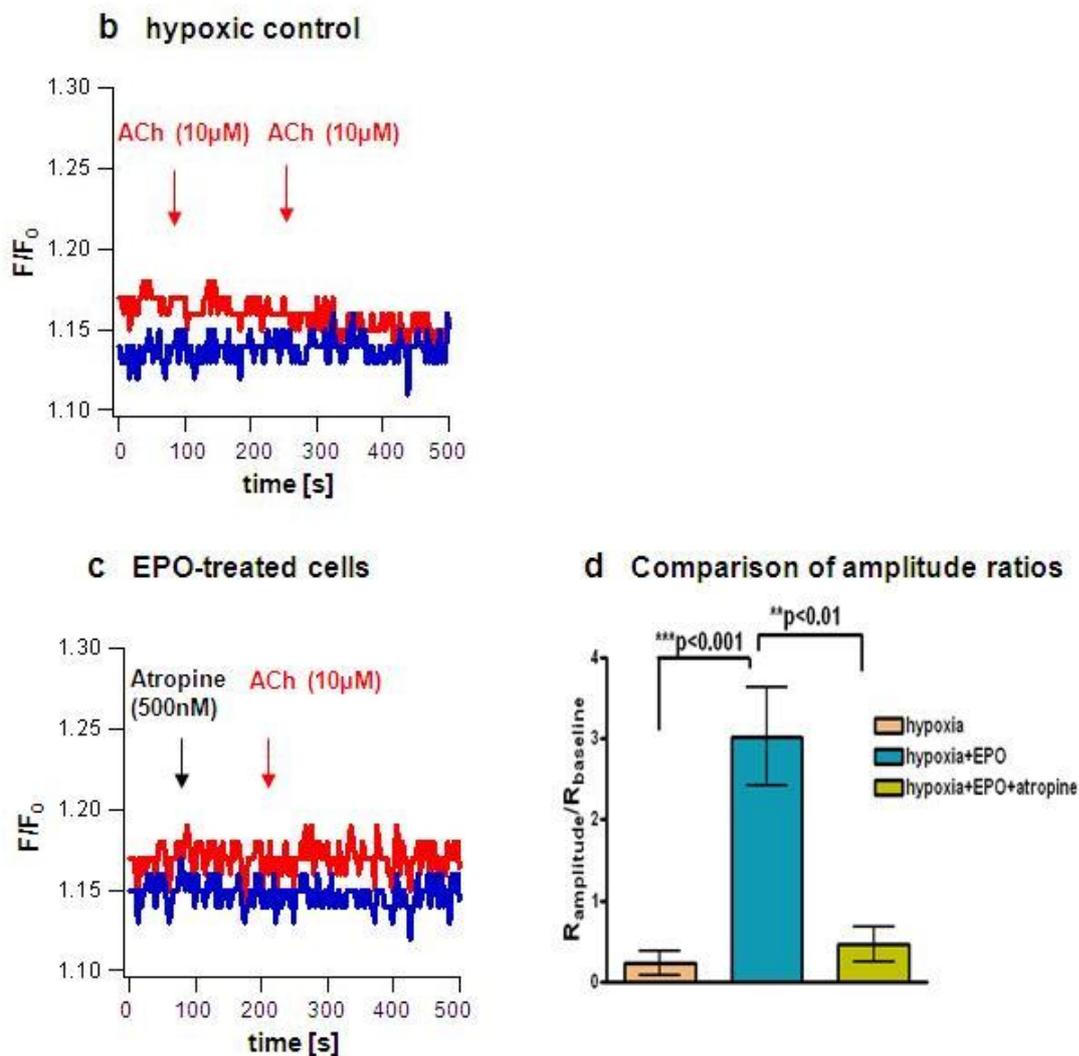
Hypoxische Kulturen von hMSC unter Zugabe von EPO reagierten ebenfalls nach einer zusätzlichen Gabe von  $10 \mu\text{M}$  ACh für 30 Sekunden mit einem deutlichen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Anstieg (Abb. 15a). Der Anstieg zeigte sich deutlich nach 150 Sekunden.

### b) bei der hypoxischen Kontrollgruppe

Trotz einer zweimaligen 30 Sekunden dauernden Applikation von jeweils  $10 \mu\text{M}$  ACh nach 100 sowie 250 Sekunden, konnte keine relevante intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Steigerung bei den hypoxischen Kontrollkulturen gefunden werden (vgl. Abb. 15b). Insgesamt zeigten die hypoxischen Kulturen niedrigere Ausgangswerte für intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  als die mit EPO behandelten Kulturen (vgl. Abb. 15a und Abb. 15b).

### c) Nach Atropin-Gabe

Atropin hemmt muskarinerge Rezeptoren. Nachdem die mit EPO behandelten hypoxischen Kulturen nach 100 Sekunden mit  $500 \text{ nM}$  Atropin behandelt wurden, zeigte sich nach Gabe von ACh (nach weiteren 100 Sekunden) kein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (vgl. Abb. 15c). Ein vergleichbarer Peak wie bei den lediglich mit EPO behandelten Zellen ohne Zugabe von Atropin konnte nicht gefunden werden (vgl. Abb. 15a und Abb. 15c).



**Abb. 15 b-d: Darstellung intrazellulärer Calcium Freisetzung von hMSC, ausgelöst durch ACh unter hypoxischen Bedingungen und unter Zugabe von EPO**

c) mit EPO behandelt b) hypoxische Kontrollkultur d) Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung nach Zugabe von ACh und Atropin.

Fura-2- beladene hMSC unter hypoxischen Umgebungsbedingungen, die mit EPO behandelt worden waren, wurden mit ACh ( $10\mu\text{m}$  für 30 Sekunden) konfrontiert, während man die intrazellulären Calcium Freisetzung darstellte ( $F/F_0$  (a-c) ist das Verhältnis der Fura-2-Fluoreszenz bei 353 und 390 nm). Die MSC der Kontrollkulturen unter Hypoxie zeigten eine verminderte Funktionalität ihrer muskarinergen Rezeptoren, was sich nach Konfrontation mit ACh in einer gleichbleibenden intrazellulären Calcium-Freisetzung darstellte (b). Bei Kontrollexperimenten wurde Atropin verwendet, um die muskarinergen Rezeptoren der mit EPO behandelten Zellen zu blockieren (c). Vergleicht man die jeweiligen Konzentrationen des intrazellulären Calciums, so zeigt sich eine höhere intrazelluläre Calcium Konzentration nach Stimulation mit ACh bei den mit EPO behandelten Zellen im Vergleich zu den hypoxischen Kulturen<sup>2</sup> oder den mit Atropin behandelten Kulturen. (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

### d) Direktvergleich der einzelnen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen

Vergleicht man die erhaltenen Daten miteinander, so erkennt man sehr deutlich, dass es vor allem bei Kulturen unter der Zugabe von EPO zu einem starken Anstieg der Intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen kommt. Der Wert ist fast 3-fach so groß wie derjenige der hypoxischen Kontrollkultur (vgl. Abb. 15d, H +EPO mit H). Unter hypoxischen Bedingungen alleine steigt die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nicht an (vgl. Abb. 15d, hypoxia mit hypoxia +EPO). Offenbar ist EPO, aufgrund der Blockade der muskarinergen Rezeptoren mit Atropin, nicht in der Lage die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, zu steigern (vgl. Abb. 15d, hypoxia +EPO +Atropin mit hypoxia und mit hypoxia +EPO).

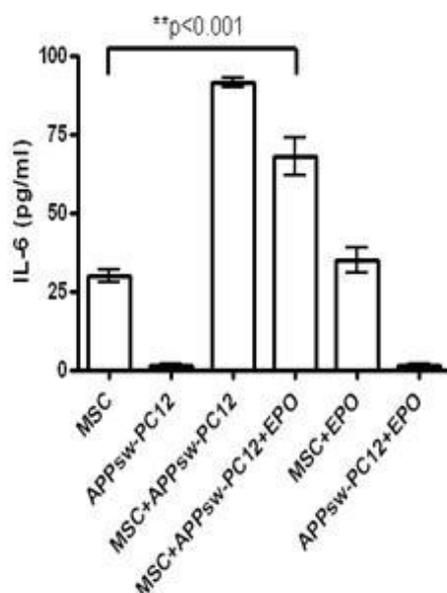
### 4.7 Interleukin Freisetzung der Kokultur von mMSC mit APPsw-PC12 Zellen

APPsw-PC12 Zellen sind durch eine Mutation im humanen Amyloid-Vorläuferprotein (APPsw) vermehrt in der Lage, Abeta zu produzieren [82]. Durch eine Kokultivierung mit diesen Zellen werden Alzheimer-ähnliche Umgebungsbedingungen geschaffen. Aus allen gemessenen inflammatorischen Zytokinen zeigten nur das Interleukin 6 (IL-6) sowie der Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierende-Faktor (GM-CSF) messbare Werte, die Konzentrationen anderer Zytokine ( IL-1 $\beta$ , IL-2,IL-4,IL-5, IL-10, IL-12 ( p70), IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ ) befanden sich weit unter der Nachweisgrenze (<5pg/ml). Die Monokulturen der mMSC wurden dabei jeweils als Kontrollproben verwendet.

#### 4.7.1 Die Wirkung von EPO auf die Produktion des Interleukin 6 (IL-6)

##### a) bei murinen MSC (mMSC)

Eine Gabe von EPO wirkte sich nicht auf die IL-6 Freisetzung in Monokulturen von hMSC aus (vgl. Abb. 16, MSC +EPO mit MSC).



**Abb. 16: Analyse der IL6-Freisetzung in das Zellkulturmedium von Kokulturen von APPsw-PC12 Zellen mit mMSC (MSC +APPsw-PC12) im Vergleich zu Monokulturen (MSC oder APPsw-PC12)** (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

##### b) bei APPsw-PC 12 Zellen von Ratten

Eine Monokultur der APPsw-PC 12 Zellen zeichnete sich im Vergleich zur MSC-Monokultur durch eine geringe Freisetzung von IL-6 aus (vgl. Abb. 16, APPsw-PC12). Dieses Verhältnis änderte sich auch nicht nach einer Inkubation der Zellen mit EPO (vgl. Abb. 16, APPsw-PC12 +EPO mit APPsw-PC12). Hinsichtlich der Kontrollkulturen (MSC) fand sich bei beiden Ansätzen mit APPsw-PC 12 eine um ca. 25 pg/ml verminderte Freisetzung von IL-6 (vgl. Abb. 16, APPsw-PC12 mit MSC und APPsw-PC12 +EPO mit MSC).

### c) bei der Kokultivierung von MSC und APPsw-PC 12 Zellen

Bei der Kokultur der beiden Zellarten, zeigte sich, hinsichtlich der Kontrollkultur (MSC), eine 3-fach vermehrte IL-6-Freisetzung (vgl. Abb. 16, MSC +APPsw-PC12 mit MSC). Betrachtet man die APPsw-PC 12-Monokultur als Kontrolle, so liegt die Kokultur mit 90 pg/ml weit darüber (vgl. Abb., 19, MSC +APPsw-PC12 mit APPsw-PC12).

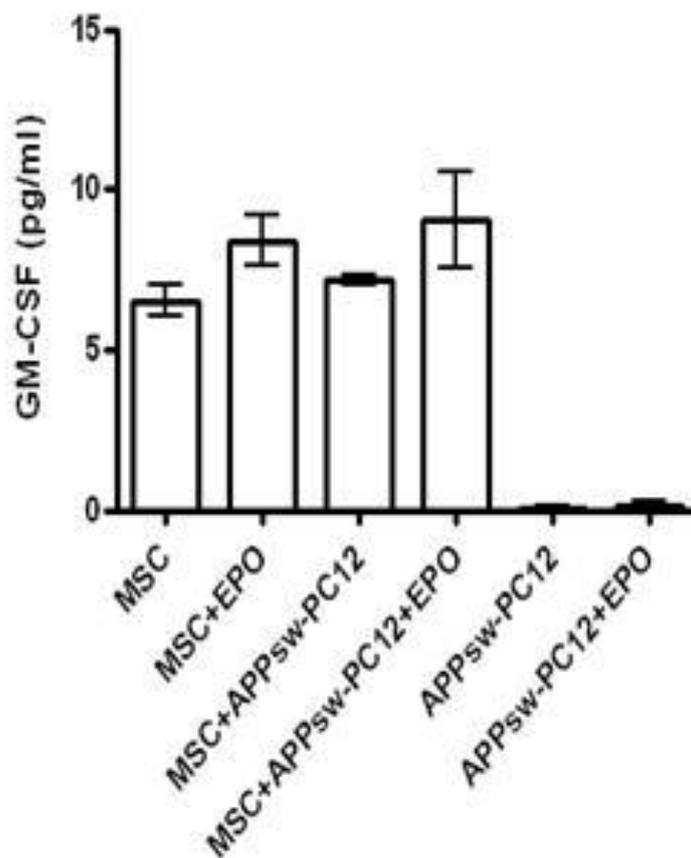
Eine zusätzliche Gabe von EPO führte zu einer reduzierteren IL-6-Produktion um ca. 20 pg/ml (vgl. Abb. 16, MSC +EPO +APPsw-PC12 mit MSC +APPsw-PC12). Hinsichtlich der Kontrollkultur liegt die IL-6-Freisetzung dieses Ansatzes jedoch noch immer um ca. 35 pg/ml höher (vgl. Abb. 16, MSC +EPO +APPsw-PC12 mit MSC).

Vergleicht man mit diesem Ansatz noch die APPsw-PC 12-Monokulturen (jeweils mit und ohne Zugabe von EPO), findet sich eine um 60 pg/ml erniedrigte IL-6-Produktion (vgl. Abb. 16, MSC +EPO +APPsw-PC12 mit APPsw-PC12 und mit APPsw-PC12 +EPO).

#### **4.7.2 Einfluss der EPO Exposition auf die Produktion des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktors (GM-CSF)**

##### **a) bei murinen MSC (mMSC)**

Bei den Monokulturen der mMSC liegt die Freisetzung des GM-CSF bei ca. 6 pg/ml (Abb. 17, MSC). Durch eine Zugabe von EPO wurde die GM-CSF-Produktion nicht beeinflusst (vgl. Abb. 17, MSC +EPO mit MSC).



**Abb. 17: Analyse der GM-CSF-Freisetzung nach einer Kokultivierung von APPsw-PC12-Zellen mit murinen mMSC im Vergleich zu Monokulturen von mMSC und APPsw-PC 12 (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)**

### b) bei APPsw-PC 12 Zellen aus der Ratte

Im Vergleich mit Monokulturen von mMSC fand sich bei den Monokulturen der APPsw-PC- 2 Zellen eine noch geringere Freisetzung des GM-CSF (vgl. Abb. 17, APPsw-PC12 mit mMSC). Durch eine zusätzliche Gabe von EPO konnte diese ebenfalls nicht verändert werden (vgl. Abb. 17, APPsw-PC12+EPO mit APPsw-PC12).

### c) bei der Kokultivierung von MSC- und APPsw-PC 12-Zellen

Betrachtet man die Kokulturen der beiden Zellarten, so zeigt sich im Vergleich zur mMSC Kontrollkultur keine Veränderung bei der GM-CSF Freisetzung (vgl. Abb. 17, APPsw-PC12 +MSC mit MSC). Da eine Produktion des GM-CSF durch Zellen einer Monokultur von APPsw-PC 12 kaum messbar ist, findet man hier hinsichtlich der Kokulturen eine Differenz von ca. 6-6,5 pg/ml im Vergleich zur Monokultur von APPsw-PC 12 (vgl. Abb. 17, APPsw-PC12 +MSC mit APPsw-PC12). Eine zusätzliche Gabe von EPO führte nicht zu signifikanten Veränderungen in der GM-CSF Freisetzung (vgl. Abb. 17, APPsw-PC12 +MSC +EPO mit APPsw-PC12 +MSC).

In Anbetracht der normoxischen Kultur unter Zugabe von EPO zeigt sich im Vergleich bei diesem Ansatz keine Änderung in der GM-CSF-Freisetzung (vgl. Abb. 17, APPsw-PC12 +MSC +EPO mit MSC +EPO). Da die vergleichbare Kultur der APPsw-PC 12-Zellen unter Gabe von EPO eine minime Freisetzung an GM-CSF zeigt, findet sich hier eine Differenz von ungefähr 9 pg/ml (vgl. Abb. 17, APPsw-PC12 +MSC +EPO mit APPsw-PC12 +EPO).

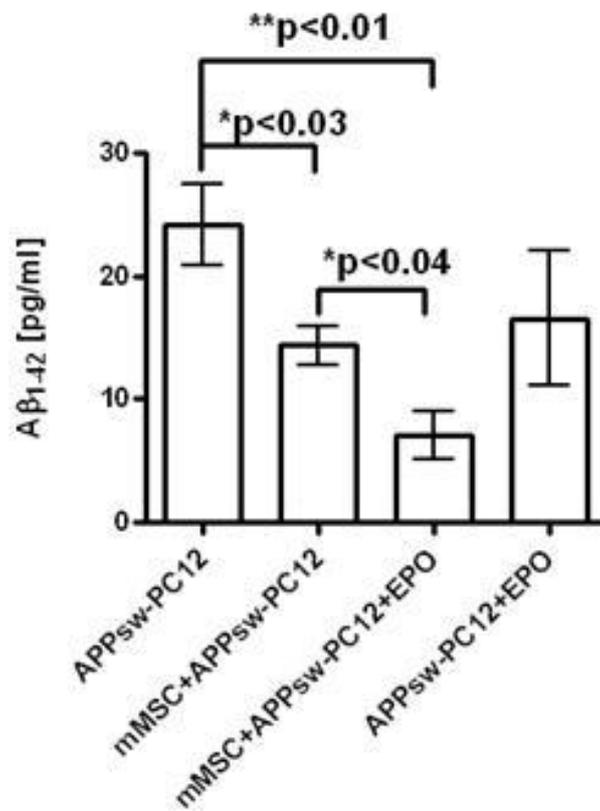
#### **4.8 Analyse der Abeta1-42-Produktion mittels ELISA**

##### **a) bei APPsw-PC 12-Zellen**

Spitzenwerte bei der Abeta Produktion zeigten sich bei den Monokulturen der APPsw-PC 12-Zellen. Werte von bis zu 23 pg/ml wurden erreicht (Abb. 18, APPsw-PC12). Eine Zugabe von EPO führte zu keiner signifikanten Reduktion des Abeta (vgl. Abb. 18, APPsw-PC12 +EPO mit APPsw-PC12).

##### **b) bei der Kokultivierung von mMSC- und APPsw-PC 12-Zellen**

Die Kokulturen der beiden Zellarten, verglichen mit der Monokultur der APPsw-PC 12 Zellen, führten zu einer um ca.10 pg/ml verminderten Abeta-Produktion (vgl. Abb. 18, APPsw-PC12 +MSC mit APPsw-PC12). Versetzte man den Ansatz mit EPO, so reduzierte sich die Abeta-Produktion auf 7 pg/ml und erreichte somit den niedrigsten Wert (vgl. Abb. 18, APPsw-PC12 +MSC +EPO). Die Differenz zur Monokultur der APPsw-PC 12-Zellen betrug 16 pg/ml (vgl. Abb. 18, APPsw-PC12 +MSC +EPO mit APPsw-PC12), zur Monokultur unter Zugabe von EPO ca. 6 pg/ml (vgl. Abb. 18, APPsw-PC12 +MSC +EPO mit APPsw-PC12 +EPO) und zur Kokultur der beiden Zellarten ebenfalls ca. 6pg/ml (vgl. Abb. 18, APPsw-PC12 +MSC +EPO mit APPsw-PC12 +MSC).



**Abb. 18: ELISA-Messung von Aβ<sub>1-42</sub> im Zellkulturüberstand nach einer Kokultivierung von APPsw-PC12-Zellen mit mMSC im Vergleich zu Monokulturen (APPsw-PC 12 und mMSC)** (Quelle: Danielyan et al. 2009, Cell death and differentiation 16: 1599-1614, © nature publishing group)

## **5. Diskussion**

Die Frage, die zu den durchgeführten Untersuchungen führte, war, ob und wie die Gabe von EPO die Differenzierung, die Funktionalität und das Überleben humaner MSC bei toxischen Umgebungsbedingungen am Beispiel der Hypoxie, Glutamat und Abeta-Exposition, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen vorgefunden werden, beeinflusst.

1.) In Bezug auf die Frage, ob EPO in der Lage ist MSC vor schädigenden Noxen wie z. B. Glutamat, Hypoxie und erhöhten Abeta-Konzentrationen zu schützen, wurden die MSC Glutamat exponiert, um so toxische Umgebungsbedingungen zu erreichen. Das Maß des Zelluntergangs wurde anhand der LDH-Freisetzung mit und ohne EPO Zugabe evaluiert. Die Apoptoserate der Zellen wurde jeweils über eine TUNEL Färbung quantifiziert. Hierbei wurde unter anderem eine Verminderung der GFAP-positiven Populationen unter hypoxischen Bedingungen und EPO-Gabe festgestellt. Diese Verminderung lässt sich nicht alleine durch die Verstärkung des Zelltods erklären, denn:

- EPO wurde eine schützende Funktion hinsichtlich Zelltod und/oder einer durch Glu verursachten Toxizität zugewiesen [84].
- Eine Abnahme der im Zelltod befindlichen Zellen konnte durch eine Färbung mittels TUNEL quantifiziert werden (Abb. 7). Dies wurde auch bei in vivo-Untersuchungen zu EPO im ZNS von Sola et al. gezeigt [85].

Die große Bedeutung für die In-vivo-Implantation von in-vitro-kultivierten und differenzierten MSC und deren Fähigkeit, ihre Differenzierung und Funktion unter hypoxischen Umgebungsbedingungen aufrecht zu erhalten (wie sie in neurodegenerativen Erkrankungen vorherrschen), wird umso deutlicher, wenn man die unterschiedlichen organspezifischen Sauerstoffpartialdrücke ( $PO_2$ , Tabelle 11) miteinander vergleicht. Hier wird klar, dass Hirngewebe ein hypoxisches Milieu für MSC darstellen kann. Dies spielt für experimentelle Ansätze mit dem Versuch einer MSC Applikation in das ZNS von Versuchstieren eine entschei-

dende Rolle (vgl. Sauerstoffpartialdruck im Knochenmark mit Hirngewebe in Tabelle 11).

Kompartiment	Sauerstoffpartialdruck (Referenzwerte)
Trockene atmosphärische Luft	159 mmHg
Alveoläre Luft	100 mmHg
Arteriellles Blut	95 mmHg
Kapillares Blut	45 mmHg
Knochenmark	55 mmHg
Hirngewebe (7-12 mm unterhalb der Dura mater)	33 mmHg
Hirngewebe (12-17 mm unterhalb der Dura mater)	33 mmHg
Hirngewebe (17-22 mm unterhalb der Dura mater)	26 mmHg
Hirngewebe (22-27 mm unterhalb der Dura mater)	24 mmHg

**Tabelle 11:** Sauerstoffpartialdrücke in verschiedenen Kompartimenten

Der Sauerstoffpartialdruck ist ein wichtiger Regulator der EPO- Freisetzung im Organismus und wird darüber auch reguliert [86].

Der  $PO_2$  variiert stark zwischen den einzelnen Kompartimenten im Körper, wobei er zum Beispiel [87] im Knochenmark 1,6- bis 2,3-fach höher als im ZNS liegt (Tabelle 11).

Der niedrige Sauerstoffpartialdruck scheint auch ursächlich dafür zu sein, dass MSC der Knochenmarksnische sich keiner neurogenen Differenzierung unterziehen, obwohl auch sie EPO ausgesetzt sind. Offenbar ist dieser niedrige Druck hier wichtig für den Erhalt ihrer multipotenten Fähigkeiten und gleichzeitig werden die Zellen daran gehindert, massiv zu proliferieren [88, 89]. Indessen scheint es jedoch, dass die Fähigkeit des relativ niedrigen Sauerstoffpartialdruckes im Hirn (verglichen mit dem  $PO_2$  des Knochenmarkes) sich nicht nur darauf beschränkt, die neurogene Differenzierung zu fördern, gleichzeitig scheint er auch die protektiven Fähigkeiten der MSC sowie ihre Überlebensfähigkeit zu senken.

Dieser negative Einfluss des niedrigen  $PO_2$ s im Hirn auf das Überleben und die Funktionalität der MSC kann durch die invasive chirurgische Transplantation oder neurodegenerative Erkrankungen noch mehr verstärkt werden, wenn sie durch eine Hypoxie, z. B. durch eine Minderperfusion des Gehirnes, begleitet werden [90].

2.) Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Arbeitshypothese war die Rolle von EPO bei der Proliferation und Differenzierung in Neuronen-ähnliche cholinerge Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen zu klären. Bezüglich dieser Hypothese wurden, wie oben beschrieben, hMSC kultiviert und dann über immunhistochemische und proteinbiochemische Verfahren Marker der neuronalen Differenzierung nachgewiesen. Betrachtet man das ausgewertete Datenmaterial, so zeigt sich, dass

- EPO in der Lage ist, eine neurogene Differenzierung von hMSC zu induzieren,
- diese Differenzierung unter hypoxischen Umgebungsbedingungen sogar noch forciert werden kann.

Diese Ergebnisse wurden durch einen signifikanten Anstieg der spezifischen Neuronen-ähnlichen Marker experimentell dargestellt. Hierzu zählten

- die Expression von  $\beta$ -Tubulin III, NeuN, sowie ChAT,
- eine verstärkte Ausprägung von muskarinergen Rezeptoren (M1R-M3R) unter hypoxischen Bedingungen nach einer zusätzlichen Stimulation mit EPO
- sowie ein Anstieg von Synaptophysin als spezifisches Molekül für die Neuronen-ähnliche Transmitterübertragung.

Offenbar kann dieses „Zusammenspiel“ von EPO und Hypoxie, welches zu einer gesteigerten Ausprägung der neuronalen (Beta-Tubulin-III, NeuN, ChAT), der muskarinergen (M1-, M2- und M3 Rezeptoren) und funktionellen Marker (GLAST, Nephilysin) führt, auch auf eine gesteigerte EPOR-Expression von MSC unter hypoxischen Bedingungen zurückgeführt werden. Ähnlich wie bei

Zwezdaryk et al. [91], fand bei unseren Untersuchungen eine durch Hypoxie induzierte Hochregulation des EPOR statt (Abb. 5). Der Effekt von EPO auf das Überleben der Zellen unter neurotoxischen Bedingungen ist auf die Hochregulation des EPOR unter diesen Bedingungen (Hypoxie etc.) zurückzuführen [92,93]. Gleichzeitig scheint dieser Mechanismus die Differenzierung in gliaähnliche Zellen zu verhindern.

Interessanterweise zeigte sich bei unseren Untersuchungen zu EPO sogar eine gesteigerte Expression von Ach, ChAT, und den zugehörigen muskarinergen Rezeptoren (siehe Abb. 10 – Abb. 15) unter hypoxischen Bedingungen.

Muskarinerge Rezeptoren reagieren auf Acetylcholin (Ach) mit einem intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Anstieg (Abb. 15). Diese Tatsache scheint unter hypoxischen Bedingungen durch EPO positiv beeinflusst zu werden: Die Kontrollgruppe von hMSC, die längere Zeit (48h) unter hypoxischen Bedingungen ohne EPO kultiviert wurde, reagierte auf Ach nicht mit einem intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Anstieg. Die Versuchsgruppe der unter hypoxischen Bedingungen mit EPO kokultivierten hMSC zeigte unter Anwesenheit des muskarinergen Rezeptor-Agonisten Ach überwiegend einen transienten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Anstieg (Abb. 15).

Die Expression von funktionellen M2-Rezeptoren unter normoxischen Bedingungen wurde unter anderem von Hoogduijn et al. beschrieben [94, 95]. Außer der mRNA von M2-Rezeptor wurde jedoch keine weitere mRNA anderer muskarinergen Rezeptortypen (M1, M3-M5) nachgewiesen.

Bei unseren Untersuchungen zeigten sich bei mit EPO behandelten hMSC unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen eine gesteigerte Produktion der mRNA von M1- bis M3-Rezeptoren (Abb. 10 – Abb. 14).

Eine der Funktionen von M1-, M3- und M5-Rezeptoren ist die Regulation intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Spiegel über die Aktivierung der Phospholipase C [96]. Diese wiederum fördert die Freisetzung des Inositol-1,4,5-triphosphates (IP3). Infolgedessen wird dann  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern in das Zytosol freigesetzt.

M2- und M4-Rezeptoren sind primär dafür bekannt, die Adenylatcyclase-Aktivität zu hemmen und die Konzentrationen von cAMP zu reduzieren. Zusätzlich

zeigte sich, dass sie bei einigen Zellarten auch einen stimulatorischen Effekt auf die Phospholipase C haben [97].

In unseren Untersuchungen fand sich ein flüchtiger Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$  bei den EPO-behandelten hMSC als Antwort auf Ach. Dies wird sehr wahrscheinlich durch die Aktivierung der M1- und M3-Rezeptoren, mit darauffolgender Aktivierung der Phospholipase C und einer Freisetzung von IP3 verursacht [96].

Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren spielen bei der kognitiven Funktion eine wichtige Rolle. Vor allem der so genannte M1-Rezeptor hat als einer der Subtypen Einfluss auf das Bewusstsein, die Aufmerksamkeit und sensorische Prozesse [98]. Bei der Entstehung der Alzheimer Demenz scheint die Beeinträchtigung dieses Rezeptors eine wesentliche Rolle zu spielen [99]. Offenbar sind diese Rezeptoren nicht nur in der Lage, Einfluss auf die Produktion des Tau-Proteins, sondern auch auf die Entstehung von Amyloid auszuüben [100].

3.) Die dritte Arbeitshypothese untersuchte den Einfluss von EPO auf die Differenzierung von MSC unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.

In diesem Zusammenhang konnten wir bei der Kultivierung und Differenzierung der hMSC zeigen, dass sie offenbar auch in der Lage sind, Glutamat Synthetase (GS) zu produzieren. Nach Gabe von EPO scheint diese Produktion gesteigert zu werden (Abb. 4). EPO ist demnach in der Lage komplexe Zellsysteme zu kontrollieren und damit ein antitoxisches Milieu zu generieren.

Im zentralen Nervensystem wird GS hauptsächlich durch Astrozyten exprimiert [101-116]. Es ist eines der wichtigsten Enzyme des Glutamin-Glutamat Zyklus. Dieser sichert durch die Verminderung von extrazellulären Glutamatkonzentrationen das Überleben der Neuronen. GS wandelt hierbei das für die Neuronen toxische Glutamat in Glutamin um [117].

Unter pathologischen Bedingungen wie z. B. Ischämie und AD hingegen produzieren die Astrozyten deutlich geringere Konzentrationen von GS. Neurone hingegen beginnen erst unter pathologischen Bedingungen GS zu synthetisieren [118].

Im Vergleich zu den normoxischen Kontrollgruppen waren die Zellen der hypoxischen Kulturen nicht in der Lage, auf 1 mM Glu mit einem Anstieg der GS-Funktion zu reagieren (Abb. 4). Dies kann als Ausdruck ihrer Unfähigkeit gewertet werden, unter gleichzeitiger Konfrontation mit Hypoxie und Glutamat ihre Fähigkeit Glutamat zu metabolisieren, zu erhalten und damit zu überleben.

Mesenchymale Stammzellen sind in der Lage, In-vitro-GS und die Glutamat-Transporter GLAST und GLT-1 zu exprimieren [119], was darauf hinweist, dass sie die Glutamat-metabolisierenden Funktionen von Astrozyten übernehmen können. Jedoch sind MSC unter hypoxischen Bedingungen nicht in der Lage trotz steigender Glutamat-Konzentrationen, ihre GS-Aktivität zu erhöhen (Abb. 4d). Die neuroprotektive Eigenschaft von EPO äußert sich unter anderem in einem Anstieg der GS-Aktivität und der GLAST-Expression. Dadurch wird die unter hypoxischen Bedingungen verminderte Glu-Metabolisierung verbessert und der Glu-induzierte Zelltod verhindert.

4.) Um die Arbeitshypothese zu untersuchen, inwieweit EPO unter hypoxischen Bedingungen ein neuroprotektives Milieu schaffen kann, wurde untersucht,

- ob EPO eine Steigerung der Expression funktioneller neuroprotektiver Proteine wie zum Beispiel GLAST und GS bewirkt

und/oder

- ob EPO die Konzentration von inflammatorischen Zytokinen oder toxischen Molekülen wie Abeta reduzieren kann.

GLAST hat im Rahmen der Glutamataufnahme eine wichtige Funktion als Glutamattransporter [120-123]. GLAST ist typisch für Astrozyten [124]. Unter regulärer neurotoxischen Bedingung ist die Glutamataufnahme der Neurone/Astrozyten durch die hypoxische Umgebungsbedingungen vermindert. Im Gegenteil, es wird sogar noch ein Übermaß an Glutamat freigesetzt [125]. Durch einen extrazellulären Glutamatanstieg werden neurotoxische Bedingungen weiter erhöht, was zu vermehrtem neuronalem Zelluntergang im ZNS führt [126, 127]. Dies wurde in unseren Untersuchungen durch die EPO-Exposition und damit

verbundene Expression von GLAST und GS verhindert und zeigt die essentielle Rolle einer EPO-Exposition.

5.) Um einen funktionellen und klinischen Nutzen, bzw. die genauere Wirkungsweise der Neuroprotektion festzustellen wurden Untersuchungen an Aβ-produzierenden Zellen durchgeführt, um die genauere Wirkungsweise in Bezug auf Neurodegeneration und Alzheimer'sche Erkrankung zu evaluieren.

Die Alzheimer'sche Krankheit ist eine der führenden Ursachen einer Demenz. Mehr als ein Drittel der über 85-Jährigen sind davon betroffen [128]. Sie ist unter anderem gekennzeichnet durch den progredienten Verlust der geistigen Fähigkeiten, einer Reduktion der Ach- sowie der ChAT-Produktion vor allem im Hippocampus [129-132] und einem Verlust der cholinergen Innervation im ZNS beim Patienten [133-136]. Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren spielen eine essentielle Rolle bei verschiedenen Denkprozessen.

Charakteristische Veränderungen umfassen eine Ansammlung von neurofibrillären Bündeln, gebildet aus dem Tau-Protein, sowie eine überhöhte Produktion des Amyloid-Beta-Proteins (Aβ). Auch die Beteiligung von hypoxischen Umgebungsbedingungen bei der Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit wird in letzter Zeit immer wieder diskutiert [137-139]. Man geht inzwischen sogar davon aus, dass Alzheimer eine toxische Folge einer ehemals hypoxischen Erkrankung sein könnte [94]. Hypoxische Umgebungsbedingungen scheinen offenbar nicht nur die Produktion des Amyloid-Vorläuferproteins, sondern eben auch die Expressierung von APP und den spaltenden Enzymen zu fördern [140], was dann letztlich zum Voranschreiten der Krankheit führt.

Doch nicht nur die hypoxischen Umgebungsbedingungen, sondern auch eine Dysfunktion cholinergen Rezeptoren des ZNS scheinen bei der Akkumulation des Aβ bei AD mit beteiligt zu sein [141].

Entscheidend für eine auf Zelltherapie basierende Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit, werden künftig nicht nur Strategien sein, die aus dem Ersatz von beschädigten Neuronen bestehen, sondern auch die Neubildung oder ein Erhalt von cholinergen Zellen wird ein wichtiger Aspekt bei der Behandlung der Alzheimer Erkrankung sein. Letztlich wird es über diesen Weg zu einer Ver-

besserung der cholinergen Signaltransduktion kommen, welcher im Umkehrschluss eine Ablagerung des  $\beta$ -Amyloids und Tau-Proteins verhindern könnte.

6.) Der mögliche Einsatz von hMSC als Zelltherapeutika bei neurodegenerativen Erkrankungen führt zu der Frage, ob diese, einmal in das ZNS transplantiert, in der Lage sind, den toxischen Effekten von Abeta, Hypoxie etc. entgegenzuwirken.

Zur Klärung der Frage, ob EPO hierbei zusätzlich einen entscheidenden Einfluss auf die Abeta-vermittelte Neurotoxizität haben könnte, wurden weiterführende Untersuchungen an Abeta produzierenden Zelllinien durchgeführt.

Die Phäochromozytom-Zelllinie APPsw-PC12 wurde so modifiziert, dass sie in der Lage, war Abeta 1–40 und Abeta 1–42 zu produzieren [142]. Die Kokultivierung von mMSC zusammen mit APPsw-PC12-Zellen zeigte eine vermehrte Produktion von IL-6 (Abb. 16).

Der toxische Effekt von Abeta auf Neurone wird unter anderem in Rattenmodellen zur Alzheimer-Erkrankung in vitro durch vermehrten neuronalen Zelluntergang [143] und eine Entzündungsreaktion [144] gemessen.

In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass

- die Freisetzung von IL-6 durch mMSC, als Reaktion auf die vermehrte Ausschüttung von Abeta der APPsw-PC12 Zellen, durch die Gabe von EPO signifikant reduziert wird (Abb. 16).
- eine EPO-Exposition bei Monokulturen von APPswPC-12-Zellen von Ratten eine komplette Abwesenheit aller gemessenen inflammatorischen Zytokinen im Zellkulturüberstand (Abb. 16) erreichen kann.

Dass die Behandlung mit EPO auch in anderen Krankheitsmodellen und organspezifischen Zellen und Geweben zu einem Abfall der IL-6-Produktion führt, wurde bereits mehrfach festgestellt [145-148].

Weitere mögliche Mechanismen, wie eine EPO-Exposition von MSC eine Abeta-Toxizität mildern können, bestehen in

- einer verminderten Ausschüttung von GM-CSF [144, 149],

- einer Aufnahme des Abetas<sub>1-42</sub> durch die MSC (Abb. 17),
- eine vermehrte Produktion von Neprilysin.

Neprilysin baut im ZNS toxisches Abeta ab [150, 151]. Unter pathologischen Bedingungen, wie z. B. bei der Alzheimer'schen Krankheit, wird Neprilysin an Orten hoher Plaquedichte und Abeta-Bildung vermindert produziert [152, 153]. Offenbar hängt die Produktion des Neprilysins auch unmittelbar mit der Wnt-Signalkaskade zusammen, da durch die Gabe von CRD Fzd7 die Produktion von Neprilysin sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie gehemmt wird (Abb. 9). Zusammengefasst kann die Applikation bzw. Exposition von EPO über verschiedene Mechanismen eine Reduktion der freien Abeta-Konzentration bewirken bzw. dessen Auswirkung mildern und deshalb als therapeutisches Target bei der Alzheimer-Krankheit Verwendung finden.

7.) Zusätzlich zum protektiven Effekt gegenüber Abeta und Neurotoxizität stellte sich die Frage, ob eine Applikation von EPO und hMSC nicht nur neuroprotektiv wirken kann, sondern ob eine Differenzierung in cholinerge Neuronen unter EPO-Einfluss und entsprechenden Umgebungsbedingungen auch ein Ersetzen degenerierter Neuronen vermitteln könnte.

Hinsichtlich dieser Frage scheint es interessant, welche Mechanismen auf die Induktion sowie auf die Aufrechterhaltung des Neuronen-ähnlichen Phänotyps von MSC einen Einfluss haben. Wir untersuchten einerseits, ob EPO

- die Produktion von Wachstumsfaktoren, wie z. B.: NGF (nerve growth factor) und/oder LIF (Leukämie-inhibierender Faktor), fördert, welche bekannterweise die Neuronen-ähnliche Differenzierung von Stammzellen unterschiedlichsten Ursprungs induzieren [154, 155],

und/oder andererseits

- Signalwege aktiviert, die sowohl Wachstum als auch Differenzierung von Zellen beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist die Wnt-Signalkaskade [156-158].

Hierfür untersuchten wir hMSC unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen unter Kokultivierung mit EPO. Bei den mit EPO behandelten hMSC, fand sich sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen keine Veränderung in der Produktion des NGF (Abb. 10 – Abb. 14). Im Gegenteil zeigte sich die Produktion unter hypoxischen Bedingungen mit und ohne Gabe von EPO im Vergleich zur Kontrollgruppe eher noch vermindert. Die Untersuchungen von Mufson et al. und Bruno et al. [159, 160], zeigten, dass bei Alzheimer Patienten eine gesteigerte Produktion des so genannten proNGF, einer Vorstufe des Nervenwachstumsfaktor stattfindet. Parallel dazu fand man dabei aber eine verminderte Produktion des NGF. Während der Umwandlungsphase des Moleküls entsteht aufgrund von fehlerhaften Zellabläufen kein Endprodukt (NGF).

LIF hingegen ist ein Mitglied der Interleukin-6-Familie [161]. Unter normalen physiologischen Umgebungsbedingungen ist der endogene LIF-Spiegel relativ niedrig, wird jedoch nach „Verletzungen“ des ZNS wie z. B. Traumen oder Ischämien massiv gesteigert [162-164]. Es zeigte sich, dass in ischämischem Gewebe- und Zellkulturen, welche sowohl unter Sauerstoff als auch unter Glukose Mangel litten, eine gesteigerte Produktion des Leukämie-inhibierenden Faktors gefunden wurde [165]. Gerade unter solchen Umgebungsbedingungen, die sich wiederum auch bei neurodegenerativen Erkrankungen finden, führt die erhöhte Konzentration des LIF zu einer forcierten Neurone-ähnlichen Differenzierung von MSC [166], vor allem unter hypoxischen Umgebungsbedingungen.

8.) In unseren Untersuchungen zur neuronalen Differenzierung der hMSC spielt in der Literatur auch die Wnt-Signalkaskade eine essentielle Rolle, und zwar durch den Aufbau und die Entwicklung von Synapsen [167, 168]. Eine Hypoxie beeinflusst die Wnt-Signalkaskade negativ und reduziert die  $\beta$ -Catenin-Aktivierung [169]. In letzter Zeit wird der Wnt-Signalkaskade eine immer stärkere Rolle bei der Neurogenese zugesprochen [170]. Dies zeigt sich in einem verminderten Regenerationspotential der gliartigen Progenitorzellen und einer vermehrten Phosphorylierung des Beta-Catenins [171].

Danielyan et al. konnten 2009 zeigen, dass EPO sowohl unter normoxischen, aber vor allem auch unter hypoxischen Bedingungen die Produktion des Wnt3a bei hMSC (Abb. 9) fördert [172]. Wnt3a wird im ZNS hauptsächlich von hippocampalen Stamm- und Progenitorzellen produziert. Es scheint nicht nur bei der postsynaptischen Differenzierung [70], sondern auch bei der Neurogenese im Hippocampus und in der subventrikulären Zone als ein intrinsischer Faktor eine große Rolle zu spielen [71]. Bekanntermaßen hemmt CRD-Fzd7 die Produktion des Wnt3a und vermindert so die Aktivierung von Beta-Catenin [173]. Auch in unseren Studien wurde durch Zugabe von CRDFzd7 die Aktivierung des Wnt Signalweges durch EPO vollständig verhindert (Abb. 9).

Bedenkt man, dass EPO auch die Expression und Funktionalität des M1-Rezeptors hochreguliert, wäre es also durchaus möglich, dass eine Interaktion zwischen den muskarinergen und Wnt Signalkaskaden letztlich dem neuroprotektiven Effekt durch die M1-Rezeptor-Aktivierung unterliegt, und zwar durch eine Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3b-Aktivität und einer Konstanzhaltung des zytosmatischen und nukleären Beta-Catenin-Spiegels [174]. So könnte die Stilllegung der Wnt-Signalkaskade durch die bestehende Abeta-Toxizität mittels EPO aufgehoben werden.

Zusätzlich hierzu verhindert der Wnt-Signalweg (vor allem Wnt3a) auch die osteogene Differenzierung der hMSC [175]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die durch EPO geförderte Mehrbildung von ChAT, Neprilysin, GLAST und LIF in den hMSC unter hypoxischen Bedingungen durch CRDFzd7 verhindert wird (Abb. 9). Auch die Ach-Bildung der hMSC, induziert durch EPO unter der Konfrontation mit Glu, führte nach Gabe von CRD Fzd7 zu einer Reduktion auf Werte im Bereich der Kontrollgruppen (Abb. 9).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass EPO den Phänotyp Neurogen-ähnlich differenzierter hMSC stabilisieren kann, indem es die Produktion des Wnt3A verstärkt. Auch die gesteigerte Überlebensfähigkeit der mit EPO behandelten hMSC unter Exposition mit Glutamat und/oder Hypoxie könnte mit der Wnt3a-Aktivität zusammenhängen.

Der negative Effekt von CRDFzd7 auf die neuroprotektiven und antiapoptotischen Effekte der EPO-Exposition konnte durch Quantifizierung von TUNEL-

positiven hMSC verdeutlicht werden (Abb. 5 – Abb. 7). Eine 8-fach erhöhte Anzahl an TUNEL-positiven Zellen nach Gabe von CRD Fzd7, mit oder ohne Zugabe von EPO sowie unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen legt jedoch auch einen EPO-unabhängigen Einfluss der Fzd7-Signalkaskade auf das Überleben der hMSC nahe.

9.) Insgesamt handelt es sich bei all unseren durchgeführten Experimenten um In-vitro-Experimente, was eine differenzierte Diskussion der von uns veröffentlichten Ergebnisse erfordert, da eine generelle Übertragbarkeit auf In-vivo-Situationen nicht möglich ist. Weitere Experimente, die eine Bestätigung der Ergebnisse am Tiermodell zeigen, sollten deswegen durchgeführt werden. Hierbei wären unter anderem Versuche an Tiermodellen der Alzheimer Erkrankung mit verstärkter Abeta-Produktion hilfreich. So konnte inzwischen gezeigt werden, dass aus Nabelschnurblut gewonnene humane MSC die kognitive Beeinträchtigung und die neuropathologischen Befunde in einem Mausmodell der Alzheimer Erkrankung unter anderem durch eine Verminderung der Entzündungsreaktion verbessern können [176]. Der genaue Mechanismus bleibt noch zu beleuchten. Unter anderem wäre es hier interessant zu untersuchen, ob eine cholinerge Differenzierung der MSCs, wie sie unsere In-vitro-Untersuchungen zeigen, für das bessere neurologische Outcome verantwortlich sein könnten, indem sie Funktionen beeinträchtigter Neuronen übernehmen, oder ob die MSCs durch Veränderung des Milieus die vorhandenen Neuronen vor einer Degeneration bewahren und die cholinerge Transmission aufrecht erhalten.

Im ZNS dieser Tiere stellen sich dann im experimentellen Ansatz weitere Schwierigkeiten, weil weder die Frage des Verabreichungsweges der MSC noch der EPO-Exposition unter In-vitro-Bedingungen derzeit ausreichend untersucht sind. Zur Administration von MSC zeigt sich in der Literatur, dass bei Applikation ein peripheres Pooling entsteht und die tatsächliche Menge, die das ZNS erreicht deutlich geringer ausfällt als die Applikationsdosis, und damit das therapeutische Potential begrenzt scheint, bzw. hohe Applikationsdosen erfordert und damit ein höheres Nebenwirkungspotential besitzt. Die direkte z. B. hippocampale oder intraventrikuläre chirurgische Implantation, wie sie in Tier-

modellen durchgeführt wird [177-179], bleibt in der humanen Anwendung fraglich. Eine transnasale Applikation wie von Danielyan et al. 2009 beschrieben [180], könnte hier einen deutlichen Vorteil erbringen, da das periphere Pooling und die Blut-Hirn-Schranke besser umgangen werden. Beispielsweise konnten über eine transnasale Applikation von MSC die klinischen Symptome sowie die Expression von Entzündungsfaktoren bei einem Tiermodell der Parkinson-Erkrankung reduziert werden [181]. Eine zusätzliche Applikation von EPO könnte in diesem Versuchsansatz weiteren Aufschluss über das Zusammenspiel von EPO und MSC unter neurotoxischen Bedingungen erbringen.

Weitere Daten zeigen, dass in Tiermodellen der Alzheimer-Erkrankung eine intrazerebrale Transplantation von MSC die Amyloid-Beta-Ablagerungen, die Abeta-Konzentration sowie die Hyperphosphorylierung [177, 179] des Tau-Proteins reduziert. In unserer Arbeit konnten wir zeigen dass MSCs in vitro Abeta aufnehmen können. Ob dieser Mechanismus eine entscheidende Rolle spielt, sollte in den besagten Tiermodellen näher beleuchtet werden.

Neben der Frage, wie die MSCs in das ZNS gelangen, um die von uns beschriebene protektive Wirkung zu entfalten, bleibt die Frage zu klären, ob eine zusätzliche EPO-Applikation, das Überleben der MSC im In-vivo-Modell in gleicher Weise verbessern kann wie unsere In-vitro-Daten das zeigen konnten. Hierfür müssen weitere Untersuchungen am Tiermodell durchgeführt werden. Bei einer zusätzlichen In-vivo-EPO-Applikation muss dann auch der zeitliche Aspekt in den näheren Fokus gebracht werden, um einen optimalen Applikationszeitpunkt zum Einsatz von EPO zu untersuchen. Entscheidend für das Überleben und die therapeutische Wirkung der MSC könnte neben dem genauen Zeitpunkt des MSC-Einsatzes im Krankheitsverlauf die Frage sein, ob eine zusätzliche Kultivierung mit EPO vor der MSC-Transplantation/-Applikation oder ein systemischer EPO-Einsatz nach MSC-Transplantation/-Applikation Vorteile bringt. Hierbei sollte in weiteren Tierexperimenten geklärt werden, ob MSC ihre neuroprotektive Wirkung prophylaktisch und/oder therapeutisch entfalten können.

In unseren Untersuchungen wurden klassische Signalkaskaden der Neurodegeneration und Differenzierung mit ihren Transmittern und Rezeptoren unter-

sucht (z. B. Glutamattoxizität), die in der Literatur häufig beschrieben sind. In der Literatur gibt es aber vor allem Anhalt, dass eine Wirkung der MSC in vivo maßgeblich durch die Modulation des Immunsystems und Aktivierung der Mikrogliaaktivität vermittelt wird [176, 179]. Es bleibt also zu zeigen, ob die von uns untersuchten Kaskaden und Faktoren tatsächlich auch in vivo entscheidend für die beschriebene MSC und EPO Wirkung sind.

Zusammengefasst konnten wir in unserer Arbeit „Survival, neuron-like differentiation and functionality of mesenchymal stem cells in neurotoxic environment: the critical role of erythropoietin“ [172] eine entscheidende Rolle von EPO im Überleben, in der Funktionalität und im protektiven Effekt von hMSC unter neurotoxischen Bedingungen, wie z. B. Hypoxie, Glutamat- und Abeta-Exposition, zeigen. Deshalb sollte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, ob bei Therapieansätzen mit MSC im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen eine zusätzliche Applikation von EPO die Resistenz und das Überleben der MSC unter den vorbestehenden pathologischen Bedingungen fördern kann und ein erhöhtes therapeutisches Potential damit einhergeht.

## **6. Zusammenfassung**

Erythropoietin (EPO) hat eine Schlüsselrolle auf das Überleben und die Funktionalität von hMSC [171]. Unter neurotoxischen Bedingungen (bestehend aus Hypoxie, Glutamat und Abeta Exposition), die charakteristisch für einige neurodegenerative Erkrankungen sind, zeigt EPO ein protektives Potential, welches die Differenzierung und das Überleben von MSC begünstigt.

Durch die zunehmende Erforschung der Pathomechanismen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie z. B. Morbus Alzheimer (AD), Morbus Parkinson (MP) oder zerebrale Ischämien und ihren therapeutischen Optionen, konnte in jüngerer Zeit auch eine Rolle für hMSC in der Neuroprotektion herausgearbeitet werden. In diesem Zusammenhang konnte eine essentielle Rolle für EPO als protektiver Einflussfaktor auf Differenzierung und Überleben von hMSC untersucht werden. EPO verstärkt die Überlebensfähigkeit und die regenerativen Möglichkeiten von MSC unter pathologischen bzw. toxischen in-vitro Bedingungen, wie z. B. Hypoxie oder Glutamat-Exposition.

Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass auch das Überleben von spezifischen neuron-ähnlichen MSC vom cholinergem Phänotyp durch EPO verbessert und forciert werden kann. Diese Ergebnisse konnten durch einen signifikanten Anstieg der spezifischen neuron-ähnlichen Marker ( $\beta$ -Tubulin III, NeuN, ChAT, etc.) experimentell dargestellt werden.

Es konnte im Weiteren ein hohes neuroprotektives Potential von EPO festgestellt werden. Ein möglicher Mechanismus hierfür besteht aus einer erhöhten Expression des Glutamattransporters (GLAST) und der Glutamat-Synthetase (GS) sowie einer Reduktion der inflammatorischen Zytokine (IL-6, LIF etc.).

Durch den positiven Einfluss von EPO auf Glutamat Stoffwechselforgänge und auf die MSC ist ein zukünftiges therapeutisches Potential in den näheren Fokus gerückt. Die neu gewonnen Erkenntnisse könnten hierbei als vielversprechendes therapeutisches Ziel für eine spätere klinische Anwendung dienen. EPO

könnte künftig vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS therapeutischen Einsatz finden, die von einer Hypoxie sowie extremen Erhöhungen der Glutamatkonzentration begleitet sind und zur Unterstützung von therapeutisch transplantierten MSC dienen, indem es deren Überleben und Differenzierung positiv beeinflusst.

Der Erfolg einer Transplantation von mesenchymalen Stammzellen in degeneriertes ZNS-Gewebe kann unter anderem durch folgende Faktoren beeinflusst werden

- a) hypoxische Bedingungen
- b) überhöhte extrazelluläre Glutamat- und
- c) schädliche Aβ-Konzentrationen.

Bei Betrachtung unterschiedlicher organspezifischer Sauerstoffpartialdrücke ( $PO_2$ , Tabelle 11) zeigte sich, dass es für einen therapeutischen Erfolg entscheidend ist, ob bei der in-vivo Implantation von in-vitro kultivierten und differenzierten MSC die Fähigkeit zur Differenzierung, trotz hypoxischen Umgebungsbedingungen, erhalten bleibt. Hierbei kann die zusätzliche EPO-Exposition möglicherweise einen entscheidenden Vorteil erbringen.

Insgesamt bedarf es für eine zunehmende klinische Anwendung noch weiterer intensiver Forschung über das protektive Potential von EPO sowie die gegenseitige neuroprotektive Wechselwirkung von EPO und MSC.

## **7. Literaturverzeichnis**

- <sup>1</sup> Hy LX, Keller DM (2000) Prevalence of AD among whites: a summary by levels of severity. *Neurology* 55: 198-204
- <sup>2</sup> Hyman BT, Trojanowski JQ (1997) Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56: 1095-1097
- <sup>3</sup> Strozyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ (2003) CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology* 60: 652-656
- <sup>4</sup> Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE (1998) Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 153: 725-733
- <sup>5</sup> Vinters HV, Wang ZZ, Secor DL (1996) Brain parenchymal and microvascular amyloid in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 6: 179-195
- <sup>6</sup> Yamada M (2000) Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 20: 8-22
- <sup>7</sup> Schubert D, Soucek T, Blouw B (2009) The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide. *The European journal of neuroscience* 29: 1323-1334
- <sup>8</sup> Taupin P (2006) Adult neurogenesis in mammals. *Current opinion in molecular therapeutics* 8: 345-351
- <sup>9</sup> Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD (2006) Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361: 1477-1497
- <sup>10</sup> Kim SS, Yoo SW, Park TS, Ahn SC, Jeong HS, Kim JW, Chang DY, Cho KG, Kim SU, Huh Y, Lee JE, Lee SY, Lee YD, Suh-Kim H (2008) Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. *Stem Cells* 26: 2217-2228
- <sup>11</sup> Park HJ, Lee PH, Bang OY, Lee G, Ahn YH (2008) Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 107: 141-151
- <sup>12</sup> Pacary E, Legros H, Valable S, Duchatelle P, Lecocq M, Petit E, Nicole O, Bernaudin M (2006) Synergistic effects of CoCl<sub>2</sub> and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells. *Journal of cell science* 119: 2667-2678
- <sup>13</sup> Webster NJ, Ramsden M, Boyle JP, Pearson HA, Peers C (2006) Amyloid peptides mediate hypoxic increase of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in central signaling. *Neurobiology of aging* 27: 439-445
- <sup>14</sup> Lassmann H, Reindl M, Rauschka H, Berger J, Aboul-Enein F, Berger T, Zurbriggen A, Lutterotti A, Bruck W, Weber JR, Ullrich R, Schmidbauer M, Jellinger K, Vandeveld M (2003) A new paraclinical CSF marker for hypoxia-like tissue damage in multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology* 126: 1347-1357
- <sup>15</sup> Decker MJ, Jones KA, Solomon IG, Keating GL, Rye DB (2005) Reduced extracellular dopamine and increased responsiveness to novelty: neurochemical and behavioral sequelae of intermittent hypoxia. *Sleep* 28: 169-176
- <sup>16</sup> Theus MH, Wei L, Cui L, Francis K, Hu X, Keogh C, Yu SP (2008) In vitro hypoxic preconditioning of embryonic stem cells as a strategy of promoting cell survival and functional benefits after transplantation into the ischemic rat brain. *Experimental neurology* 210: 656-670
- <sup>17</sup> Tilleux S, Hermans E (2007) Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *Journal of neuroscience research* 85: 2059-2070
- <sup>18</sup> Gonzalez FF, McQuillen P, Mu D, Chang Y, Wendland M, Vexler Z, Ferriero DM (2007) Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Developmental neuroscience* 29: 321-330

- 19 Zhang J, Li Y, Cui Y, Chen J, Lu M, Elias SB, Chopp M (2005) Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Brain research* 1034: 34-39
- 20 Ehrenreich H, Fischer B, Norra C, Schellenberger F, Stender N, Stiefel M, Siren AL, Paulus W, Nave KA, Gold R, Bartels C (2007) Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 130: 2577-2588
- 21 Chong ZZ, Li F, Maiese K (2005) Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Current neurovascular research* 2: 387-399
- 22 Xue YQ, Zhao LR, Guo WP, Duan WM (2007) Intrastratial administration of erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcome in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 146: 1245-1258
- 23 Danielyan L, Mueller L, Proksch B, Kabisch D, Weller M, Wiesinger H, Buniatian GH, Gleiter CH (2005) Similar protective effects of BQ-123 and erythropoietin on survival of neural cells and generation of neurons upon hypoxic injury. *European journal of cell biology* 84: 907-913
- 24 Esneault E, Pacary E, Eddi D, Freret T, Tixier E, Toutain J, Touzani O, Schumann-Bard P, Petit E, Roussel S, Bernaudin M (2008) Combined therapeutic strategy using erythropoietin and mesenchymal stem cells potentiates neurogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28: 1552-1563
- 25 <http://www.usbio.net/item/N2173>
- 26 <http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/Neuronal-Class-III-betaTubulin-Antibody-Clone-TUJ.aspx>
- 27 <http://www.ebioscience.com/human-mouse-rat-beta-catenin-antibody-purified-polyclonal.htm>
- 28 Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ (1994) Beta-catenin: a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways. *Trends in biochemical sciences* 19: 538-542
- 29 Bullions LC, Levine AJ (1998) The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Current opinion in oncology* 10: 81-87
- 30 Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N (2002) The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 296: 1644-1646
- 31 Kawashima K, Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life sciences* 74: 675-696
- 32 Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ (2003) The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life sciences* 72: 2055-2061
- 33 Cai Y, Cronin CN, Engel AG, Ohno K, Hersh LB, Rodgers DW (2004) Choline acetyltransferase structure reveals distribution of mutations that cause motor disorders. *The EMBO journal* 23: 2047-2058
- 34 <http://www.lsbio.com/Products/Antibodies/AntibodyDetailPDF.ashx?AntibodyID=6817&pricing=nomprice>
- 35 <http://datasheets.scbt.com/sc-695.pdf>
- 36 Damen JE, Krystal G (1996) Early events in erythropoietin-induced signaling. *Experimental hematology* 24: 1455-1459
- 37 <http://www.abdserotec.com/catalog/datasheet.aspx?ProductCode=0300-0182>
- 38 Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research* 25: 1439-1451
- 39 Eng LF (1985) Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP): The Major Protein of Glial Intermediate Filaments in differentiated Astrocytes. *J Neuroimmunology* 8:203-214
- 40 [http://www.progen.de/media/en\\_us/datasheets/10505.pdf](http://www.progen.de/media/en_us/datasheets/10505.pdf)
- 41 Collins VP (1984) Monoclonal antibodies to glial fibrillary acidic protein in the cytologic diagnosis of brain tumors. *Acta 94ignaling94a* 28: 401-406
- 42 Gegelashvili G, Danbolt NC, Schousboe A (1997) Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *Journal of neurochemistry* 69: 2612-2615

- 43 Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15: 711-720
- 44 Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992) An [Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51: 295-310
- 45 Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 1835-1853
- 46 Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725
- 47 <http://www.abcam.com/eaat1-antibody-c-terminal-ab85863.html>
- 48 Suárez I, Bodega G, Fernandez B (2002) Glutamine signaling in brain: effect of ammonia. *Neurochemistry international* 41: 123-142
- 49 Meister A (1985) Glutamine signaling from mammalian tissues. *Methods in enzymology* 113: 185-199
- 50 Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A (2011) The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cellular signaling* 23: 317-323
- 51 Meyer-Siegler K, Mauro DJ, Seal G, Wurzer J, deRiel JK, Sirover MA (1991) A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 8460-8464
- 52 Glaser PE, Gross RW (1995) Rapid plasmenylethanolamine-selective fusion of membrane bilayers catalyzed by an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: discrimination between glycolytic and fusogenic roles of individual isoforms. *Biochemistry* 34: 12193-12203
- 53 Tisdale EJ (2001) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 276: 2480-2486
- 54 Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature cell biology* 7: 665-674
- 55 Ishitani R, Chuang DM (1996) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 9937-9941
- 56 Sawa A, Khan AA, Hester LD, Snyder SH (1997) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 11669-11674
- 57 Saunders PA, Chalecka-Franaszek E, Chuang DM (1997) Subcellular distribution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cerebellar granule cells undergoing cytosine arabinoside-induced apoptosis. *Journal of neurochemistry* 69: 1820-1828
- 58 Ishitani R, Tanaka M, Sunaga K, Katsube N, Chuang DM (1998) Nuclear localization of overexpressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured cerebellar neurons undergoing apoptosis. *Molecular pharmacology* 53: 701-707
- 59 Ishitani R, Sunaga K, Hirano A, Saunders P, Katsube N, Chuang DM (1996) Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. *Journal of neurochemistry* 66: 928-935
- 60 Ishitani R, Kimura M, Sunaga K, Katsube N, Tanaka M, Chuang DM (1996) An antisense oligodeoxynucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase blocks age-induced apoptosis of mature cerebrocortical neurons in culture. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 278: 447-454
- 61 Metcalf D (2003) The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells* 21: 5-14
- 62 Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336: 684-687

- 63 Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336: 688-690
- 64 <http://datasheets.scbt.com/sc-1336>.
- 65 Preusser M, Laggner U, Haberler C, Heinzl H, Budka H, Hainfellner JA (2006) Comparative analysis of NeuN immunoreactivity in primary brain tumours: conclusions for rational use in diagnostic histopathology. *Histopathology* 48: 438-444
- 66 [http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/5c32d4952269905a85257306007402ed/\\$FILE/ATT2JREB/MAB377.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/5c32d4952269905a85257306007402ed/$FILE/ATT2JREB/MAB377.pdf)
- 67 Turner AJ, Isaac RE, Coates D (2001) The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23: 261-269
- 68 Howell S, Nalbantoglu J, Crine P (1995) Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid (1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* 16: 647-652
- 69 Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nature medicine* 6: 143-150
- 70 Henriquez JP, Webb A, Bence M, Bildsoe H, Sahores M, Hughes SM, Salinas PC (2008) Wnt signaling promotes AchR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 18812-18817
- 71 Zhou CJ, Zhao C, Pleasure SJ (2004) Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 121-126
- 72 <http://www.genelink.com/newsite/products/MODPDFFILES/26-6437.pdf>
- 73 <http://www.abcam.com/FITC-antibody-Phycoerythrin-ab25539.html>
- 74 <http://www.abcam.com/Alkaline-Phosphatase-antibody-ab354.html>
- 75 Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7841-7845
- 76 Schäfer R, Dominici M, Müller I, Dazzi F, Bieback K, Godthardt K, Le Blanc K, Meisel R, Pochampally R, Richter R, Skutella T, Steinhoff G, Mitterberger M, Wendel H, Wiskirchen J, Handgretinger R, Northoff H (2007) Progress in characterization, preparation and clinical applications of non-hematopoietic stem cells, 29-30 September 2006, Tübingen, Germany. *Cytotherapy* 9: 397-405
- 77 Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301
- 78 [http://www.hirnliga.de/F\\_Projekte/Projekt-Beschreibungen/2004\\_keil.htm](http://www.hirnliga.de/F_Projekte/Projekt-Beschreibungen/2004_keil.htm)
- 79 Danielyan L, Lourhmati A, Verleysdonk S, Kabisch D, Proksch B, Thiess U, Umbreen S, Schmidt B, Gleiter CH (2007) Angiotensin receptor type 1 blockade in astroglia decreases hypoxia-induced cell damage and TNF alpha release. *Neurochemical research* 32: 1489-1498
- 80 Olson BJ, Markwell J (2007) Assays for determination of protein concentration. *Current protocols in protein science/editorial board, John E Coligan [et al] Chapter 3: Unit 3 4*
- 81 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 119: 493-501
- 82 [http://www.hirnliga.de/F\\_Projekte/Projekt-Beschreibungen/2004\\_keil.htm](http://www.hirnliga.de/F_Projekte/Projekt-Beschreibungen/2004_keil.htm)
- 83 Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 4137-4141
- 84 Digicaylioglu M, Lipton SA (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signaling cascades. *Nature* 412: 641-647

- 85 Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T, Wen TC (2005) Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatric research* 57: 481-487
- 86 Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF (1988) Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242: 1412-1415
- 87 Habler OP, Messmer KF (1997) The physiology of oxygen transport. *Transfusion science* 18: 425-435
- 88 D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC (2006) Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone* 39: 513-522
- 89 Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, Gully C, Gassner R, Lepperding G (2007) Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging cell* 6: 745-757
- 90 Roher AE, Debbins JP, Malek-Ahmadi M, Chen K, Pipe JG, Maze S, Belden C, Maarouf CL, Thiyyagura P, Mo H, Hunter JM, Kokjohn TA, Walker DG, Kruchowsky JC, Belohlavek M, Sabbagh MN, Beach TG (2012) Cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Vascular health and risk management* 8: 599-611
- 91 Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Figueroa YG, Liu J, Phinney DG, LaMarca HL, Florez L, Morris CB, Hoyle GW, Scandurro AB (2007) Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a pro-angiogenic program in human mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* 35: 640-652
- 92 Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT (2002) Erythropoietin receptor signaling is required for normal brain development. *Development* 129: 505-516
- 93 Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST (2006) A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 1269-1274
- 94 Henry-Feugeas MC (2008) Alzheimer's disease in late-life dementia: a minor toxic consequence of devastating cerebrovascular dysfunction. *Medical hypotheses* 70: 866-875
- 95 Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Korevaar SS, Eijken M, Drabbels JJ, Roelen DL, Maat AP, Balk AH, Weimar W, Baan CC (2009) Donor-derived mesenchymal stem cells remain present and functional in the transplanted human heart. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9: 222-230
- 96 Nathanson NM (2008) Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacology & therapeutics* 119: 33-43
- 97 Zhu X, Birnbaumer L (1996) G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by Gs- and Gi-coupled receptors: Lack of receptor selectivity of G $\alpha$ (16) and evidence for a synergic interaction between G $\beta$  gamma and the alpha subunit of a receptor activated G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 2827-2831
- 98 Conn PJ, Jones CK, Lindsley CW (2009) Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends in pharmacological sciences* 30: 148-155
- 99 Tsang SW, Pomakian J, Marshall GA, Vinters HV, Cummings JL, Chen CP, Wong PT, Lai MK (2007) Disrupted muscarinic M1 receptor signaling correlates with loss of protein kinase C activity and glutamatergic deficit in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 28: 1381-1387
- 100 Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM (2006) M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 49: 671-682
- 101 Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine 97ignaling97: glial localization in brain. *Science* 195: 1356-1358
- 102 Schousboe A, Svenneby G, Hertz L (1977) Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *Journal of neurochemistry* 29: 999-1005
- 103 Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain research* 161: 303-310
- 104 Norenberg MD (1979) Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 27: 756-762
- 105 Hallermayer K, Harmening C, Hamprecht B (1981) Cellular localization and regulation of glutamine synthetase in primary cultures of brain cells from newborn mice. *Journal of neurochemistry* 37: 43-52

- 106 Linser P, Moscona AA (1983) Hormonal induction of glutamine synthetase in cultures of embryonic retina cells: requirement for neuron-glia contact interactions. *Developmental biology* 96: 529-534
- 107 Yamamoto H, Konno H, Yamamoto T, Ito K, Mizugaki M, Iwasaki Y (1987) Glutamine signaling of the human brain: purification and characterization. *Journal of neurochemistry* 49: 603-609
- 108 Fages C, Khelil M, Rolland B, Bridoux AM, Tardy M (1988) Glutamine synthetase: a marker of an astroglial subpopulation in primary cultures of defined brain areas. *Developmental neuroscience* 10: 47-56
- 109 Kaneko T, Shigemoto R, Mizuno N (1988) Metabolism of glutamate and ammonia in astrocyte: an immunocytochemical study. *Brain research* 457: 160-164
- 110 Mearow KM, Mill JF, Vitkovic L (1989) The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain. *Brain research Molecular brain research* 6: 223-232
- 111 Khelil M, Rolland B, Fages C, Tardy M (1990) Glutamine signaling modulation in astrocyte cultures of different mouse brain areas. *Glia* 3: 75-80
- 112 Derouiche A, Frotscher M (1991) Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation. *Brain research* 552: 346-350
- 113 Tansey FA, Farooq M, Cammer W (1991) Glutamine signaling in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. *Journal of neurochemistry* 56: 266-272
- 114 Derouiche A, Ohm TG (1994) Glutamine synthetase immunoreactivity in the human hippocampus is lamina-specific. *Neuroscience letters* 165: 179-182
- 115 Suarez I, Bodega G, Arilla E, Fernandez B (1996) Long-term changes in glial fibrillary acidic protein and glutamine 98signaling98 immunoreactivities in the supraoptic nucleus of portocaval shunted rats. *Metabolic brain disease* 11: 369-379
- 116 Suarez I, Bodega G, Arilla E, Fernandez B (1997) Region-selective glutamine 98signaling98 expression in the rat central nervous system following portocaval anastomosis. *Neuropathology and applied neurobiology* 23: 254-261
- 117 Meister A (1974) The gamma-glutamyl cycle. Diseases associated with specific enzyme deficiencies. *Annals of internal medicine* 81: 247-253
- 118 Robinson SR (2000) Neuronal expression of glutamine signaling in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. *Neurochemistry international* 36: 471-482
- 119 de Hemptinne I, Vermeiren C, Maloteaux JM, Hermans E (2004) Induction of glial glutamate transporters in adult mesenchymal stem cells. *Journal of neurochemistry* 91: 155-166
- 120 Bergles DE, Jahr CE (1997) Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 19: 1297-1308
- 121 Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1-14
- 122 Carmignoto G (2000) Astrocyte-neurone crosstalk: variants of the same language? *Trends in pharmacological sciences* 21: 373-375
- 123 Fellin T, Sul JY, D'Ascenzo M, Takano H, Pascual O, Haydon PG (2006) Bidirectional astrocyte-neuron communication: the many roles of glutamate and ATP. *Novartis Foundation symposium* 276: 208-217; discussion 217-221, 233-207, 275-281
- 124 Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725
- 125 Nicholls D, Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends in pharmacological sciences* 11: 462-468
- 126 Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic—ischemic brain damage. *Annals of neurology* 19: 105-111
- 127 Sattler R, Xiong Z, Lu WY, MacDonald JF, Tymianski M (2000) Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 22-33
- 128 Ravasi L, Semah F (2009) [Brain functional imaging in Alzheimer's disease]. *Psychologie & neuropsychiatrie du vieillissement* 7 Spec No 1: 21-27

- 129 Mesulam MM, Geula C (1988) Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. *The Journal of comparative neurology* 275: 216-240
- 130 Davies P, Maloney AJ (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2: 1403
- 131 Whitehouse PJ, Struble RG, Clark AW, Price DL (1982) Alzheimer disease: plaques, tangles, and the basal forebrain. *Annals of neurology* 12: 494
- 132 Araujo DM, Lapchak PA, Robitaille Y, Gauthier S, Quirion R (1988) Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 50: 1914-1923
- 133 Benzing WC, Mufson EJ, Armstrong DM (1993) Immunocytochemical distribution of peptidergic and cholinergic fibers in the human 99signalin: their depletion in Alzheimer's disease and morphologic alteration in non-demented elderly with numerous senile plaques. *Brain research* 625: 125-138
- 134 Emre M, Heckers S, Mash DC, Geula C, Mesulam MM (1993) Cholinergic innervation of the amygdaloid complex in the human brain and its alterations in old age and Alzheimer's disease. *The Journal of comparative neurology* 336: 117-134
- 135 Nagai T, McGeer PL, Peng JH, McGeer EG, Dolman CE (1983) Choline acetyltransferase immunohistochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and controls. *Neuroscience letters* 36: 195-199
- 136 Coyle JT, Price DL, DeLong MR (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190
- 137 Patterson C, Feightner JW, Garcia A, Hsiung GY, MacKnight C, Sadovnick AD (2008) Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 178: 548-556
- 138 Khan S, Davies IB (2008) Hypoxia and Alzheimer disease. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 178: 1687; author reply 1687-1688
- 139 Scragg JL, Fearon IM, Boyle JP, Ball SG, Varadi G, Peers C (2005) Alzheimer's amyloid peptides mediate hypoxic up-regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19: 150-152
- 140 Peers C, Dallas ML, Boycott HE, Scragg JL, Pearson HA, Boyle JP (2009) Hypoxia and neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1177: 169-177
- 141 Thathiah A, De Strooper B (2009) G protein-coupled receptors, cholinergic dysfunction, and Abeta toxicity in Alzheimer's disease. *Science signaling* 2: re8
- 142 Kögel D, Schomburg R, Schurmann T, Reimertz C, König HG, Poppe M, Eckert A, Müller WE, Prehn JH (2003) The amyloid precursor protein protects PC12 cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Journal of neurochemistry* 87: 248-256
- 143 Bisaglia M, Venezia V, Piccioli P, Stanzione S, Porcile C, Russo C, Mancini F, Milanese C, Schettini G (2002) Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF-kappaB activation. *Neurochemistry international* 41: 43-54
- 144 Patel NS, Paris D, Mathura V, Quadros AN, Crawford FC, Mullan MJ (2005) Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* 2: 9
- 145 Jehle T, Meschede W, Dersch R, Feltgen N, Bach M, Lagreze WA (2010) [Erythropoietin protects retinal ganglion cells and visual function after ocular ischemia and optic nerve compression]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 107: 347-353
- 146 Tascilar O, Cakmak GK, Tekin IO, Emre AU, Ucan BH, Bahadir B, Acikgoz S, Irkorucu O, Karakaya K, Balbaloglu H, Kertis G, Ankarali H, Comert M (2007) Protective effects of erythropoietin against acute lung injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis. *World journal of gastroenterology : WJG* 13: 6172-6182
- 147 Strunk T, Hartel C, Temming P, Matzke N, Zimmer J, Schultz C (2008) Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes. *Acta Paediatr* 97: 16-20
- 148 Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yilmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H (2007) Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology* 92: 269-278

- 149 Volmar CH, Ait-Ghezala G, Frieling J, Paris D, Mullan MJ (2008) The granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) regulates amyloid beta (Abeta) production. *Cytokine* 42: 336-344
- 150 Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S (2008) Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18: 240-252
- 151 Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292: 1550-1552
- 152 Apelt J, Ach K, Schliebs R (2003) Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques. *Neuroscience letters* 339: 183-186
- 153 Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neuroscience letters* 297: 97-100
- 154 Arien-Zakay H, Nagler A, Galski H, Lazarovici P (2007) Neuronal conditioning medium and nerve growth factor induce neuronal differentiation of collagen-adherent progenitors derived from human umbilical cord blood. *Journal of molecular neuroscience : MN* 32: 179-191
- 155 Levenberg S, Burdick JA, Kraehenbuehl T, Langer R (2005) Neurotrophin-induced differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymeric scaffolds. *Tissue engineering* 11: 506-512
- 156 Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, Black JR, Wojtacha D, Samuel K, Hannoun Z, Pryde A, Filippi C, Currie IS, Forbes SJ, Ross JA, Newsome PN, Iredale JP (2008) Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 12301-12306
- 157 Otto A, Schmidt C, Luke G, Allen S, Valasek P, Muntoni F, Lawrence-Watt D, Patel K (2008) Canonical Wnt 100ignaling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *Journal of cell science* 121: 2939-2950
- 158 Katoh M (2008) WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine. *Current drug targets* 9: 565-570
- 159 Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD (2008) Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert review of neurotherapeutics* 8: 1703-1718
- 160 Bruno MA, Cuello AC (2006) Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 6735-6740
- 161 Bauer S, Kerr BJ, Patterson PH (2007) The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nature reviews Neuroscience* 8: 221-232
- 162 Minami M, Maekawa K, Yamakuni H, Katayama T, Nakamura J, Satoh M (2002) Kainic acid induces leukemia inhibitory factor mRNA expression in the rat brain: differences in the time course of mRNA expression between the dentate gyrus and hippocampal CA1/CA3 subfields. *Brain research Molecular brain research* 107: 39-46
- 163 Sriram K, Benkovic SA, Hebert MA, Miller DB, O'Callaghan JP (2004) Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? *The Journal of biological chemistry* 279: 19936-19947
- 164 Suzuki S, Tanaka K, Nogawa S, Ito D, Dembo T, Kosakai A, Fukuuchi Y (2000) Immunohistochemical detection of leukemia inhibitory factor after focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20: 661-668
- 165 Slevin M, Krupinski J, Mitsios N, Perikleous C, Cuadrado E, Montaner J, Sanfeliu C, Luque A, Kumar S, Kumar P, Gaffney J (2008) Leukaemia inhibitory factor is over-expressed by ischaemic brain tissue concomitant with reduced plasma expression following acute stroke. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 15: 29-37
- 166 Bauer S, Rasika S, Han J, Mauduit C, Raccurt M, Morel G, Jourdan F, Benahmed M, Moyses E, Patterson PH (2003) Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 1792-1803

- 167 Salinas PC, Zou Y (2008) Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annual review of neuroscience* 31: 339-358
- 168 Arikath J, Reichardt LF (2008) Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 31: 487-494
- 169 Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM (2001) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental cell research* 268: 189-200
- 170 Li G, Pleasure SJ (2005) Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. *Developmental neuroscience* 27: 93-99
- 171 He P, Shen Y (2009) Interruption of beta-catenin signaling reduces neurogenesis in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 6545-6557
- 172 Danielyan L, Schafer R, Schulz A, Ladewig T, Lourhmati A, Buadze M, Schmitt AL, Verleysdonk S, Kabisch D, Koepfen K, Siegel G, Proksch B, Kluba T, Eckert A, Kohle C, Schoneberg T, Northoff H, Schwab M, Gleiter CH (2009) Survival, neuron-like differentiation and functionality of mesenchymal stem cells in neurotoxic environment: the critical role of erythropoietin. *Cell death and differentiation* 16: 1599-1614
- 173 Kemp CR, Willems E, Wawrzak D, Hendrickx M, Agbor Agbor T, Leyns L (2007) Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236: 2011-2019
- 174 Farias GG, Godoy JA, Hernandez F, Avila J, Fisher A, Inestrosa NC (2004) M1 muscarinic receptor activation protects neurons from beta-amyloid toxicity. A role for Wnt signaling pathway. *Neurobiology of disease* 17: 337-348
- 175 de Boer J, Siddappa R, Gaspar C, van Apeldoorn A, Fodde R, van Blitterswijk C (2004) Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 34: 818-826
- 176 Lee HJ, Lee JK, Lee H, Carter JE, Chang JW, Oh W, Yang YS, Suh JG, Lee BH, Jin HK, Bae JS (2012) Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiology of aging* 33: 588-602
- 177 Kim JY, Kim DH, Kim JH, Lee D, Jeon HB, Kwon SJ, Kim SM, Yoo YJ, Lee EH, Choi SJ, Seo SW, Lee JI, Na DL, Yang YS, Oh W, Chang JW (2012) Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid-beta plaques. *Cell death and differentiation* 19: 680-691
- 178 Klinge PM, Harmening K, Miller MC, Heile A, Wallrapp C, Geigle P, Brinker T (2011) Encapsulated native and glucagon-like peptide-1 transfected human mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 497: 6-10
- 179 Lee JK, Jin HK, Endo S, Schuchman EH, Carter JE, Bae JS (2010) Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. *Stem Cells* 28: 329-343
- 180 Danielyan L, Schafer R, von Ameln-Mayerhofer A, Buadze M, Geisler J, Klopfer T, Burkhardt U, Proksch B, Verleysdonk S, Ayturan M, Buniatian GH, Gleiter CH, Frey WH, 2nd (2009) Intranasal delivery of cells to the brain. *European journal of cell biology* 88: 315-324
- 181 Danielyan L, Schafer R, von Ameln-Mayerhofer A, Bernhard F, Verleysdonk S, Buadze M, Lourhmati A, Klopfer T, Schaumann F, Schmid B, Koehle C, Proksch B, Weissert R, Reichardt HM, van den Brandt J, Buniatian GH, Schwab M, Gleiter CH, Frey WH, 2nd (2011) Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. *Rejuvenation research* 14: 3-16

## **8. Anhang**

### **8.1 Bilderverzeichnis**

**Abb. 1:** Lichtmikroskopische Aufnahme adulter hMSC von 5 verschiedenen Spendern

**Abb. 2:** Expression von EPOR, Beta-Tubulin-III und GFAP unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

**Abb. 3:** Einfluss von Hypoxie und EPO auf den Glutamat-metabolisierenden Phänotyp der hMSC

**Abb. 4:** LDH Freisetzung und GS Aktivität bei humanen MSC unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und Gabe von Glutamat (G)

**Abb. 5:** Synaptophysin Expression bei humanen MSC unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und Gabe von EPO

**Abb. 6:** Darstellung der Ach-Freisetzung in humanen MSC unter normoxischen Bedingungen und Gabe von EPO

**Abb. 7:** Quantifizierung von TUNEL-positiven Zellen in hMSC

**Abb. 8:** Anzahl der Neu-N- und DAPI-positiven Zellen unter Normoxie und Hypoxie und Quantifizierung der Gesamtzellzahl anhand der DAPI-positiven Zellen pro cm<sup>2</sup>

**Abb. 9:** Western Blot Analyse des Wnt3a, Beta-Catenin, Neprilysin, LIF, GLAST, sowie glialen (GFAP) und synaptischen (Synaptophysin) Markern.

**Abb. 10:** Expression von M1 mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO

**Abb. 11:** Expression von M2 mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO

**Abb. 12:** Expression von M3 mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO

**Abb. 13:** Expression von NGF mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO

**Abb. 14:** Expression von  $\beta$ -Tubulin-III mRNA unter Normoxie, Hypoxie und Gabe von EPO

**Abb. 15 a-d:** Darstellung intrazellulärer Calcium Freisetzung von hMSC, ausgelöst durch ACh unter hypoxischen Bedingungen und unter Zugabe von EPO

**Abb. 16:** Analyse der IL6-Freisetzung in das Zellkulturmedium von Kokulturen von APPsw-PC12-Zellen mit mMSC (MSC+ APPsw-PC12) im Vergleich zu Monokulturen (MSC oder APPsw-PC12)

**Abb. 17:** Analyse der GM-CSF-Freisetzung nach einer Kokultivierung von APPsw-PC12-Zellen mit mMSC im Vergleich zu Monokulturen von mMSC und APPsw-PC 12

**Abb. 18:** ELISA-Messung von Abeta<sub>1-42</sub> im Zellkulturüberstand nach einer Kokultivierung von APPsw-PC12-Zellen mit mMSC im Vergleich zu Monokulturen (APPsw-PC 12 und mMSC)

## **8.2 Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** Verwendete Primärantikörper bei Westernblot und Immunfluoreszenzanalysen

**Tabelle 2:** Verwendete Sekundärantikörper bei Westernblot und Immunfluoreszenzanalysen

**Tabelle 3:** Auflistung der Anti Phycerythrin-konjugierten Antikörper

**Tabelle 4:** Auflistung der molekularbiologischen und biochemischen Kits

**Tabelle 5:** Auflistung der Chemikalien

**Tabelle 6:** Auflistung der zusätzlichen Materialien

**Tabelle 7:** Verdünnung der Primärantikörper in PBS zur immunzytochemischen Untersuchung

**Tabelle 8:** Verdünnung der Sekundärantikörper in PBS zur immunzytochemischen Untersuchung

**Tabelle 9:** Verwendete Antikörper beim Western Blot

**Tabelle 10:** Densitometrische Untersuchung der durch Western Blot erfassten Proteinmengen der hMSC

**Tabelle 11:** Sauerstoffpartialdrücke in verschiedenen Kompartimenten

## **9. Danksagung**

In erster Linie möchte ich dem Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen Prof. Dr. Matthias Schwab, sowie meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph H. Gleiter danken, die mir ermöglicht haben, in ihrem Institut eine solche Dissertation unter bester Betreuung zu verwirklichen. In diesem Rahmen muss ich mich auch für die gute Betreuung meiner Arbeit und die wissenschaftliche Diskussion bei meiner direkten Betreuerin Frau Dr. Lusine Danielyan bedanken. Ihr Einsatz, die Vermittlung wissenschaftlichen „Know-hows“, die Konzeption der Arbeit sowie der wissenschaftliche und menschlich sehr voranbringende Aufenthalt in den USA waren zum größten Teil ihr Verdienst. Bei den Mitarbeitern der Gruppe von Fr. Dr. Lusine Danielyan möchte ich mich bedanken für die Unterstützung und die Hilfe, die für die Verwirklichung meiner Arbeit unerlässlich waren. Hierfür gehört allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe mein Dank für die Hilfe und wissenschaftliche Diskussion.

In besonderer Weise möchte ich mich auch bei den Wissenschaftlern bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, indem Sie wissenschaftliches Know-how und Material sowie Teilschritte und Ergebnisse zur Verfügung gestellt haben. Hierbei sind vor allem zu nennen: Dr. Richard Schäfer, der im Rahmen seiner Tätigkeit am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin des Universitäts-klinikums Tübingen als Laborleiter die Isolierung und Charakterisierung der MSC ermöglichte und beurteilte. Bei Prof. Dr. Torsten Kluba bedanke ich mich für die Bereitstellung wissenschaftlich nutzbarer Materialien. Frau Barbara Proksch möchte ich für die Amyloid beta-, und Caspase 3/2 Analysen, Ali Lourhmati für die GS- und LDH Messungen danken, Marina Buadze für die Durchführung verschiedener Western Blots, Daniela Kabisch und Angela Schulz für die Durchführung von PCRs und Thomas Ladewig für die durchgeführten  $Ca^{2+}$ -Messungen. Weiterhin möchte ich mich noch namentlich bei den weiteren Co-Autoren der Veröffentlichung „Survival,

neuron-like differentiation and functionality of mesenchymal stem cells in neurotoxic environment: the critical role of erythropoietin“ bedanken. Hierbei sind Stephan Verleysdonk, Dr. Katja Köppen, Prof. Anne Eckert, Dr. Christoph Köhle, Prof. Torsten Schönberg und Prof. Hinnak Northof zu nennen, da sie durch ihre wissenschaftliche Arbeit zum Gelingen der gemeinsamen Veröffentlichung entscheidend beigetragen haben.

Nina danke ich für die Hilfe, als mir die Sprache versagte, und Felix für eine wahnsinnig lustige und inspirierende Zeit im Schleifmühlweg. Außerdem danke an meinen Bruder Max für Solidarität und rationale Blickweise bei den verschiedensten Problemen.

Dank gebührt auch meinem Freund Stephan, der mich in jeder auch noch so schwierigen Situation unterstützt und eine passende Lösung geschaffen hat, obwohl Klinik und Forschung ihm manchmal diese Unterstützung erschwerten.

Danke für den Umzug!

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, für die nun fast 30-jährige Hilfestellung. Meine Ausbildung wurde sowohl moralisch als auch finanziell konstant gefördert. Meine Eltern standen mir ständig mit gutem Rat und oft auch Tat zur Seite, egal in welcher Situation. Danke für alles !