

Aus dem Labor für Molekulare Psychiatrie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genetische Modifikationen Mesenchymaler Stromazellen des
Knochenmarks und deren regeneratives Potential
im Schlaganfallmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Scheibe

aus Neubrandenburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Priller

2. Prof. Dr. med. C. Winter

3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Henschler

Datum der Promotion: 19.11.2010

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Der Schlaganfall	8
1.2 Therapeutische Konzepte der zerebralen Ischämie	10
1.3 Mesenchymale Stromazellen	11
1.4 Gewebsreparatur- und regeneration durch mesenchymale Stromazellen	15
1.5 Genetische Modifikation mesenchymaler Stromazellen	16
2 Aufgabenstellung	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Zellkulturmodell der murinen Mesenchymalen Stromazellen (mMSC)	22
3.1.1 Isolierung und Kultivierung von mMSC	22
3.1.2 Untersuchung der Proliferationseigenschaften der mMSC	24
3.1.3 Differenzierung der mMSC in Fett, Knochen und Knorpel	24
3.1.4 Chromosomenpräparation und Karyotypisierung	25
3.1.5 Durchflusszytometrie (FACS; Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)	26
3.2 <i>In vitro</i> Schlaganfallmodell des kombinierten Sauerstoff – Glukose – Entzugs (<i>Oxygen–Glucose–Deprivation, OGD</i>)	28
3.2.1 Neuronale Zellkultur	28
3.2.2 Kultivierung muriner neuronaler Stammzellen (mNSC)	29
3.2.3 Kultivierung humaner Mesenchymaler Stromazellen (hMSC)	29
3.2.4 Induktion der Neuroprotektion	30
3.2.5 Kombiniertes Sauerstoff – Glukose – Entzug (<i>OGD</i>)	31
3.2.6 Laktat-Dehydrogenase (LDH) Bestimmung	32
3.2.7 Acridin Orange und Ethidiumbromidfärbung	33
3.3 <i>In vivo</i> Schlaganfallmodell	34
3.3.1 Filamentmodell – Okklusion der A. cerebri media (MCAo)	34
3.3.2 MRT – Infarktvolumetrie	35
3.4 Molekularbiologische Methoden	36
3.4.1 RNA – Isolierung	36

3.4.2 Reverse Transkription	36
3.4.3 Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	37
3.4.4 Gelelektrophorese, Sequenzierung und Klonierung	37
3.5 Transfektion der mMSC	38
3.5.1 Verwendete Plasmide	38
3.5.2 Transiente Transfektion der mMSC	38
3.5.3 Stabile Transfektion der mMSC	40
3.5.4 Quantifizierung der Transgenexpression	40
3.6 <i>In vitro</i> Hämatopoese-Bestimmung	41
3.7 <i>In vivo</i> Hämatopoese-Bestimmung	41
3.8 Western Blot	42
3.8.1 Proteinextraktion	42
3.8.2 Proteinquantifizierung mittels BCA-Reaktion	43
3.8.3 Gelelektrophorese, Blotting und Entwicklung der Banden	43
3.9 Immunhisto –und immunzytochemische Methoden	44
3.9.1 Perfusion, Organfixierung und Schneiden	44
3.9.2 Immunhistochemie	44
3.9.3 Immunzytochemie	44
3.10 Statistik	45
3.11 Materialien und Geräte	46
3.11.1 Materialien	46
3.11.2 Geräte	50
4 Ergebnisse	51
4.1 Isolierung und Charakterisierung der mMSC	51
4.1.1 Isolierung der mMSC	51
4.1.2 Wachstumskinetik und Proliferationsverhalten der mMSC	52
4.1.3 Differenzierung der mMSC	53
4.1.4 Basale Expression neuraler Proteine in den mMSC	56
4.1.5 FACS basierte Oberflächenepitopanalyse der mMSC	56
4.1.6 Karyotypisierung der mMSC	58
4.2 Neuroprotektion durch MSC <i>in vitro</i>	59
4.2.1 Neuroprotektion durch MSC im Kokultursystem	60
4.2.2 Neuroprotektion durch MSC-konditioniertes Medium	62

4.2.3 Anti-apoptotische Mechanismen der Neuroprotektion	65
4.2.4 Signalkaskaden der Neuroprotektion	66
4.2.5 MSC verändern nicht die Zusammensetzung neuronaler Zellkulturen	67
4.3 Transplantation humaner MSC im <i>in vivo</i> Schlaganfallmodell	68
4.4 Transfektion der mMSC	70
4.4.1 Etablierung geeigneter transienter Transfektionsprotokolle für mMSC mit dem pEGFP-N2 Vektor	70
4.4.2 Stabile Transfektion der mMSC mit dem pEGFP-N2 Vektor	73
4.4.3 Stabil transfizierte mMSC zeigen keine Veränderungen ihrer Plastizität oder des Proliferationsverhaltens	75
4.4.4 Gentransfer von murinem Erythropoietin (EPO) in mMSC	76
4.4.4.1 Transiente Transfektion der mMSC mit dem pEPO-IRES2-EGFP Vektor	78
4.4.4.2 Biologische Aktivität des von mMSC sezernierten EPO <i>in vitro</i>	79
4.4.4.3 Stabile Transfektion der mMSC mit dem pEPO-IRES2-EGFP Vektor	80
4.4.4.4 Hämatopoetische Aktivität des von mMSC sezernierten EPO <i>in vivo</i>	81
5 Diskussion	85
5.1 Isolierung und Charakterisierung muriner MSC	85
5.2 Neuroprotektion durch MSC	88
5.3 Genetische Modifikation von mMSC	94
6 Zusammenfassung und Ausblick	101
Literaturverzeichnis	103
Lebenslauf	116
Veröffentlichungen	117
Danksagung	118
Eidesstattliche Erklärung	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

αMEM	Alpha Minimum Essential Medium, <i>engl. α-Minimal Essential Medium</i>
BMP-6	Knochenbildendes Protein-6, <i>engl. Bone Morphogenetic Protein – 6</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CFU-E	Koloniebildende erythroide Einheiten, <i>engl. Colony forming unit – erythroid</i>
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	nach Dulbecco modifiziertes Eagle's Medium, <i>engl. Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFP	Verstärkte Variante des grün fluoreszierenden Proteins, <i>engl. enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EPO	Erythropoietin
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, <i>engl. fluorescence-activated cell sorting</i>
FKS	Fötale Kälberserum
hMSC	humane Mesenchymale Stromazelle
IBMX	3-Isobuthyl-1-Methylxanthin
KZM	komplettes Zellkulturmedium
KM	konditioniertes Medium
MCAo	Okklusion der A. cerebri media, <i>engl. middle cerebral artery occlusion</i>
MCS	Klonierungsregion, <i>engl. multiple cloning site</i>
MSC	Mesenchymale Stromazelle
mMSC	murine Mesenchymale Stromazelle
NBM	Neurobasalmedium
NDS	normales Eselserum, <i>engl. normal donkey serum</i>
NGS	normales Ziegenserum, <i>engl. normal goat serum</i>
OGD	kombinierter Sauerstoff – Glukose – Entzug, <i>engl. oxygen glucose deprivation</i>
PBS	Phosphatpuffer, <i>engl. phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>engl. polymerase chain reaction</i>

ROI	Region des Interesses, <i>engl. region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
sc-CFU	Einzelzell – koloniebildende Einheiten, <i>engl. single cell – colony forming unit</i>
SVZ	Subventrikulärzone
t-CFU	traditionelle koloniebildende Einheiten, <i>engl. traditional – Colony Forming Unit</i>
TGF- β 3	transformierender Wachstumsfaktor- β 3, <i>engl. transforming growth factor -β3</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem regenerativen Potential mesenchymaler Stromazellen (MSC) des Knochenmarks im Schlaganfallmodell und deren potentielle Einsatzmöglichkeiten für gentherapeutische Anwendungen. Die zyto- und gewebsschutzenden Eigenschaften von MSC wurden *in vitro* im Modell des kombinierten Sauerstoff – Glukose – Entzugs (*oxygen – glucose – deprivation*, OGD), als auch *in vivo* nach experimenteller zerebraler Ischämie (MCAo – *middle cerebral artery occlusion*) untersucht. Die Plastizität der MSC prädisponiert für deren Einsatz bei zellbasierten regenerativen Therapien. Ihr Wirkpotential lässt sich durch das Einschleusen von krankheitsmodifizierenden Genen weiter erhöhen. Vor diesem Hintergrund wurden nonvirale Transfektionsmethoden auf ihre Tauglichkeit zur transienten und stabilen Genexpression in MSC für *in vitro* und *in vivo* Applikationen geprüft.

1.1 Der Schlaganfall

Der Schlaganfall gehört zu den häufigsten Erkrankungen, die die Gesundheit der Bevölkerung industrialisierter Länder beeinträchtigen. Allein in Deutschland erleiden jährlich 150.000-200.000 Menschen einen Schlaganfall (Poeck und Hacke, 2006). Damit rangiert der Schlaganfall in der Todesursachenstatistik hinter dem Myokardinfarkt und Tumorerkrankungen auf Platz 3 und ist der Hauptauslöser dauerhafter körperlicher Behinderung und kognitiver Einschränkung im Erwachsenenalter (Berlit, 2000). Die Mortalität des Schlaganfalls liegt mit circa 15-20% in den ersten 4 Wochen nach Krankheitsbeginn sehr hoch. Selbst von den Überlebenden können nur 1/3 der Patienten ohne Behinderungen den Alltag bewerkstelligen. Ein weiteres Drittel erreicht zwar wieder die Selbständigkeit, wird aber im täglichen Leben durch Lähmungen und andere Folgesymptome eingeschränkt. 1/3 der Schlaganfallpatienten bleiben langfristig pflegebedürftig (Poeck und Hacke, 2006). Diese Daten erklären die hohen finanziellen Belastungen, die durch Akutbehandlung, Rehabilitation und durch Ausfall der Erwerbsfähigkeit vieler Betroffener entstehen. Die resultierenden sozioökonomischen Kosten für unser Gesundheitssystem sind enorm und machen den Schlaganfall zur teuersten Erkrankung in unserer Gesellschaft (Wolf et al. 1992).

Ätiologisch entstehen ca. 80% der Schlaganfälle durch eine fokale zerebrale Ischämie. Sie ist meist Folge eines thrombotischen oder thromboembolischen Verschlusses eines hirnversorgenden Gefäßes. Dieser führt im betroffenen Hirnareal zur Reduktion des zerebralen Blutflusses mit nachfolgender Erschöpfung der lokalen Sauerstoff- und ATP-Reserven, die sekundär die Aktivierung verschiedener Schadenskaskaden im Gewebe auslösen. Hierzu zählen die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität, Perinfarkt – Depolarisationen, Inflammation und der programmierte Zelltod durch Apoptose (Dirnagl et al. 1999).

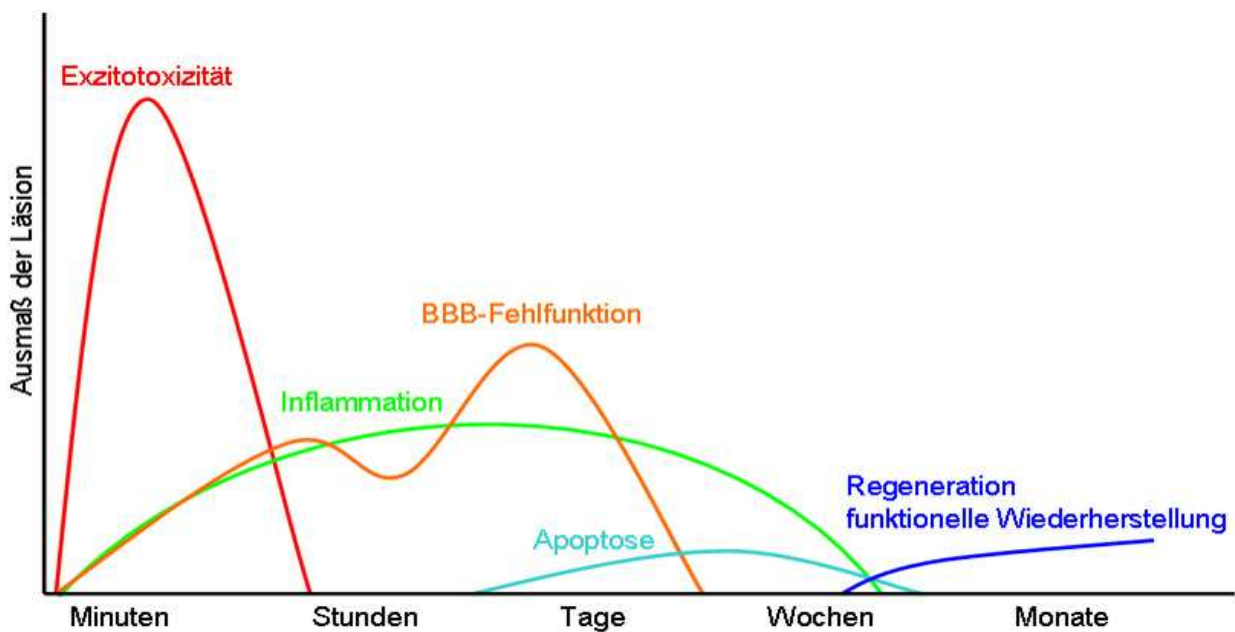


Abb. 1. Kaskade der Schadensmechanismen nach fokaler zerebraler Ischämie (modifiziert nach Dirnagl et al. 1999).

Das ischämische Areal ist dabei in unterschiedlichem Ausmaß von den oben beschriebenen Veränderungen betroffen. Im Infarktkern ist die Blutflussreduktion am stärksten limitiert. Der rasche Energieverlust führt hier überwiegend zum Zelltod durch Nekrose (Hossmann et al. 1994). Im Gegensatz dazu ist die Peripherie der ischämischen Region – die sogenannte Penumbra – weniger von der Drosselung des Blutflusses betroffen, da hier Kollateralgefäße zur Kompensation der zerebralen Perfusion beitragen. Der Energiemetabolismus kann hier auf reduziertem Niveau aufrecht erhalten werden. Neurone sterben hier überwiegend durch den programmierten Zelltod, die Apoptose (Astrup et al. 1977).

1.2 Therapeutische Konzepte der zerebralen Ischämie

Für die zerebrale Ischämie stehen bis heute überwiegend symptomatische Ansätze im Zentrum der therapeutischen Intervention. Für die Akuttherapie und Sekundärprävention werden überwiegend thrombolytische und thrombozytenaggregationshemmende Substanzen angewandt, deren Funktion in der Wiederherstellung oder dem Erhalt des zerebralen Blutflusses besteht.

Ergänzend zu den bisher bestehenden klinisch angewandten und validierten symptomatischen Schlaganfalltherapien wurden auf experimentell pharmakologischer Ebene weitere Therapieansätze untersucht, um Konzepte zur effizienten Reduktion von Neurotoxizität und Apoptose in ischämisch geschädigten Hirnarealen zu entwickeln. Hierzu zählen die neuroprotektiven Wirkungen von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase Inhibitoren (Statinen) (Zacco et al. 2003), Erythropoetin (Wang et al. 2004; Leist et al. 2004; Ehrenreich et al. 2002), Phosphodiesteraseinhibitoren Typ 5 (Zhang et al. 2005) oder NO-Donoren (Endres et al. 2004). Diese auf Neuroprotektion basierenden Strategien, waren bereits teilweise Untersuchungsgegenstand klinischer Studien. Aufgrund der teils widersprüchlichen Daten, der mangelnden Wirksamkeit und des nicht unerheblichen Nebenwirkungsprofils einiger dieser Wirkstoffe, hat keine der getesteten Substanzen – abgesehen von den Statinen – am Menschen Anwendung gefunden.

Aus diesen Gründen ist im Bereich der Schlaganfallforschung zunehmend eine Tendenz zur Entwicklung von regenerativen, zellbasierten Therapieansätzen zu beobachten. Sie greifen nicht nur in die Schädigungsmechanismen der akuten Phase der zerebralen Ischämie ein, sondern beeinflussen vielmehr die Geweberegeneration beziehungsweise -reparatur Tage bis Wochen nach statt gehabtem Insult. So konnte beispielsweise die erfolgreiche Rekrutierung von transplantierten, als auch von endogenen neuronalen Stammzellen nach Schlaganfall gezeigt werden (Leker et al. 2007; Thored et al. 2006; Kelly et al. 2004). Analog liegen ähnliche Daten für embryonale Stammzellen vor (Buhmann et al. 2006). Nach Transplantation von adulten mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks, können diese in das geschädigte Hirnareal einwandern und zur funktionellen Wiederherstellung des Gewebes nach experimentellem Schlaganfall beitragen (Kurozumi et al. 2005; Zhao et al. 2002). Im Vergleich zu neuronalen oder embryonalen Stammzellen, sind die mesenchymalen Stromazellen nicht nur sehr leicht verfügbar, ihre Handhabung wird

auch nicht durch ethische Konflikte kompliziert. Die leichte Isolierbarkeit aus einem adulten Spender mit der Möglichkeit zur allogenen Transplantation hat neben dem regenerativen Potential dieser Zellen dazu beigetragen, dass MSC in den letzten Jahren in den Fokus gewebsregenerativer Studien gerückt sind.

1.3 Mesenchymale Stromazellen

Das Knochenmark der Vertebraten enthält neben den für die Rekonstitution des Blutzellpools zuständigen hämatopoetischen Stammzellen, auch mesenchymale Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften. Diese sind Bestandteil des Knochenmarkstromas. Die Existenz einer derartigen Knochenmarksubpopulation wurde bereits vor über 140 Jahren von dem deutschen Pathologen Cohnheim angedeutet (Cohnheim et al. 1867). Im Rahmen von Studien zur Wundheilung, injizierte er einen unlöslichen Anilinfarbstoff in die Venen verletzter Tiere und beobachtete, welche Zellen in den distalen Wundherd einwanderten. Neben Entzündungszellen fanden sich auch Zellen mit fibroblastoider Morphologie, die durch den Farbstoff markiert wurden. Aus den Ergebnissen schlussfolgerte er, dass zumindest ein Teil der an der Wundheilung beteiligten Zellen aus der Blutbahn und somit letztendlich dem Knochenmark entstammen müsse. Ungefähr 100 Jahre später entdeckte Friedenstein im Knochenmark von Meerschweinchen und Mäusen, koloniebildende, fibroblastenähnliche Zellen, die er als *colony forming unit – fibroblasts* beziehungsweise CFU-F bezeichnete (Friedenstein et al. 1976). Nach Entfernung hämatopoetischer Zellen durch das Waschen der Kulturen, konnten die CFU – F über ihre Eigenschaft der Plastikadhärenz isoliert werden. Zunächst bildeten sich nur sehr diskrete adhärenzte Foci, die für 2-4 Tage inaktiv blieben, danach aber sehr rasch zu proliferieren begannen und über mehrere Passagen subkultiviert werden konnten. In weiteren wegweisenden Pionierarbeiten konnten Friedenstein, aber auch weitere Forschergruppen (Piersma et al. 1983; Caplan et al. 1991) belegen, dass diese Zellen nicht nur zu Fibroblasten differenzieren, sondern auch zu anderen Zelltypen mesodermalen Ursprungs (Ashton et al. 1980; Bab et al. 1986; Castro-Malaspina et al. 1980). Es fanden sich Ablagerungen von Knochen und Knorpel in den Kulturen.

In folgenden *in vitro* Experimenten offenbarte sich nicht nur das extensive Proliferationsvermögen dieser Zellen, sondern auch deren Plastizität für die

Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten (Pittenger et al. 1999; Pereira et al. 1995; DiGirolamo et al. 1999). Nicht-hämatopoetische Knochenmarkszellen, die nicht nur die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, sondern auch ein multipotentes Differenzierungspotential aufwiesen, wurden fortan als mesenchymale Stammzellen, mesenchymale Progenitor- oder Stromazellen bezeichnet. Spätere Studien zeigten, dass MSC in weitere mesodermale Gewebetypen wie Myozyten (Miyahara et al. 2006), Endothelzellen (Anjos-Afonso und Bonnet et al. 2007; Kasper et al. 2007) oder Tenozyten (Young et al. 1998) differenzieren können.

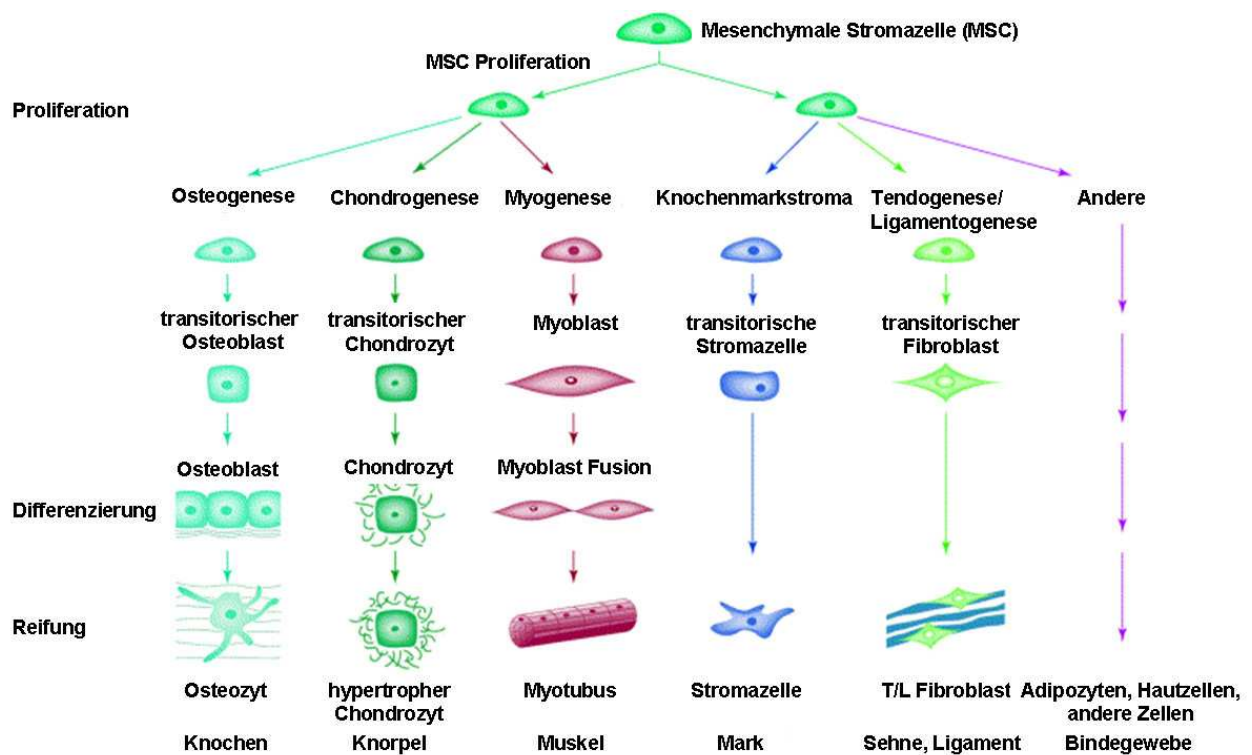


Abb. 2. Übersicht über das Differenzierungspotential Mesenchymaler Stromazellen (modifiziert nach Caplan et al. 2001).

Weiterführende Untersuchungen zum Differenzierungspotential der Zellen erbrachten Hinweise, dass MSC nach entsprechender Induktion Phänotypen mit endodermalen und ektodermalen Charakteristika annehmen können. Die entstandenen Zellen wiesen Merkmale von Hepatozyten (Schwartz et al. 2002), hämatopoetischen Zellen (Serafini et al. 2007), Pankreaszellen (Moriscot et al. 2005) oder neuronalen Zellen (Wislet-Gendebien et al. 2005; Trzaska et al. 2007; Jiang et al. 2003) auf. Diese Transdifferenzierung der MSC ist in der Literatur jedoch umstritten. Grund hierfür ist die teilweise mangelhafte Charakterisierung der *in vitro* generierten Zellen, die zwar häufig

Transkripte der endo- und ektodermalen Entwicklungslinie exprimierten, aber Fragen zu funktionellen Eigenschaften der Zellen blieben meist unbeantwortet.

Die Regulation der MSC-Differenzierung und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bis heute nur ansatzweise verstanden. Ein Grund hierfür ist auch die Inhomogenität der MSC-Kulturen. Selbst klonale MSC, die einer einzelnen MSC entstammen, sind in ihrem Entwicklungspotential nicht homogen. Eine Studie konnte belegen, dass nur 1/3 der klonalen MSC ein tatsächlich trivalentes Differenzierungsvermögen (osteogen, adipogen, chondrogen) aufweist (Pittenger et al. 1999). Diese Daten konnten von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Muraglia et al. 2000).

Die Isolierung der MSC gelingt beim Menschen durch einfache Knochenmarkaspiration des Beckenkamms. Durch nachfolgende Percoll-Dichtegradientenzentrifugation und über die Eigenschaft der Plastikadhärenz können MSC leicht gewonnen werden.

Weit komplizierter ist die Isolierung der MSC aus dem Knochenmark von Nagetieren. Zwar kann das Knochenmark durch Durchspülen der langen Röhrenknochen einfach präpariert werden, jedoch werden die initial plastikadhärenten Zellen sehr schnell von hämatopoetischen Zellen überwuchert. Nur durch die Wahl adäquater Passagezeitpunkte und geeigneter Serum- und Mediumkonditionen kann die Aufreinigung der Kulturen und die Isolierung der MSC aus Nagetieren gelingen (Peister et al. 2004a; Javazon et al. 2001).

Bisher konnten MSC aus vielen verschiedenen Spezies isoliert werden, nicht nur aus dem Menschen, sondern auch aus Affen, Ratten, Mäusen, Kaninchen, Schafen, Hunden und einigen weiteren Tierarten (Dazzi et al. 2006).

Mesenchymale Stromazellen sind nicht organspezifisch auf das Knochenmark beschränkt. Verschiedene Studien deuten auf die Existenz von MSC in fötalen und adulten Geweben hin. Es wurden MSC-ähnliche Zellen aus dem Pankreas (Chen et al. 2003), der Leber (Campagnoli et al. 2001), dem Fettgewebe (Katz et al. 2005), dem Thymus (Rzhaninova et al. 2005), dem Synovialgewebe (Djouad et al. 2005; De Bari et al. 2001), der Plazenta (Igura et al. 2004), der Amnionflüssigkeit (In 't Anker et al. 2004) oder dem Nabelschnurblut (Bieback et al. 2004) isoliert. Es wird angenommen, dass MSC in nahezu allen Geweben auftreten und einen Teil des ortsständigen Organstromas ausmachen (Caplan und Dennis et al. 2006). Jedoch zeigen MSC verschiedener Organe eine phänotypische Heterogenität, sind unterschiedlich

anspruchsvoll in der Isolierungs- und Kultivierungstechnik und durch ein variierendes Maß an Plastizität charakterisiert (Zuk et al. 2002; Sakaguchi et al. 2005).

Die Verwendung von MSC aus verschiedenen Spezies und Geweben hat innerhalb dieses Forschungsgebietes zu teils sehr diskrepanten Ergebnissen geführt. Die Bewertung und Vergleichbarkeit der von verschiedenen Forschungseinrichtungen gewonnenen Daten, wird durch folgende Aspekte maßgeblich erschwert: 1) MSC aus verschiedenen Spezies und Gewebequellen können ihrer Natur entsprechend gravierende Unterschiede in ihren Eigenschaften aufweisen. 2) Methoden der Isolierung und Expansion der Zellen schwanken zwischen einzelnen Laboren teilweise beträchtlich. 3) Die Charakterisierung der MSC folgt unterschiedlichen Standards, was zu qualitativ variablen MSC-Präparationen führt.

Um die Vergleichbarkeit publizierter Studien zu verbessern, hat sich die „*International Society for Cellular Therapy (ISCT)*“ 2006 auf minimale Kriterien zur Definition humaner mesenchymaler Stammzellen geeinigt (Dominici et al. 2006). Diese fordern von humanen MSC die Eigenschaft der Plastikadhärenz, die Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 und ein Fehlen der Expression der Epitope CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR. Des Weiteren müssen die Zellen über ein Multidifferenzierungspotential in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten verfügen. Für MSC anderer Spezies fehlen bisher derartige allgemeinverbindliche Kriterien.

Neuere Ergebnisse belegen eine weit komplexere Biologie der MSC als bisher angenommen. Die Zellen sind immunprivilegiert und verfügen über immunmodulatorische beziehungsweise suppressive Fähigkeiten. *In vitro* hemmen sie die Proliferation von T-, B- und NK-Zellen, induzieren die Bildung von regulatorischen T-Zellen (Treg) und hemmen die Differenzierung von dendritischen Zellen (Nauta und Fibbe et al. 2007). MSC werden aufgrund ihrer sehr niedrigen Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse I (MHC I) und der fehlenden Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche (Tse et al. 2003) als hypoinmunogen betrachtet. Des Weiteren synthetisieren sie auch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie SCF, M-CSF und IL-6 (Haynesworth et al. 1996), über die sie immunmodulatorisch wirksam werden, aber auch im Knochenmarkstroma die Hämatopoese unterstützen (Caplan und Dennis et al. 2006).

Auch verschiedene Chemokinrezeptoren, wie CCR1, CCR4, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10 und CXCR2-6 werden von den Zellen exprimiert (Wynn et al. 2004; Honczarenko et al. 2006; Ringe et al. 2007; Chamberlain et al. 2008). In Chemotaxisuntersuchungen konnten durch Zugabe geeigneter Liganden (CCL3, CCL5, CCL17, CCL19, CCL21, CCL25, CCL28, CXCL12, CXCL13, CXCL16 und CX3CL1) migratorische Eigenschaften von MSC beobachtet werden. Allerdings ist die Variabilität der Daten enorm. Widersprüche entstehen unter anderem dadurch, dass einige Chemokinrezeptoren nur intrazellulär und nicht auf der Zellmembran nachweisbar sind. Sie können aber auch Folge variierender Isolierungs- und Kultivierungsbedingungen sein. Das Vorhandensein multipler Chemokinrezeptoren auf den Zellen legt nahe, dass die Zellen das Potential haben, in andere Organe zu migrieren, um dort zu regenerativen Zwecken eingesetzt zu werden.

Eine weitere dafür nötige Bedingung ist das Vorhandensein verschiedener Adhäsionsmoleküle auf den MSC. Hierzu zählen unter anderem α - und β -Integrine (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , α_v , β_1 , β_3 , β_5), VCAM-1, ICAM-1, VLA-4 (Ruster et al. 2006; Chamberlain et al. 2007). Über die Expression von Zelladhäsionsfaktoren können MSC auf Gefäßwänden entlang rollen. Die Fähigkeit zur Adhäsion auf Endothelzellen bildet eine entscheidende Grundvoraussetzung für die Extravasation der MSC in ein Gewebe.

1.4 Gewebsreparatur- und regeneration durch mesenchymale Stromazellen

Die Diversität und Komplexität der MSC charakterisiert sich durch ihr Multidifferenzierungspotential, ihr hervorragendes Expansionsvermögen, ihre Fähigkeit zur Produktion von trophischen Faktoren und Extrazellulärmatrixproteinen, ihre immunmodulatorischen Eigenschaften, als auch durch ihre Fähigkeit zur Chemoattraktion und Zelladhäsion. Ihr therapeutischer Nutzen wurde in vielen verschiedenen Krankheitsmodellen evaluiert, unter anderem in Tiermodellen der zerebralen Ischämie (Kurozumi et al. 2005; Zhao et al. 2006; Chen et al. 2003a; Nomura et al. 2005), der Parkinson-Erkrankung (Dezawa et al. 2004), dem Myokardinfarkt (Amado et al. 2005; Gnecci et al. 2005; Kawada et al. 2004; Li et al. 2007; Vulliet et al. 2004) oder der Osteogenesis imperfecta (Chamberlain et al. 2004; Horwitz et al. 1999). Aufgrund der vielversprechenden präklinischen Daten wurden die Zellen auch beginnend in klinischen Phase I und II Studien (unter anderem bei der *Graft versus host Disease*, dem Myokardinfarkt, dem Morbus Crohn, der Knochenmarkstammzelltransplantation etc.) untersucht (Newman et al. 2009; Sundin et

al. 2009). Die ermutigenden Ergebnisse lassen adulte MSC als attraktive Quelle für gewebsregenerative Ansätze im Rahmen der Stammzelltherapie erscheinen.

Insbesondere nach Transplantation der MSC in Ratten nach experimenteller zerebraler Ischämie, reduzierten die Zellen nicht nur das Ausmaß der Schlaganfallvolumina, sondern vermochten auch in verhaltensparametrischen Analysen eine deutliche Verbesserung der funktionalen Defizite zu bewirken. Über welche Mechanismen MSC neuro- beziehungsweise gewebsprotektiv wirksam werden, ist bisher nur in Ansätzen verstanden. Initial wurde angenommen, dass MSC durch Transdifferenzierung in Neurone und durch eine damit einhergehende funktionelle Integration in das ZNS-Parenchym zur Gewebsregeneration beitragen können (Zhao et al. 2002). Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass dieses Phänomen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt und MSC über andere Fähigkeiten, vor allem durch die Abschwächung der schlaganfallassoziierten lokalen Inflammationsreaktion und die Synthese trophischer Faktoren zur Regeneration neuralen Gewebes beitragen. Dabei reduzieren sie die Bildung der Glianarbe, wirken anti-apoptotisch, fördern die Angiogenese und stimulieren die endogene Plastizität durch Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen (Caplan und Dennis et al. 2006; Munoz et al. 2005).

1.5 Genetische Modifikation mesenchymaler Stromazellen

Für ein besseres Verständnis der MSC-Biologie sind Techniken zur genetischen Modifikation dieser Zellen von entscheidender Bedeutung. Bei Studien zur Gewebsreparatur oder -regeneration können durch Einschleusen von bestimmten Genen, die regenerativen Eigenschaften von MSC noch weiter erhöht werden. Die Kenntnis effizienter Verfahren bildet dabei die Grundlage für den Einsatz von MSC in der Zell- und Gentherapie oder dem *Tissue Engineering*.

Effiziente Technologien für die Einschleusung von genetischem Material ermöglichen die Regulation der Expression von Proteinen in einer Zielzelle oder Zielgewebe. Zellen können zur Synthese eines fluoreszierenden Proteins, beispielsweise GFP oder DsRed, gebracht und hierüber längerfristig markiert und von anderen Zellen unterscheidbar gemacht werden. Derartige Techniken können aber auch der Substitution fehlender oder nicht funktionierender Proteine in Zellen dienen, sowie der Produktion pharmakologisch wirksamer Substanzen. Durch Überexpression oder Ausschaltung von Genen, insbesondere von Transkriptionsfaktoren, könnten Prozesse, die möglicherweise bei der Transdifferenzierung oder Dedifferenzierung der MSC eine

Rolle spielen, näher spezifiziert werden. Hierbei würde nicht nur ein Gen, sondern ein vielseitiges Repertoire an Zielgenen im Expressionsprofil verändert werden.

Eine optimierte Methode des Gentransfers sollte daher die folgenden Bedingungen erfüllen: 1) Sie sollte vor der Degradation des Transgens durch Nukleasen in der intrazellulären Matrix schützen. 2) Sie sollte das Transgen durch die Plasmamembran direkt in den Nukleus transportieren. 3) Sie sollte keine oder wenig zytotoxische Effekte aufweisen (Gao et al. 2007).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze für den Gentransfer in eukaryote Zellen verfolgt. Methoden der nonviralen (Lavigne und Gorecki et al. 2006; Miyazaki et al. 2006) oder viralen (Blesch et al. 2004) Transfektion fanden dabei Anwendung. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile, die in Abhängigkeit der Fragestellung abgewägt werden müssen. Bei der Wahl eines geeigneten Systems sollten folgende Aspekte berücksichtigt werden: 1) Dauer der Proteinexpression: transient oder dauerhaft 2) Charakteristika der Zielzellen: leicht oder schwer transfizierbar (mitotisch aktive oder ruhende Zellen) 3) Weg des Gentransfers (*in vivo* oder *ex vivo*) 4) gewünschte zeitliche Regulation der Transgenexpression (induziert oder konstitutiv) 5) der maximale Grenzwert für die vektorinduzierte Immunantwort sollte abgewägt werden (Heyde et al. 2007; Phillips et al. 2007).

Die transienten Transfektionsmethoden basieren auf teilweise sehr verschiedenen Funktionsprinzipien. Grundsätzlich unterscheidet man physikalische und chemische Methoden. Zu den physikalischen Methoden gehören die Injektion nackter DNA (Wolff et al. 1990), die Elektroporation (Heller et al. 2005), die Genkanone (Yang et al. 1990; Yang und Sun et al. 1995) oder Ultraschall (Lawrie et al. 2000). Chemische Ansätze bedienen sich meist eines synthetischen oder natürlichen Trägers, um ein Transgen in eine Zelle einzuschleusen. Hierzu gehören die Calciumphosphat – Präzipitation (Graham und van der Eb et al. 1973), aber auch kationische Lipide, kationische Polymere oder Lipid-Polymerkombinationen (Midoux et al. 2009).

Der Vorteil viraler Transduktionstechniken liegt in ihrer weit höheren Effizienz mit der Fähigkeit zur langfristigen Transgenexpression.

Die transiente Transfektion umgeht Probleme, die mit der viralen Transduktion vergesellschaftet sind, wie zum Beispiel die erhöhten Sicherheitsanforderungen oder der größere Aufwand bei der Virusproduktion, schwer kontrollierbare Immunantworten in Transgenempfängern oder das Risiko einer onkogenen Transformation nach insertionaler Mutagenese viraler Fragmente in genomische DNA.

Limitationen der transienten Transfektion, wie ihre häufig niedrigere Effizienz, zytotoxische Effekte oder die nur transient vorhandene Genexpression, haben den breiten Einsatz dieser Methoden bisher verhindert. Auch das Potential nonviraler Techniken für die Generierung stabil transfizierter Klone wurde bisher nur in Ansätzen untersucht (Peister et al. 2004b; Hohenstein et al. 2008).

Die am weitesten verbreiteten Methoden der transienten Transfektion sind die Nukleofektion und Lipofektion. Aber auch die Magnetofektion hat sich für eine Vielzahl von Zelltypen als effektiv erwiesen (Gersting et al. 2004). Aus diesen Gründen wurden die drei Methoden in dieser Studie auf ihre Eignung zur transienten und stabilen Transgenexpression in MSC untersucht.

Die von der Firma Amaxa entwickelte Methode der Nukleofektion basiert auf dem Funktionsprinzip einer modifizierten Elektroporation. Über ein Nukleofektionsgerät wird ein elektrisches Feld appliziert, das in Biomembranen die Bildung von Mikroporen induziert. Die DNA kann nun direkt über das Zytosol in den Nukleus – dem Ort der Gentranskription – gelangen. Durch Kombination eines zelltypspezifischen Nukleofektionspuffers mit definierten Ionenkonzentrationen und Applikation eines geeigneten elektrischen Pulses, wird das Eindringen der Plasmid-DNA in das intrazelluläre Kompartiment optimiert. Diese Technik erwies sich bereits bei Transfektion von Zelllinien (Maasho et al. 2004), aber auch bei transfektionsresistenten primären Zellen, wie kortikalen Neuronen (Zeitelhofer et al. 2007), neuronalen oder embryonalen Stammzellen (Cesnulevicius et al. 2006; Siemen et al. 2005; Lakshmipathy et al. 2004) als äußerst effizient.

Die Lipofektion basiert auf Ladungsinteraktionen zwischen einem kationischen Lipid und der zu transfizierenden DNA (Felgner et al. 1987). Die Lipid-DNA-Komplexe gelangen in Vesikel verpackt über Endozytose, Mikropinozytose oder Phagozytose in den Intrazellulärraum, lokalisieren sich perinukleär und bilden dort Endosom-assoziierte Aggregate. Um in den Kern zu gelangen, muss die DNA vom Lipid und dem endosomalen Kompartiment dissoziieren. Dies ist der limitierende Schritt der Lipofektion und begründet die meist schwächere Transgenexpression im Vergleich zu anderen Methoden (Zabner et al. 1995; Wattiaux et al. 2000; Briane et al. 2002).

Das Prinzip der Magnetofektion besteht in der Bindung von DNA, Oligonukleotiden, siRNAs oder Viren an biokompatible Magnetitnanopartikel über elektrostatische Anziehungskräfte (Scherer et al. 2002; Dobson et al. 2006). Diese Nanopartikel sind circa 100 nm groß und haben einen superparamagnetischen Kern aus Eisenoxid, der

mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI) beschichtet ist. Die Zugabe eines weiteren kationischen Lipids zum Reaktionsansatz führt zu einer Verbesserung der Transfektionseffizienz. Die geformten Komplexe werden nach Applikation eines magnetischen Feldes über Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen. Der Vorteil dieser Methode besteht im Vergleich zur Lipofektion in der beschleunigten Sedimentation der Magnetofektinkomplexe auf die Zelloberfläche. Dies führt zu einer erheblich reduzierten Transfektionsdauer und einer verstärkten Aufnahme der Komplexe in die Zellen (Huth et al. 2004).

Abb. 3 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsmethoden.

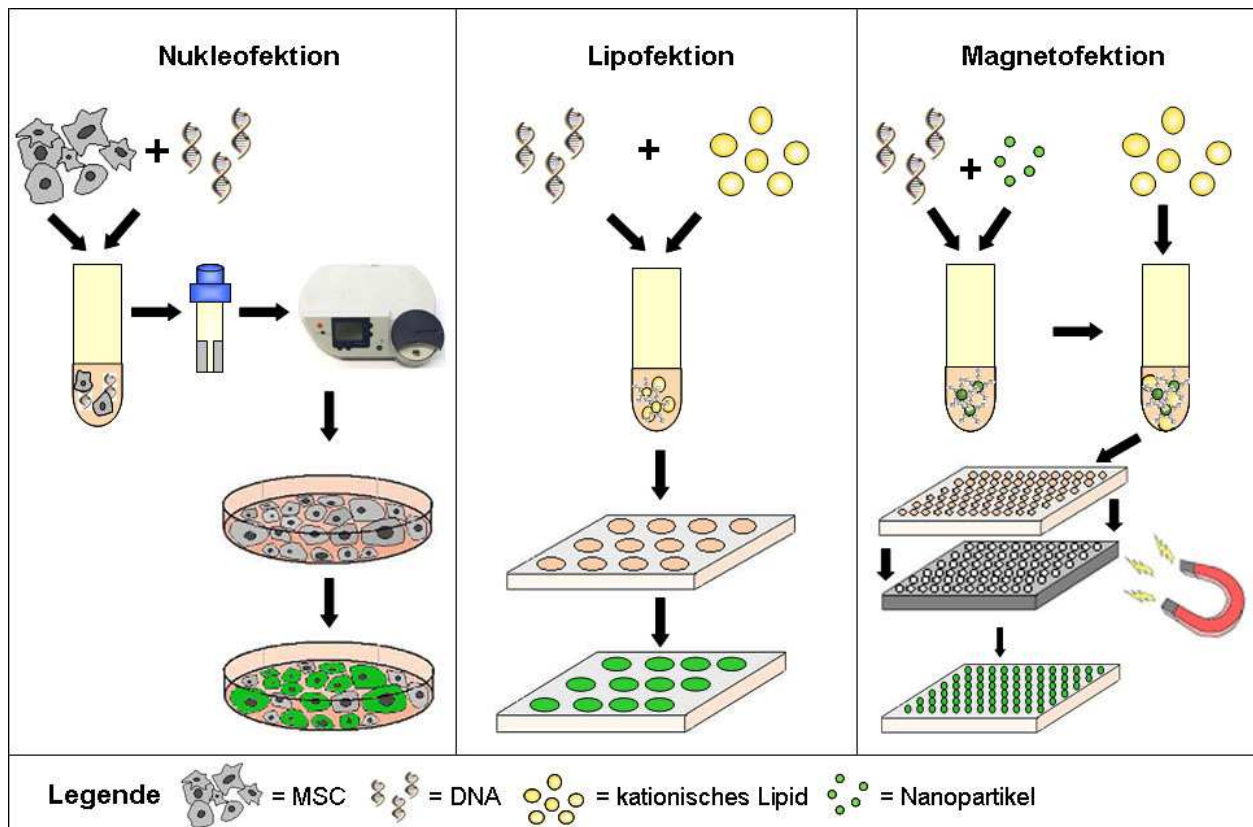


Abb. 3. Schematische Darstellung der Funktionsweise der Transfektionsmethoden: Nukleofektion, Lipofektion und Magnetofektion.

Bisher wurden die Methoden der Nukleofektion und Lipofektion nur an MSC des Menschen, der Ratte, des Rindes oder Schweines näher untersucht (McMahon et al. 2006; Colleoni et al. 2005; Aslan et al. 2006). Für murine MSC liegen diesbezüglich noch keine Erkenntnisse vor. Die Anwendbarkeit der Magnetofektion an MSC wurde bis heute nicht überprüft.

2 AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war es, MSC aus dem Knochenmark der Maus zu isolieren, die Kulturen hinsichtlich Reinheit, Proliferationsverhalten und Differenzierungspotential zu charakterisieren, um nach Etablierung dieses Modells ihre protektiven Eigenschaften im Schlaganfallmodell, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen. Zu Beginn dieser Dissertation gab es erste Hinweise darauf, dass MSC im Schlaganfallmodell der Ratte ischämieassoziierte Folgeschäden reduzieren können (Zhao et al. 2002). In den hier durchgeführten Experimenten sollte geklärt werden, über welche Mechanismen MSC neuroprotektiv wirksam werden. Hierbei galt es die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

- 1) Können MSC des Knochenmarks in einem – in unseren Labor etablierten – *in vitro* Schlaganfallmodell des kombinierten Sauerstoff – Glukose – Entzugs (OGD) Neurone vor dem Zelluntergang schützen?
- 2) Falls ja, über welche Mechanismen schützen MSC vor apoptotisch-neuronalem Zelluntergang? Handelt es sich um einen Effekt, der direkten Zell- zu Zell-Kontakt zwischen Neuronen und MSC erfordert oder spielen parakrine Mechanismen der MSC die entscheidende Rolle?
- 3) Welche Faktoren der MSC führen zur Reduktion von neuronalem Zelltod nach OGD und welche intrazellulären Signalkaskaden werden dabei aktiviert?
- 4) Wirken MSC nach systemischer Applikation *in vivo* in Mäusen nach zerebraler Ischämie (MCAo) ebenfalls neuroprotektiv? Führt eine MSC-basierte Zelltherapie nach experimentellem Schlaganfall zu einer signifikanten Reduktion der Schlaganfallvolumina und zu einer verbesserten funktionellen Regeneration in den betroffenen Tieren?

Um bei der Entwicklung von zellbasierten Therapiekonzepten das zyto- und geweberegenerative Potential von MSC weiter zu erhöhen, erscheint deren Einsatz als zellulärer Vektor für gentherapeutische Applikationen interessant, insbesondere um durch das Einschleusen von krankheitsrelevanten, beziehungsweise modifizierenden Genen das Wirkpotential der Zellen weiter zu optimieren. Bisherige Verfahren hierfür basieren auf viralen Transduktionmethoden. Da diese jedoch Gefahren und Limitationen in sich bergen, sollten im Rahmen dieser Dissertation nonvirale

Transfektionstechniken hinsichtlich ihrer Eignung des transienten und stabilen Gentransfers in murinen MSC untersucht werden. Endziel war die Überprüfung der Einsatzfähigkeit derart stabil transfizierter MSC für *in vivo* Applikationen. Aufgrund seiner versatilen Funktionen in der Hämatopoese und Zyto-/Neuroprotektion (Arcasoy et al. 2008), wurde Erythropoietin exemplarisch ausgewählt, um nach stabiler Integration in das MSC-Genom die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

5) Sind nonvirale Transfektionsmethoden als Alternative zu viralen Ansätzen geeignet, um in MSC in relevantem Ausmaß eine stabile (dauerhafte) Transgenexpression zu induzieren?

6) Weisen die von MSC exprimierte Transgene *in vitro* und *in vivo* eine biologische Aktivität auf, die tendenziell den Einsatz derart genetisch modifizierter Zellen in experimentellen *in vivo* Studien erlauben?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkulturmodell der murinen Mesenchymalen Stromazellen (mMSC)

3.1.1 Isolierung und Kultivierung von mMSC

Die mMSC wurden aus dem Knochenmark der Tibiae und Femures von 8-12 Wochen alten C57BL/6 Mäusen (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin, Deutschland) isoliert. Die Tiere wurden mittels Isoflurananästhesie narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die unteren Extremitäten der Mäuse wurden vom Rumpf abgetrennt und das Muskel- und Bindegewebe entlang der Tibiae und Femures abpräpariert. Unter Verwendung von 23 und 25 gauge Nadelspritzen wurden die Epiphysen der Tibiae und Femures angebohrt und mit je 5 ml komplettem Zellkulturmedium (KZM) durchgespült. Die gewonnenen Knochenmarkzellen wurden für 10 min bei 200 g und 4°C zentrifugiert und in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/cm² in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden in 5 ml KZM, bestehend aus *α-Mimimal Essential Medium* (αMEM), 20% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Inkubation von 24 h wurden die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (PBS) gespült, um die nicht-adhärenente Zellpopulation zu entfernen. 5 Tage nach dem Ausplattieren erfolgte die Trypsinierung der adhärenenten Zellen mit 0,5%/0,2% (w/v) Trypsin/EDTA für 2 min bei 37°C im Inkubator. Die Knochenmarkzellen wurden in einer Verdünnung von 1:2 wieder ausplattiert (Passage 1). Alle folgenden Passagen wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/cm² in 145 cm² Petrischalen mit 20 ml KZM ausgesät. Medienwechsel erfolgten in den Kulturen alle 3-4 Tage. mMSC der frühen Passagen wurden bis zum Erreichen einer 70-80% Konfluenz für 7-14 Tage kultiviert. Die mMSC ab Passage 7 und alle folgenden Subkulturen wurden nach jeweils 7 Tagen geerntet. Für das Trypsinieren der mMSC wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 70-80% einmal kurz mit PBS gespült. Anschließend wurde 0,5%/0,2% (w/v) Trypsin/EDTA zu den Zellen zugesetzt. Während einer Inkubation von 2 min bei 37°C im Inkubator lösten sich die Zellen vom Boden der Petrischale. Nach Zugabe des jeweiligen Zellkulturmediums wurden die Zellen bei 200 g zentrifugiert. Die mMSC wurden mit Trypanblau gefärbt, in

einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt und anschließend in einer Dichte von 50 Zellen/cm² wieder ausgesät.

Zellen der Passage 7 wurden tiefgefroren und für alle im Folgenden beschriebenen Experimente verwendet. Für das Einfrieren der mMSC wurden die Zellen trypsinisiert und in Kryoröhrchen als je 1 ml Aliquots á 0,5 x 10⁶ Zellen/Röhrchen in α MEM, 30% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 5% DMSO tiefgefroren. Die Kryoröhrchen wurden in einem Kryoeinfrierkontainer bei -80°C über Nacht aufbewahrt und anschließend bei -200°C in flüssigem Stickstoff zur Langzeitkonservierung gelagert. Das Auftauen der Zellen geschah zügig bei 37°C im Wasserbad. Die Zellen eines Röhrchens wurden in eine 145 cm² Petrischale in 20 ml KZM ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen trypsinisiert und in einer Dichte von 50 Zellen/cm² wieder ausgesät. Abb. 4 fasst die einzelnen Schritte der mMSC-Isolierung aus dem Knochenmark zusammen.

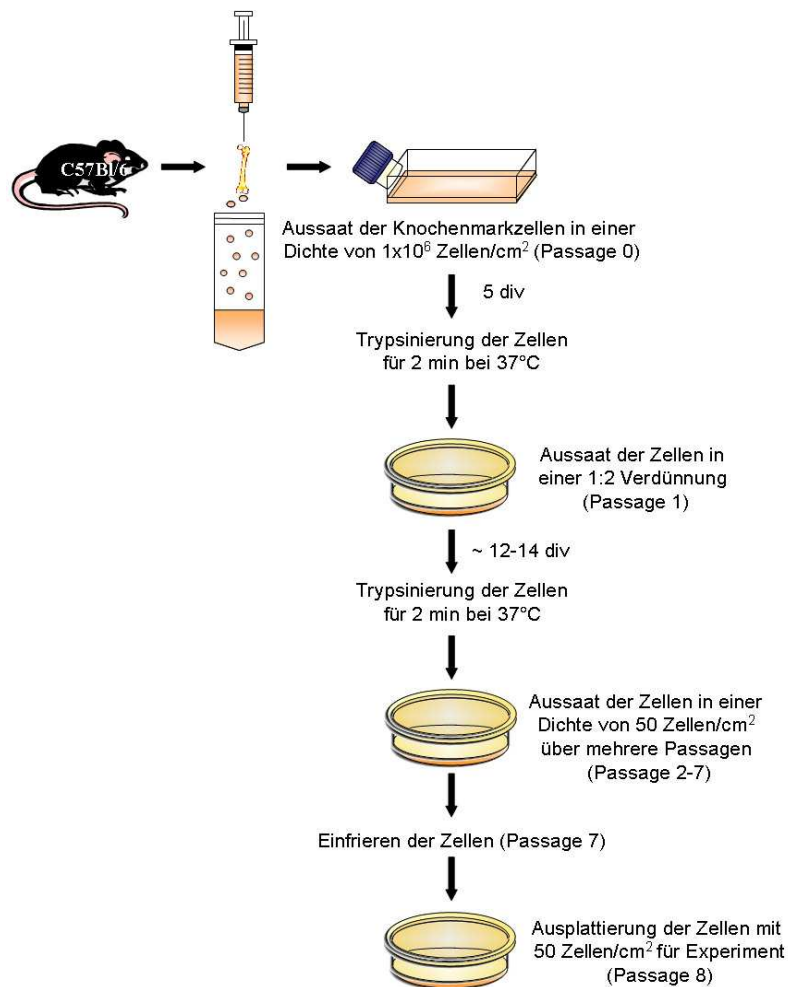


Abb. 4. Schematische Darstellung der Isolierung der mMSC aus heterogenen Knochenmarkmischkulturen

3.1.2 Untersuchung der Proliferationseigenschaften der mMSC

Die Proliferationseigenschaften der mMSC wurden mittels Wachstumskurve und mit einer Untersuchung zur Bildung traditionell kolonieformender Einheiten (t-CFU, *traditional colony forming unit*) evaluiert.

Für die Erstellung einer Wachstumskinetik wurden die mMSC in einer Dichte von 50 Zellen/cm² in 58 cm² Petrischalen ausgesät und jeden Tag wurden für die Dauer von 10 Tagen 3 Petrischalen trypsinisiert. Die Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt und in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt. Die Vermehrung der Zellzahl wurde berechnet aus der Zellzahl nach dem Trypsinieren zum jeweiligen Zeitpunkt, dividiert durch die Zellzahl bei Aussaat der Zellen. Die Zahl der Zellverdopplungen wurde zur Zahl der initial ausgesäten Zellen ins Verhältnis gesetzt.

Für den t-CFU Assay wurden je 100 Zellen in 58 cm² Petrischalen ausplattiert und in KZM kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die mMSC einmal mit PBS gespült und mit einer in Methanol gelösten 3% Crystalviolettlösung für 5 min gefärbt. Danach wurden die Platten mit destilliertem Wasser gewaschen und die gefärbten Kolonien mit einer Größe von mehr als 2 mm gezählt. Die t-CFU Aktivität in [%] wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\text{t-CFU Aktivität in [\%]} = \frac{\text{Zahl der Kolonien nach 14 Tagen}}{\text{Zahl der ausgesäten Zellen}} \times 100$$

3.1.3 Differenzierung der mMSC in Fett, Knochen und Knorpel

Die Differenzierung der mMSC in Fett, Knochen und Knorpel erfolgte analog zu bereits publizierten Protokollen mit einigen Modifikationen (Peister et al. 2004a; Sekiya et al. 2005).

Für die adipogene und osteogene Differenzierung wurden die Zellen zunächst in einer Dichte von 50 Zellen/cm² in 58 cm² Zellkulturschalen ausgesät und für 4-6 Tage in KZM kultiviert. Die Differenzierung wurde durch Zugabe des jeweiligen Differenzierungsmediums ausgelöst. Weitere Medienwechsel erfolgten alle 3-4 Tage.

Adipogene Differenzierung. Die Adipogenese wurde initiiert durch Zugabe eines Mediums bestehend aus α MEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 5 μ g/ml Insulin, 50 μ M Indomethacin, 1 μ M Dexamethason und 0,5 μ M 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX). Die Zellen wurden für 21 Tage mit dem

Fettdifferenzierungsmedium kultiviert und danach einmal mit PBS gespült und mit 10% Formalin für 20 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Die Visualisierung der Fettdifferenzierung erfolgte mit einer 0,5%igen Oil Red O Färbelösung, gelöst in Methanol für 20 min bei RT.

Osteogene Differenzierung. Durch Zugabe des Knochendifferenzierungsmediums für die Dauer von 21 Tagen wurde die osteogene Differenzierung ausgelöst. Das hierfür verwendete Induktionsmedium bestand aus α MEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 20 mM β -Glycerolphosphat, 50 ng/ml L-Thyroxin, 1 nM Dexamethason, 50 μ g/ml L-Ascorbat-2-Phosphat. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und mit 10% Formalin für 20 min bei RT fixiert. Die Visualisierung der Calciumphosphatablagerungen geschah mit einer 1%igen Alzarin Red S-Färbelösung, gelöst in deionisiertem Wasser, pH 4,1 für 20 min bei RT.

Chondrogene Differenzierung. Zur Induktion der Knorpeldifferenzierung wurden je 200.000 Zellen bei 450 g in einem 15 ml Polypropylenröhrchen zentrifugiert. Die entstandenen Zellsedimente wurden für 21 Tage in einem serumfreien Medium, bestehend aus *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit hohem Glukoseanteil, 10 ng/ml TGF- β 3 (*transforming growth factor- β 3*), 500 ng/ml BMP-6 (*bone morphogenetic protein-6*), 100 nM Dexamethason, 50 μ g/ml Ascorbat-2-Phosphat, 40 μ g/ml L-Prolin, 100 μ g/ml Pyruvat und 50 mg/ml ITS+™ Premix (MA: 6,25 μ g/ml Insulin, 6,25 μ g/ml Transferrin, 6,25 ng/ml Selensäure, 1,25 mg/ml bovines Serumalbumin, 5,35 mg/ml Linolensäure) kultiviert. Die entstandene Knorpelmatrix wurden mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert, in Paraffin eingebettet und in 5 μ m dicke Scheiben geschnitten. Für die histologische Aufarbeitung wurden die Schnitte zunächst entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Die Färbung erfolgte mit einer 1%igen Toluidinblaulösung (gelöst in destilliertem H₂O) für 5 min bei RT. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, und anschließend mit Vitro Clud® eingedeckelt.

3.1.4 Chromosomenpräparation und Karyotypisierung

Für die Bestimmung numerischer Chromosomenaberrationen wurden Chromosomenpräparationen zur anschließenden Karyotypisierung angefertigt.

Hierfür wurden mMSC der Passage 7 in einer Zelldichte von 50 Zellen/cm² ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Die Fixierung der Metaphasechromosomen erfolgte durch Zugabe von 0,04 μ g/ml Colcemid zum Zellkulturmedium für 90 min bei 37°C im

Inkubator. Die Zellen wurden trypsiniert und für 10 min bei 180 g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden tropfenweise 5 ml einer hypotonen 0,4% KCl-Lösung zugegeben. Während der folgenden Inkubation von 10 min bei 37°C im Wasserbad kam es zur Anschwellung der Zellen aufgrund des osmotischen Gradienten. Die Zellen wurden erneut für 10 min bei 180 g zentrifugiert und danach durch sehr langsame Zugabe eines Fixativs bestehend aus Methanol:Eisessig im Verhältnis 3:1 (bei -20°C vorgekühlt) fixiert. Im Folgenden wurden die Zellen drei weitere Male bei 180 g für 10 min zentrifugiert und mit dem Methanol:Eisessig-Gemisch fixiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Fixativ bis auf 1 ml abpipettiert und die Zellsuspension durch Resuspension homogenisiert. Die Zellen wurden nun vorsichtig auf gereinigte Objektträger aufgetropft. Nach Antrocknung der Zellen, wurden die Objektträger für 10 min mit einer 10%igen Giemsalösung bei RT gefärbt. Die Chromosomenpräparationen wurden einmal mit destilliertem Wasser gespült und im Anschluss mit Vitro Clud[®] eingedeckelt. Die Chromosomensätze der einzelnen Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt.

Zusätzlich wurden Chromosomenpräparationen aus nativen Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäusen angefertigt. Hierfür wurden 4×10^7 Knochenmarkszellen in 5 ml KZM in 25 cm² Flaschen ausplattiert. Sofort nach Aussaat wurde direkt 0,04 µg/ml Colcemid zu den Zellen zugesetzt und danach die Chromosomenpräparate angefertigt.

3.1.5 Durchflusszytometrie (FACS; Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)

Um die Präsenz von bestimmten Zelloberflächenepitopen auf den mMSC zu untersuchen, wurde eine Durchflusszytometrie mittels Cytomics FC 500 FACS oder FACSCalibur[™] durchgeführt. Für die Vorbereitung der Proben wurden 500.000 mMSC für 5 min bei 200 g zentrifugiert und anschließend mit 300 µl FACS-Puffer mit 2% Mausserum für 30 min bei RT geblockt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und für 20 min bei RT mit einem PE-, FITC- oder APC konjugierten Antikörper auf einem Schüttler unter Lichtabschirmung inkubiert. FITC-konjugierte Antikörper wurden in einer Konzentration von 2 µg/ml und PE- und APC-konjugierte Antikörper wurden in einer Konzentration von 2,5 µg/ml eingesetzt. Vor der FACS-Analyse wurden die Zellen noch zweimal für 5 min bei 200 g zentrifugiert und mit FACS-Puffer gewaschen.

Die Auswertung der FACS-Daten wurde mit Hilfe der WinMDI oder CellQuest Pro Software durchgeführt. Die Zellen wurden mit den folgenden Antikörpern, inklusive geeigneter Isotypkontrollen, markiert:

Marker	Antikörper
Hämatologischer Marker	CD3e-FITC
Hämatologischer Marker	CD11b-PE
Hämatologischer Marker	CD34-PE
Hämatologischer Marker	CD45-PE
Hämatologischer Marker	CD45R/B220-FITC
Hämatologischer Marker	Ly6G/ Ly6C-FITC
Hämatologischer Marker	Ter119/ Erythroid cells-FITC (Ly-76)
Hämatologischer Marker	MHCII-PE
Kostimulatorisches Molekül	CD40-APC
Kostimulatorisches Molekül	CD80-PE
Kostimulatorisches Molekül	CD86-APC
Endothelzellmarker	Flk1-PE (VEGF-R2)
Endothelzellmarker	CD31-FITC (PECAM-1)
Endothelzellmarker	VCAM1-FITC (CD106)
Zelladhäsionsmolekül	CD29-FITC (Integrin β_1)
Zelladhäsionsmolekül	CD44-FITC
Stammzellmarker	Sca1-PE (Ly6A/E)
Stammzellmarker	CD90.1-PE (Thy1.1)
Stammzellmarker	CD90.2-FITC (Thy1.2)
Stammzellmarker	CD117-FITC (c-kit)
Isotypkontrolle	Ratte IgG _{2a} κ -PE
Isotypkontrolle	Hamster IgG ₂ κ -PE
Isotypkontrolle	Maus IgG _{2a} κ -PE
Isotypkontrolle	Ratte IgG _{2b} κ -FITC
Isotypkontrolle	Ratte IgG _{2a} κ -APC

Tabelle 1. Verwendete FACS-Antikörper zur Analyse der Expression verschiedener Zelloberflächenepitope auf den mMSC. Alle FACS-Antikörper wurden bei Becton Dickinson gekauft.

3.2 *In vitro* Schlaganfallmodell des kombinierten Sauerstoff – Glukose – Entzugs (Oxygen – Glucose – Deprivation, OGD)

3.2.1 Neuronale Zellkultur

Primäre neuronale Zellkulturen wurden aus der Großhirnrinde (Cortex) von Embryonen des Embryonaltages E17 von trächtigen Wistarratten (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin, Deutschland) gewonnen. Die Zellen wurden nach der Methode von Brewer (1995) mit einigen Modifikationen kultiviert.

Die Mutterratten wurden mit einer Isofluraninhalationsanästhesie betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Das Fell der Tiere wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und das Abdomen eröffnet. Aus dem Uterus wurden unter sterilen Bedingungen die Embryonen entnommen und in eine Petrischale mit PBS transferiert. Unter einem Präparationsmikroskop wurde die Schädelkalotte mit einer Pinzette eröffnet und das Gehirn entnommen. Nach Entfernung der Meningen wurden die Cortices präpariert, in PBS überführt und dreimal mit diesem gewaschen. Danach folgte die enzymatische Verdauung des Hirngewebes mit 0,5%/0,2% (w/v) Trypsin/EDTA für 15 min bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde einmal mit PBS und danach mit einem Nährmedium, bestehend aus *Modified Eagle's Medium* (MEM), 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 44 mM Glukose, 100 IE Insulin/L gespült. Das Hirngewebe wurde mit einer Glas-Pasteur-Pipette vorsichtig dissoziiert und bei 210 g für 2 min bei RT zentrifugiert. Das Zellsediment wurde nun in einem Starter-Medium, bestehend aus *Neurobasal Medium* (NBM), B27 Supplement (10 ml auf 500 ml), 100 U/L Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,5 mM L-Glutamin und 25 µM Glutamat aufgenommen.

Die Zellzahl wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt und mittels Trypanblaufärbung wurde die Zahl lebender und toter Zellen in den Präparationen quantifiziert.

Vor Aussaat der kortikalen Neurone wurden die verwendeten Zellkulturplatten auf folgende Weise beschichtet: Inkubation für 1 h bei RT mit Poly-L-Lysin (0,5% w/v in PBS), einmal Spülen mit PBS, Beschichtung mit Collagen G-Medium, bestehend aus MEM, 5% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES, 0,03% Collagen G für 1 h bei 37°C im Inkubator, zweimal Spülen mit PBS und Vorlage von

Startermedium in die Vertiefungen der Zellkulturplatten. Die Zellen wurden nun in einer Dichte von 200.000 Zellen/cm² in die Vertiefungen eingesät und im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Ab dem vierten Tag erfolgte nun zweimal wöchentlich ein halber Mediumwechsel mit Neurobasalmedium (entspricht Starter-Medium ohne 25 µM Glutamat; Rezeptur siehe oben).

3.2.2 Kultivierung muriner neuronaler Stammzellen (mNSC)

Für die NSC Präparation wurden Gehirne von 8-10 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäusen verwendet. Diese wurden zweimal mit PBS gespült, bevor aus 2 mm dicken Hirnschnitten die Seitenventrikel mit der umliegenden subventrikulären Zone (SVZ) präpariert wurden. Hierbei wurden Striatum und Corpus callosum entfernt und die SVZ als dünne Schicht um die Seitenventrikel gewonnen. Das Gewebe wurde in kleine Stücke geschnitten und für 30-60 min in einer Papain-DNase-Lösung (47,2 mg Papain, 9 mg Cystein, 9 mg Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in 50 ml *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 110 g für 10 min pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Gewebe in einer Ovomuroid-Lösung (0,7 mg/ml Ovomuroid in *Neurobasal A Medium* (NBM-A), 2% B27 Supplement w/o Retinsäure, 1% L-Glutamin) dissoziiert. Die einzelnen Zellen wurden durch Zentrifugation bei 110 g für 10 min erneut pelletiert und in Wachstumsmedium (NBM-A, 2% B27 Supplement w/o Retinsäure, 1% L-Glutamin, 10 ng/ml EGF, 20 ng/ml b-FGF) resuspendiert. Um Neurosphären zu generieren, wurden die Zellen in einer Dichte von 4.000 Zellen/cm² in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nach der ersten Subkultivierung der Neurosphären, wurden die Zellen in „*low-attachment*“ Zellkulturflaschen weiter kultiviert. Die Experimente wurden mit Zellen der Passage 4-5 durchgeführt.

3.2.3 Kultivierung humaner Mesenchymaler Stromazellen (hMSC)

Die hMSC wurden freundlicherweise von Prof. Darwin Prockop vom *Center for Gene Therapy* der Tulane University, New Orleans, LA, USA zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um hMSC-Präparationen, deren Stammzellplastizität und Proliferationseigenschaften bereits vollständig charakterisiert wurden (Colter et al. 2000; Sekiya et al. 2002). Die Zellen wurden nach einem vom „*Institutional Review Board*“ geprüften Protokoll aus dem Knochenmarkspirat der Crista iliaca eines männlichen erwachsenen und gesunden Spenders kaukasischer Herkunft isoliert. Die kernhaltigen

Zellen des Punktats wurden über Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Paque) gewonnen und in humanem MSC-Medium aufgenommen. Dieses bestand aus α MEM, 16,5% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin. Kryoröhrchen mit gefrorenen hMSC der Passage 3 wurden nach dem Auftauen in 25 ml dieses Mediums in 145 cm² Petrischalen ausgesät und für 24 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Zellernte mit Trypsin/EDTA wurden die hMSC nun in einer Dichte von 50 Zellen/cm² in 145 cm² Petrischalen ausplattiert und für 10-12 Tage bis zum Erreichen einer 70-80%igen Konfluenz kultiviert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

3.2.4 Induktion der Neuropotektion

Bei allen Experimentalgruppen (inklusive Kontrollgruppe) erfolgte in den 24 well Platten am Tag 8 ein partieller Mediumwechsel. Hierfür wurden 300 μ l aus jedem well entfernt und 250 μ l frisches Neurobasalmedium supplementiert mit 4% FKS zu jedem well hinzugefügt. Das Volumen je well betrug 500 μ l (dies entspricht einer Serumendkonzentration von 2% je well).

Die Präkonditionierung der Neurone erfolgte durch direkte Kokultur mit MSC oder durch Zugabe von MSC-konditioniertem Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten in variablen Konzentrationen.

Kokulturrexperimente. Für die direkte Kokultur der Neurone mit MSC wurde ein Transwell-Kokultur-System etabliert. Hierbei wuchsen die Neuronenkulturen am Grund der wells, während 10.000 mMSC oder 1.000 hMSC in Zellkultureinsätze (*Inserts*) mit einer PET (Polyethylenterephthalat)-Membran von 0,4 μ m Porengröße in 150 μ l NBM, 4% FKS ausgesät und für 48 h mit den Neuronen kokultiviert wurden. Die Membran erlaubte die Diffusion löslicher Faktoren, während Zell- Zellkontakte zwischen den Kompartimenten verhindert wurden. Die unterschiedlich eingesetzten Zellzahlen der hMSC und mMSC waren wegen des unterschiedlichen Proliferationsverhaltens der Zellen unter den Kokulturbedingungen erforderlich. Während die hMSC proliferierten, wiesen die mMSC einen Proliferationsstopp auf.

Zusätzlich wurden 100 μ l NBM mit 4% FKS in jedes well pipettiert (500 μ l Endvolumen/well). Unter gleichen Experimentalbedingungen wurden als Kontrollgruppe entweder keine Zellen oder 1.000, 10.000 oder 20.000 mNSC mit Neuronen kokultiviert.

Experimente mit MSC-konditioniertem Medium. Zur Untersuchung neuroprotektiver Eigenschaften von MSC-konditioniertem Medium wurden kortikale Rattenneurone mit Medium behandelt, worin zuvor entweder hMSC oder mMSC wuchsen.

Dieses wurde wie folgt hergestellt: mMSC oder hMSC wurden in einer Dichte von jeweils 50 Zellen/cm² in 145 cm² Petrischalen ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70-80% in ihrem jeweiligen Proliferationsmedium kultiviert. Nun wurden 20 ml frisches NBM mit 2% FKS für die Dauer von 24 h zu den MSC zugesetzt, dieses anschließend abgenommen, über einen 0,2 µm Filter filtriert, aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren.

hMSC- und mMSC-konditioniertes Medium wurde nun in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 3% und 5%) und zu verschiedenen Zeitpunkten (-48 h, -30 min, post OGD) zu den Neuronenkulturen zugesetzt.

3.2.5 Kombiniertes Sauerstoff – Glukose – Entzug (OGD)

Die OGD an kortikalen Rattenneuronen wurde nach einer Kultivierungsdauer von 10 Tagen in 24 well Platten durchgeführt.

Vor Beginn der OGD wurden die *Inserts* aus den wells entfernt, das gesamte Medium abgesaugt und die primären Neuronenkulturen einmal mit PBS gespült. Die OGD startete durch Zugabe von 500 µl/well einer deoxygenierten und aglykämischen basalen Salzlösung (BSL₀: 143,8 mM Na⁺, 5,5 mM K⁺, 1,8 mM Ca²⁺, 1,8 mM Mg²⁺, 125,3 mM Cl⁻, 26,2 mM HCO³⁻, 1,0 mM PO₄³⁻, 0,8 mM SO₄²⁻; pH 7,4) in einer anoxischen Atmosphäre. Die Anoxie wurde in einem befeuchteten und gasdichten Inkubator (Concept 400) bei 37°C und unter Durchfluss eines Gasgemisches von 5% CO₂, 85% N₂ und 10% H₂ durchgeführt. Die OGD dauerte zwischen 90-120 min.

In Kontrollexperimenten wurden die Neurone keiner OGD unterzogen. Sie wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 500 µl BSL₂₀ (entspricht BSL₀ mit 20 mM Glukose und 2% FKS) je well versetzt. Die Neurone wurden für die Dauer des Versuches in der normoxischen Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37°C gehalten.

Sofort nach Ende der OGD wurde bei den OGD-behandelten Zellen und den Kontrollgruppen das Medium entfernt und durch 400 µl Medium ersetzt. Dieses bestand aus 50% frischem NBM und 50% neuronenkonditioniertem Medium, welches am Tag 8 vor der Präkonditionierung abgenommen wurde, und 2% FKS. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ für 24 h weiter kultiviert.

Für alle Experimente wurden jeweils 4 wells einer 24 well Platte für einen Ansatz verwendet. Um Variabilitäten von Platte zu Platte zu minimieren, enthielt jede Platte eine unbehandelte Kontrollgruppe.

3.2.6 Laktat-Dehydrogenase (LDH) Bestimmung

Die LDH ist ein direkter Parameter für die Beurteilung des Zellunterganges in den Neuronenkulturen. Bei Zellschädigung kommt es zum Verlust der Membranintegrität und zur Freisetzung der LDH aus den Zellen in den Überstand. Die LDH gibt dabei keine Auskunft über die Todesart, ob Apoptose oder Nekrose, korreliert aber hervorragend mit der Zahl der untergegangenen Zellen in den Kulturen (Koh and Choi et al. 1987).

24 h nach Ende der OGD wurde die LDH-Aktivität im Überstand der Neuronenkulturen gemessen. Zur Messung der LDH-Aktivität wurden 25 µl Probe aus den wells in Doppelbestimmungen in eine 96 well Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurden in je 2 well jeder Mikrotiterplatte 25 µl eines LDH Enzymstandards mit einer Enzymaktivität von 500 U/ml gegeben. Zu jedem well der Mikrotiterplatte wurden nun 100 µl eines 0,1 M LDH-Puffers zugefügt. Der 0,1M LDH-Puffer wurde aus einer 10X Stammlösung (1 M) hergestellt. Für die Herstellung der Stammlösung wurden 45,3 g KH_2PO_4 und 116,1 g K_2HPO_4 in circa 800 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und auf 1000 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt. Zu 20 ml des 0,1 M LDH-Puffers wurden vor Verwendung 3 mg β -NADH beigemischt. Danach wurden zu jedem well der Mikrotiterplatte 25 µl Pyruvatlösung (Herstellung: 1,25 g Na-Pyruvat auf 500 ml 0,1 M LDH-Puffer) pipettiert. Die LDH-Aktivität wurde in einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 340 nm zehnmal alle 20 Sekunden gemessen. Die Extinktionsabnahme bei 340 nm zeigt die Abnahme des Substrates β -NADH als annähernd lineare Funktion. Die negative Steigung dieser Funktion konnte mit der Extinktionsabnahme der Standard LDH-Lösung von 500 U/ml in Relation gesetzt werden. Hierüber ließen sich nun die LDH-Aktivitäten in U/ml Medium in den Proben berechnen.

Danach wurden 20 µl einer 10% Triton X-100 Lösung zu jedem well pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dies führte zum Absterben aller Zellen und ermöglichte die Messung der Gesamt-LDH aus allen Zellen eines wells. Nach Ablauf der Inkubation wurde die LDH erneut quantifiziert.

Zur Berechnung des durch die OGD entstandenen Schadens wurden sowohl die LDH-Werte der OGD-behandelten wells, als auch der BSL₂₀ behandelten wells durch die

Gesamt-LDH-Werte dividiert. Nun wurden von den LDH-Werten der OGD-behandelten Kulturen die LDH-Werte der BSL₂₀-behandelten Gruppen (als Hintergrund-LDH) subtrahiert. Die normoxische BSL₂₀-Stimulation wurde auf 0% Zellschaden normiert und die OGD-Behandlung auf 100% Zellschaden.

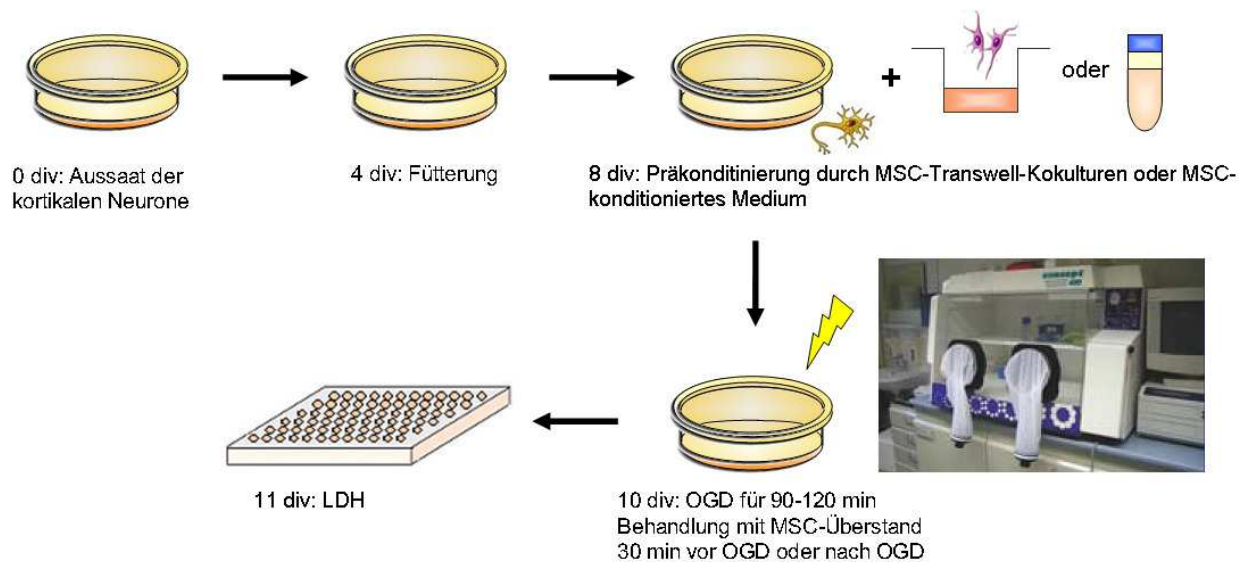


Abb. 5. Modell des kombinierten Sauerstoff – Glukose – Entzugs (OGD). Primäre kortikale Neurone wurden aus Rattenembryonen (E17) präpariert und in beschichtete 24 well Platten ausgesät. Nach Kultivierung für 8 div wurden die Neurone durch Kokultur mit MSC oder MSC-konditioniertem Medium präkonditioniert. Andere Versuchsgruppen wurden erst 30 min vor OGD oder direkt nach OGD mit MSC-konditioniertem Medium behandelt. Nach 10 div wurde die OGD für die Dauer von 90-120 min durchgeführt und 24 h später der neuronale Zelltod mittels LDH-Messung bestimmt.

3.2.7 Acridin Orange und Ethidiumbromidfärbung

Ethidiumbromid und Acridin Orange sind fluoreszierende DNA-interkalierende Färbeagenzien, die zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen in neuronalen Zellkulturen unterscheiden können. Acridin Orange ist grün fluoreszierend, membranpermeabel und färbt vitale Zellen. Ethidiumbromid kann intakte Zellmembranen nicht penetrieren und markiert den Nukleus in Zellen mit gestörter Zellintegrität orange. Die Doppelfärbung mit Ethidiumbromid und Acridin Orange ermöglicht die Unterscheidung verschiedener Zustandsformen der Zellen: Zellen mit einem normal großen grün fluoreszierenden Kern repräsentieren lebende Zellen. Dagegen sind grün fluoreszierende Zellen mit einem kondensierten, fragmentierten beziehungsweise geschrumpften Nukleus früh-apoptotische Zellen. Spät-apoptotische Zellen verfügen über einen rot fluoreszierenden kondensierten, geschrumpften oder fragmentierten Nukleus. Nekrotische Zellen imponieren durch einen rot fluoreszierenden normal großen oder vergrößerten Kern.

24 h nach durchgeführter OGD wurden primäre kortikale Neuronenkulturen mit 2 µg/ml Acridin Orange und 2 µg/ml Ethidiumbromid für 5 min inkubiert. Mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop wurde der Zellschaden quantifiziert. Hierfür wurden je Versuchsgruppe bei 400X Vergrößerung 3 well einer 24 well Platte in jeweils 5 Gesichtsfeldern/well die apoptischen, nekrotischen und nicht geschädigten Zellen gezählt.

3.3 In vivo Schlaganfallmodell

3.3.1 Filamentmodell – Okklusion der A. cerebri media (MCAo)

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden auf Grundlage der Richtlinien des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, Berlin ausgeführt.

Zur Erzeugung eines experimentellen Schlaganfalls wurden 8-12 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse einer 60 min andauernden filamentösen Okklusion der A. cerebri media (MCAo) unterzogen. Die Schlaganfälle wurden von Sabine Cho und Katharina Stohlmann durchgeführt. Die Tiere wurden mittels Inhalationsnarkose in einem N₂O-O₂-Gasgemisch (69% N₂O, 30% O₂) anästhesiert. Die Narkose wurde mit 1,5% Isofluran eingeleitet und dann mit 1% Isofluran fortgeführt. Unter Benutzung eines Heizkissens und eines *Feedback*-Temperaturreglers wurde die Körpertemperatur der Mäuse bei 36,5°C ± 0,5°C konstant gehalten. Die zerebrale Ischämie wurde durch das Einführen eines beschichteten (Silikon-Resin-Gemisch) 8.0 Nylon-Monofilamentfadens initiiert. Das Filament wurde dafür in die rechte A. carotis interna bis zum Abgang der A. cerebri anterior eingeführt. Dadurch wurde die A. cerebri media und die A. choroidea anterior okkludiert. Die Filamente wurden nach 60 min wieder entfernt, wodurch die Reperfusion ermöglicht wurde. Der regionale zerebrale Blutfluß wurde mittels Laser-Doppler-Flußmetrie gemessen, fiel auf weniger als 20% während der Ischämiephase und erreichte wieder 100% innerhalb von 5 min nach Reperfusion. Die Tiere wurden für 2 h nach Schlaganfall in einem beheizten Käfig gehalten und kehrten danach wieder in ihre normalen Käfige mit freiem Zugang zu Futter und Wasser zurück.

Vor dem Schlaganfall und täglich nach dem Schlaganfall wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Als Verhaltenstest zur orientierenden Einschätzung des sensomotorischen Defizits wurde der Bederson-Score (Bederson et al. 1986) verwendet. Dieser teilt sich wie folgt in die Grade 0-3 ein:

Grad 0: normal – kein beobachtbares Defizit

Grad 1: moderates Defizit – Flexion der Vorderpfote

Grad 2: schweres Defizit – Flexion der Vorderpfote und verminderter Widerstand gegen seitlichen Druck

Grad 3: wie Grad 2, nur zusätzliches Kreiseln der Tiere

Alle Mäuse erhielten einen experimentellen Schlaganfall. 24 h später wurden 1×10^6 hMSC (von der Firma Pharmicell zur Verfügung gestellt) in einem Volumen von 250 μ l PBS, intravenös in die Schwanzvene injiziert. Zuvor war eine Viabilitätsprüfung der Zellen durch Trypanblaufärbung erfolgt. Für die Transplantation wurden Zellpräparationen der Passagen 4-6, mit einer Viabilität > 80% innerhalb von 2 h nach Zellernte transplantiert. Kontrolltiere mit MCAo erhielten nur 250 μ l PBS intravenös injiziert.

3.3.2 MRT – Infarktvolumetrie

Am Tag 4 oder 5 nach MCAo wurden durch Katharina Stohlmann zerebrale MRT-Aufnahmen der Mäuse in einem 7 Tesla Nagetier Scanner (Pharmascan 70/16 AS) angefertigt.

Für die Bildgebung wurden die Mäuse in einem stereotaktischen Rahmen fixiert und über eine Gesichtsmaske durch ein Gasgemisch, bestehend aus 1,0-1,5% Isofluran, 69% N₂O und 30% O₂ narkotisiert. Die Körpertemperatur der Tiere wurde unter Verwendung eines zirkulierenden Heißwasserkissens bei 37°C konstant gehalten. Die Respirationsrate wurde während des Experimentes kontinuierlich überwacht (Small Animal Monitoring & Gating). Um die akkurate Kopfpositionierung der Tiere zu prüfen, wurden zunächst Gradienten-Echo Schnellaufnahmen angefertigt. Zur Generierung reproduzierbarer Bildaufnahmen wurden T2-gewichtete 2D Turbo Spin-Echo-Sequenzen durchgeführt (Aufnahmeparameter: T2 TR / TE = 4200 / 36 ms, RARE Faktor 8, und 4 Averages). Unter Ausschluss des Bulbus olfactorius wurden vom Gehirn 20 axiale Schichten mit einer Schichtdicke von 0,5 mm, einem Bildfeld von 2,85 x 2,85 cm und einer Matrix von 256 x 256 aufgezeichnet. Für die Datenaquisition und Bildverarbeitung wurde die Bruker Software Paravision 4.0 verwendet. Das Infarktvolumen wurde aus den T2-gewichteten Bildaufnahmen unter Verwendung einer Bildverarbeitungssoftware, programmiert mit MATLAB (The Mathworks, Inv, Natick, MA, USA), rekonstruiert.

Die Läsion in der ischämischen Hemisphäre stellte sich in den T2-gewichteten Aufnahmen als Hyperintensität dar. Es wurden die Bereiche als hyperintens betrachtet, die eine signifikante Abweichung von der Signalverteilung der nicht-betroffenen kontralateralen Hemisphäre aufwiesen. Die Infarktregionen wurden durch eine ROI (*region of interest*) Auswahlmarkierung dargestellt und daraus die Infarktvolumen mit dem Programm Analyze 5.0 (AnalyzeDirect, Inc., Lenexa USA) berechnet. Schlaganfallvolumina ergaben sich aus der Summe der ausgewählten Gebiete je Schichtebene, multipliziert mit der Schichtdicke von 0,5 mm.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA – Isolierung

Für die Synthese einer EPO cDNA wurde zunächst RNA aus der Niere einer C57BL/6 Maus über TRIzol Extraktion gewonnen. Die Nukleinsäuren der Probe wurden mit Chloroform und Isopropanol gewonnen und in DEPC-H₂O aufgenommen. Der DNA-Verdau erfolgte nach einem modifizierten RQ1 RNase-freien DNase Protokoll der Firma Promega. Die Inkubationszeit wurde auf 20 min bei 37°C verkürzt und im Anschluss wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl eines Phenol/Chloroform/Isopropanol-Gemisches (25/24/1) zum Reaktionsgemisch gestoppt. Nach Zentrifugation bei 9.500 g für 10 min bei 10°C wurde der gewonnene Überstand mit 200 µl Chloroform/Isopropanol (24/1) vermengt und erneut mit 9.500 g für 10 min bei 10°C zentrifugiert. 20 µl 8 M Lithiumchlorid und 550 µl absolutes Ethanol wurden zum abpipettierten Überstand zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 70°C präzipitierten die Proben während einer Zentrifugation bei 11.500 g für 30 min und 0°C. Das Präzipitat wurde mit 600 µl 75% Ethanol gewaschen, bei 6.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und bei RT getrocknet. Die RNA wurde in 20 µl DEPC-H₂O gelöst.

3.4.2 Reverse Transkription

Über die reverse Transkription wurde die extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben. Für die Erststrangsynthese wurde ein Reaktionsmix aus 3 µg RNA und 3 µl Random Hexamer Primern (10 µM) in 15 µl DEPC-H₂O hergestellt und für 10 min bei 70°C inkubiert, um eine korrekte Primerbindung zu ermöglichen. Zu diesem

Reaktionsgemisch wurden dann 6 µl M-MuLV Reaktionspuffer (5x), 2 µl dNTP (2,5 mM), 1 µl RNase-Inhibitor (1 U/µl), 5 µl DEPC-H₂O und 1 µl M-MuLV (Moloney murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase dazupipettiert. Der cDNA-Pool wurde über ein RT-PCR Programm von 5 min bei 21°C, 1 h bei 37°C und 5 min bei 95°C synthetisiert.

3.4.3 Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Über eine Nested-PCR konnte aus dem cDNA-Pool mit Hilfe geeigneter Primer die EPO cDNA amplifiziert werden. In einer ersten PCR wurden Primer verwendet, die außerhalb der kodierenden Region des EPO-Gens lagen (genepo_sense and genepo_antisense; Tab. 2.). In einer zweiten PCR wurden Primer verwendet, die das EPO-Gen vom Start- zum Stoppcodon amplifizierten (epo_sense and epo_antisense; Tab. 2). An die Gensequenz angehängte BamHI-Schnittstellen ermöglichten die nachfolgende Klonierung der EPO cDNA.

Die Nested-PCR wurde in einer Hybaid PCR-Maschine in zwei Schritten durchgeführt. 1. PCR: 3 min bei 95°C; 35 Zyklen: 30 sec bei 65°C, 1 min bei 72 °C, 30 sec bei 95°C; 10 min bei 72°C; Kühlung bei 4°C. 2. PCR: 3 min bei 95°C; 5 Zyklen: 30 sec bei 67°C, 1 min bei 72°C, 3 min bei 95°C; 15 Zyklen: 30 sec bei 70°C, 1 min bei 72°C, 3 min bei 95°C; 10 min bei 72°C; Kühlung bei 4°C. Für beide PCR-Reaktionen wurde die *Pfu* Turbo Hotstart DNA-Polymerase entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Das PCR-Produkt aus der ersten PCR wurde 1:50 verdünnt und dann für die zweite PCR eingesetzt.

3.4.4 Gelelektrophorese, Sequenzierung und Klonierung

Die amplifizierte EPO cDNA wurde in einem 1,2%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt und mit einem Gel Extraction Kit der Firma Qiagen gereinigt. Da die *Pfu*-Polymerase PCR-Produkte mit stumpfen Enden generiert, musste die EPO cDNA zunächst in den pCR-Blunt II TOPO Vektor unter Verwendung von kompetenten Bakterien (Top10 One Shot Cells) kloniert werden. Die Plasmid-DNA wurde aus einzelnen Kolonien mit Hilfe des Qia prep Kit isoliert. Die *Inserts* wurden unter Verwendung eines ALFexpress™ DNA-Sequenzierers und des Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit sequenziert. Die Primer M13FWDY und M13REVCY (Tab. 2) wurden mit Cy5 markiert. Folgende Parameter wurden für die Sequenzierung verwendet: t = 900 min; T = 55°C; 800 V; 55mA und 30W.

Die EPO cDNA wurde aus dem pCR-Blunt II TOPO Vektor herausgeschnitten und in die BamHI Schnittstelle der *Multiple Cloning Site* (MCS) vor die IRES-Sequenz des pIRES2-EGFP Vektors kloniert.

Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte durch das QIAprep Spin Miniprep Kit. Die gewonnene Plasmid-DNA für die Transfektion in mMSC wurde mittels EndoFree Plasmid Maxi Kit hergestellt. Mini- und Maxiprep wurden unter Befolgung des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Generierung der EPO cDNA und die Klonierungsarbeiten wurden von Christel Bonnas durchgeführt.

Primer	Sequenz
genepo_sense	GAACTTCCAAGGATGAAGACTTGCAGC
genepo_antisense	GTGGCAGCAGCATGTCCACCTGTC
epo_sense	TATGGATCCATGGGGGTGCCCGAACGTCCCAC
epo_antisense	TATGGATCCTCACCTGTCCCCTCTCCTGCAGAC
M13FWDCY	GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG
M13REVCY	AGCGGATAACAATTTCCACACAGGA

Tabelle 2. Liste der verwendeten Primer.

3.5 Transfektion der mMSC

3.5.1 Verwendete Plasmide

Für die Transfektion der mMSC wurden entweder der 4,7kb pEGFP-N2 Vektor oder der 6kb große pEPO-IRES2-EGFP Vektor verwendet. Beide Konstrukte exprimieren ihre Gene unter der Kontrolle eines CMV-Promoters und enthalten eine Neomycin-Resistenzkassette, die die Selektion mit dem Antibiotikum G418-disulfat erlaubt.

Abgesehen von der IRES-Sequenz und dem EPO-Gen verfügen beide Vektoren über ein identisches Grundgerüst. Daher ist der pEGFP-N2 Vektor als Kontrollplasmid für den pEPO-IRES2-EGFP Vektor geeignet.

3.5.2 Transiente Transfektion der mMSC

Nukleofektion. Für die Nukleofektion der mMSC wurden ein spezieller Nukleofektionspuffer und das Nukleofektorgerät der Firma Amaxa verwendet. Der Nukleofektionspuffer bestand aus 50 mM MgCl₂ gelöst in deionisiertem H₂O und einer wässrigen Lösung von 192 mM NaCl und 9,6 mM KCl. Beide Lösungen wurden direkt vor Transfektion in einem Verhältnis von 1:5 miteinander gemischt. Diese

Ionenkonzentrationen entsprachen der Zusammensetzung des Nukleofektionspuffers für Neurone der Ratte (Rat Neuron Nucleofactor[®] Kit, Amaxa). Vor der Transfektion wurden mMSC der Passage 8 zunächst für 7 Tage kultiviert, mit 0,5%/0,2% (w/v) Trypsin/ EDTA gelöst und bei 200 g zentrifugiert. $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ oder 1×10^6 Zellen wurden in 100 μ l Nukleofektionspuffer resuspendiert und mit 1 μ g, 3 μ g, 5 μ g oder 7 μ g DNA kombiniert. Das DNA-Zellgemisch wurde in eine Nukleofektionsküvette transferiert und die Nukleofektion wurde unter Verwendung des Programms A-30 des Nukleofektorgerätes durchgeführt. Die Applikation eines speziellen elektrischen Pulses führte zur direkten Einschleusung der Plasmid-DNA in den Nukleus. Nach der Nukleofektion wurden 500 μ l KZM zu den Zellen in die Nukleofektionsküvette pipettiert. Die Zellen wurden vorsichtig in eine 58 cm² Petrischale transferiert. Durch einen Mediumwechsel und Zugabe von 10 ml frischem KZM 3 h nach Transfektion wurden die Kulturen von toten Zellen und Zelltrümmern befreit. Jede Transfektion wurde pro Ansatz doppelt ausgeführt.

Lipofektion. Für die Lipofektion wurden mMSC der Passage 8 in einer Dichte von 50 Zellen/cm² in 12 well Platten ausgesät und für 7 Tage in KZM kultiviert. Die Zellen wurden in OptiMEM mit Lipofektamin[™] 2000 transfiziert. Hierfür wurden zunächst verschiedene Volumina Lipofektamin in 100 μ l OptiMEM verdünnt und danach entweder 2 μ g, 4 μ g oder 6 μ g DNA (Konzentration 1 μ g/ml) in jeweils 100 μ l OptiMEM aufgenommen.

Die verdünnten DNA-Mengen wurden nun mit dem verdünnten Lipofektamin im Volumenverhältnis DNA:Lipofektamin von 1:2, 1:1 oder 2:1 gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Vor Transfektion wurden die Zellen dreimal mit OptiMEM gespült, um interferierende Serumbestandteile aus den Kulturen zu entfernen. In jedes well wurden dann 1 ml frisches OptiMEM, sowie 200 μ l der DNA-Lipofektamin-Komplexe pipettiert. Diese wurden für 3,5 h auf den Zellen belassen. Nach dieser Zeit wurde der Transfektionsvorgang durch einen Mediumwechsel und Zugabe von 1 ml frischem KZM je well gestoppt. Pro Ansatz wurden je 2 wells transfiziert.

Magnetofektion. Die Zellen der Passage 8 wurden in einer Dichte von 50 Zellen/cm² in 96 well Platten ausgesät und für 7 Tage kultiviert.

Für die Magnetofektion wurde zuerst die DNA mit CombiMAG Nanopartikeln in 80 μ l OptiMEM für 15 min bei RT inkubiert. In einem getrennten Ansatz wurde Lipofektamin in 80 μ l OptiMEM verdünnt und nach Ablauf der 15 minütigen Inkubationszeit zu den DNA-Nanopartikel-Komplexen pipettiert. DNA, CombiMAG-Partikel und Lipofektamin

bildeten nun während einer weiteren Inkubationszeit von 20 min bei RT Magnetofektinkomplexe aus. Zwischenzeitlich wurden die Zellen zweimal mit OptiMEM gespült und 110 µl frisches OptiMEM wurde in jedes well gegeben. 10 µl der DNA/ Nanopartikel/ Lipofektamin-Komplexe wurden zu jedem well pipettiert und für jeden Ansatz wurden 15 wells transfiziert. Jedes einzelne well wurde mit entweder 25 ng, 75 ng oder 150ng DNA (1µg/µl) und CombiMAG Nanopartikeln in einem Volumenverhältnis von 1:1 oder 2:1 und entweder 0,1 µl oder 0,2 µl Lipofektamin transfiziert.

Die Applikation des magnetischen Feldes erfolgte sofort durch das Transferieren der 96 well Platte auf die MagnetoFACTOR-96 Platte für 5 min bei RT. Direkt nach der Transfektion wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt.

3.5.3 Stabile Transfektion der mMSC

Für die Generierung stabil transfizierter mMSC wurden EGFP positive Zellen nach der Transfektion durch Zugabe von KZM mit 400 µg/ml G418-disulfat (Geneticin) für 14 Tage selektioniert. Nach Trypsinierung der Zellen am Ende der Selektionsphase wurde jeweils eine EGFP exprimierende Zelle über einen FACS-Sorter (Moflo) in jedes well einer 96 well Platte sortiert. Unter Verwendung dieses *single cell – Colony Forming Unit Assays* (sc-CFU) wuchsen die Einzelzellen zu einer oder mehreren Kolonien in den wells heran. Die Platten wurden auf Kolonien mit EGFP-Expression durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Klone wurden nach 7-10 Tagen trypsiniert und separat in 145 cm² Petrischalen in KZM expandiert. Zellen der Passage 10 (lipofizierte und magnetofizierte Klone) und Passage 11 (nukleofizierte Klone) wurden am FACS (FACSCalibur™) auf ihre EGFP-Expression hin analysiert.

3.5.4 Quantifizierung der Transgenexpression

Bestimmung der Transfektionsraten. Die EGFP-Fluoreszenz der mMSC nach transienter Transfektion wurde nach 2, 4, 7, 14 und 21 Tagen durch eine FACS-Analyse am FACSCalibur™ bestimmt und mittels CellQuest Pro Software ausgewertet. Die Zahl der transfizierten Zellen ergab sich aus der Zahl der EGFP positiven Zellen dividiert durch die Gesamtzahl der Zellen.

Messung der EPO-Konzentration in den mMSC-Überständen. Überstände von EPO-exprimierenden mMSC wurden gesammelt, bei -80°C tiefgefroren und die EPO-Sekretion mittels Quantikine® mouse/rat immunoassay ELISA Kit nach

Herstellerprotokoll quantifiziert. Die Proben wurden im ELISA-Photometer bei 450 nm gemessen.

3.6 *In vitro* Hämatopoese-Bestimmung

Die Funktionalität und biologische Aktivität des von den mMSC produzierten EPO wurde mittels *Colony formin Unit – erythroid* (CFU-E) Assay beurteilt. Nach Empfehlung des Herstellerprotokolls wurden 200.000 frisch präparierte Knochenmarkzellen aus C57BL/6 Mäusen in cytokinfreiem Methocult[®] Medium in jedes well einer 6 well Platte ausgesät. Um die Bildung der CFU-E zu stimulieren, wurden entweder Überstände von EPO-exprimierenden mMSC oder rekombinantes humanes EPO (rhEPO) als Positivkontrolle zu den Knochenmarkzellen in einer Konzentration von 1,5 U/ml EPO (1 U EPO entsprach einer Proteinmenge von etwa 10 ng) gegeben. Kontrollmedium ohne EPO diente als Negativkontrolle. Jeder Ansatz wurde doppelt durchgeführt. 48 h nach dem Ausplattieren wurden in jedem well alle Cluster von reifenden erythroiden Progenitoren unter Verwendung eines Lichtmikroskops ausgezählt. Die CFU-E Aktivität wurde als Zahl der CFU-Es je 200.000 Knochenmarkzellen angegeben.

3.7 *In vivo* Hämatopoese-Bestimmung

Zur Beurteilung der *in vivo* Effekte stabil transfizierter mMSC auf die Hämatopoese wurden entweder stabil EPO/EGFP-exprimierende mMSC und zur Kontrolle nur stabil EGFP-exprimierende mMSC oder PBS intraperitoneal in männliche C57BL/6 Mäuse transplantiert. Den Tieren wurde repetitiv in einem Volumen von 1 ml PBS am Tag 0 20×10^6 Zellen, am Tag 2 10×10^6 Zellen und am Tag 3 10×10^6 Zellen oder nur PBS gespritzt. Nach 7 und 35 Tagen wurde den Mäusen retroorbital mittels Hämatokritkapillaren Blut abgenommen und in diesem die biologischen Verlaufsparemeter Hämatokrit, Hämoglobin und der EPO-Spiegel im Serum quantifiziert.

Hämatokritmessung. Das in Hämatokritröhrchen abgenommene Blut wurde für 10 min bei 1.500 g zentrifugiert und anschließend der Hämatokrit bestimmt. Dieser berechnete sich wie folgt:

$$\text{Hämatokrit in [\%]} = \frac{\text{Länge der Erythrozytensäule in mm}}{\text{Länge der Gesamtblutsäule in mm}} \times 100$$

Messung des Hämoglobinspiegels. Die Blutproben wurden unverzüglich nach Abnahme 1:10 mit Heparin verdünnt. Die Hämoglobinmessung erfolgte anschließend nach Herstellerprotokoll mittels QuantiChrom Hämoglobin Assay. Der Hämoglobingehalt der Blutproben wurde am ELISA-Photometer bei 405 nm bestimmt.

Messung der EPO-Konzentration im Serum. Nachdem das abgenommene Mausblut über 2 h bei RT geronnen war, wurde dieses bei 550 g für 10 min bei RT zentrifugiert, das erhaltene Serum abpipettiert und bei -20°C tiefgefroren. Für die Bestimmung der Serum EPO-Konzentration wurden die Proben 1:2 verdünnt und dann mittels Quantikine® mouse/rat immunoassay ELISA Kit nach Herstellerprotokoll quantifiziert.

3.8 Western Blot

3.8.1 Proteinextraktion

Vor der Zellernte wurden die Neurone 1x mit eiskaltem PBS gespült und pro well einer 6 well Platte wurden 120 µl Lysepuffer zugesetzt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml Leupeptin, supplementiert mit Mini Protease Inhibitor Cocktail und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF). Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und die Lysate in 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Diese wurden nun bei 21.000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Protein enthaltenden Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und ein kleines Aliquot für die Proteinquantifizierung mittels BCA-Reaktion aufbewahrt. Die Proteinproben wurden umgehend mit 2x SDS-Probenpuffer 1:1 verdünnt. Dieser bestand aus: 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 20% Glycerol, 10% β-Mercaptoethanol, 0.008% Bromphenolbau. Die Proteinextrakte wurden umgehend für 5 min bei 100°C im Wasserbad gekocht und bei -80°C tiefgefroren.

3.8.2 Proteinquantifizierung mittels BCA-Reaktion

Für die BCA-Reaktion wurde zunächst in eine 96 well Mikrotiterplatte ein Albuminstandard in 8 Konzentrationen (2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0 mg/ml) aufgetragen. In Doppelbestimmungen wurden entweder 25 µl/well Albuminstandard oder die zu untersuchenden Proteinlysate in geeigneten Verdünnungen pipettiert. Nun wurden 200 µl von Reagenz A + B des Herstellerkits zugegeben, kurz geschüttelt und für 30 min im Inkubator bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde bei 550 nm am ELISA-Photometer vermessen. Aus den Extinktionen der Werte des Albuminstandards konnte mittels linearer Regressionsanalyse die Standardkurve ermittelt werden. Die Extinktionswerte der Proben lagen immer im Bereich der Standardkurve. Anhand dieser wurde der Proteingehalt der Proben errechnet.

3.8.3 Gelelektrophorese, Blotting und Entwicklung der Banden

Auf einem SDS-Polyacrylamidgel (7,5%, 10%, 15%) wurden jeweils 20 µg Protein je Tasche aufgetragen. Zur Orientierung der Laufgeschwindigkeit wurde der Proteinmarker Kaleidoskop verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V für ca. 60-90 min in 1x Laemmli-Puffer (0,37 M Glycin, 0,05 M Tris-base, 3,52 mM SDS) durchgeführt. Anschließend wurden die Gele auf Nitrozellulosemembranen im Sandwichverfahren mit jeweils 3 Lagen befeuchtetem (10% Methanol und 1x Laemmli-Puffer) Whatman Blottingpapier ober- und unterhalb des Gels/Membran bei 200 mA für 60 min geblottet. Die Membranen wurden nun für 3 x 10 min mit TBST-Puffer (0,05% Tween 20, 10 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, pH 7,6) gewaschen und dann mit 5% bovinem Serumalbumin (BSA) für 60 min bei RT geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Nach erneutem Spülschritt mit TBST für 3 x 10 min wurden die Membranen mit den Primärantikörpern in TBST mit 5% BSA über Nacht bei 4°C inkubiert. Folgende Primärantikörper wurden verwendet: p42/44 MAPK 1:1000, pSTAT3 (Tyr705) 1:1000, pAkt (Thr 308) 1:2000, pan-Akt 1:1000 und β-Actin 1:1000. Nach Waschen für 3 x 10 min mit TBST wurden HRP-konjugierte anti-rabbit (1:1000) oder anti-goat (1:10.000) Sekundärantikörper für 2 h bei RT an den Primärantikörper gebunden. Nach mehrfachem Austausch des TBST wurden die Nitrozellulosemembranen mittels Chemilumineszenzreagenz und Kodak-Fotofilm (Belichtungszeit 1-5 min) entwickelt.

3.9 Immunhisto –und immunzytochemische Methoden

3.9.1 Perfusion, Organfixierung und Schneiden

Zu definierten Zeitpunkten wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 3 mg/ml Ketamin und 0,6 mg/ml Xylazin tief anästhesiert und nach Verlust der Schmerzempfindlichkeit thorakotomiert. Nach Punktion der rechten Herzkammer wurde der linke Herzvorhof eröffnet und die Tiere zunächst mit 30 ml PBS und im Anschluß mit 30 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Anschließend wurden die inneren Organe entnommen. Diese wurden für 24-48 h in 4% PFA bei 4°C nachfixiert und anschließend in 30% Sucrose bei 4°C equilibriert. Die Proben wurden nun in PBS mit 0,5% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt. Für die Langzeitlagerung wurden die Organe in 2-methyl-Butan bei -70°C tiefgefroren und danach bei -20°C gelagert. Die Organe wurden dann am Kryostaten in 20 µm dicke Schnitte aufgearbeitet und auf Objektträger aufgezogen.

3.9.2 Immunhistochemie

Die Organschnitte wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 10% *Normal Donkey Serum* und 0,3% Triton X-100 in PBS für 60 min bei RT geblockt und permeabilisiert. Nach einem Spülschritt mit PBS für 3 x 10 min wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper mouse anti-GFP 1:500 in 3% *Normal Donkey Serum* und 0,1% Triton X-100 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Spülen der Schnitte für 3 x 10 min mit PBS wurde der Sekundärantikörper Alexa 488 *goat anti-mouse* 1:250 in PBS für 2 h bei RT an den Primärantikörper gekoppelt. Nach Spülen der Schnitte mit PBS für 3 x 10 min wurden die Zellkerne mit 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) 1:4000 in PBS für 10 min bei RT gefärbt. Im Anschluß an erneutes Spülen wurden die Objektträger mit einem Einbettungsmedium eingedeckelt.

3.9.3 Immunzytochemie

Die Zellen wurden in 24 well Platten auf Glasplättchen ausgesät und nach einmaligem PBS-Spülen mit frisch zubereitetem 4% PFA für 15 min bei RT fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte die Permeabilisierung und das Blocken der Zellen durch Zugabe von 0,3% Triton X-100, 5% *Normal Donkey Serum* und 1% bovines Serumalbumin gelöst in PBS für 30 min bei RT. Der Primärantikörper wurde mit

3% *Normal Goat Serum* oder 3% *Normal Donkey Serum* verdünnt in PBS zu den Zellen zupipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Folgende Primärantikörper wurden verwendet: MAP-2 1:500, TuJ1 (β Tubulin III) 1:500, Nestin 1:500, S100 β 1:5000, Vimentin 1:40, GFAP 1:1000, CNPase 1:500, Iba-1 1:2000. Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper mit einem der folgenden Sekundärantikörper detektiert: Alexa 594 *goat anti-mouse*, Alexa 594 *donkey anti-goat*, Alexa 594 *goat anti-rabbit*, Alexa 488 *goat anti-rabbit*. Der Zweitantikörper wurde 1:800 in PBS verdünnt und mit 3% *Normal Donkey* oder *Goat Serum* für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne für 5 min mit DAPI gefärbt. Nach kurzem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen mit einem Einbettungsmedium auf Objektträger aufgezogen. Die Antikörperfärbungen wurden am Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Immunzytochemien, die unter Weglassen des Primärantikörpers durchgeführt wurden, dienten als Negativkontrollen.

3.10 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Es wurden jeweils die Daten mehrerer Experimente zusammengefasst. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ gekennzeichnet.

Für die statistische Analyse der Daten aus den durchgeführten Experimenten wurden die folgenden statistischen Tests verwendet:

In vivo Hämatopoese-Bestimmung: One Way ANOVA (*analysis of variance*) mit dem Bonferroni posthoc-Test.

OGD-Experimente: Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks Test mit der Dunn's Methode als posthoc-Test.

Bederson score: nicht-parametrischer Mann-Whitney-Test.

Infarkt volumetrie: Student's t-test.

Gewicht: nicht-parametrischer Mann-Whitney-Test.

3.11 Materialien und Geräte

3.11.1 Materialien

Produkt

Acridin Orange

β -Actin-Antikörper

Agarose

Alexa 594 *goat anti-mouse* Sekundärantikörper

Alexa 594 *donkey anti-goat* Sekundärantikörper

Alexa 594 *goat anti-rabbit* Sekundärantikörper

Alexa 488 *goat anti-rabbit* Sekundärantikörper

Alizarin Red S

α -Minimal Essential Medium (α MEM)

B27 Supplement

B27 Supplement w/o Retinsäure

basic-Fibroblast growth factor (b-FGF)

BCA-Proteinassay

Bone morphogenetic protein-6 (BMP-6)

bovines Serumalbumin (BSA)

Bromphenolblau

Chemilumineszenzreagenz

CNPase-Antikörper

Colcemid

Collagen G

CombiMAG Nanopartikel

Crystallviolett

Dexamethason

4', 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)

Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

dNTP-Mix

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)
(hoher Glukoseanteil)

Eisessig

EndoFree Plasmid Maxi Kit

Epidermal growth factor (EGF)

Essential balanced salt solution (EBSS)

Herkunft

AppliChem GmbH, Darmstadt,
Deutschland

Santa Cruz, Heidelberg,
Deutschland

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Invitrogen (Gibco), Karlsruhe,
Deutschland

Invitrogen (Gibco), Karlsruhe,
Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Pierce, Thermo –Scientific, Perbio
Science, Bonn, Deutschland

R&D Systems, Minneapolis, USA

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Santa Cruz, Heidelberg,
Deutschland

Covance, Hiss Diagnostics GmbH,
Freiburg, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Chemicell, Berlin, Deutschland

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Promega, Mannheim,
Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Qiagen, Düsseldorf, Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Invitrogen (Gibco), Karlsruhe,
Deutschland

Ethanol	Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
FACS-Antikörper	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Ficoll-Paque	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA
Formalinlösung (10%)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Fötales Kälberserum (FKS)	Lonza, Vervier, Belgien
Gel Extraction Kit	Qiagen, Düsseldorf, Deutschland
Geneticin (G418-disulfat)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GFAP-Antikörper	Dako, Hamburg, Deutschland
GFP-Antikörper	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Giemsalösung	Dr. K. Hollborn Söhne, Leipzig, Deutschland
Glukose	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Glutamat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glycerol, > 99% Reinheit	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
β-Glycerolphosphat	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Glycin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Hämatokritkapillaren	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Eisenroth, Deutschland
Heparin (Liquemin)	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
HEPES	Biochrom, Berlin, Deutschland
HRP-konjugierter anti-rabbit Sekundärantikörper	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
HRP-konjugierter anti-goat Sekundärantikörper	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Iba-1-Antikörper	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
Indomethacin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Insulin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
3-Isobuthyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Isofluran	Abbot, Wiesbaden, Deutschland
ITS+™ Premix	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kaleidoskop-Proteinmarker	Bio-Rad, München, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Ketamin	Bela-Pharm, Vechta, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
(di)-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Kodak-Fotopapier	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Kryoeinfrierkontainer	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
L-Ascorbat-2-phosphat	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lipofektamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

L-Prolin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
L-Thyroxin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Lysepuffer für Western Blot	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
MAP-2-Antikörper	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Mausserum	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Methocult [®] Medium	Stem Cell Technologies, Cellsystems, St. Katharinen, Deutschland
Modified Eagle's Medium (MEM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Mikrotiterplatten: 96 well	Sarstedt, Newton, USA
Mini Protease Inhibitor Cocktail	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
M-MuLV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim, Deutschland
NaCl	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
β-NADH	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Natrium-Pyruvat	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Nestin-Antikörper	Chemicon, Millipore, Schwalbach, Deutschland
Neurobasalmedium	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, Deutschland
Neurobasal A Medium	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Normal Donkey Serum	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Nukleofektionsküvetten	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland
Oil Red O	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
p42/44 MAPK-Antikörper	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland
pAkt (Thr 308)-Antikörper	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland
pan-Akt-Antikörper	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
pCR-Blunt II TOPO Vector	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pEGFP-N2 Vektor	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<i>Pfu</i> Turbo Hotstart DNA Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v), UltraPure™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS w/o)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pIRES2-EGFP Vektor	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Propidiumiodid	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pSTAT3 (Tyr705)-Antikörper	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland
Pyruvat	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
QIA prep Kit	Quiagen, Düsseldorf, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen, Düsseldorf, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Düsseldorf, Deutschland
QuantiChrom Hämoglobin Assay	Bioassay systems, Köln, Deutschland
Quantikine [®] mouse/rat immunoassay ELISA kit	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Random Hexamer Primer	Promega, Mannheim, Deutschland
rekombinantes humanes EPO (rhEPO)	Roche, Mannheim, Deutschland
RNase Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
RQ1 RNase-free DNase	Promega, Mannheim, Deutschland
Silikon-Resin-Gemisch (Xantopren M Mucosa and Activator NF Optosil Xantopren)	Haereus Kulzer, Hanau, Deutschland
Small Animal Monitoring & Gating	SA Instruments, Stony Brook, New York, USA
Sucrose	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
S100 β -Antikörper	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Thermo Sequenase [™] Primer Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences, München, Deutschland
Top10 One Shot Cells	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tris-base	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Tris-Hydrochlorid, > 99% Reinheit	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
TRizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblaufärbelösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin/ EDTA 0,2%/0,5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
TuJ1-Antikörper (β Tubulin III)	Covance, Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg, Deutschland
Tween 20	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Vimentin-Antikörper	Chemicon, Millipore, Schwalbach, Deutschland
Vitro Clud [®]	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Whatman Blottingpapier	NeoLab Migge, Heidelberg, Deutschland

Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Zellkulturflaschen: 25 cm ²	Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Zellkulturflaschen („low attachment“): 25 cm ²	Corning (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland)
Zellkulturinserts	Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Zellkulturplatten: 6/ 12/ 24/ 96 well	Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Zellkulturschalen (Petrischalen): 58 cm ² , 145 cm ²	Nunc, Wiesbaden, Deutschland

3.11.2 Geräte

Produkt

ALFexpress™ DNA-Sequenzierer

Cytomics FC 500 FACS
ELISA-Photometer

FACSCalibur™

Fluoreszenzmikroskop Leica DM RA2
Lichtmikroskop Olympus CKX41
Licht- und Fluoreszenzmikroskop Leica DM-IL
MagnetoFACTOR-96 Platte
Microm HM 560 CryoStar (Kryostat)

Moflo (FACS-Sorter)

MRT-Gerät Pharmascan 70/16 AS

Nukleofektionsgerät
OGD Kammer Concept 400

pH-Meter (pH100)

Präparationsmikroskop Leica Zoom 2000TM

Herkunft

Amersham Pharmacia Biotech, München, Deutschland
Beckman Coulter, Miami, FL, USA
MRX_{TC} Revelation, Thermo Labsystems, Dreieich, Deutschland
Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Leica, Wetzlar, Deutschland
Olympus, Hamburg, Deutschland
Leica, Wetzlar, Deutschland
Chemicell, Berlin, Deutschland
ThermoScientific, Oberhausen, Deutschland
Dakocytomation, Hamburg, Deutschland
Bruker BioSpin, Ettlingen, Deutschland
Amaxa, Köln, Deutschland
Ruskin Technologies, Bridgend, UK
VWR International, Darmstadt, Deutschland
Leica, Wetzlar, Deutschland

4 ERGEBNISSE

4.1 Isolierung und Charakterisierung der mMSC

4.1.1 Isolierung der mMSC

Die Isolierung der mMSC erfolgte aus dem Knochenmark der Tibiae und Femures von C57BL/6 Mäusen. Durch Spülen der Knochen mit KZM wurde zunächst das komplette Knochenmark isoliert und ausgesät. Aus diesen extrem heterogenen Knochenmarkmischkulturen wurden die äußerst seltenen mMSC gewonnen. Die besondere Schwierigkeit in der Isolierung der MSC liegt nicht nur an ihrer geringen Vorkommensfrequenz innerhalb des Knochenmarks. Es gibt ferner auch keinen MSC-spezifischen Marker, über den sich die Zellen sortieren ließen. Die mMSC wurden daher durch ihre Eigenschaft der Plastikadhärenz gewonnen. Erschwerend bei der MSC-Präparation aus Mäusen ist die extrem starke Kontamination der Kulturen mit hämatopoetischen Stammzellen, beziehungsweise diversen hämatopoetischen Progenitoren. Diese adhären partiell, überwuchern bevorzugt mesenchymale Zellen und hemmen deren Proliferation. Durch Akkumulation von Extrazellulärmatrix in den Petrischalen wird das Wachstum der Zellen zusätzlich gehemmt.

Bei dem hier verwendeten mMSC-Isolierungsprotokoll wurde eine Reduktion der hämatopoetischen Zellpopulation zunächst durch Spülen der Mischkulturen mit PBS 24 h nach dem Ausplattieren erreicht. Durch Auswahl eines geeigneten chargenselektierten Serums und die Aussaat der Zellen in einer Zelldichte von 50 Zellen/cm² über mehrere Passagen wurden die mMSC aufgereinigt. Kontaminierende hämatopoetische Zellen konnten die Bedingungen dieser sehr dünnen Zelldichte nicht überleben, so dass die mMSC aufgrund der für sie optimalen Kultivierungsbedingungen und ihres hohen Proliferationspotentials selektioniert wurden.

Unter dem Mikroskop imponierten die mMSC morphologisch als runde, teils polygonale oder spindelförmige, koloniebildende Zellen (Abb. 6A-B).

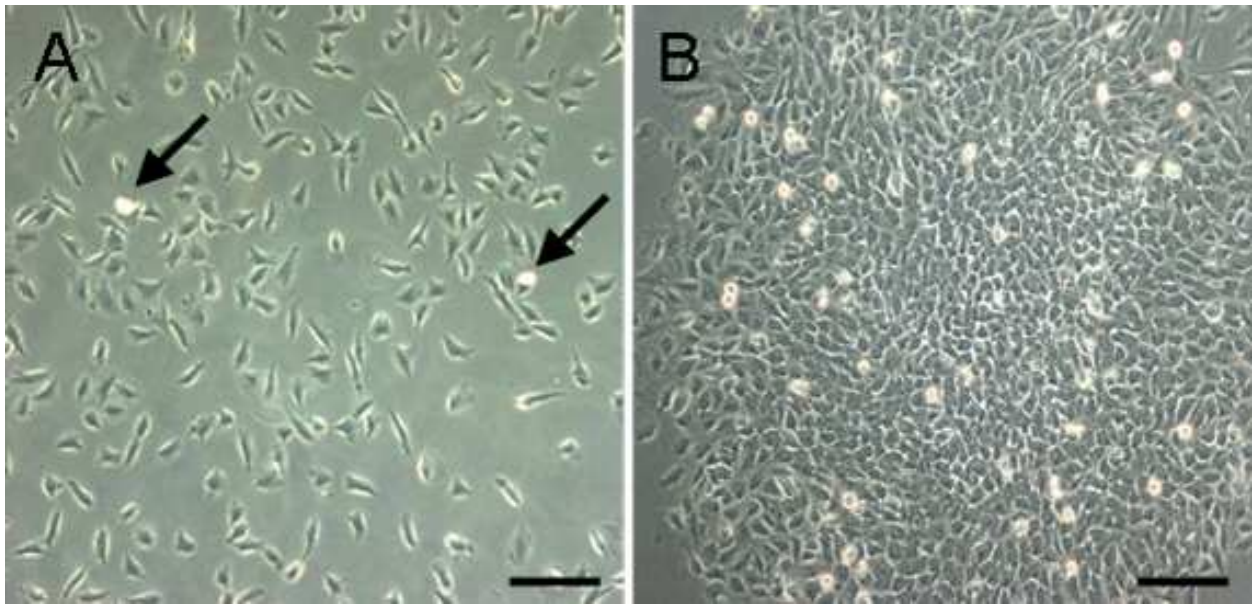


Abb. 6. A) mMSC der Passage 8 zeigen die typische runde, spindelförmige oder polygonale Morphologie. Die Pfeile zeigen auf mitotische Zellen. B) Typische Koloniebildung der mMSC. A und B) 100X Vergrößerung; Skalierungsbalken 200 μm .

4.1.2 Wachstumskinetik und Proliferationsverhalten der mMSC

Die Proliferationseigenschaften der mMSC wurden über eine Wachstumskinetik und durch einen t-CFU Assay beurteilt.

Für den t-CFU Assay wurden 100 Zellen in jede Petrischale ausgesät und nach 14 Tagen die entstandenen Kolonien mit einer Größe von ≥ 2 mm gezählt. Hierbei ergab sich eine t-CFU Aktivität von $122,1\% \pm 9,6\%$ ($n=3$; Abb. 7A). Es wuchsen mehr Kolonien als ursprünglich Zellen ausgesät wurden. Dies ist ein bekanntes Phänomen von mMSC und ist Ausdruck der Absiedlung von Tochterzellen von ihren Mutterkolonien. Aus den Tochterzellen gingen dann neue Kolonien hervor.

Für die Ermittlung der Wachstumskurve wurden die Zellen in einer Dichte von 50 Zellen/ cm^2 ausgesät und über die Dauer von 10 Tagen wurden je Tag drei Petrischalen trypsiniert. Aus der Zellzählung ergab sich, dass mMSC der Passage 8 mehr als eine Zellverdopplung pro Tag ausführen, beziehungsweise $\sim 8,5$ Zellverdopplungen innerhalb von 7 Tagen. Dies entspricht einer mehr als 300fachen Vermehrung der Zellzahl nach 7 Tagen oder einer mehr als 2000fachen Vermehrung innerhalb von 10 Tagen (Abb. 7C-D). Die mMSC wurden über insgesamt 27 Passagen kultiviert, ohne dass es zu einer Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit oder einem Proliferationsstopp kam. In dieser Zeit führten die Zellen ~ 237 Zellverdopplungen aus (Abb. 7B). Diese Daten betonen das außerordentliche Proliferationspotential der MSC.

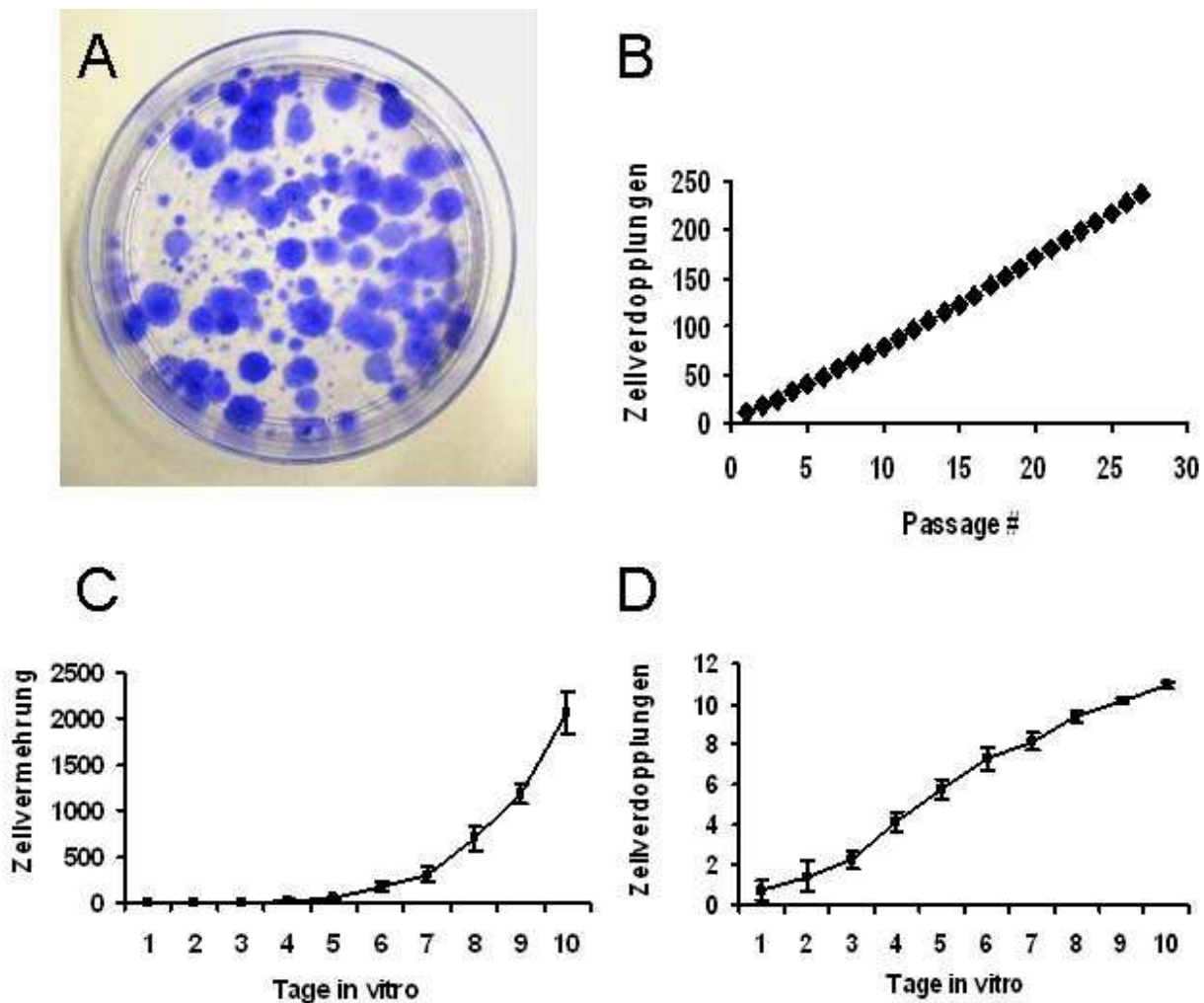


Abb. 7. Darstellung des Proliferationsverhaltens der mMSC. A) Ergebnis eines t-CFU Assays nach Crystalviolett-färbung. B) Der lineare Verlauf der Zellzahlverdopplungen/ Passage illustriert die konstante Proliferationsgeschwindigkeit der mMSC während einer Kulturdauer von 27 Subkulturen. C und D) Erstellung einer Wachstumskinetik der mMSC im Verlauf einer Passage. C) Zellzahlvermehrung der mMSC während einer Kultivierungsdauer von 10 Tagen (n=6). Die Zellzahlvermehrung wurde errechnet aus der Zahl der Zellen zum Trypsinierungszeitpunkt, dividiert durch die Zellzahl bei Aussaat. D) Zahl der Zellverdopplungen, die die mMSC bis zum jeweiligen Trypsinierungszeitpunkt in Kultur ausgeführt haben (n=6). Die Zahl der Zellverdopplungen wurde zur Zahl der initial ausgesäten Zellen ins Verhältnis gesetzt.

4.1.3 Differenzierung der mMSC

Im Rahmen der Charakterisierung des Zellkulturmodells wurde die Plastizität der mMSC durch die erfolgreiche adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung nachgewiesen.

Die Differenzierung der mMSC in Fettzellen erfolgte durch Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium für 21 Tage. Bereits 3-4 Tage nach Zugabe des Induktionsmediums erschienen die ersten gelb leuchtenden, runden Fettvakuolen. Die

stattgehabte Triglyzeridsynthese wurde durch die Rotfärbung der Fettvakuolen in der Oil Red O Färbung nachgewiesen (Abb. 8A-C).

Die osteogene Differenzierung der mMSC gelang durch Zugabe eines speziellen Induktionsmediums für die Dauer von 21 Tagen. Die rote Kolorierung in der anschließenden Alizarin Red S Färbung belegte die Ausbildung einer Knochenmatrix mit darin enthaltenen Calciumphosphatablagerungen (Abb. 8D-H).

Die chondrogene Differenzierung der mMSC gelang in einem serumfreien Differenzierungsmedium unter Verwendung eines Pelletzellkultursystems. In der Toluidinblaufärbung konnte die positive Knorpeldifferenzierung nachgewiesen werden. Die violette Kolorierung belegt die Ausbildung einer chondrogenen Matrix mit Proteoglykanablagerungen. Auch unter morphologisch-histologischen Gesichtspunkten zeigte sich in den Präparaten die Ausdifferenzierung in reifen Knorpel. Eingebettet in die Knorpelmatrix fanden sich die knorpeltypischen Lakunen mit den eingelagerten Chondrozyten (Abb. 8I-J).

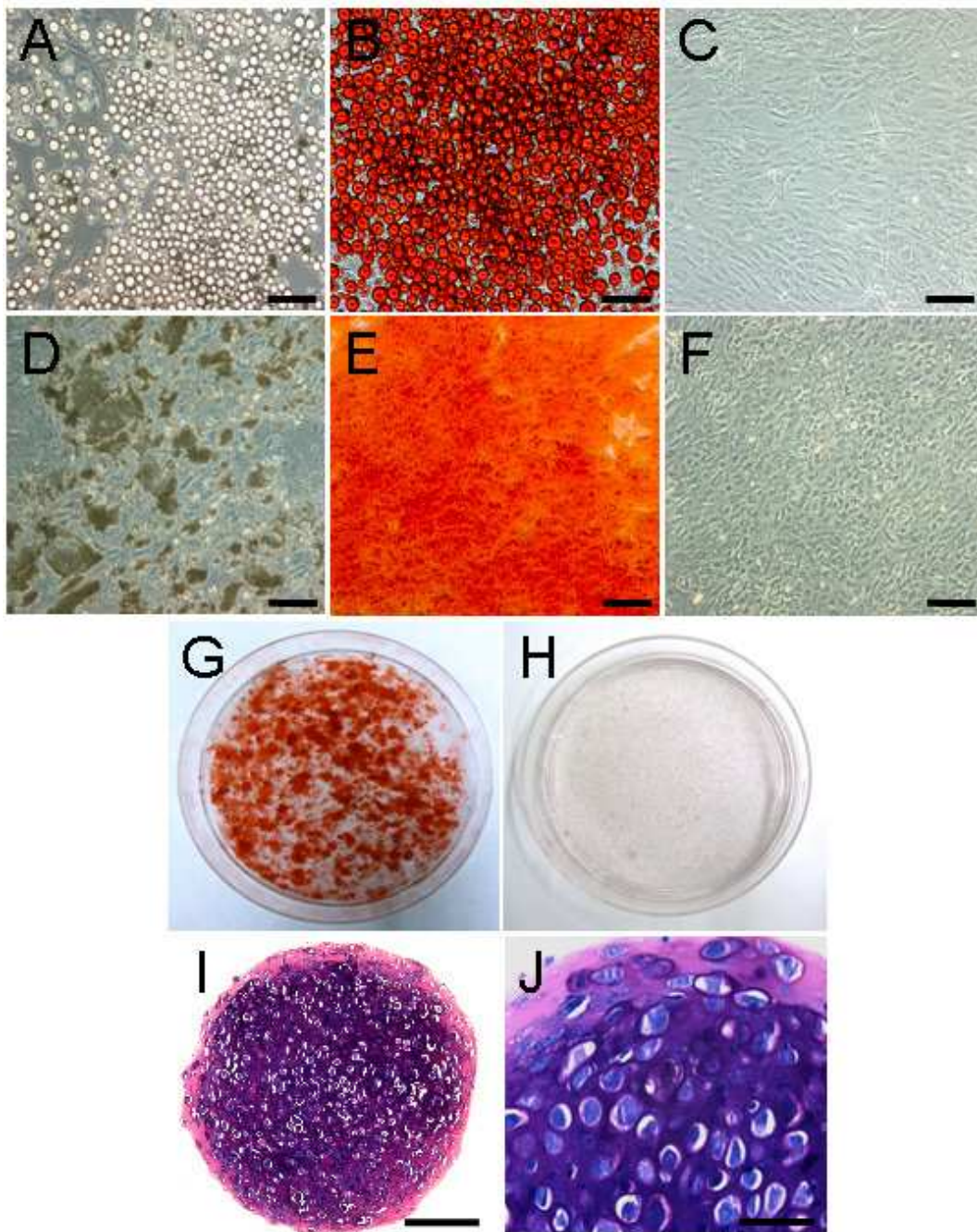


Abb. 8. Plastizität der mMSC. A-C) Adipogene Differenzierung. A) Ungefärbte Zellen nach Kultivierung in Fettdifferenzierungsmedium. B) Nachweis der positiven Triglyzeridsynthese durch Rotfärbung der Fettvakuolen in der Oil Red O Färbung. C) Negativkontrolle, in der die Zellen für 21 Tage in KZM kultiviert und anschließend mit Oil Red O gefärbt wurden. D-H) Osteogene Differenzierung. D) Ungefärbte Zellen nach Induktion mit Knochendifferenzierungsmedium. E und G) Nachweis von Calciumphosphatablagerungen durch die rote Kolorierung in der Alizarin Red S Färbung. G) Die Photographie illustriert das Ausmaß der Knochendifferenzierung in einer 58 cm² Petrischale. In den ungefärbten Arealen der Zellkulturschale hat kein Zellwachstum stattgefunden. F und H) Negativkontrolle, in der die Zellen für 21 Tage in KZM kultiviert und danach mit Alizarin Red S gefärbt wurden. I-J) Chondrogene Differenzierung. Die violette Kolorierung in der Toluidinblaufärbung beweist die Ablagerung von Proteoglykanen in der Knorpelmatrix. I) Im gesamten Pellet zeigt sich die positive Knorpeldifferenzierung. J) In der Vergrößerung werden die knorpeltypischen Lakunen mit den in sie eingebetteten Chondrozyten sichtbar. A-F und I) 100X Vergrößerung; Skalierungsbalken 200 µm. J) 400X Vergrößerung; Skalierungsbalken 50 µm.

4.1.4 Basale Expression neuraler Proteine in den mMSC

Im Rahmen der Charakterisierung der Zellen wurden die mMSC auf die Expression neuraler Proteine untersucht. In der immunzytochemischen Analyse fanden sich mMSC-Subpopulationen mit Expression von TuJ1, Nestin, S100 β , aber auch Vimentin (Abb. 9A-D). Sämtliche Markerproteine wurden bereits basal unter normalen Kulturbedingungen in den mMSC exprimiert, ohne dass es einer speziellen Stimulation hinsichtlich einer neuralen Differenzierung bedurft hätte. Unter mikroskopisch-morphologischen Gesichtspunkten gab es keinen Hinweis auf neuroektodermale Differenzierung der mMSC.

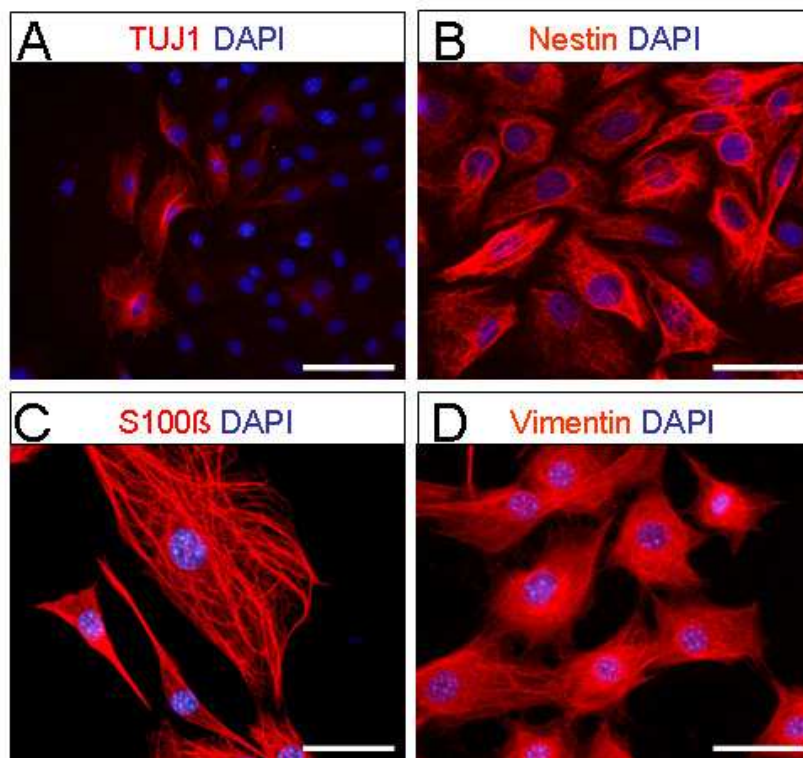


Abb. 9. Expression neuraler Proteine in mMSC und nukleäre Färbung mit DAPI. A) TuJ1 (β Tubulin III), B) Nestin, C) S100 β und D) Vimentin. A-B) 200X Vergrößerung; Skalierungsbalken 100 μ m. C-D) 400X Vergrößerung; Skalierungsbalken 50 μ m.

4.1.5 FACS-basierte Oberflächenepitopanalyse der mMSC

mMSC der Passage 8 wurden auf die Expression von verschiedenen Zelloberflächenproteinen mit 20 verschiedenen Antikörpern untersucht (Abb. 10). Die FACS-Untersuchung konnte das Vorhandensein von hämatopoetischen Markern wie CD3e, CD11b, CD34, CD45, CD45R/B220, Ter119/Erythroid cells und Ly6G/Ly6C

ausschließen. Ferner fand sich keine Evidenz für die Expression von typischen Endothelzellmarkern, wie CD31 (PECAM), Fik1 (VEGF-R2) oder VCAM1 (CD106). Epitope wie CD86 oder MHCII waren ebenfalls nicht detektierbar. Selbst bekannte Stammzellmarker wie CD90.1, CD90.2 und CD117 (c-kit) konnten nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Stattdessen wurden folgende Marker auf den mMSC stark exprimiert: der Stammzellmarker Sca1, CD29 (Integrin β_1), CD44 und CD80. Zusätzlich fand sich eine sehr kleine Subpopulation von CD40 positiven mMSC (<2%) in den Kulturen.

Eine Kontamination der mMSC durch residuale hämatopoetische Zellen oder Endothelzellen konnte somit ausgeschlossen werden.

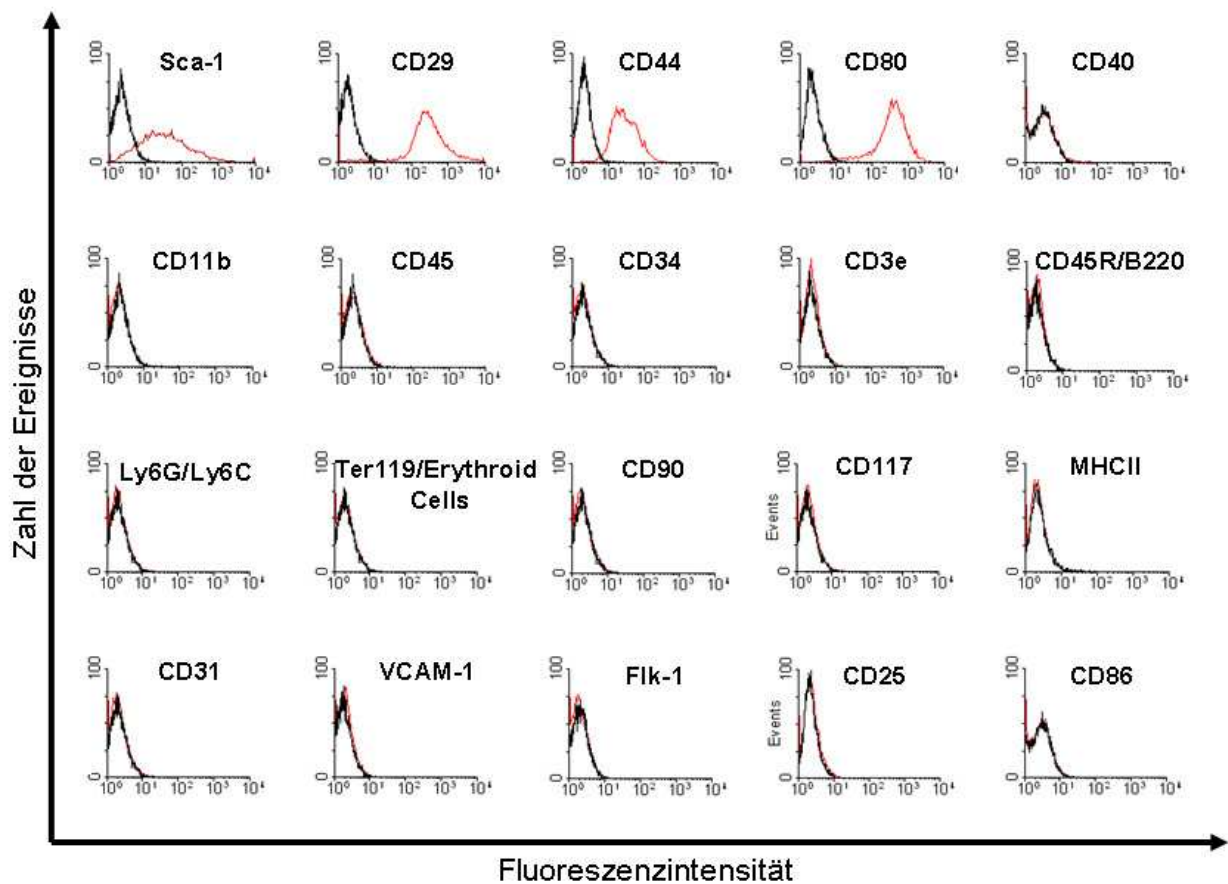


Abb. 10. FACS – Analyse der mMSC zum Ausschluss einer Kontamination der Kulturen mit hämatopoetischen Zellen oder Endothelzellen (n=3). Rot dargestellt sind die Fluoreszenzsignale nach Anfärbung des Zielantigens mit einem fluorochromassozierten Antikörper. Die schwarzen Kurven in den Histogrammen repräsentieren das Signal korrespondierender Isotypkontrollen.

4.1.6 Karyotypisierung der mMSC

Im Rahmen der Charakterisierung des mMSC-Zellkulturmodells wurden mMSC nach Erstellung von Chromosomenpräparaten karyotypisiert. Für die Quantifizierung der Chromosomenzahlen je Zelle wurden jeweils 20 komplette Chromosomensätze ausgezählt.

Das ausgeprägte Proliferationspotential der Zellen mit hohen Mitoseraten, sowie die lange Kultivierungsdauer über viele Passagen ohne Proliferationsstopp oder Proliferationsverlangsamung ließen die Quantifizierung der Mauschromosomen in den mMSC-Kulturen sinnvoll erscheinen.

In den angefertigten Mauschromosomenpräparationen zeigten sich hochgradige numerische Chromosomenaberrationen. mMSC der Passagen 4 hatten im Durchschnitt $96,9 \pm 38,03$ Chromosomen/Zelle, mMSC der Passage 8 $75,1 \pm 35,40$ Chromosomen/Zelle und mMSC der Passage 26 $64,4 \pm 21,37$ Chromosomen/Zelle (Abb. 11A-E). Diese Ergebnisse stellen deutliche Abweichungen zum normalen diploiden Chromosomensatz der Maus von 40 Chromosomen dar. Um zu klären, ob nicht bereits *in vivo* Chromosomenaberrationen vorhanden sind, wurden aus frisch isoliertem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen ebenfalls Chromosomenpräparationen angefertigt. Diese Zellen wiesen zum überwiegenden Anteil einen normalen Chromosomensatz von 40 Chromosomen je Zelle auf. Im Durchschnitt enthielt jeder Kern jedoch 42,6 Chromosomen, wobei die beobachteten Chromosomenzahlen je Zelle zwischen 36 und 76 schwankten (Abb. 11F).

Der Nachweis von heteroploiden Chromosomensätzen aus frisch isoliertem Knochenmark belegt das Vorhandensein von numerischen Chromosomenaberrationen bereits *in vivo*.

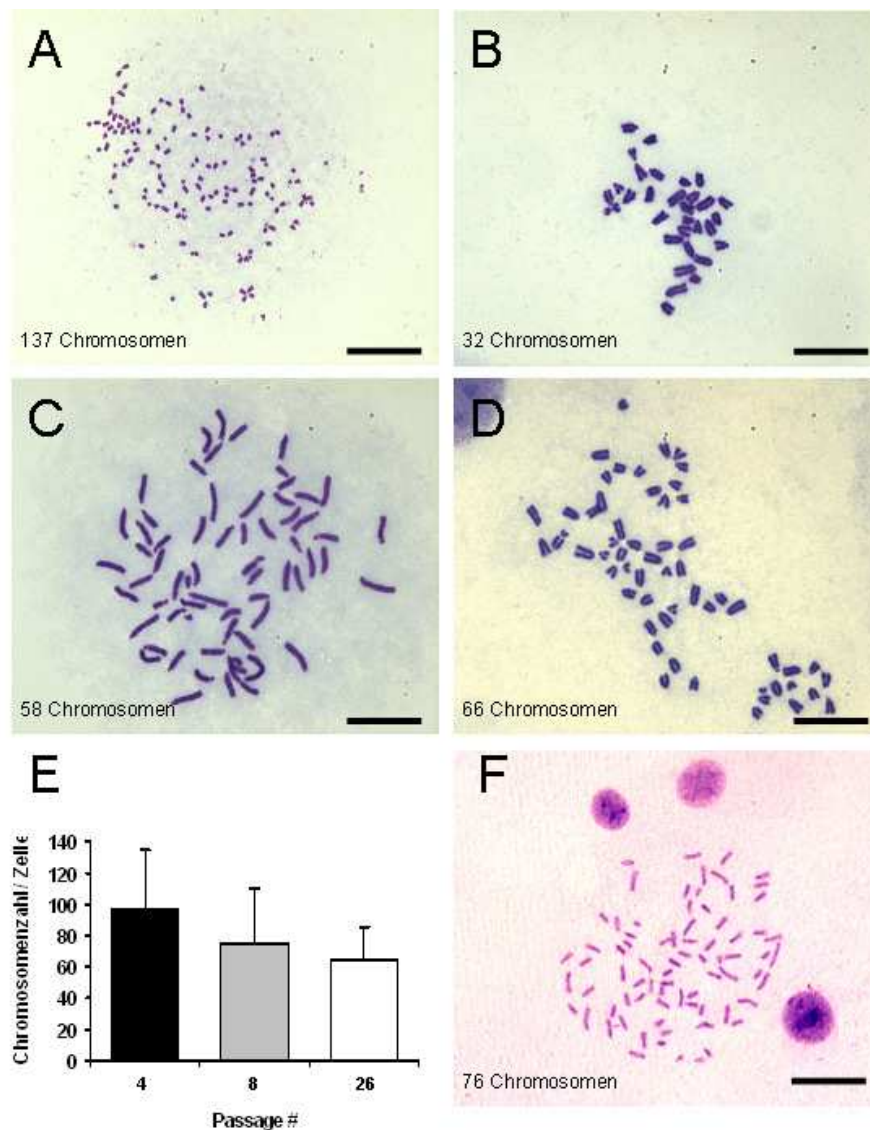


Abb. 11. Karyotypisierung der mMSC nach Chromosomenpräparation. Chromosomensätze von mMSC der Passage 4 (A), der Passage 8 (B und C) und der Passage 26 (D). E) Darstellung der Abnahme der Chromosomenzahl/Zelle im Verlauf der Passagen. F) Numerische Chromosomenaberration einer Knochenmarkszelle aus frisch präpariertem Knochenmark. A) 400X Vergrößerung; Skalierungsbalken 50 μm . B-D, F) 1000X Vergrößerung; Skalierungsbalken 20 μm .

4.2 Neuroprotektion durch MSC *in vitro*

Für die Untersuchung neuroprotektiver Effekte von MSC *in vitro* standen zwei verschiedene Systeme zur Auswahl. Zum einen das Modell der organotypischen Retina-Kulturen, zum anderen die Kokultivierung der MSC mit primären Neuronen. Für die *in vitro* Kultivierung der Retinae werden Netzhäute adulter Ratten in quadratische circa 1 mm³ große Fragmente geschnitten und in Suspension auf Wälzvorrichtungen für

bis zu 90 Tage im Inkubator kultiviert. Der Vorteil dieser von uns charakterisierten organotypischen Retina-Kulturen (Rzeczinski, Scheibe et al. 2006) besteht in deren komplexer 3D-Gewebsarchitektur, mit der für die adulte Netzhaut typischen Schichtenbildung, aussprossenden Nervenfasern, Gliastützgewebe und einer vorhandenen Vaskularisierung. Im Gegensatz dazu bilden die Neuronenkulturen ein weit einfacheres 2D-Modell ohne die Ausbildung von Gefäßnetzen. Sie bestehen zum überwiegenden Anteil aus Neuronen, einer mäßigen astroglialen Komponente und sehr wenigen Oligodendrozyten oder Mikroglia (Petzold, Scheibe et al. 2005).

Für die Durchführung von Neuroprotektionsstudien existiert für die Retina jedoch nur das Modell der Glutamat-induzierten Neurotoxizität, während für neuronale Zellkulturen verschiedene Zellschädigungsmodelle zur Verfügung stehen, beispielsweise der kombinierte Sauerstoff – Glukose – Entzug (OGD), die Glutamat-Zytotoxizität, Staurosporin oder Ethylcholin-Aziridiniumion (AF64A).

Neuronale Zellkulturen sind – im Gegensatz zur Retina – weit vielseitiger in der Simulierung verschiedener Krankheitsmodelle des ZNS einsetzbar. Sie sind nicht nur ein besser kontrollierbares System, sie sind auch leichter mit MSC kokultivierbar und unterliegen keinerlei Einschränkungen durch gewebsbedingte Diffusionsbarrieren.

Aus diesen Gründen wurden für die Untersuchung potentiell neuroprotektiver Eigenschaften von MSC neuronale Zellkulturen verwendet und das *in vitro* Zellschädigungsmodell des kombinierten Sauerstoffs – Glukose – Entzugs angewandt. Dieses Verfahren wurde von Goldberg und Choi (Goldberg und Choi et al. 1990; Goldberg und Choi et al. 1993) an kortikalen Neuronenkulturen entwickelt. Neurone werden hierbei temporär unter sauerstoff- und glukosefreien Bedingungen gehalten, wodurch über Exzitotoxizität und oxidativen Stress die Zytotoxizität induziert wird. In der Folge treten ähnliche Schadenskaskaden auf, wie sie *in vivo* nach Schlaganfall beobachtet werden.

4.2.1. Neuroprotektion durch MSC im Kokultursystem

In Experimenten, bei denen entweder 10.000 mMSC oder 1.000 hMSC in einem Transwell-Kokultursystem mit kortikalen Neuronen für 48 h kokultiviert wurden, erwiesen sich sowohl die mMSC als auch die hMSC als neuroprotektiv. Durch Präkonditionierung der Neurone mit 10.000 mMSC für 48 h konnte 24 h nach OGD eine Reduktion der LDH-Freisetzung auf 68,9% ± 6,9% im Vergleich zur unbehandelten

Kontrollgruppe erreicht werden. Durch Kokultivierung mit 1.000 hMSC wurde die LDH-Freisetzung auf $65,0\% \pm 9,3\%$ reduziert (Abb. 12A-B).

Um zu prüfen, in wie weit auch andere Stammzellpopulationen Neurone vor dem Zelltod im OGD-Modell schützen können, wurden mNSC auf neuroprotektive Eigenschaften untersucht. Die Kokultivierung von Neuronen mit entweder 1.000, 10.000 oder 20.000 mNSC ergab keinen Hinweis auf zytoprotektive Eigenschaften von mNSC. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte keine statistisch signifikante Reduktion der LDH-Freisetzung nach OGD beobachtet werden. Die parallel mitgeführte Positivkontrolle (48 h Präkonditionierung mit 5% hMSC-konditioniertem Medium) führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der LDH-Freisetzung (Abb. 12C).

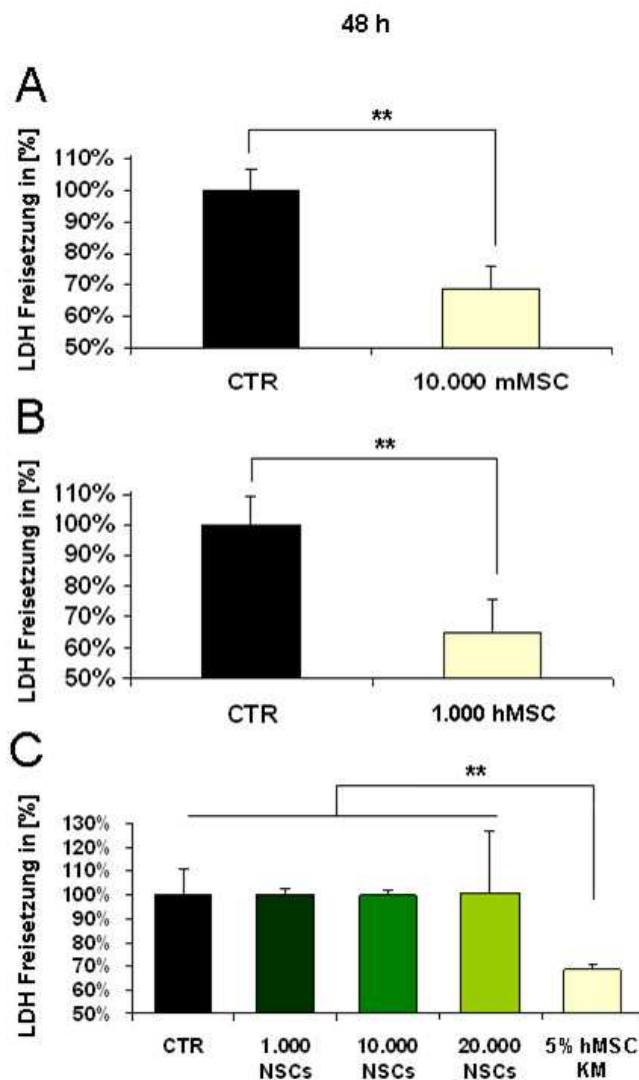


Abb. 12. Die Kokultivierung von Neuronen mit A) mMSC oder B) hMSC in Zellkultureinsätzen für 48 h führt zur Neuroprotektion und Reduktion der LDH-Freisetzung nach OGD. C) mNSC weisen keine neuroprotektiven Eigenschaften unter gleichen Experimentalbedingungen auf. A-B) $n=5$, C) $n=3$, ** $p < 0,001$.

4.2.2 Neuroprotektion durch MSC-konditioniertes Medium

mMSC- und hMSC-konditioniertes Medium (KM) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (-48 h, -30 min) und in verschiedenen Konzentrationen (0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 3%, 5%) zu den Neuronen zugesetzt. Durch Zugabe von mMSC- und hMSC-Überständen 48 h vor OGD wurden ähnliche Neuroprotektionsraten erreicht, wie in den Kokulturrexperimenten. Zusätzlich zeigte sich eine eindeutige Dosisabhängigkeit: Niedrige Überstandkonzentrationen konnten Neurone nicht vor dem Zelluntergang schützen, während im Konzentrationsbereich von 1-5% die höchsten Neuroprotektionsraten erreicht werden konnten. Für mMSC KM (3%) wurde die LDH-Freisetzung auf $71,0\% \pm 10,6\%$ reduziert und für hMSC KM (5%) auf $63,5 \pm 13,3\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 13A und C).

Zur Untersuchung einer möglichen zeitlichen Dynamik im Wirkungseintritt der MSC-Überstände wurden Neurone für nur 30 min vor OGD präkonditioniert. Hier ließ sich die zuvor beobachtete Dosisabhängigkeit der Wirksamkeit der MSC-Überstände nicht mehr bestätigen. MSC KM war hier bereits in sehr niedrigen Konzentrationen neuroprotektiv. So reduzierten 0,1%ige hMSC-Überstände die LDH-Freisetzung auf $75,60\% \pm 9,34\%$. Parallel dazu führte eine 30 minütige Präkonditionierung mit 0,1% mMSC KM zur Verminderung der LDH-Freisetzung auf $80,3\% \pm 16,8\%$ (Abb. 13B und D). Insgesamt konnten Neurone mit einer Präkonditionierungsdauer von 48 h besser vor dem Zelluntergang im OGD-Modell bewahrt werden, als wenn die Vorbehandlung nur 30 min währte. Ursächlich hierfür ist möglicherweise eine verzögerte Bildung oder Degradation der zellschützenden Faktoren im Zeitverlauf.

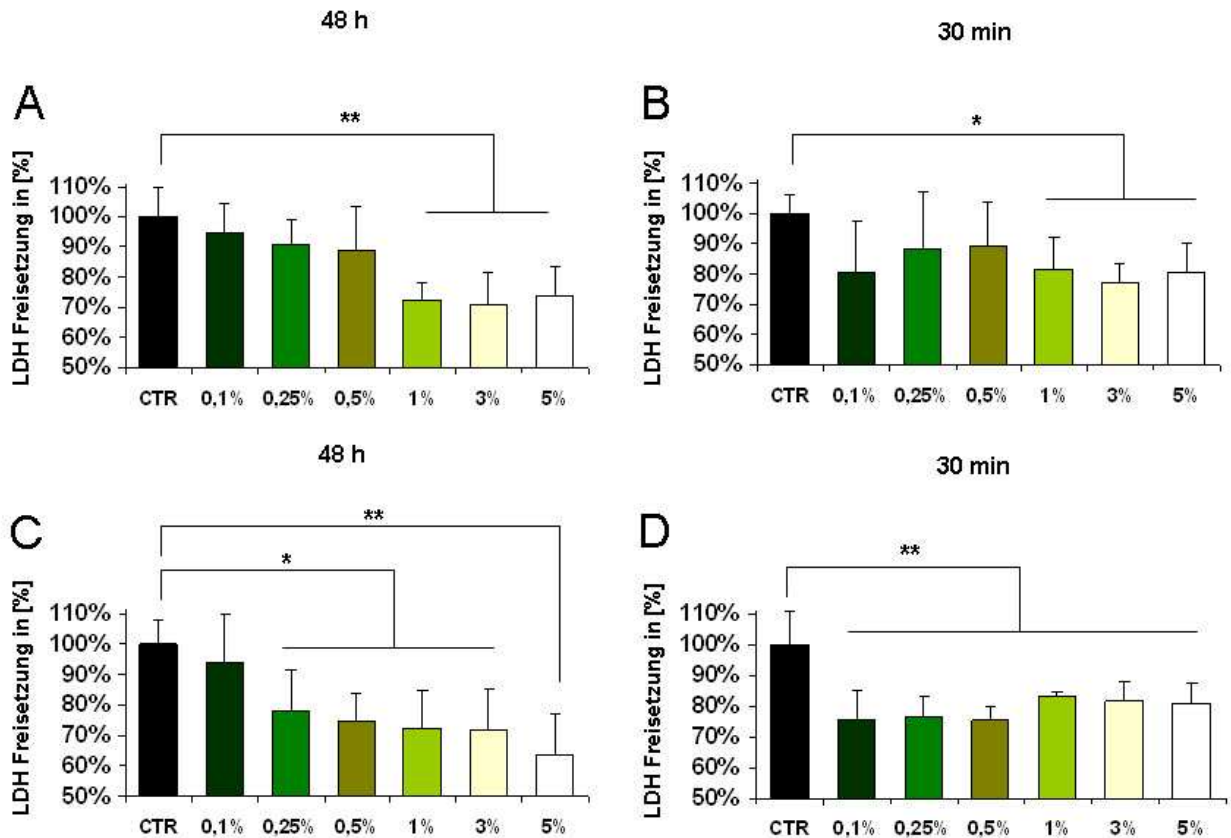


Abb. 13. Die Prækonditionierung mit MSC-konditioniertem Medium für entweder 48 h oder 30 min vor OGD schützt kortikale Neurone vor dem Zelluntergang. A und B) Behandlung mit mMSC-konditioniertem Medium. C und D) Prækonditionierung mit hMSC-konditioniertem Medium. n=5, * p < 0,05, ** p < 0,001 .

In weiteren Experimenten zeigte sich, dass MSC-Überstände auch nach Eintritt des toxischen Ereignisses geschädigte Neurone vor dem Zelltod schützen können. Nachdem mMSC- und hMSC-KM in variablen Konzentrationen (0,1%, 0,25%, 0,5% und 1%) erst nach Ende der OGD zu den Neuronen pipettiert wurde, konnte nach Behandlung mit mMSC-KM die LDH-Freisetzung auf maximal $75,2 \pm 11,2\%$ und nach Zugabe von hMSC-KM auf maximal $80,8\% \pm 8,9\%$ reduziert werden (Abb. 14A-B). Auch hier war die erreichte Neuroprotektion geringer ausgeprägt, als nach einer Prækonditionierungsdauer von 48 h.

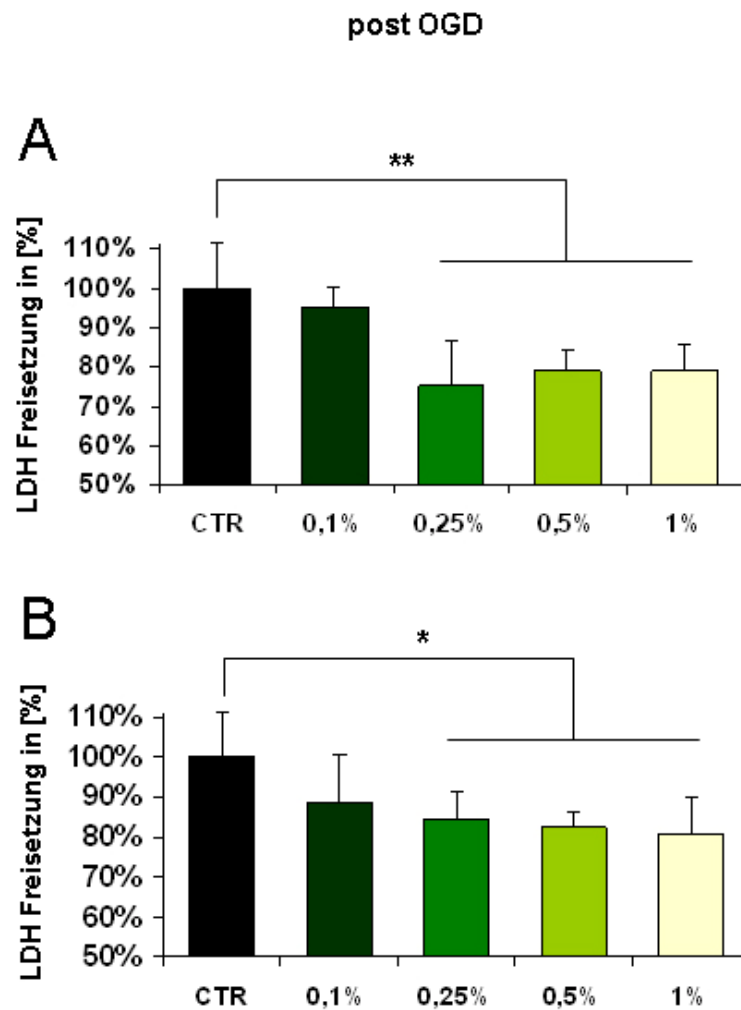


Abb. 14. Eine Reduktion der LDH-Freisetzung nach OGD zeigt sich nach Zugabe von mMSC-konditioniertem Medium (A) und hMSC-konditionierten Medium (B). $n=5$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Zusammenfassend sind die neuroprotektiven Eigenschaften von MSC:

- 1) nicht speziesabhängig. Sowohl murine als auch humane MSC erwiesen sich im vergleichbaren Ausmaß als neuroprotektiv.
- 2) Um Neurone vor dem Zelltod im OGD-Modell zu schützen, bedarf es keines direkten Zell- Zellkontaktes zwischen Neuronen und MSC, da die Neuroprotektion über einen offensichtlich parakrinen Mechanismus vermittelt wird.
- 3) Allerdings führten in den Präkonditionierungsexperimenten hohe Zellzahlen von MSC (für mMSC > 10.000 , für hMSC > 5.000) und höhere Konzentrationen von MSC-KM ($> 5\%$) zu zytotoxischen Effekten in den Neuronenkulturen. Ebenso kam es zu Neurotoxizität nach Zugabe von höher konzentrierten MSC-Überständen nach OGD ($>$

0,5%). Dies wurde sowohl durch Phasenkontrastmikroskopie als auch durch LDH-Messungen direkt vor OGD nachgewiesen. Unter Berücksichtigung dieser Daten, wurde die MSC-vermittelte Neuroprotektion nur im non-toxischen Dosisbereich untersucht.

4.2.3 Anti-apoptotische Mechanismen der Neuroprotektion

Durch Zugabe von Acridin Orange und Ethidiumbromid zu den Neuronenkulturen 24 h nach OGD wurde der Anteil von apoptotischen und nekrotischen Zellen quantifiziert. Zellen, die entweder mit 5% hMSC- oder 5% mMSC-KM 48 h vor OGD oder 0,5 % hMSC oder 0,5% mMSC KM nach OGD behandelt wurden, zeigten korrespondierend zur Reduktion der LDH-Freisetzung einen signifikant geringer ausgeprägten Gesamtzellschaden. Das verbesserte Überleben der Neurone war auf eine signifikante Reduktion des apoptotischen Zelltodes in den Experimentalgruppen zurückzuführen (Abb. 15A-F). Der Zelltod durch Nekrose spielte insgesamt im OGD-Modell nur eine untergeordnete Rolle. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

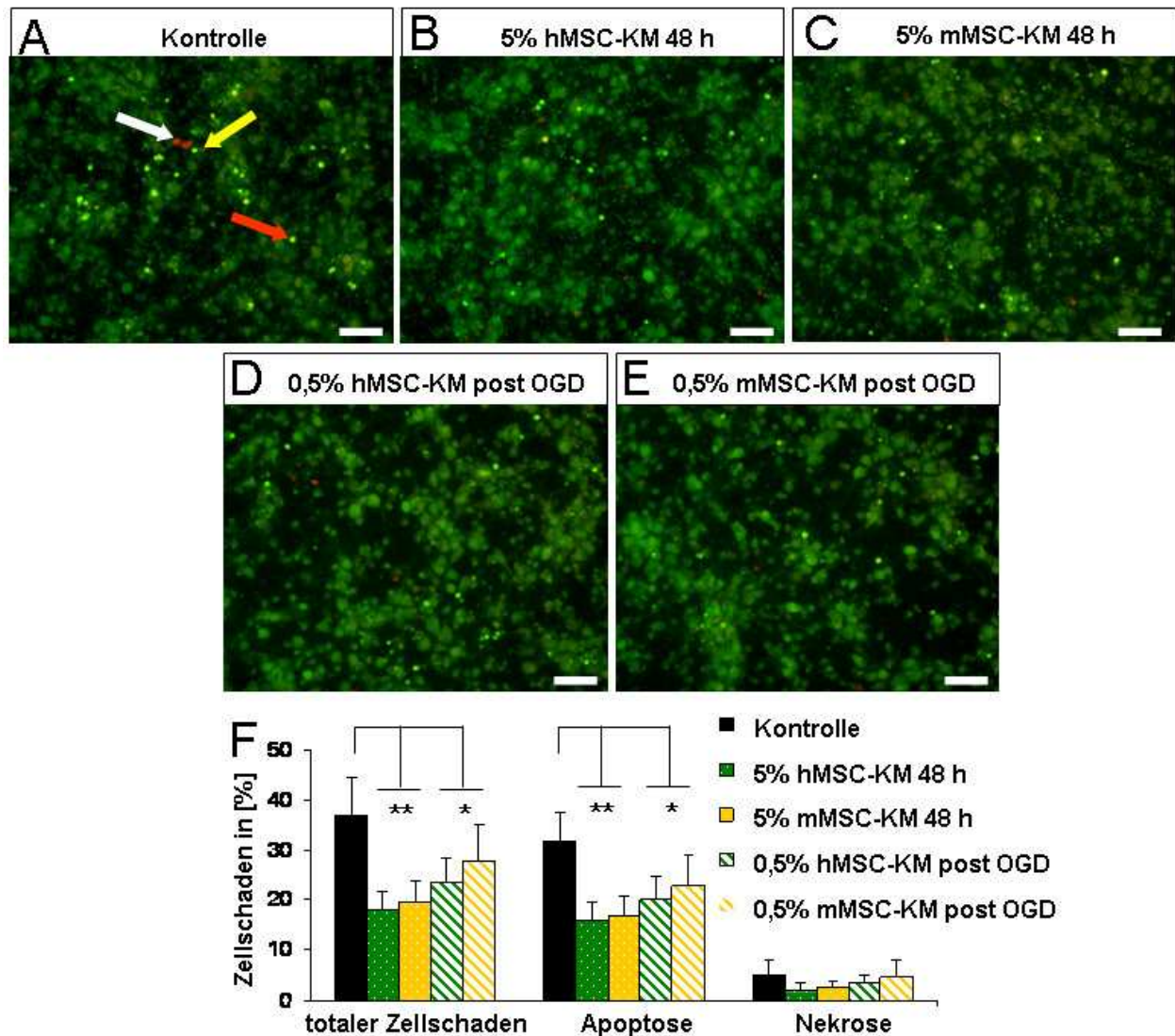


Abb. 15. MSC und deren Überstände schützen Neurone vor dem Zelluntergang im OGD-Modell durch einen antiapoptotischen Wirkmechanismus. In der Kontrollgruppe finden sich → frühapoptotische, → spätapoptotische und auch → nekrotische Zellen (A). Zellen, die mit B) 5% hMSC-konditioniertem Medium, C) 5% mMSC-konditioniertem Medium 48 h vor OGD oder mit D) 0,5% hMSC-konditioniertem Medium oder E) 0,5% mMSC-konditioniertem Medium nach OGD behandelt wurden, zeigten einen reduzierten Gesamtschaden, vor allem aber eine Reduktion der apoptotischen Neurone. Nur sehr wenige Neurone sterben durch Nekrose (F). *n*=6, * *p* < 0,05, ** *p* < 0,001, 200X Vergrößerung, Skalierungsbalken 100 µm.

4.2.4 Signalkaskaden der Neuroprotektion

Mit Hilfe von Western Blot-Studien wurden intrazelluläre Signalkaskaden untersucht, die an der Vermittlung des anti-apoptotischen Effektes von MSC beteiligt sein könnten.

Hierfür wurden Neurone für 10 Tage *in vitro* kultiviert und danach mit 5% hMSC- oder mMSC-KM für 30 min behandelt, bevor die Proteinextrakte aus den Zellen gewonnen wurden. Die Western Blot-Ergebnisse ergaben eine Hochregulierung von pSTAT3 (Tyr705) (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) und pAkt (Thr 308).

Hingegen spielte die MAPK/ERK-Signalkaskade (*Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase*), die in vielen Zellen an zytoprotektiven Mechanismen beteiligt ist, keine Rolle. Die p42/44-MAPK zeigte in dem hier angewandten Schadensmodell keine vermehrte Aktivierung (Abb. 16).

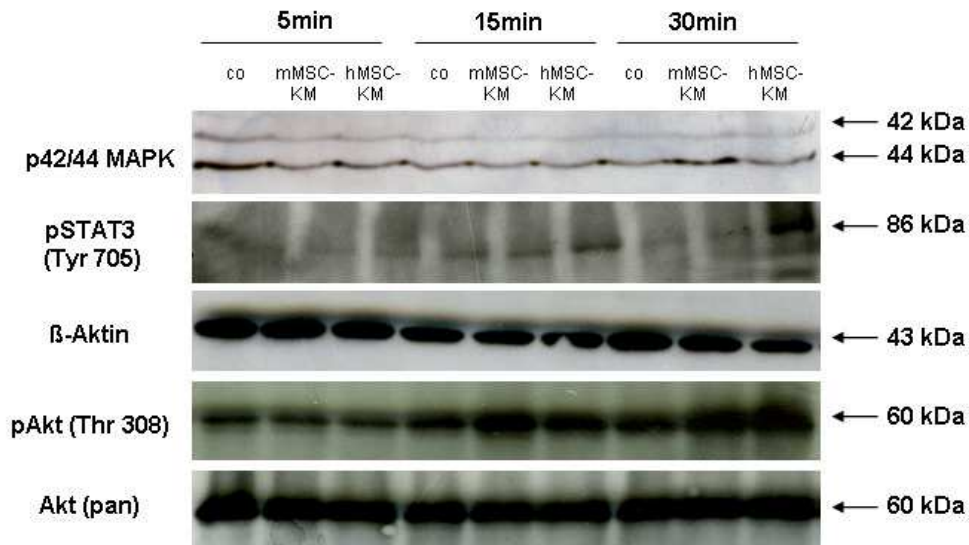


Abb. 16. Die Behandlung der Neurone mit Kontrollmedium, mMSC-KM oder hMSC-KM zeigte im Zeitverlauf eine Hochregulierung von pSTAT3 (Tyr705) und pAkt (Thr308). Die p42/44 MAPK war dagegen nicht reguliert.

4.2.5 MSC verändern nicht die Zusammensetzung neuronaler Zellkulturen

Die Neuronenkulturen wurden nach Kokultivierung mit murinen und humanen MSC oder nach Behandlung mit murinen oder humanen MSC-KM vor OGD mit PFA fixiert und über eine Immunzytochemie auf ihren Anteil an Neuronen (MAP-2-Immunreaktivität), Astrozyten (GFAP-Immunreaktivität), Oligodendrozyten (CNPase-Immunreaktivität) und Mikroglia (Iba-1-Immunreaktivität) untersucht (Abb. 17). Die immunzytochemische Analyse ergab, dass die MSC oder von ihnen produzierte lösliche Faktoren die Zellzusammensetzung der Neuronenkulturen nicht veränderten. In den Kulturen fanden sich in allen Experimentalgruppen ~89% Neurone und ~11% Astrozyten. Der Anteil an Oligodendrozyten betrug ~0,1% und die Vorkommensfrequenz der Mikroglia lag bei < 0,04%. Diese Daten suggerieren, dass die beobachtete Neuroprotektion nicht das Resultat einer veränderten Zellzusammensetzung ist, sondern auf anderweitige Veränderungen der Neuronenkulturen durch MSC beziehungsweise ihre Überstände zurückzuführen ist.

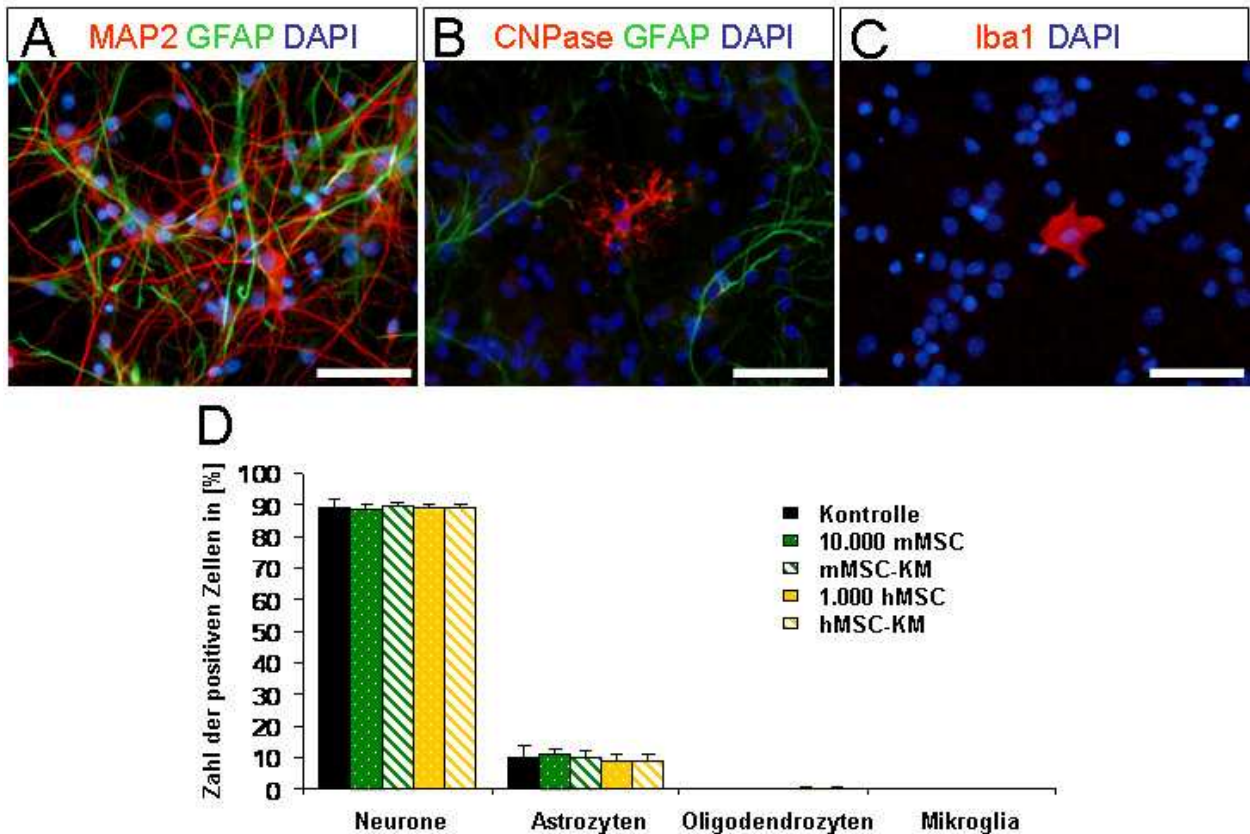


Abb. 17. Immunzytochemie der kortikalen Neuronenkulturen. A) MAP-2/GFAP-Färbung, B) CNPase/GFAP-Färbung, C) Iba1-Färbung. Zellkerne werden mit DAPI gefärbt. 400X Vergrößerung, Skalierungsbalken 50 μ m.

4.3 Transplantation humaner MSC im *in vivo* Schlaganfallmodell

Aufgrund der nachgewiesenen neuroprotektiven Eigenschaften von MSC im *in vitro* Schlaganfallmodell (OGD), sollte das regenerative Potential der Zellen *in vivo* an Schlaganfallmäusen (MCAo) untersucht werden. Hierfür wurden jeweils 1×10^6 hMSC 24 h nach 60 minütiger MCAo intravenös in die Schwanzvenen von C57BL/6 Mäusen injiziert. Ein xenogenes Transplantationsmodell mit humanen MSC wurde gewählt, um in einem translational präklinisch orientierten Ansatz – in Kooperation mit der Firma Pharmicell – die protektiven Eigenschaften der MSC zu erforschen.

Im zeitlichen Verlauf wurde das Gewicht der Tiere, der Bederson-Score als orientierender Parameter zur Einschätzung des neurologischen Defizits, die Mortalität der Tiere und das Schlaganfallvolumen mittels MRT evaluiert.

Zwischen beiden Behandlungsgruppen konnte hinsichtlich des Körpergewichtes, welches vor Ischämie und danach über weitere 8 Tage täglich gemessen wurde, kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Am Tag 5 nach MCAo war der maximale

Gewichtsverlust zu verzeichnen. Versuchstiere die PBS erhielten, wogen zu diesem Zeitpunkt $18,4 \text{ g} \pm 2,1 \text{ g}$ und Mäuse der hMSC-Gruppe $17,7 \text{ g} \pm 2,6 \text{ g}$ (Abb. 18A).

Hinsichtlich des neurologischen Defizits ergab sich zwischen beiden Experimentalgruppen kein signifikanter Unterschied im Bederson-Score (Abb. 18B), wobei die spontane Remission des Defizits in der ersten Woche nach MCAo zu beachten ist.

Die Mortalitätsraten der Tiere nach experimentellem Schlaganfall lag für die PBS-Gruppe bei 40% (n=15) und für die hMSC-transplantierten Tiere bei 50% (n=28). Die OP-Mortalität betrug 10%. Die höhere Mortalität der hMSC-Gruppe war nicht durch Embolien infolge intravenöser Transplantation der Zellen bedingt. Die erhöhte Mortalitätsrate dieser Gruppe kam durch höhere Tieraussfallraten zu späteren Zeitpunkten zustande.

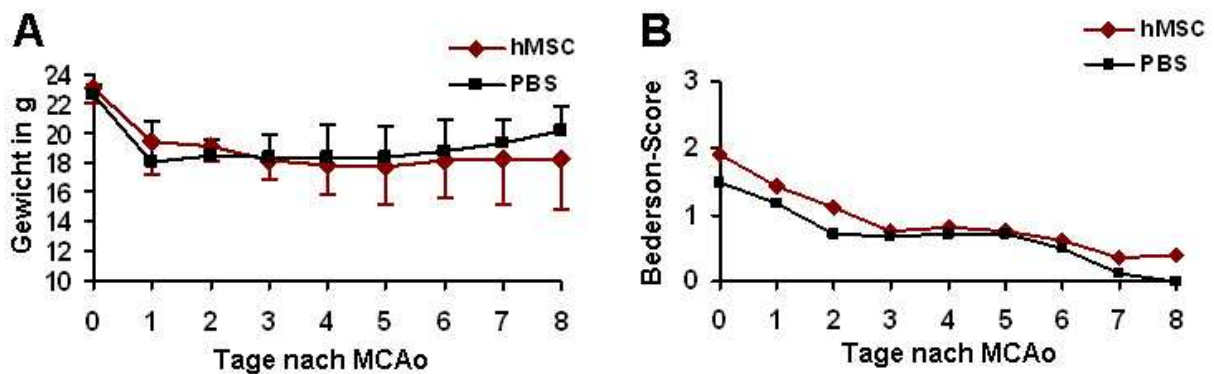


Abb. 18. Klinische Parameter in C57BL/6 Mäusen nach 60 minütiger MCAo und intravenöser Applikation von 1×10^6 hMSC versus PBS nach 24 h. A) Die Gewichtskurven der Tiere bis zu 8 Tage nach MCAo zeigten keinen signifikanten Unterschied im Gewichtsverhalten der Tiere (hMSC, n=14, PBS n=9). B) Der Bederson-Score als Verhaltenstestparameter konnte zwischen beiden Versuchsgruppen keinen Unterschied in der Schwere des neurologischen Defizits nachweisen (hMSC, n=14, PBS n=9).

Für die Evaluierung der Infarkt volumina wurden T2-gewichtete MRT-Aufnahmen am Tag 4 oder 5 nach 60 min MCAo angefertigt. Die hMSC-behandelten Mäuse zeigten ein Schlaganfallvolumen von $81,5 \text{ mm}^3 \pm 46,9 \text{ mm}^3$ und die Tiere der PBS-Behandlungsgruppe zeigten eine Läsionsgröße von $66,0 \text{ mm}^3 \pm 40,8 \text{ mm}^3$ (Abb. 19A-C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mäuse nach zerebraler Ischämie von der hMSC Applikation nicht profitierten, weder im Hinblick auf das Gewicht, noch auf die Schwere des neurologischen Defizits oder die Größe des Infarktvolumens. Die hMSC

wurden in immunhistochemischen Färbungen gegen das *human nuclei antigen* (huNu) angefärbt, jedoch ließen sich in den Gehirnen keine eingewanderten hMSC detektieren.

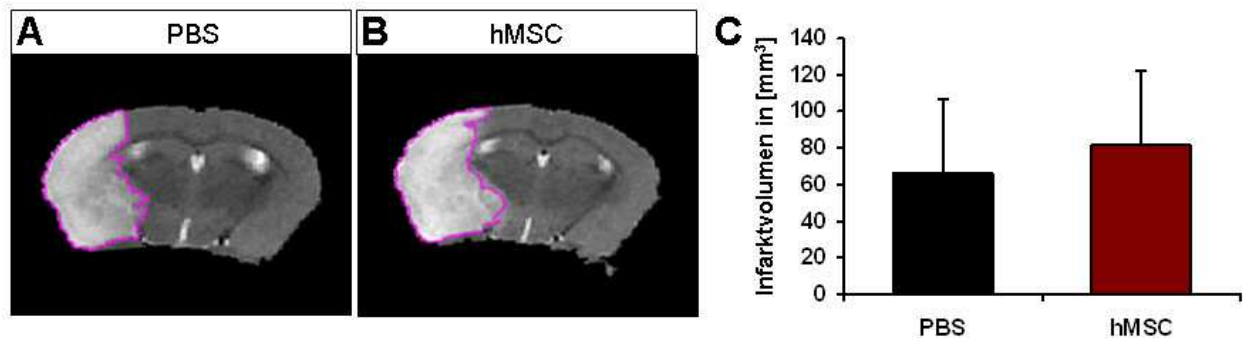


Abb. 19. Die Infarkt volumina der Tiere wurden aus T2-gewichteten MRT-Aufnahmen von (A) PBS- und (B) hMSC- behandelten Mäusen am Tag 4 oder 5 nach 60 min MCAo bestimmt. C) Zwischen hMSC- (n=20) und PBS- (n=10) behandelten Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied in den Infarkt volumina.

4.4 Transfektion der mMSC

4.4.1 Etablierung geeigneter transienter Transfektionsprotokolle für mMSC mit dem pEGFP-N2 Vektor

Mesenchymale Stromazellen gehören neben anderen Stammzellpopulationen zu den am schwierigsten zu transfizierenden Zellen. Auf der Suche nach einer geeigneten Methode für die transiente Transfektion von mMSC wurden vielversprechende Methoden ausgewählt und auf ihre Effizienz überprüft. Hierzu gehörten die Nukleofektion, Magnetofektion und Lipofektion. Um die Techniken zu etablieren, wurden die Zellen mit dem pEGFP-N2 Vektor transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mittels FACS auf ihre EGFP-Expression untersucht.

Nukleofektion. Für die von der Firma Amaxa entwickelte Technologie der Nukleofektion wurde vom Hersteller kein Transfektionsprotokoll für murine MSC zur Verfügung gestellt. Im Rahmen des Optimierungsprozesses der Transfektionsbedingungen erwies sich der von Amaxa vertriebene Nukleofektionspuffer für Neurone der Ratte (Rat Neuron Nucleofactor[®] Kit) auch für mMSC geeignet.

In initialen Experimenten wurden die folgenden Programme des Nukleofektionsgerätes im Hinblick auf hohe Transfektionsraten und Zellviabilität analysiert: A-23, A-24, A-30, C-17, T-05, T-16, T-20, T-23, T-27, U-11, U-23 und V-13. Die besten Ergebnisse

wurden mit dem Programm A-30 erzielt, welches dann in allen folgenden Experimenten verwendet wurde.

Während der Etablierungsphase wurden jeweils $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ oder 1×10^6 mMSC mit entweder 1 μg , 3 μg , 5 μg oder 7 μg Plasmid-DNA kombiniert. Die besten Transfektionsergebnisse wurden unter Verwendung von 1×10^6 Zellen mit 5 μg DNA erzielt (Abb. 20A).

Zur Bestimmung der Toxizität der Methode wurde die Zahl der überlebenden Zellen in Relation zur Zahl der nukleofizierten Zellen gesetzt. Die Zellviabilität wurde 3h nach Nukleofektion und somit vor Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus mittels Zellzählung und Trypanblaufärbung bestimmt. Hierbei ergab sich eine Zellüberlebensrate nach Nukleofektion von $36,7\% \pm 1,4\%$ mit einer Zellviabilität von $94,0\% \pm 0,7\%$ (n=3).

Magnetofektion. Für die Etablierung eines geeigneten Magnetofektionsprotokolls für mMSC wurden die Zellen in 96 well Platten ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit 25 ng, 75 ng oder 150 ng DNA, kombiniert mit CombiMAG Nanopartikeln im Verhältnis 1:2, 1:1 oder 2:1 und unter Zusatz von entweder 0,1 μl oder 0,2 μl Lipofektamin je well. Die besten Transfektionsraten wurden unter Verwendung von 150 ng DNA, in Kombination mit CombiMAG Nanopartikeln im Verhältnis 1:1 und 0,2 μl Lipofektamin je well erreicht (Abb. 20B). Die kurz dauernde Applikation des magnetischen Feldes von 5 min auf der MagnetoFACTOR-96 Platte erwies sich als besonders günstig, um hohe Transfektionsraten bei gutem Zellüberleben zu erzielen.

Lipofektion. Für die Transfektion durch Lipofektamin wurden die Zellen in 12 well Platten ausgesät und mit DNA-Lipofektamin-Komplexen transfiziert. Dafür wurden entweder 2 μg , 4 μg oder 6 μg DNA mit Lipofektamin im Verhältnis 2:1, 1:1 oder 1:2 gemischt. Bei Kombination von 4 μg DNA mit 4 μl Lipofektamin konnten die besten Transfektionsergebnisse erzielt werden (Abb. 20C).

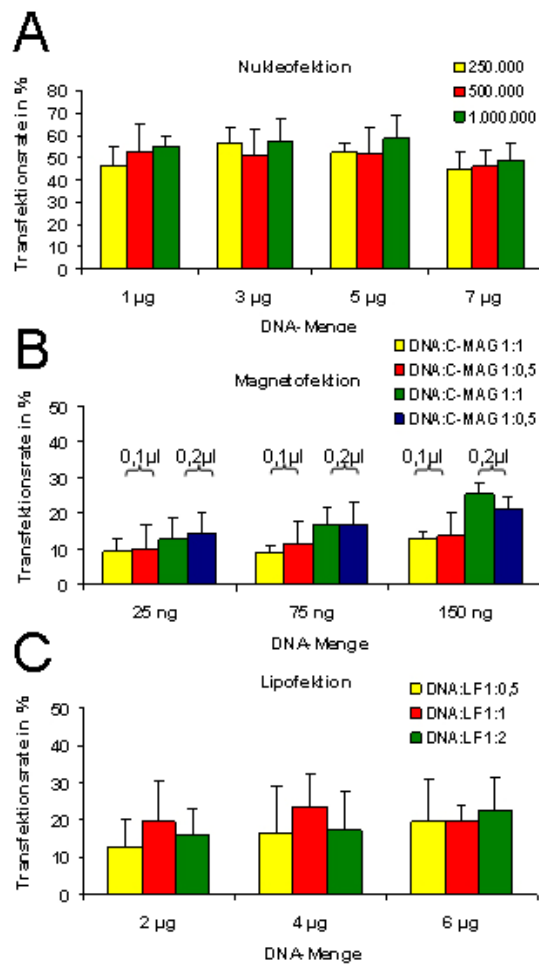


Abb. 20. Transfektionsraten der mMSC nach Nucleofektion (A), Magnetofektion (B) und Lipofektion (C) während der Optimierungsphase der Methoden (n=4) .

Detektion der EGFP-Expression nach transienter Transfektion. Bereits 6-8 h nach Transfektion konnte in den Zellen eine initiale grüne Fluoreszenz als Ausdruck der beginnenden EGFP-Proteinbiosynthese am Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. 24 h nach dem Einschleusen des Transgens fanden sich bei allen drei Transfektionsmethoden zahlreiche stark grün fluoreszierende Zellen in den Kulturen (Abb. 21A-C).

Bei Vergleich der verschiedenen Techniken stellte sich die Nucleofektion als die klar überlegene Methode heraus. FACS-Analysen 48 h nach Transfektion ergaben für die Nucleofektion Transfektionsraten von $60,2\% \pm 2,0\%$, während die Magnetofektion nur $29,5 \pm 1,7\%$ und die Lipofektion mit Lipofektamin nur $22,8\% \pm 2,0\%$ erreichten (Abb. 21D). Die Langzeitexpression von EGFP wurde in transient transfizierten mMSC am FACS zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht: 4d, 7d, 14d und 21d nach

Transfektion. In den ersten Tagen nach Transfektion ist bei allen drei Transfektionsmethoden die Transgenexpression auf gleichem Niveau stabil, während sich nach 7 Tagen die Zahl der EGFP-positiven Zellen zunehmend reduziert. Nach 2-3 Wochen produzieren nur noch wenige Zellen EGFP (Abb. 21D).

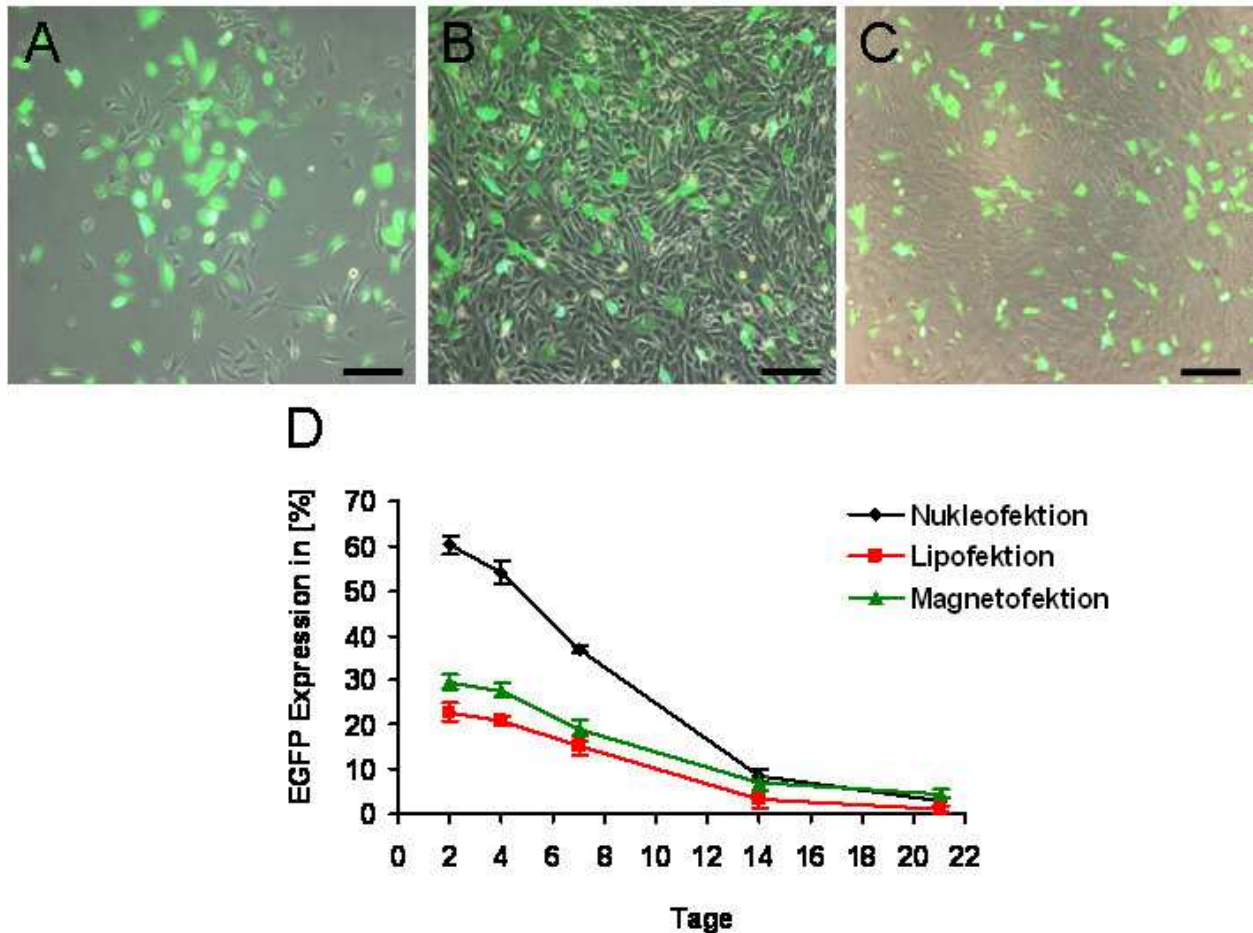


Abb. 21. Überlagerung von Phasenkontrastbildern mit Fluoreszenzphotographien nach Transfektion der mMSC mit dem pEGFP-N2 Vektor. Die Bilder zeigen repräsentative Beispiele EGFP-exprimierender mMSC nach Nukleofektion (A), Lipofektion (B) und Magnetofektion (C). D) Darstellung des Zeitverlaufs der EGFP-Expression in mMSC: 2, 4, 7, 14 und 21 Tage nach Transfektion wurden in den mMSC die Transfektionsraten für die Nukleofektion, Lipofektion und Magnetofektion mittels FACS bestimmt (n=3). A-C) 100X Vergrößerung; Skalierungsbalken 200 μm.

4.4.2 Stabile Transfektion der mMSC mit dem pEGFP-N2 Vektor

Ziel der stabilen Transfektion der mMSC war die Umgehung des zügigen Verlustes der Transgenexpression nach transienter Transfektion.

Um die stabile Integration von EGFP in das Genom der mMSC zu erreichen, wurden die Zellen nach Nukleofektion, Magnetofektion und Lipofektion für 14 Tage mit 400 μg/ml Geneticin selektioniert. Unter anschließender Verwendung eines sc-CFU wurde

über einen FACS Sorter jeweils eine einzelne EGFP-positive Zelle in jedes well einer 96 well Platte sortiert (n=3). Aus diesen Einzelzellen wuchsen neue Kolonien, die weiter expandiert und mittels FACS auf ihre EGFP-Fluoreszenz untersucht wurden.

Über diese Methode konnten unabhängig von der Transfektionstechnik stabil EGFP-exprimierende klonale mMSC generiert werden. Klone, die durch Nukleofektion selektioniert wurden, zeigten eine EGFP-Expression in über 96% der Zellen, nach Magnetofektion in über 98% der Zellen und nach Lipofektion in über 91,6% der Zellen (Abb. 22A-B). Die Zellen wurden für weitere 4 Passagen in einer Zelldichte von 50 Zellen/cm² subkultiviert und danach erneut auf ihre EGFP-Expression analysiert, um die stabile Integration der EGFP-DNA zu belegen. Die FACS-Analyse bestätigte, dass die Zahl der EGFP-positiven Zellen vergleichbar war mit den Ergebnissen 4 Passagen zuvor (Abb. 22C).

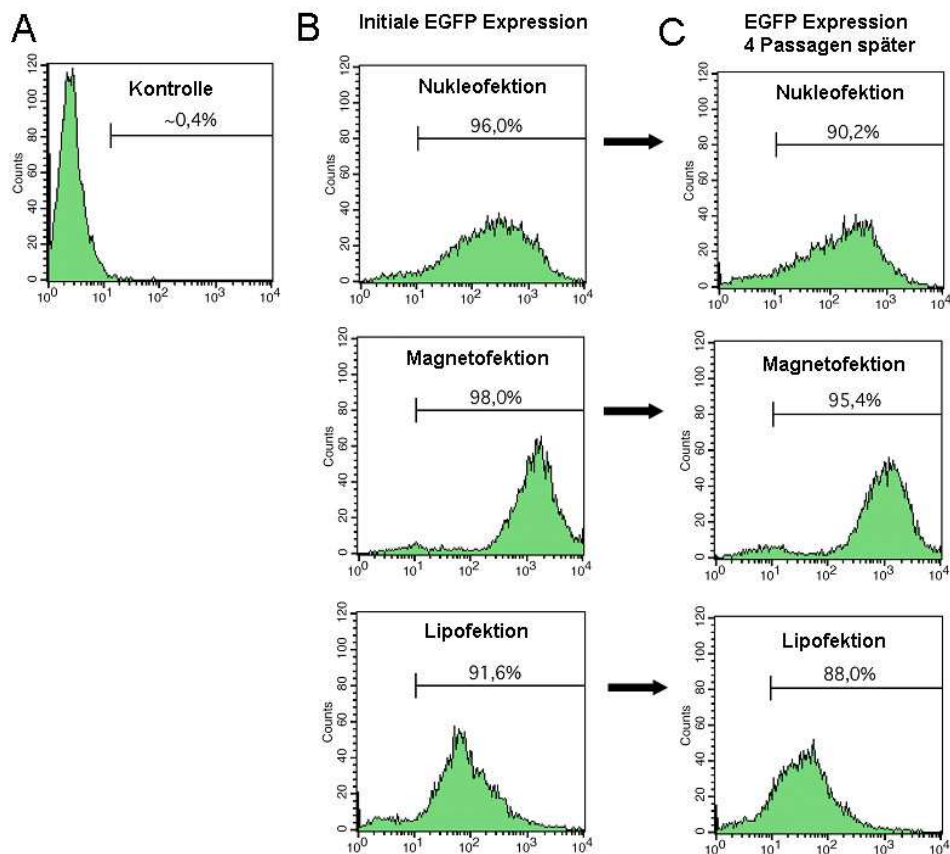


Abb. 22. Generierung stabil transfizierter mMSC nach Nukleofektion, Magnetofektion und Lipofektion. A) Untransfizierte Zellen dienen als Kontrolle. B) Sowohl mittels Nukleofektion, Magnetofektion, als auch Lipofektion ließen sich stabil EGFP-exprimierende mMSC-Klone erzeugen. C) Die Langzeit-EGFP-Expression erwies sich in den untersuchten mMSC-Klonen bei erneuter Analyse 4 Passagen später als stabil.

Während der Selektionierung mit Geneticin zeigten transfizierte mMSC sehr wenig zytotoxische Effekte, während Kulturen untransfizierter mMSC bereits bei Dosen von unter 20 µg/ml starben. Durch die ausgeprägte Antibiotikaresistenz untransfizierter Zellen in den transfizierten mMSC-Kulturen, konnte während der Selektionsphase nicht die für andere Zelltypen typische Koloniebildung beobachtet werden. Über einen „Bystander“-Effekt konnten transfizierte Zellen möglicherweise untransfizierte mMSC vor dem Zelltod schützen.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Zahl der untersuchten stabil transfizierten Klone für die verwendeten Transfektionsmethoden. Unter Berücksichtigung der transfektionsassoziierten Zytotoxizität und der nachfolgenden Proliferation der Zellen unter Selektionierung ergab sich nach Hochrechnung, dass ca. 1 aus $1,8 \times 10^3$ Zellen nach Nukleofektion die EGFP-DNA stabil ins Genom integrierten. Nach Magnetofektion integrierten ~1 aus 320 Zellen und nach Lipofektion ~1 aus 350 Zellen stabil ins Genom. Die geringe Frequenz der stabilen Transgenintegration bei der Nukleofektion beruht auf der hohen Toxizität der Methode direkt nach Transfektion.

	Nukleofektion	Magnetofektion	Lipofektion
Gesamtzahl der Klone	5/288	9/288	10/288
Klone: EGFP > 85%	2/288	3/288	4/288
Klone: EGFP 50 - 85%	0/288	1/288	2/288
Klone: EGFP < 50%	3/288	5/288	4/288

Tabelle 3. Zusammenfassende Darstellung der durch Selektionierung mit Geneticin und sc-CFU gewonnenen stabil transfizierten mMSC-Klone.

4.4.3 Stabil transfizierte mMSC zeigen keine Veränderungen ihrer Plastizität oder des Proliferationsverhaltens

Nach stabiler Transfektion der mMSC mit dem pEGFP-N2 Vektor (Abb. 23A-C), kam es zu keiner Veränderung des Phänotyps. Stabil EGFP-exprimierende mMSC-Klone zeigten vergleichbare Proliferations- und Differenzierungseigenschaften wie untransfizierte Zellen. Nach Stimulation mit dem jeweiligen Induktionsmedium konnte die Differenzierung in die adipogene und osteogene Linie nach Oil Red O und Alizarin Red S Färbung nachgewiesen werden (Abb. 23D-I). Die Proliferationseigenschaften der stabil transfizierten mMSC waren mit untransfizierten Zellen vergleichbar. Die EGFP-

exprimierenden Klone vollführten zwischen 30-32 Zellverdopplungen während einer Kultivierungsperiode von 4 Wochen (4 Passagen).

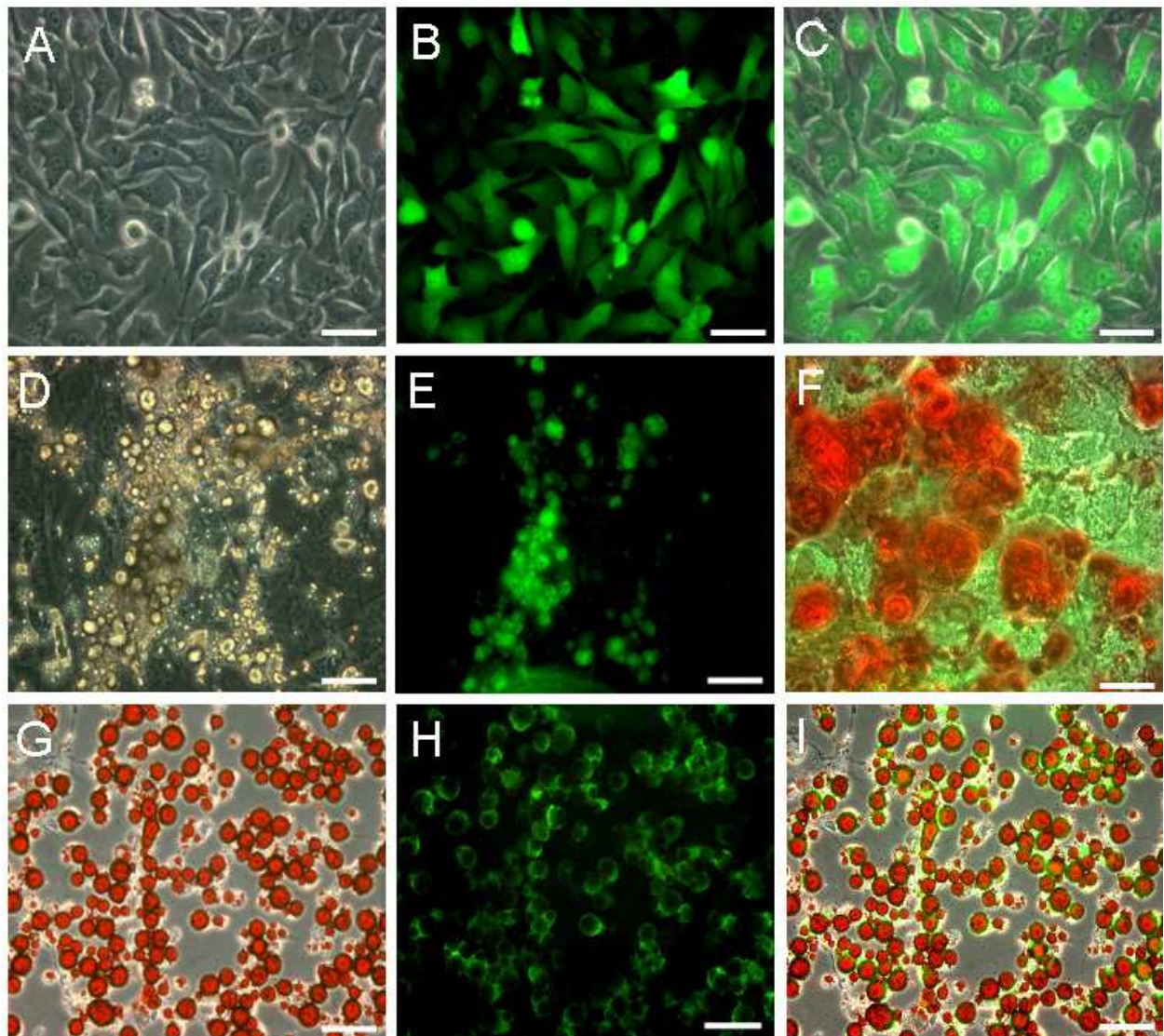


Abb. 23. A-C) Nach stabiler Transfektion exprimieren mMSC EGFP. D-F) Die ungefärbten Bilder (D und E) und die Alizarin Red S Färbung (F) zeigen die Ausdifferenzierung von stabil EGFP-exprimierenden mMSC in Ostoblasten. G-I) Die Kolokalisation von Oil Red O und EGFP demonstriert die Triglyceridsynthese von stabil transfizierten mMSC und die damit verbundene positive Fettdifferenzierung. A-F) 400X Vergrößerung; Skalierungsbalken 40 µm. G-I) 200X Vergrößerung; Skalierungsbalken 100 µm.

4.4.4 Gentransfer von murinem Erythropoietin (EPO) in mMSC

Als Anwendungsbeispiel für potentiell gentherapeutische Applikationen wurden mMSC mit murinem Erythropoietin genetisch modifiziert. Erythropoietin wurde ausgewählt, da es innerhalb der Knochenmarknische eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Erythropoese spielt, darüber hinaus aber auch in verschiedenen Organen versatile

Funktionen im Bereich der Zyto- und Neuroprotektion ausübt (Calvillo et al. 2003; Sinor und Greenberg et al. 2000). EPO wirkt im Gehirn neuroprotektiv und kann in *in vitro* Schlaganfallmodellen durch Aktivierung entsprechender Signalkaskaden Neurone vor dem Zelluntergang durch Apoptose bewahren (Ruscher et al. 2002). Bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie dem Schlaganfall (Bernaudin et al. 1999; Brines et al. 2000), der Multiplen Sklerose (Ehrenreich et al. 2007a) oder der Schizophrenie (Ehrenreich et al. 2007b) erwies sich EPO in tierexperimentellen oder auch humanen Studien als gewebsschutzend. Vor diesem Hintergrund erscheinen EPO-produzierende MSC als geeignete zelluläre Vektoren, um bei neurologischen Erkrankungen oder zur Behandlung der Anämie im Rahmen von gentherapeutischen Applikationen Anwendung zu finden.

Endogenes EPO – als Glykoprotein mit 165 Aminosäuren – wird nach hypoxämischer Stimulation zum überwiegenden Teil von interstitiellen Fibroblasten der Niere synthetisiert, aber auch in der Leber, im Uterus oder im Gehirn (Chikuma et al. 2000). Die Klonierung des EPO-Gens 1985 ermöglichte die rekombinante Produktion von EPO (Lin et al. 1985) und revolutionierte die Behandlung der Anämie. Wiederholte Bluttransfusionen, die mit der Gefahr einer Eisenüberladung einhergingen, waren zur Behandlung der Anämie nicht mehr nötig (Nomura et al. 1990). Um anhaltend therapeutische Plasmaspiegel von EPO in einem Organismus zu erzielen, bedarf es jedoch repetitiver Injektionen von rekombinantem EPO. Zellbasierte gentherapeutische Anwendungen könnten hierbei eine effiziente Alternative bilden. Mittels adenoviralem, retroviralem oder lentiviralem Gentransfer (Osada et al. 1999; Oh et al. 2006; Daga et al. 2002) konnte bisher in zahlreichen *in vivo* Studien EPO in Nagetiere, aber auch in Primaten eingeschleust und eine biologisch relevante Stimulation der Erythropoese beobachtet werden. Nonviral wurde EPO bisher durch intramuskuläre Injektion von Plasmid-DNA, durch Administration nackter DNA oder durch Elektroporation in Zielzellen eingebracht (Tripathy et al. 1996; Svensson et al. 1997).

Vor diesem Hintergrund wurde die Einsatzfähigkeit nonviral transfizierter mMSC für gentherapeutische Applikationen geprüft und die Zellen mit murinem EPO transient und stabil transfiziert. Die biologische Aktivitätstestung erfolgte mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Hämatopoese-Bestimmungen.

4.4.4.1 Transiente Transfektion der mMSC mit dem pEPO-IRES2-EGFP Vektor

mMSC wurden mit dem für murines EPO kodierenden Vektor pEPO-IRES2-EGFP durch Nukleofektion transient transfiziert. 48 h nach Transfektion ergab die FACS-Analyse eine EGFP-Expression von 27% ± 5% (Abb. 24A). Die Langzeitexpression von EGFP nach 4, 7, 14 und 21 Tagen ergab eine kontinuierliche Reduktion der EGFP-Expression im Zeitverlauf. Nach 7 Tagen fanden sich nur noch 7% ± 2% EGFP-positive Zellen und nach 21 Tagen waren nur noch wenige EGFP-positive Zellen in der FACS-Analyse detektierbar (Abb. 24A).

Die Überstände von 1 x 10⁶ transfizierten Zellen wurden nach 2, 4 und 7 Tagen ohne zwischenzeitlichen Mediumwechsel abgenommen. Die akkumulierende EPO-Sekretion wurde im ELISA quantifiziert (Abb. 24B). Die Überstände enthielten 2 Tage nach der Transfektion 64,4 ng/ml ± 20,6 ng/ml EPO, nach 4 Tagen 92,2 ng/ml ± 19,0 ng/ml EPO und nach 7 Tagen 58,2 ng/ml ± 13,6 ng/ml EPO. Die Reduktion der EPO-Menge im Überstand nach 7 Tagen ist vermutlich auf die verminderte Plasmidtranskription und auf eine Halbwertszeit-assoziierte Proteindegradation von EPO im Überstand zurückzuführen. Um den Verlust der transienten EPO-Produktion im Zeitverlauf besser darzustellen, wurde ein Mediumwechsel 2 und 4 Tage nach Transfektion durchgeführt. Die Überstände wurden jeweilig nach 4 und 7 Tagen gesammelt. Im ELISA fanden sich 20,4 ng/ml ± 5,7 ng/ml EPO im Überstand nach 4 Tagen und 7,1 ng/ml ± 2,9 ng/ml EPO 7 Tage nach Transfektion (Abb. 24B). 21 Tage nach Transfektion waren nur noch sehr geringe Mengen EPO messbar. Mit pEGFP-N2 transfizierte mMSC dienten im ELISA als Kontrolle und produzierten kein EPO.

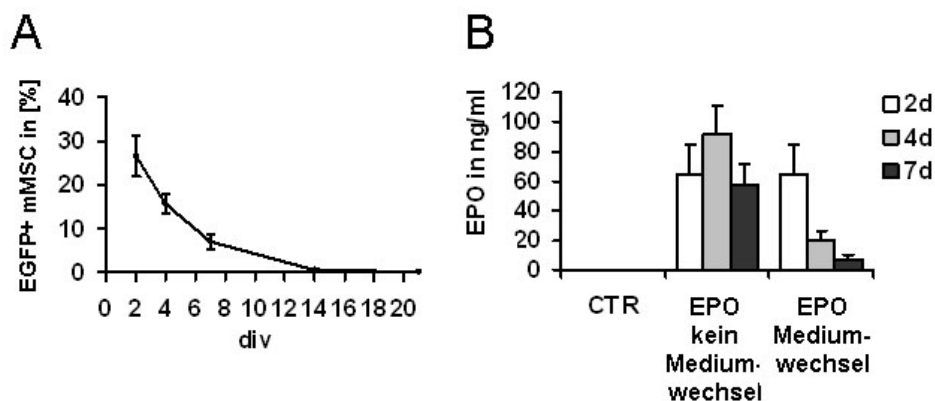


Abb. 24. A) Langzeit EGFP-Expression der mMSC nach Transfektion mit dem pEPO-IRES2-EGFP Vektor (n=3). B) Quantifizierung der EPO-Sekretion nach transienter Transfektion der mMSC mit und ohne Mediumwechsel (n=3).

4.4.4.2 Biologische Aktivität des von mMSC sezernierten EPO *in vitro*

Mit Hilfe eines CFU-E Ansatzes wurde die hämatopoetische Aktivität des von den mMSC sezernierten EPO überprüft. Frisch präpariertes Knochenmark von C57BL/6 Mäusen wurde in einem methylzellulosebasierten Medium ausgesät und entweder mit 15 ng/ml von mMSC synthetisiertem EPO oder mit kommerziell erhältlichem rhEPO (1,5 U/ml) als Positivkontrolle stimuliert. Kulturen ohne EPO-Behandlung dienten als Negativkontrolle. Knochenmarkszellen, die mit EPO-haltigem Medium von mMSC behandelt wurden, bildeten $408,5 \pm 49,9$ erythroide Cluster/200.000 Zellen und Zellen, die mit rhEPO stimuliert wurden, bildeten $393,5 \pm 29,3$ CFU-E/200.000 Zellen (Abb. 25A-D). Erythroide Cluster, bestehend aus 8-32 fusionierten Erythroblasten, konnten mit murinem EPO genauso gut generiert werden, wie nach rhEPO-Behandlung.

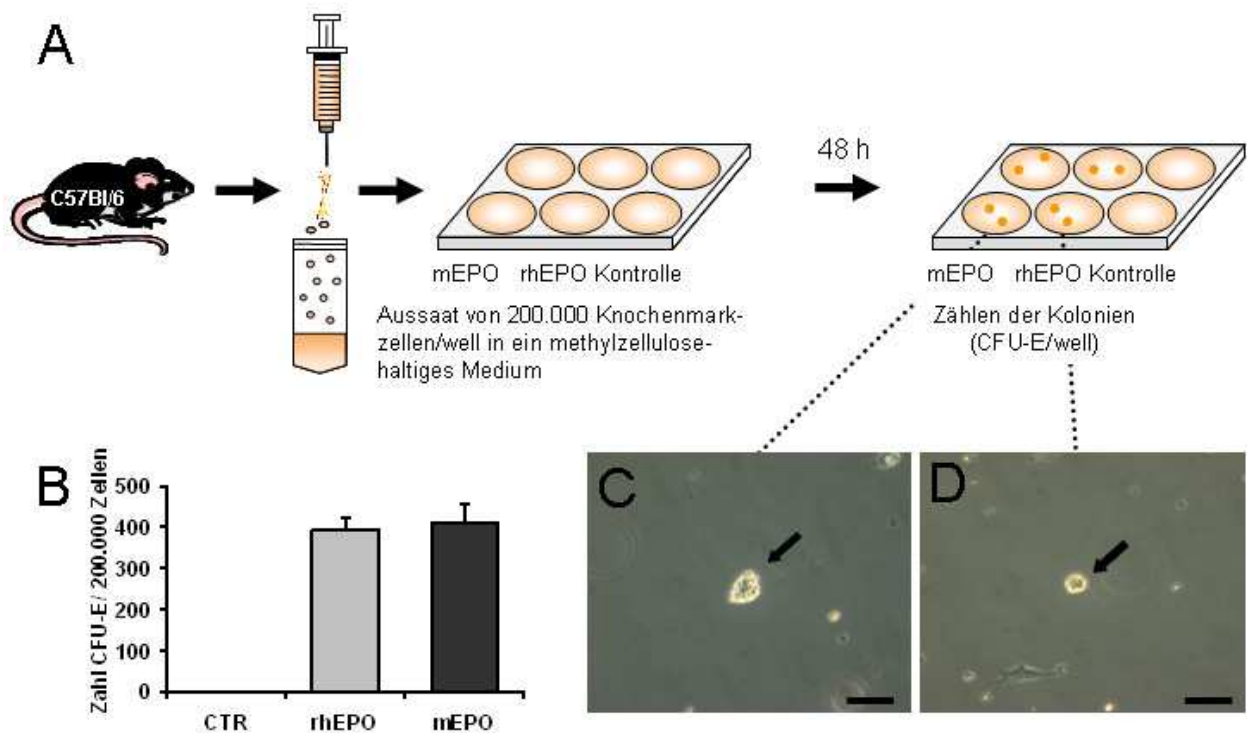


Abb. 25. Bestimmung der hämatopoetischen Aktivität des von mMSC produzierten EPO im CFU-E Ansatz. A) Schema der Versuchsdurchführung. B) Graphische Darstellung der gebildeten CFU-E nach Stimulation mit Kontrollmedium (CTR), rhEPO und des von mMSC synthetisierten EPO (n=3). Bildung von erythroiden Clustern nach Stimulation mit EPO aus mMSC (C) und rhEPO (D).

4.4.4.3 Stabile Transfektion der mMSC mit dem pEPO-IRES2-EGFP Vektor

Stabil EPO-sezernierende mMSC wurden in Analogie zum oben stehenden Protokoll nach Selektion mit 400 µg/ml Geneticin und sc-CFU generiert. Die EGFP-Expression der stabil transfizierten Zellen erreichte initial 80,1%. Für die Quantifizierung der EPO-Produktion *in vitro* wurden 100.000 stabil transfizierte Zellen in jedes well einer 6 well Platte mit 1 ml KZM ausgesät. Die Analyse der Zellkulturüberstände im ELISA ergab eine EPO-Produktion von 89,6 ng/ml ± 7,0 ng/ml EPO innerhalb von 24 h, 159,6 ng/ml ± 7,8 ng/ml EPO in 48 h und 211,7 ng/ml ± 5,5 ng/ml EPO in 72 h. Die Reevaluierung der EGFP-Fluoreszenz und EPO-Sekretion 4 Passagen später, ergab eine Reduktion der EGFP-Expression auf 43,9%, während die EPO-Sekretion stabil blieb. Die EPO-Produktion erreichte 81,6 ng/ml ± 7,5 ng/ml EPO in 24 h, 148,2 ng/ml ± 6,5 ng/ml EPO in 48 h und 191,8 ng/ml ± 10,2 ng/ml EPO innerhalb von 72 h (Abb. 26A-B).

In den durchgeführten Experimenten konnten keine Klone generiert werden, die für EGFP und EPO eine gleichbleibend hohe Expression zeigten. Meistens wurden zwar beide Gene von den jeweiligen Klonen exprimiert, jedoch wurde im Verlauf der Subkulturen wenigstens eines der Gene herunterreguliert.

Nach stabiler Transfektion der mMSC mit dem pEPO-IRES2-EGFP Plasmid zeigten die Zellen keine Veränderungen ihrer Proliferations- und Differenzierungseigenschaften. Die Plastizität der Zellen konnte für die adipogene und osteogene Differenzierungslinie nachgewiesen werden. Innerhalb von 4 Passagen vollführten die Zellen ~32 Zellverdopplungen bei stabiler Proliferationsgeschwindigkeit.

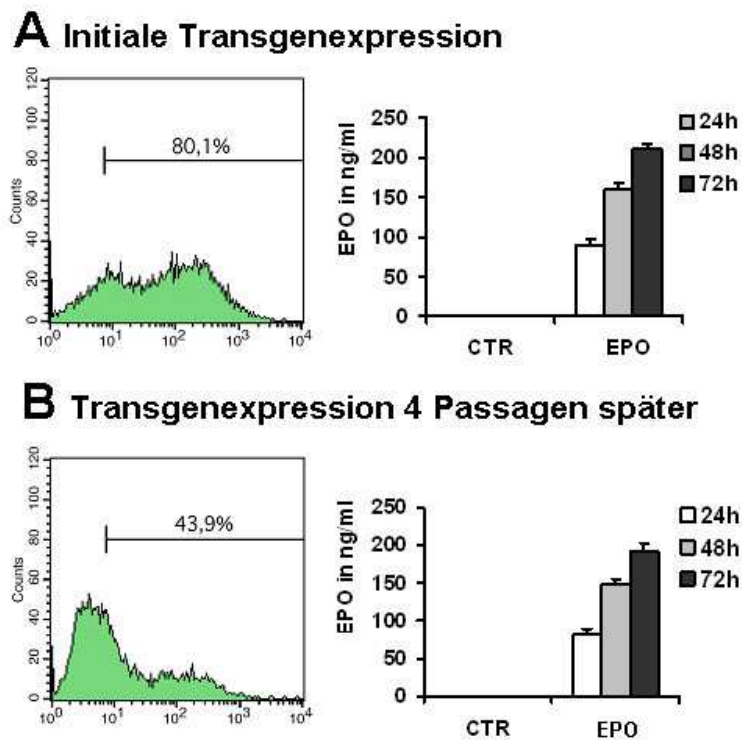


Abb. 26. Generierung stabil EPO-exprimierender mMSC nach Transfektion mit pEPO-IRES2-EGFP. A) Initiale EGFP- und EPO-Expression nach sc-CFU. B) Die Re-Analyse 4 Passagen später zeigt die Reduktion der EGFP-Expression auf 43,9%, während die EPO-Sekretion auf gleichem Niveau stabil bleibt (n=2).

4.4.4.4 Hämatopoetische Aktivität des von mMSC sezernierten EPO *in vivo*

Eine wesentliche Funktion von EPO im Organismus besteht in der Ausreifung erythroider Progenitorzellen in Proerythroblasten, die in weiteren Maturationsstufen zu reifen Erythrozyten ausdifferenzieren und den physiologischen Zellpool an roten Blutkörperchen rekonstituieren.

Zur Überprüfung der Hypothese, ob die durch Nukleofektion generierten stabil transfizierten mMSC auch *in vivo* ihr Transgen exprimieren und dieses eine biologische und somit hämatopoetische Aktivität aufweist, wurde folgendes Experiment durchgeführt: am Tag 0 wurden 20×10^6 stabil transfizierte mMSC und am Tag 2 und Tag 3 jeweils 10×10^6 stabil transfizierte mMSC in C57BL/6 Mäuse intraperitoneal transplantiert. Dabei erhielten die Tiere jeweils einen mMSC-Klon injiziert, der entweder stabil EPO/EGFP oder nur EGFP exprimierte. Um zu kontrollieren, dass mögliche biologische Phänomene tatsächlich durch murines EPO bedingt und nicht ein Nebeneffekt der mMSC selbst sind, wurde einer Kontrollgruppe am Tag 0, Tag 2 und Tag 3 PBS intraperitoneal appliziert. Am Tag 7 und Tag 35 nach Erstinjektion wurde

den Mäusen durch retroorbitale Punktion mit heparinisierten Mikrohämatokritkapillaren Blut abgenommen und aus diesem der Hämatokrit, der Hämoglobingehalt und der Serum-EPO-Spiegel bestimmt. Einige Mäuse wurden am Tag 35 perfundiert, die Organe entnommen und die mMSC durch anti-EGFP-Immunhistochemie nachgewiesen. Eine Übersicht über den Experimentablauf gibt Abb. 27.

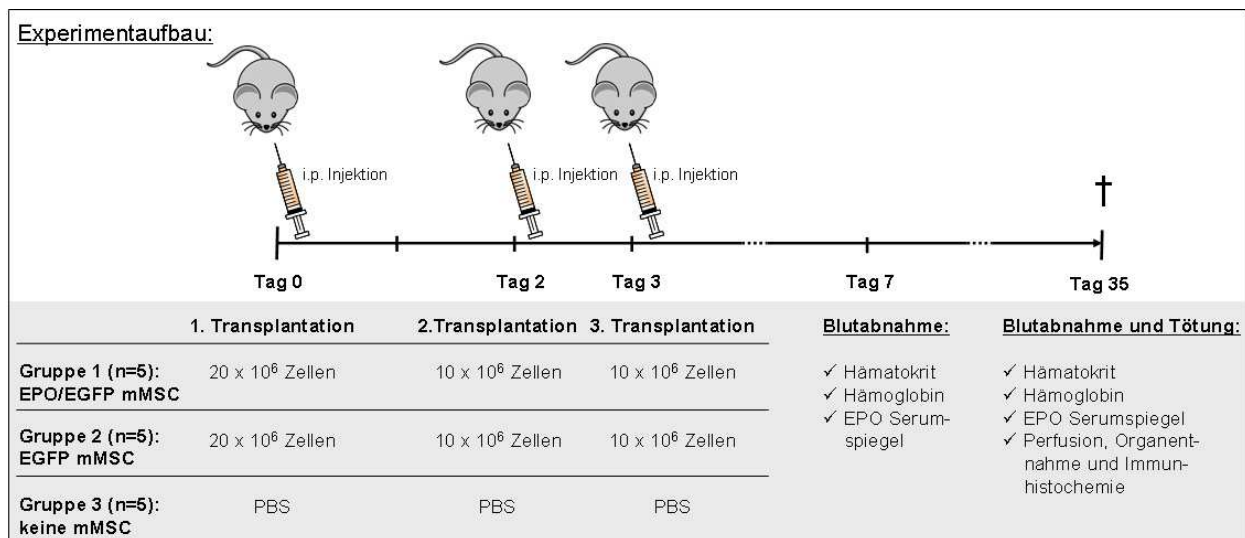


Abb. 27. Darstellung des Experimentaufbaus der intraperitonealen Injektion genetisch modifizierter mMSC.

Tiere, die mit stabil EPO/EGFP-produzierenden mMSC transplantiert wurden, zeigten nach 7 Tagen einen signifikanten Hämatokritanstieg auf 61,2% ± 2,8% im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Mäuse, die stabil EGFP-transfizierte mMSC erhielten, erreichten einen Hämatokrit von 46,4% ± 1,8%, während die PBS-injizierten Tiere einen Hämatokrit von 46,1% ± 1,9% aufwiesen (Abb. 28A). Korrespondierend hierzu stieg der Hämoglobinspiegel im Blut von 11,8 g/dl ± 0,2 g/dl in der EGFP-Gruppe und 11,5 g/dl ± 0,9 g/dl in der PBS-Gruppe, auf Werte von 13,8 g/dl ± 0,3 g/dl in der EPO/EGFP-Gruppe an (Abb. 28C). Gleichzeitig war ein Anstieg der EPO-Spiegel im Serum zu verzeichnen. Tiere, die mit EPO/EGFP-mMSC transplantiert wurden, zeigten einen Serumspiegel von 228,9 pg/ml ± 76,0 pg/ml, während die EGFP- und PBS-Gruppe Werte von 89,1 pg/ml ± 57,1 pg/ml und 119,7 pg/ml ± 21,5 pg/ml aufwiesen (Abb. 28E). Um die langfristige Expression und Sekretion biologisch relevanter EPO-Mengen durch stabil transfizierte mMSC zu überprüfen, wurde den Mäusen 35 Tage nach Erstinjektion erneut Blut abgenommen. EPO-mMSC-transplantierte Tiere wiesen zwar noch signifikant erhöhte Hämatokritwerte von 51,7% ± 3,8% versus 48,5 ± 1,7% in der EGFP-Gruppe und 46,8% ± 1,0% in der PBS-Gruppe auf (Abb. 28B), jedoch war ein

deutlicher Abfall der Hämatokritwerte in der EPO-mMSC-Gruppe zu verzeichnen. Parallel hierzu waren 35 Tage nach Erstinjektion keine signifikant erhöhten Hämoglobin- und EPO-Serumwerte zu beobachten. Die EPO-Gruppe zeigte Hämoglobinwerte von $12,7 \text{ g/dl} \pm 1,7 \text{ g/dl}$, die EGFP-Gruppe $11,5 \text{ g/dl} \pm 0,5 \text{ g/dl}$ und die PBS-Gruppe $11,7 \text{ g/dl} \pm 0,4 \text{ g/dl}$ (Abb. 28D). Analog hierzu waren auch die EPO-Serumspiegel auf die Ausgangswerte abgesunken. Der EPO-Serumspiegel in der EPO-Gruppe betrug $85,7 \text{ pg/ml} \pm 24,0 \text{ pg/ml}$, $101,3 \text{ pg/ml} \pm 11,9 \text{ pg/ml}$ in der EGFP-Gruppe und $94,3 \text{ pg/ml} \pm 9,2 \text{ pg/ml}$ in der PBS-Gruppe (Abb. 28F).

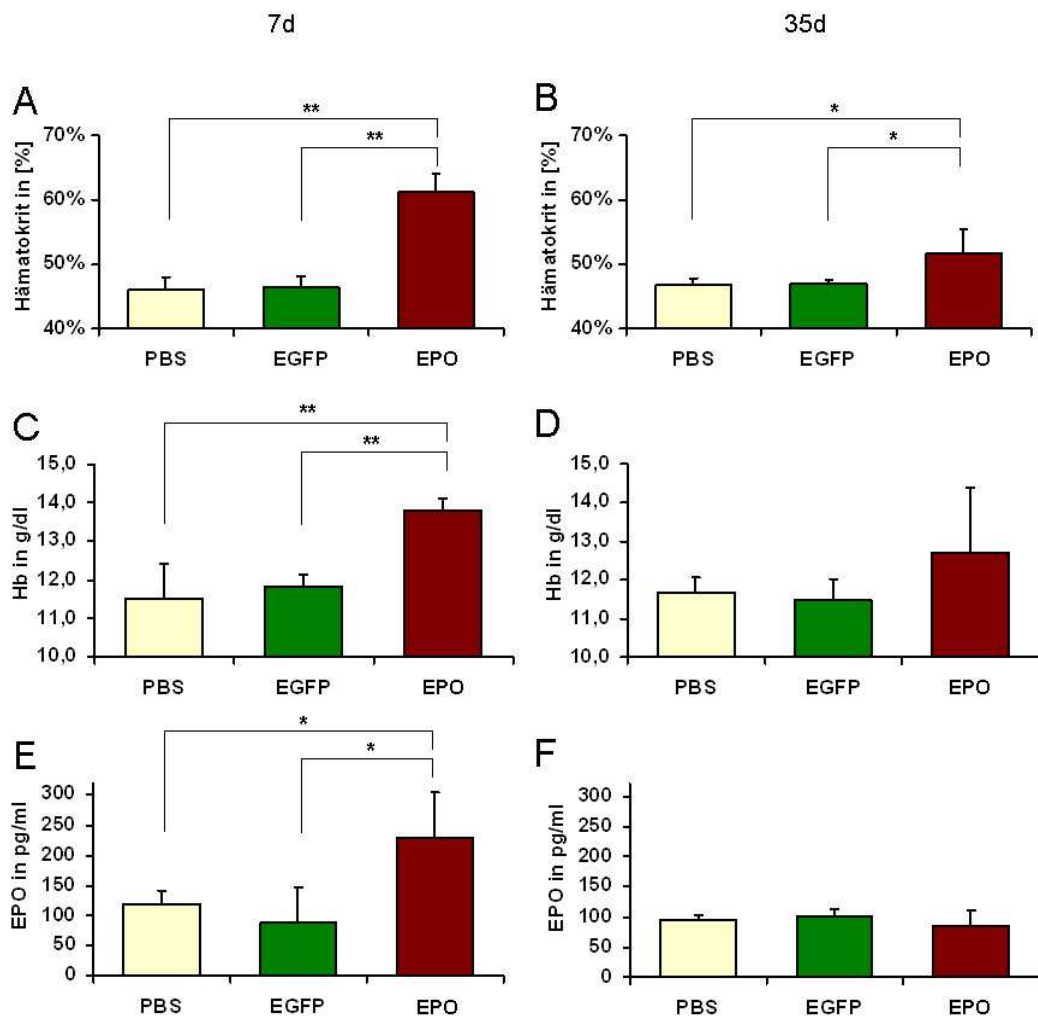


Abb. 28. Die repetitive intraperitoneale Injektion von stabil EPO/EGFP-transfizierten mMSC führt *in vivo* nach 7 Tagen zu signifikanten Anstiegen des Hämatokrits (A), der Hämoglobinwerte (C) und des EPO-Spiegels (E) im Blut. Nach 35 Tagen war der Hämatokrit noch leicht erhöht (B), während sich die Hämoglobin- und EPO-Serumspiegel bereits normalisiert haben (D und F). $n=5$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

35 Tage nach Erstinjektion der Zellen wurden einige Tiere perfundiert und die langfristige Transgenexpression der stabil EGFP-transfizierten mMSC *in vivo* mittels

Immunhistochemie gegen EGFP visualisiert. Die Zellen waren zum überwiegenden Teil in den Darm (Abb. 29A-B) und in die Leber (Abb. 29C-D) eingewandert. Im Darm fanden sich die Zellen zumeist im Zottenstroma und in der Leber im Leberparenchym verstreut. Vereinzelt konnten die Zellen auch in der Milz und in den abdominalen Lymphknoten nachgewiesen werden.

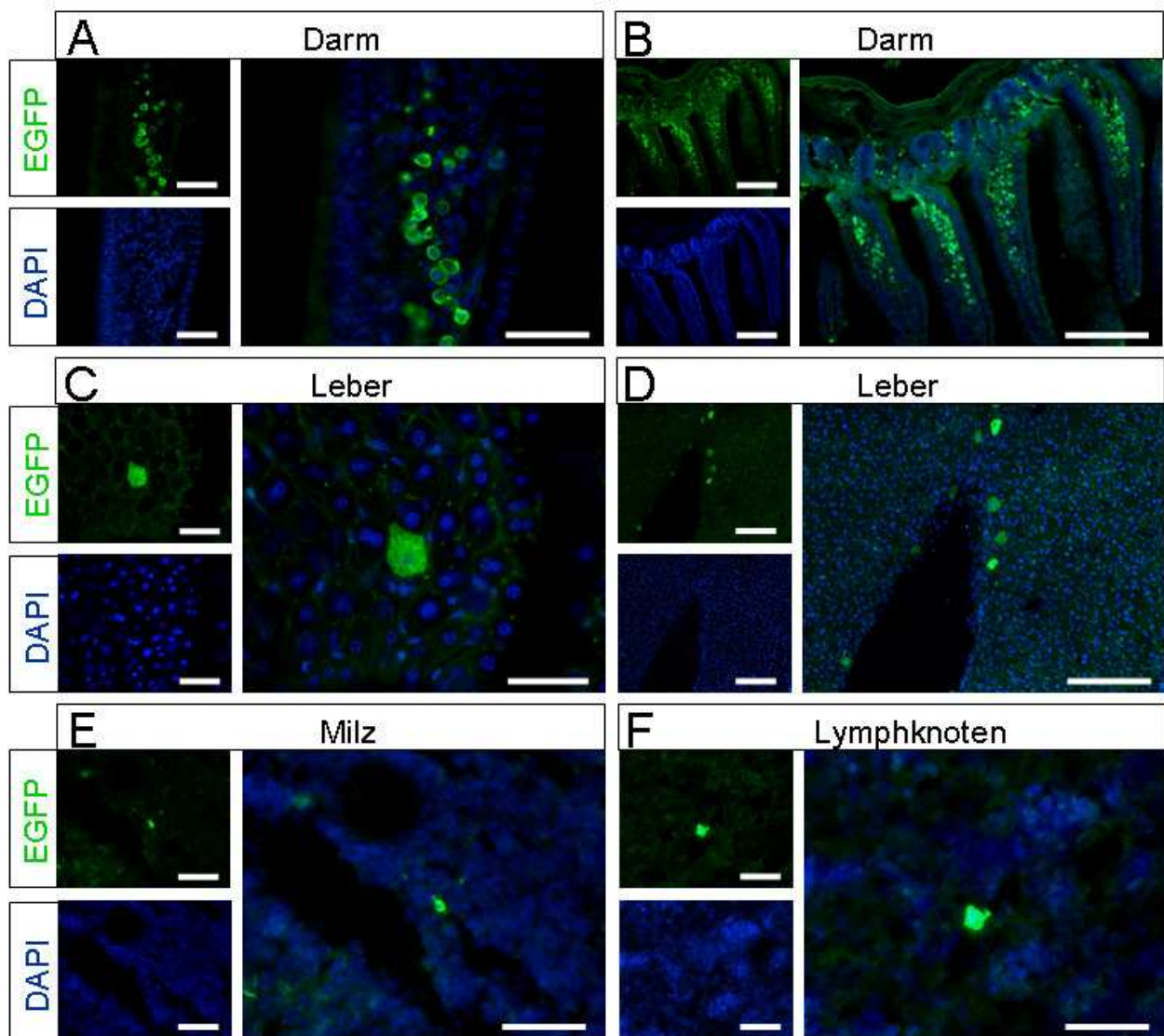


Abb. 29. Nachweis der stabil EGFP-transfizierten mMSC in den abdominalen Organen 35 Tage nach Erstinjektion der Zellen. Die Zellen wanderten zum großen Teil in den Darm (A-B), aber auch in die Leber (C-D) ein. Vereinzelt fanden sich Zellen in der Milz (E) und in Lymphknoten (F). A, E und F) 200X Vergrößerung; Skalierungsbalken 100 μm . B und D 100X Vergrößerung; Skalierungsbalken 200 μm . C) 400X Vergrößerung; Skalierungsbalken 50 μm .

5 DISKUSSION

MSC belegten in bisherigen Studien ein hohes regeneratives Potential in einer Vielzahl verschiedener Krankheitsmodelle. So konnten mehrere Arbeiten therapeutische Effekte der Zellen im experimentellen Tiermodell der zerebralen Ischämie (MCAo) nachweisen. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Zellkulturmodells für MSC aus dem Knochenmark der Maus, um deren regeneratives Potential im Schlaganfallmodell *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen. Hierbei galt es, mechanistische Aspekte der Neuroprotektion näher zu beleuchten. Die Eignung der Zellen für deren Einsatz in der Schlaganfalltherapie wurde dabei in einem präklinisch orientierten Ansatz geprüft. Dies ist von Bedeutung, da ein umfassendes Verständnis über die Biologie dieser Zellen die Grundlage für deren potentiellen Einsatz bei modernen zellbasierten Therapien oder auch möglichen gentherapeutischen Applikationen bildet. Bezüglich des letzteren Punktes wurden im zweiten Teil dieser Arbeit nonvirale Transfektionstechniken auf ihre potentielle Befähigung zur stabilen Transgenexpression *in vitro* und *in vivo* untersucht.

5.1 Isolierung und Charakterisierung muriner MSC

Ein Zellkulturmodell zur Isolation und Expansion von MSC aus dem Knochenmark der Maus erscheint bei grundlagenorientierten Fragestellungen aus mehreren Gründen vorteilhaft: Zum einen sind viele tierexperimentelle Krankheitsmodelle, aber auch transgene Tiere und Knockout-Stämme überwiegend im Mausmodell etabliert. Zum anderen gestattet das Vorhandensein von murinen MSC deren Verwendung zur syngen Transplantation in präklinischen tierexperimentellen Studien. Probleme der Xenotransplantation, wie HLA-Inkompatibilitäten oder immunologische Abstoßungsreaktionen in Empfängertieren können so umgangen werden. Aufgrund der bestehenden Schwierigkeiten bei der Isolierung von MSC aus Nagetieren verwenden einige Forscher immundefiziente SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäuse mit fehlender T- und B-Zellfunktion, um Abstoßungsreaktionen nach Transplantation von humanen Zellen zu verhindern. Bei der Verwendung von Xenotransplantationsmodellen dürfen jedoch elementare Aspekte der MSC-Biologie nicht übersehen werden. Da MSC selbst über immunmodulatorische beziehungsweise immundepressive Eigenschaften verfügen (Nauta und Fibbe et al. 2007), kann es unter

Xenotransplantationsbedingungen zu alterierten MSC-Interaktionen mit dem Immunsystem der Empfängertiere kommen. Da das Verhalten der Zellen maßgeblich durch Umwelteinflüsse moduliert wird, z.B. lokale Inflammationsreaktionen nach Verletzungen die Eigenschaften der Zellen beeinflussen (Cho et al. 2008), können Aussagen hinsichtlich des Überlebens oder Transdifferenzierungspotentials des Transplantats verzerrt werden (Wang et al. 2007; Grinnemo et al. 2004). Diese Erkenntnisse sind insbesondere bei grundlagenwissenschaftlich orientierten Fragestellungen relevant.

Andererseits können Xenotransplantationen mit humanen Zellen durchaus nützlich sein, wenn es darum geht, in präklinischen Studien die klinische Translationsfähigkeit von zellbasierten Therapiekonzepten in einem speziellen Krankheitsmodell zu evaluieren.

Für derartige Studien können humane MSC über einfache Plastikadhärenz aus menschlichen Knochenmarksaspiraten gewonnen werden. Im Gegensatz dazu erfordert die Isolierung von MSC aus dem Knochenmark von Nagetieren (Maus, Ratte) die Überwindung von technisch-methodischen Schwierigkeiten. Im vorliegenden Modell erfolgte die Isolierung von murinen MSC aus dem Knochenmark der Tibiae und Femures von C57BL/6 Mäusen. Erkenntnisse aus der Literatur gehen davon aus, dass altersabhängig die Vorkommensfrequenz der MSC im Knochenmark zwischen 10^4 und 2×10^6 liegt (Caplan et al. 2009). Die besondere Schwierigkeit bei der Isolierung der MSC liegt aber nicht nur in ihrer geringen Vorkommensfrequenz innerhalb des Knochenmarks. Es gibt ferner auch keinen MSC-spezifischen Marker, über den sich die Zellen gegebenenfalls über FACS oder MACS (Magnet-aktivierte Zellsortierung) isolieren ließen. Murine MSC werden daher analog zu humanen MSC durch ihre Eigenschaft der Plastikadhärenz gewonnen. Jedoch wird die MSC-Präparation aus heterogenen Knochenmarkmischkulturen von Nagetieren durch die Produktion von Extrazellulärmatrix und eine sehr starke Kontamination der Kulturen mit hämatopoetischen Vorläuferzellen erschwert. Diese können partiell adhären, überwuchern dabei bevorzugt mesenchymale Zellen und hemmen diese in ihrer Proliferation. Eine Reduktion der hämatopoetischen Zellpopulation wurde durch Spülen der Mischkulturen mit PBS, die Verwendung eines speziellen chargenselektierten Serums und die Aussaat der Zellen in sehr geringer Zelldichte über mehrere Passagen erreicht. Das hohe Proliferationspotential der MSC führte im Verlauf der Passagen zur Elimination von kontaminierenden hämatopoetischen Progenitoren.

Die in unserem Modell erreichten Zellexpansionsraten sind vergleichbar mit murinen MSC-Präparationen anderer Arbeitsgruppen (Peister et al. 2004a). In umfangreichen FACS-Analysen gelang der Nachweis, dass die MSC-Kulturen nicht durch Zellen der Hämatopoese verunreinigt waren. Stattdessen fand sich die Expression von Zelloberflächenepitopen, wie sie inzwischen von anderen Arbeitsgruppen für murine MSC beschrieben wurden. So exprimierten die Zellen die Marker Sca-1, CD29, CD44 und CD80 (Baddoo et al. 2003). Bei nachgewiesener adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierung konnten die mMSC in hohem Ausmaß in verschiedene Zelltypen der mesodermalen Entwicklungslinie differenzieren.

Das hohe Proliferationspotential der mMSC – bei fehlender Proliferationsverlangsamung beziehungsweise Wachstumsarrest nach über 27 Passagen (mit über 200 Zellverdopplungen) und bei einer Zellverdopplungszeit von nur ~1 Tag – ging mit numerischen Chromosomenaberrationen im MSC-Genom einher. Die im Verlauf der Subkultivierungen beobachtete Abnahme der Chromosomenzahl/Zelle (Passage 4: ~ 97 Chromosomen/Zelle, Passage 26: ~64 Chromosomen/Zelle) ist möglicherweise durch einen Selektionsvorteil von mMSC mit niedrigeren Chromosomenzahlen bedingt, da Zellen mit weniger DNA-Gehalt die identische Replikation der DNA während der S-Phase des Zellzyklus schneller absolvieren können.

Entsprechend den Entdeckungen von Hayflick und Moorhead (1961) können humane Zellen (Fibroblasten) ~50 Zellverdopplungen *in vitro* ausführen, bevor als Folge der natürlichen Seneszenz die Mitosefähigkeit der Zellen zum Erliegen kommt. Hierbei altern non-klonale Zellkulturen kontinuierlich und die Hayflick-Grenze wird durch die am längsten *in vitro* proliferierende Zelle determiniert. Wie lange Zellen die Fähigkeit zur Mitose behalten oder ob sie im Rahmen der Zellalterung einen Proliferationsarrest erleiden, um anschließend in Apoptose zu gehen, wird unter anderem durch die Telomerlänge und Telomeraseaktivität in jeder Körperzelle bestimmt (Rubin et al. 2002). Ausnahmen von der Hayflick-Regel bilden immortalisierte Tumorzellen oder Stammzellen. Letztere können in der Regel im Organismus mehr als ~1000 Zellverdopplungen vollführen, ohne morphologische Zeichen der Zellalterung. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das expansive Proliferationsvermögen der hier verwendeten mMSC als Teil ihres Stammzellcharakters zu interpretieren ist.

Arbeiten von Levan und Biesele (1958) konnten aber auch zeigen, dass artifizielle Zellkulturbedingungen in murinen Zellen zu chromosomalen Instabilitäten führen.

Infolge der besonderen Vulnerabilität des Maus-Chromatins finden sich bereits in den ersten Passagen nach *ex vivo* Kultivierung heteroploide Chromosomenanomalien. Dieses Phänomen wurde auch unter dem Terminus „*Multistage Carcinogenesis*“ zusammengefasst (Rubin et al. 2001). In Analogie hierzu zeigen murine MSC in der Regel unabhängig vom verwendeten Mausstamm numerische Chromosomenaberrationen *in vitro*. Nach *in vivo* Transplantation dieser Zellen bildeten sich Tumoren – überwiegend Sarkome – als Ausdruck der malignen Transformation der Zellen (Tolar et al. 2007). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass in murinen MSC die chromosomalen Abnormalitäten mit einer erhöhten Telomeraseaktivität und einer erhöhten c-myc Expression vergesellschaftet sind (Miura et al. 2006). Im Vergleich hierzu charakterisieren sich humane MSC typischerweise durch einen diploiden Chromosomensatz.

In Ergänzung zu diesen Daten wurden in Chromosomenpräparationen aus frisch präpariertem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen, Zellen mit numerischen Chromosomenaberrationen gefunden (hier: Schwankungen der Chromosomenzahl/Zelle zwischen 36 und 76). Bekanntermaßen haben im Knochenmark von Mensch und Maus Megakaryozyten einen polyploiden Chromosomensatz (Jackson et al. 1990). Dieser entsteht durch Endomitose, die die Zellteilung in der späten Anaphase ohne nukleäre oder zytoplasmatische Teilung beendet. Auch andere eukaryote Zellen, wie Hepatozyten oder Endothelzellen haben unter physiologischen Bedingungen polypleide Chromosomensätze (Geddis und Kaushansky et al. 2004), ohne dass hiermit eine maligne Transformation der Zellen einhergeht. In diesem Kontext bleibt unklar, ob die hier isolierten murinen MSC aus dem Knochenmark bereits *in vivo* numerische Chromosomenaberrationen aufweisen oder ob diese erst als Folge von artifiziellen Kulturbedingungen *in vitro* entstanden sind. Ersteres kann bei fehlendem Marker für MSC schwer *in vivo* überprüft werden. Für die Bedeutung des Letzteren spricht die bekannte Vulnerabilität muriner DNA *in vitro*. In wie weit die Heteroploidie der hier verwendeten mMSC auch mit einem potentiell onkogenen Potential einhergeht, ist Gegenstand weiterer Studien.

5.2 Neuroprotektion durch MSC

In der Literatur finden sich in verschiedensten akuten und chronischen Schadensmodellen Hinweise auf zytoprotektive und regenerative Eigenschaften von MSC *in vitro* und *in vivo*. Vor diesem Hintergrund war es ein Ziel dieser Arbeit, dass

neuroprotektive Potential der MSC im Zellkultur- und Tiermodell des Schlaganfalls zu untersuchen.

Im *in vitro* Modell der zerebralen Ischämie – der OGD – konnten durch einen Transwell-Kokulturansatz ~35-40% der Neurone nach 48 h Kokultivierung mit humanen oder murinen MSC vor dem Zelltod bewahrt werden. In analogen Präkonditionierungsexperimenten induzierte die Behandlung von Neuronen mit hMSC- und mMSC-konditioniertem Medium 48 h vor OGD äquivalente anti-apoptotische Effekte. Durch Sezernierung löslicher Faktoren vermittelten MSC über einen parakrinen Mechanismus ihre neuroprotektiven Eigenschaften. Ein direkter Zell- Zellkontakt zwischen Neuronen und MSC war hierfür nicht notwendig. In Kontrolleexperimenten, in denen Neurone mit neuronalen Stammzellen (NSC) kokultiviert wurden, konnten Neurone nicht vor dem Zelltod geschützt werden. Diese Daten legen nahe, dass es sich bei den neuroprotektiven Eigenschaften von MSC um einen zellspezifischen Effekt handelt. Unterstützend hierbei wirkt, dass sowohl humane als auch murine MSC speziesunabhängig Neurone vor dem Zelltod im OGD-Modell retten konnten.

Sowohl bei Präkonditionierung 30 min vor OGD als auch nach Zugabe von MSC-konditioniertem Medium nach OGD fand sich eine signifikante Neuroprotektion. Diese Daten suggerieren, dass die Überstände der MSC Faktoren enthalten, die vor und nach dem Schadensereignis Zelltodkaskaden inhibieren können.

Die hier erhobenen Ergebnisse stehen in Einklang mit Daten anderer Arbeitsgruppen, in denen beispielsweise Astrozyten oder Oligodendrozyten nach Kokultivierung mit *Bone Marrow Stromal Cells* (BMSC) im OGD-Modell dem Zelltod entgehen konnten (Gao et al. 2008; Zhang et al. 2008). Andere Studien zeigten, dass durch direkte Kokultivierung mit Zell- Zellkontakten von MSC und UV-bestrahlten Fibroblasten, Letztere vor Apoptose geschützt werden konnten (Block et al. 2009). Allerdings erwies sich in diesem Modell die Zugabe von MSC-konditioniertem Medium als nicht anti-apoptotisch wirksam. Ursächlich hierfür war eine notwendige Aktivierung der MSC durch direkten Zellkontakt mit den geschädigten Fibroblasten. Nur dadurch ließ sich eine Veränderung des transkriptionalen Expressionsprofils der MSC und die Synthese von protektiven Faktoren induzieren (Block et al. 2009). Bei den von mir vorgestellten Daten spielten direkte Zell- Zellkontakte jedoch keine Rolle. Im Gegenteil, durch direkte Kokultur von Neuronen mit MSC ließen sich stattdessen toxische Effekte der MSC (selbst bei sehr geringen Zellzahlen) beobachten (Daten nicht gezeigt). Die hier beobachtete Neuroprotektion ist somit auf einen rein parakrinen Wirkmechanismus zurückzuführen.

In einer anderen Publikation wirkten Überstände mit MSC-konditioniertem Medium nicht neuroprotektiv, sondern nach ischämischer Schädigung neurotoxisch (Horn et al. 2009). In dieser Arbeit wurden organotypische hippocampale *Slice*-Kulturen im OGD-Modell mit MSC-konditioniertem Medium behandelt. Die Überstände der MSC wurden jedoch nativ oder in 1:2 Verdünnung eingesetzt (Horn et al. 2009). In unseren Experimenten erwiesen sich MSC-Überstände im Konzentrationsbereich von 0,1%-5% als neuroprotektiv, während MSC-konditioniertes Medium in Verdünnungen ab ca. 1:10 (und geringer) ebenfalls neurotoxisch wirkte (Daten nicht gezeigt). Die diskrepanten Befunde dieser Studie lassen sich somit über eine einfache Dosis-Wirkungsbeziehung erklären. Bei Durchführung der Experimente außerhalb des pharmakologischen wirksamen Fensters kann das neuroprotektive Potential der MSC-Überstände nicht detektiert werden.

Bisher beschäftigten sich einige Arbeiten mit der Identifizierung der von MSC sezernierten Faktoren. Dieses Wissen ist von elementarer Bedeutung, um die Mechanismen zu verstehen, über die MSC ihre zyto- und neuroprotektiven Eigenschaften, aber auch ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten und ihr Potential in der Angiogenese entfalten. Methodisch wurden auf Proteinebene Sekretomanalysen mittels Massenspektrometrie oder Proteinarrays angewandt. Eine Sekretomstudie aus humanen MSC des Fettgewebes entdeckte interessante Kandidaten, u.a. anti-inflammatorische Moleküle (z.B. *Follistatin-like 1*, *Pentraxin related gene*), aber auch Antioxidantien (z.B. Gluthation S-Transferase P, Peroxiredoxin 6, Thioredoxin etc.) (Chiellini et al. 2008). Weiterführende Proteomstudien identifizierten eine Vielzahl weiterer Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, über die sich die protektiven Effekte der MSC erklären ließen. Tabelle 4 gibt hierüber einen Überblick ohne Anspruch auf Vollständigkeit.

<i>Angiogenic factor</i>	Flt-3 Ligand	IGFBP-1	IL-7	OSM
Follistatin	GCP	IGFBP-2	IL-7R	PARC
BMP-4	G-CSF	IGFBP-3	IL-8	PDGF-R
EGF-R	GM-CSF	IGFBP-4	IL-11	PIGF
ENA78	GRO	IGFBP-6	IL-12	SCF
bFGF	LIF	IL-1	IL-12p40	NT-4
FGF-4	M-CSF	IL-1 β	IL-14	SDF-1
FGF-6	MCP-1	IL-3	IL-15	TNF α -I/IIIR
FGF-7	MIP-3	IL-4	IL-17	TGF- β -I/IIIR
FGF-9	LIF-1	IL-6	IFN- γ R	VEGF
FGF-R	MIF	IL-6R	IP-10	VEGF-D
HGF	Osteoprotegerin	IL-2R α	TIMP-1	ICAM-3
BTC	FAS	Lymphotaktin	TIMP-2	TRAIL R3
Angiopoietin-2	GIT-R	MIP-1 α	Oncostatin M	TRAIL R4
Transferrinrezeptor	uPAR	MIP-1 β		
TGF- β 2		MIP-3 β		
TGF- β 3				

Tabelle 4. Zusammenfassung der in proteinbiochemischen Analysen identifizierten Faktoren des MSC-Sekretoms (modifiziert nach Park et al. 2007; Wagner et al. 2007; Schinkothe et al. 2008).

In den einzelnen Analysen ergaben sich bei diesen nicht- oder semiquantitativen Verfahren jedoch teils erheblich diskrepante Befunde. Eine Studie konnte zeigen, dass unterschiedliche Isolierungs- und Kultivierungsbedingungen der verwendeten MSC, aber auch die variable Herkunft von MSC aus verschiedenen Spezies und Geweben teils zu erheblichen Schwankungen im Sekretionsprofil der MSC führte (Wagner et al. 2007).

Aus diesen qualitativen Analysen von biologisch komplexen MSC-Zellkulturüberständen, lassen sich somit keine Aussagen ableiten, ob die identifizierten Faktoren auch in ausreichender Menge produziert werden, um zytoprotektive Effekte zu vermitteln. Ziel weiterführender proteinbiochemischer Untersuchungen ist es, das Sekretom der von mir verwendeten MSC näher zu analysieren, um die beobachteten neuroprotektiven Eigenschaften der MSC besser verstehen zu können.

In dem hier vorliegenden Schadensmodell wirkten MSC über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer anti-apoptotischer Signalkaskaden zytoprotektiv. Trotz Unkenntnis der neuroprotektiv wirksamen Faktoren ließ sich in den Neuronenkulturen eine Hochregulation der Phosphorylierung von STAT3 am Tyrosinrest 705 und von AKT am Threoninrest 308 nachweisen. Eine Beteiligung der p42/44 MAPK-Kaskade fand sich hingegen nicht. In einer Arbeit, in der humane Aortenendothelzellen durch Zugabe von MSC-konditioniertem Medium vor Hypoxie-induziertem apoptotischen Zelltod

geschützt werden konnten, fand sich ebenfalls eine Hochregulation der Phosphorylierung von PI3K-Akt und STAT-3 (Hung et al. 2007). In dem in dieser Studie verwendeten konditionierten Medium ließen sich nach ELISA-Quantifizierung relevante Spiegel von VEGF, MCP-1 und IL-6 detektieren. Allerdings wurde in Blockierungsexperimenten gezeigt, dass diese Faktoren nicht an der Verhinderung des apoptotischen Zelltodes in den Endothelzellen beteiligt waren. Ferner fand sich in den Kulturen nach Behandlung mit MSC-konditioniertem Medium eine Hochregulation der p-ERK Signalkaskade, die jedoch in Inhibitorexperimenten nicht zur Reduktion des apoptotischen Zelltodes beitragen konnte (Hung et al. 2007). In einem OGD-Schadensmodell mit Oliodendrozyten konnten die Zellen ebenfalls durch Aktivierung von pAkt und Herunterregulation von p75 vor Apoptose geschützt werden (Zhang et al. 2008). Unsere Daten und die Ergebnisse dieser anderen Studien legen nahe, dass die MSC-vermittelten anti-apoptotischen Effekte auf die Aktivierung der pSTAT3 und pAKT-Signalkaskaden zurückzuführen ist. Bei vermutlich multifaktoriell bedingtem Schutz kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch andere unbekannte Signalwege, rezeptorabhängig oder -unabhängig aktiviert werden, zur Expression von anti-apoptotischen Genen in den Neuronen beitragen und die Zellen somit vor dem Ischämie-induzierten Zelltod schützen.

Im *in vivo* Schlaganfallmodell der MCAo konnte in einem klinisch translational geprägten Ansatz nach intravenöser Transplantation von humanen MSC, die *in vitro* beobachtete Neuroprotektion durch MSC nicht bestätigt werden. Im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe hatten die mit hMSC behandelten MCAo-Mäuse gleich große Schlaganfallvolumina im MRT und keine Verbesserung funktioneller Defizite im orientierenden Verhaltenstest. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu bisher publizierten Daten, in denen die Transplantation von hMSC in Ratten kurz nach MCAo zu einem verbesserten Abschneiden der Tiere in Verhaltenstests und zu geringeren Hirninfarktgrößen führte (Li et al. 2005; Honma et al. 2006). Selbst bei intravenöser MSC Transplantation 7 Tage nach MCAo waren im Rattenmodell die gleichen positiven MSC-vermittelten Effekte nachweisbar (Chen et al. 2001). Die beobachteten protektiven Eigenschaften der MSC wurden mit den folgenden Beobachtungen erklärt: Initial gab es Indizien, dass MSC nach Transplantation im Hirngewebe in Nerven- und Gliazellen ausdifferenzieren, durch Transdifferenzierung untergegangenes neuronales Gewebe ersetzen und darüber zur Gewebsrestauration beitragen können (Nagai et al. 2007).

Inzwischen werden die protektiven Eigenschaften eher auf anti-apoptotische und anti-inflammatorische Effekte der MSC zurückgeführt. MSC reduzieren nach Schlaganfall die Zahl der durch Apoptose untergehenden Neurone und die Zahl der einwandernden Mikroglia (Kim et al. 2008). Zusätzlich vermindern MSC die Dicke der Glianarbe (Li et al. 2005), fördern die Angiogenese (Hanabusa et al. 2005; Chen et al. 2003b) und stimulieren die Proliferation, Migration und Differenzierung endogener neuraler Zellen im Schlaganfallkontext (Li et al. 2002). Weiterführende Studien zeigten, dass nach intrazerebraler Transplantation von hMSC in den Hippokampus immundefizienter Mäuse, diese endogene Zellen zur Produktion von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren (VEGF, CNTF, NT4/5, NGF) stimulierten (Munoz et al. 2005). Die damit verbundene intensivierete endogene Neurogenese und Gewebsreparatur wurde dabei durch trophische Faktoren der MSC vermittelt. Diese Daten unterstreichen, dass parakrine Mechanismen einen großen Anteil am regenerativen Potential der MSC ausmachen.

Verschiedene Ursachen kommen für die Diskrepanz zwischen den Literaturdaten und den Ergebnissen dieser Studie in Frage: 1) Die Daten über das regenerative Potential von MSC wurden für das Schlaganfallmodell fast ausschließlich an Ratten erhoben. Daten für das Mausmodell der MCAo sind kaum verfügbar. In einer Studie, in der murine BMSC über eine Stickstoffmonoxid-Donor-abhängige (DETA-NONOate) Hochregulation von SDF-1/CXCR4 in das Gehirn von MCAo-Mäusen migrieren sollten, fand sich in den Ischämietieren mit reiner BMSC-Behandlung ebenfalls keine Verbesserung der klinischen Verhaltensparameter (Cui et al. 2007). Die Diskrepanz dieser Befunde könnte durch neuroanatomische und pathophysiologische Unterschiede zwischen beiden Nagetierspezies bedingt sein. Die intrinsische Regenerationskapazität nach Schlaganfall ist bei Mäusen stärker ausgeprägt, wodurch potentiell gewebsschutz Effekte der MSC abgeschwächt werden können. 2) Supportive Effekte von MSC traten auf, sobald MSC direkt ins Hirnparenchym transplantiert wurden (Ohtaki et al. 2008; Nagai et al. 2007) oder MSC nach peripherer Applikation verstärkt ins ZNS migrierten (Cui et al. 2007). Die Applikationsroute der MSC (systemische versus periphere Administration) spielt somit für den Therapieerfolg eine entscheidende Rolle. In der hier vorliegenden Studie wurde das Einwandern von MSC ins Gehirn jedoch nicht beobachtet. 3) Unter der Annahme, dass ein Großteil der MSC-spezifischen Effekte auf parakrinen Mechanismen beruht, können bei räumlicher

Trennung zwischen MSC und Läsionsort parakrine Mechanismen durch Faktordilution nicht mehr wirksam werden.

Trotz der hier erhobenen negativen *in vivo* Ergebnisse werden MSC heute als interessante Kandidaten für zellbasierte regenerative Therapieansätze betrachtet. Die endogen gewebsschutzenden Eigenschaften der MSC, ihre leichte Isolierbarkeit, ihr hohes Expansionspotential *in vitro*, ihre geringe Immunogenität und die Möglichkeit zur genetischen Modifikation unterstreichen die Attraktivität dieses Zelltyps.

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass sich das regenerative Potential von genetisch modifizierten MSC durch Einschleusung biologisch wirksamer Proteine, wie beispielsweise die Wachstumsfaktoren BDNF, CNTF, NGF im Schlaganfallkontext noch weiter erhöhen lässt (Horita et al. 2006; Nomura et al. 2005; Kurozumi et al. 2005).

5.3 Genetische Modifikation von mMSC

Die genetische Modifikation von MSC bedarf effizienter Methoden des Gentransfers, wofür virale und nonvirale Techniken zur Verfügung stehen.

In der hier durchgeführten Studie wurde schwerpunktmäßig die Eignung nonviraler Transfektionsmethoden hinsichtlich der stabilen Transgenexpression *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es wurde geprüft, ob diese Techniken eine Alternative zur viralen Transduktion darstellen können. Hierbei zeigten sich nonvirale Verfahren für den transienten und stabilen Gentransfer in mMSC *in vitro* geeignet. Im direkten Vergleich von drei verschiedenen Methoden – Nukleofektion, Lipofektion und Magnetofektion – erwies sich die Nukleofektion als die Effektivste mit Transfektionsraten von über 60%. Äquivalente Daten wurden von anderen Arbeitsgruppen erhoben, in denen MSC des Menschen, der Ratte, des Rinds oder des Schweins mittels Nukleofektion transfiziert wurden (McMahon et al. 2006; Colleoni et al. 2005; Aslan et al. 2006; Ferreira et al. 2008).

Die hohen Transfektionsraten bei der Nukleofektion gingen allerdings auf Kosten der Zellviabilität. Die Methode erwies sich als sehr toxisch mit Zellüberlebensraten von ~36%. Jedoch sind diese Beobachtungen in Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, in denen MSC anderer Spezies (Aluigi et al. 2006; Peister et al. 2004b), MSC anderer Gewebe (Zaragosi et al. 2007) oder andere Zelltypen (von Levetzow et al. 2006) transfiziert wurden. Die Toxizität der Nukleofektion liegt in ihrer Funktionsweise begründet. Durch das Nukleofektorgerät wird ein Stromimpuls erzeugt, der zelluläre Membranen und damit die zelluläre Integrität beschädigt. Hieraus

resultieren das niedrige Zellüberleben und die damit verbundene Reduktion der Transfektionseffizienz. Jedoch werden die überlebenden Zellen nicht beeinträchtigt, sobald der Zelldebris durch einen Mediumwechsel nach Transfektion entfernt wird.

Die transiente Genexpression in Zellen ist zur Beantwortung vieler Fragestellungen ausreichend, selbst bei bestimmten *in vivo* Applikationen, bei denen nur eine kurzfristige Transgenexpression gewünscht ist. So wurden beispielsweise MSC des Fettgewebes über Nukleofektion mit BMP-6 und EGFP transient transfiziert und in die paravertebrale Muskulatur von immundefizienten Mäusen injiziert. Die Zellen induzierten im Vergleich zu untransfizierten Zellen die Bildung einer Knochenmatrix mit Wirbelkörperperfusion als Ausdruck einer „biologischen Spondylodese“ (Sheyn et al. 2008). Für viele präklinische *in vivo* Fragestellungen ist jedoch die langfristige Transgenexpression in einem zellulären Vektor von Relevanz. In bisherigen Untersuchungen wurde die Eignung nonviraler Transfektionsmethoden zur stabilen Transgenexpression in MSC nur unzureichend geprüft. Limitierend hierbei ist die extreme Seltenheit der stabilen Integration des Transgens in das Genom. Zur Überwindung dieses Hindernisses bedarf es eines sehr hohen Selektionsdruckes durch ein Antibiotikum (z.B. G418-disulfat). In den hier durchgeführten Experimenten überlebten nach transients Transfektion und Selektionierung mit Geneticin aber auch viele untransfizierte Zellen und proliferierten. Im Vergleich hierzu starben untransfizierte Kontrollkulturen bereits unter einer Geneticindosis von 20 µg/ml vollständig ab. Normalerweise wird die Antibiotikaresistenz nur nach Transgenintegration erreicht und diese Zellen wachsen dann als vereinzelt Kolonien in den Kulturschalen hoch. Möglicherweise kam es in unseren Experimenten zu einer Art „*Bystander-Effekt*“, bei dem transfizierte Zellen mit Neomycinresistenz untransfizierte Zellen in Kokultur schützen können. Über welchen Mechanismus dies konkret funktioniert, ist aktuell unklar. Bekannt ist, dass z.B. humane MSC ganze Mitochondrien über zytoplasmatische Ausläufer oder auch direkten Zellkontakt mit anderen Zellen austauschen können. So konnten über diesen Weg somatische Zellen mit defekten Mitochondrien wieder aerobe Stoffwechselwege bestreiten und vor dem Zelluntergang geschützt werden (Spees et al. 2006).

Die massiven *in vitro* Manipulationen durch Transfektion, Selektionierung oder Transgenexpression führten nicht zu wesentlichen Veränderungen zellulärer Funktionen der MSC. Sowohl die Proliferationskapazität der stabil transfizierten mMSC, als auch ihr Differenzierungspotential in Osteoblasten und Adipozyten war im Vergleich zu

untransfizierten Zellen unverändert. Des Weiteren ließ sich nach Differenzierung in den Klonen nach wie vor die Expression des Reportergens nachweisen. Dies ist von biologischer Relevanz, da insbesondere nach Differenzierungsprozessen in Stammzellen eine verminderte Transgenexpression beobachtet wird (Laker et al. 1998). Differenzierte Zellen exprimieren deutlich weniger Gene als Stammzellen – bedingt durch hochkomplexe Veränderungen des zellulären Genexpressionsprofils mit permanentem An- und Abschalten von Genen (Sasaki und Matsui et al. 2008). Diese Reduktion der Genaktivität mit Stilllegung ganzer Genabschnitte kann nach Differenzierung in Stammzellen zum Verlust der Transgenexpression führen.

Nach unserem Protokoll integrierten ca. 1 aus $1,8 \times 10^3$ Zellen nach Nukleofektion das Transgen in ihr Genom. In Studien, in denen embryonale Stammzellen mittels Nukleofektion stabil transfiziert wurden, erfolgte die stabile Integration ins Genom nur in 1 von 10^4 Zellen (Hohenstein et al. 2008). In unserem Modell wurde somit eine um den Faktor ~ 5 höhere Effizienz erreicht.

Bei dem hier verwendeten Verfahren der stabilen Transgenexpression zeigten sich jedoch zwischen den einzelnen Klonen Variabilitäten sowohl hinsichtlich der Stärke der Transgenexpression, als auch der Zahl der transgenexprimierenden Zellen zwischen den einzelnen Klonen. Bei einigen Klonen kam es im Verlauf mehrerer Passagen zur Reduktion der Transgenexpression.

Die Ursachen hierfür können vielfältiger Natur sein: Bei zufällig ins zelluläre Genom integrierenden Vektoren sind hohe Raten von „*Gene Silencing*“ und eine variable Transgenexpression bekannt, sei es nach viraler Transduktion oder nonviraler Transfektion (Ellis et al. 2005; Cherry et al. 2000; Liew et al. 2007). Das *Silencing* der integrierten Expressionskassetten kann durch methylierungsabhängige- und unabhängige Mechanismen, Histonmodifikationen oder andere epigenetische Phänomene bedingt sein (Yao et al. 2004). Neben dem Integrationsloкус selbst und dessen transkriptioneller Aktivität, wird die Transgenexpression auch durch die Zahl der ins Genom eingebauten Transgenkopien beeinflusst. Durch mehrfache Integration ins Genom kann ein partielles „*Gene Silencing*“ verdeckt werden (Jakobsson et al. 2004).

Variable Transgenexpressionen finden sich bevorzugt bei Transgenintegration in nahe gelegenes Heterochromatin. Aber auch negativ transkriptionale (regulatorische) Effekte durch umgebende Gene spielen eine Rolle (Burgess-Beusse et al. 2002). Des Weiteren können nukleäre Proteine, die Fremd-DNA erkennen, Transgene an bestimmten

Integrationsstellen ausschalten (Ross et al. 2009). Aber auch die zur Genexpression verwendeten Promotoren können für *Silencing*-Phänomene verantwortlich sein. Beim CAG Promoter ist beispielsweise eine stark variierende Transgenexpression bekannt (Liew et al. 2007). In einer anderen Studie wurden Embryonale Stammzellen mit einem β -Aktin-Promoter tragenden Plasmid stabil transfiziert, bei dem die Transgenexpression selbst unter Differenzierungsbedingungen lange Zeit auf hohem Niveau stabil blieb (Costa et al. 2005). Dies verdeutlicht, dass der verwendete Promoter nicht allein über die Persistenz der Transgenexpression entscheidet. Eine variable Transgenexpression zwischen einzelnen Klonen kann sich aber je nach Fragestellung auch als vorteilhaft erweisen. So erlaubt es neben der Auswahl von Klonen mit dem höchsten Transgenexpressionsniveau, auch die Auswahl von Klonen mit definierter Transgenproduktion.

Um die Problematik der zufälligen Transgenintegration mit „*Gene Silencing*“ und variabler Transgenexpression zu umgehen, empfiehlt sich die Entwicklung von Technologien, die gezielt in einen für „*Gene Silencing*“ wenig anfälligen, speziell definierten Locus im Genom integrieren. Hierfür eignen sich Systeme wie die *adeno-associated virus type 2* (AAV2)-Technologie, bei der Transgene in einen bestimmten Genabschnitt, den AAVS1 Locus auf Chromosom 19, integrieren können (Smith et al. 2008). In dieser Studie konnten nach transienter Transfektion mit diesem Vektor humane Embryonale Stammzellen durch antibiotischen Selektionsdruck stabil EGFP als Reporter gen ins Genom integrieren. Selbst nach Beendigung des antibiotischen Selektionsdrucks blieb die Transgenexpression auf hohem Niveau stabil. Im Vergleich zu Klonen, bei denen Transgene zufällig ins Genom integriert wurden, fanden sich hier erheblich geringere Schwankungen der Transgenexpression und eine deutliche Reduktion des „*Gene Silencings*“ in mehreren untersuchten Klonen. Bei einer stabilen Transgenexpressionsrate von 4,16% erwies sich diese Technologie zusätzlich als sehr effizient.

Neben der stabilen Transgenexpression *in vitro*, konnte nach repetitiver intraperitonealer Transplantation von stabil EGFP-exprimierenden mMSC (transfiziert mit dem pEGFP-N2 Vektor) in C57BL/6 Mäuse, auch *in vivo* eine stabile Transgenexpression nachgewiesen werden. In den Tieren ließen sich 5 Wochen nach Injektion noch eine Vielzahl grün fluoreszierender Zellen nachweisen. Die Zellen wanderten offenbar in verschiedene Organe ein und integrierten sich unter fortlaufender Transgenexpression ins Organparenchym. Ob es in einem Teil der überlebenden Zellen

jedoch *in vivo* zu einem „*Gene Silencing*“ kam, kann bei fehlendem MSC-spezifischen Marker nicht abschließend beantwortet werden. In Analogie zu diesen Daten konnten nach Nukleofektion stabil transfizierte embryonale Stammzellen *in vivo* unter persistierender GFP-Expression Teratome bilden (Hohenstein et al. 2008).

Dennoch erscheint die stabile Transgenexpression nach genetischer Modifikation von MSC für deren Einsatz bei zellbasierten gentherapeutischen *in vivo* Applikationen von Bedeutung, insbesondere zur Behandlung verschiedener Erkrankungen wie des Schlaganfalls, der Anämie oder anderer immunvermittelter Erkrankungen.

Vor diesem Hintergrund wurden mMSC derart genetisch modifiziert, dass sie neben EGFP als Reporteragen, auch ein physiologisch relevantes Protein – in diesem Fall Erythropoietin (EPO) – exprimierten. Die versatilen Eigenschaften von EPO, nicht nur in der Hämatopoese (JACOBSON et al. 1959), sondern auch seine zytoprotektiven (Wang und Zhang et al. 2008) und neuroprotektiven Eigenschaften, u.a. im Modell der zerebralen Ischämie, konnten in vielen *in vitro* (Ruscher et al. 2002) und *in vivo* Studien (Bernaudin et al. 1999; Brines et al. 2000) nachgewiesen werden.

Nach stabiler Transfektion der mMSC mit einem für EPO und EGFP codierenden Plasmid – beide Gene verbunden über eine „*Internal Ribosome Entry Site*“ – fiel die EGFP-Expression von initial ~ 80%, konsekutiv auf ~ 43% nach 4 Passagen *in vitro*. Die Transkription von EGFP erfolgte hinter der IRES-Sequenz des Plasmids. Möglicherweise führte dies zu einer schwächeren Transkriptexpression, aber auch die bereits oben erwähnten Mechanismen können zur Reduktion der Transgenexpression geführt haben.

Im Gegensatz zu EGFP wurde EPO dauerhaft *in vitro* über mehrere Passagen ohne signifikanten Verlust an Proteinmengen produziert. Die biologische *in vitro* Aktivität des von mMSC sezernierten EPO wurde in CFU-E Bestimmungen durch Ausreifung hämatopoetischer Progenitoren bestätigt. Durch Anstieg von Hämatokrit, Hämoglobin- und EPO-Serumspiegel 7 Tage nach repetitiver Injektion von stabil EPO/EGFP-exprimierenden mMSC in C57BL/6 Mäuse wurde die Transgenexpression, aber auch die biologische Aktivität von EPO *in vivo* bewiesen. Diese Daten bestätigten, dass die von den mMSC posttranskriptional vorgenommenen Glykosilierungen am EPO-Molekül zu einem *in vitro* als auch *in vivo* biologisch wirksamem Protein führten. Dies ist aus folgenden Gründen von entscheidender Bedeutung: Das murine Glykoprotein EPO, bestehend aus 165 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ~30 kDa, weist in Abhängigkeit vom Zelltyp, in dem es produziert wird, unterschiedliche

Glykosilierungsmuster auf (Takeuchi und Kobata et al. 1991). Die Glykosilierungen machen dabei ~ 30% des Molekulargewichts aus (Shoemaker und Mitscock et al. 1986) und entscheiden nicht nur über die Stabilität und damit über die Halbwertszeit des Proteohormons, sondern auch über die Löslichkeit und die biologische Aktivität (Narhi et al. 1991). Unglykosiliertes EPO hat eine sehr geringe Bioaktivität, unterliegt einer schnellen „*Clearance*“ aus dem Plasma und weist dennoch eine unveränderte *in vitro* Aktivität in hämatopoetischen Bioassays auf. Jedoch geht bei fehlender oder unzureichender Glykosilierung die *in vivo* Aktivität von EPO verloren. (Tsuda et al. 1990). Die von mMSC am EPO-Molekül vorgenommenen Glykosilierungen führten zu einer biologischen Aktivität von EPO.

5 Wochen nach Erstinjektion der stabil EPO-exprimierenden mMSC war der Hämatokrit zwar noch signifikant erhöht, jedoch kam es hier bereits zu einem Abfall der Werte und einer Normalisierung von Hämoglobin- und EPO-Serumspiegeln. Für diese Beobachtungen kommen folgende Erklärungen in Betracht: 1) Der im Vergleich zu Hämoglobin- und EPO-Serumspiegel protrahierte Abfall des Hämatokritwertes nach 5 Wochen, lässt sich mit der Lebensdauer von Erythrozyten in der Maus von ~47 Tagen erklären (Abbrecht und Littell et al. 1972). 2) Der konsekutive Zelltod der intraperitoneal injizierten stabil transfizierten mMSC führt im Zeitverlauf zu einem Verlust von EPO-sezernierenden Zellen und damit auch zu einer abfallenden *in vivo* EPO-Produktion. Das von überlebenden mMSC produzierte EPO reicht nicht mehr aus, um biologische Effekte auf die Hämatopoese *in vivo* auszuüben. Die mittels ELISA gemessenen normalisierten EPO-Serumwerte sind hiermit gut vereinbar. 3) Alternativ kann ein partielles „*Gene Silencing*“ von EPO in den mMSC *in vivo* nicht ausgeschlossen werden. 4) Die in den Mäusen initial deutlich erhöhten EPO-Serumspiegel könnten zu immunologischen Reaktionen mit Bildung von anti-EPO Antikörpern geführt haben. In einer Studie, in der MSC retroviral mit EPO transduziert und anschließend in Mäuse transplantiert wurden, ließen sich EPO-neutralisierende Antikörper detektieren (Campeau et al. 2009). Diese inaktivierten biologisch wirksames EPO und induzierten einen vorzeitigen Abfall des Hämatokrits auf Normalwerte nach syngener Transplantation. Zusätzlich führte die allogene Transplantation der Zellen in den Empfängertieren regelhaft zu einer Anämie (Rameshwar et al. 2009). Inwieweit es in den hier behandelten Tieren zu einer derartigen Immunreaktion gekommen ist, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Zusammenfassend erwies sich das hier verwendete System der nonviralen stabilen Transfektion mit einem EPO-kodierenden Plasmid als gut geeignet, um *in vitro* langfristig eine stabile Transgenexpression zu erreichen und *in vivo* die Hämatopoese zu stimulieren. Andere Autoren zeigten, dass retroviral mit EPO transduzierte MSC nach subkutaner Transplantation in eine MatrigelTM- oder eine humankompatible Collagen-Matrix EPO *in vivo* sezernieren. Durch Neovaskularisation des Organoids konnte das von den MSC gebildete EPO in die Blutzirkulation ausgeschleust werden. Die systemisch erhöhten EPO-Serumspiegel führten in den Tieren zu einem langfristig erhöhten Hämatokrit (Eliopoulos et al. 2003; Yokoo et al. 2008). Jedoch wurden in dieser Studie auch viral EPO-transduzierte Zellen intraperitoneal appliziert. Nach wenigen Wochen kam es hier zu einem Abfall des Hämatokrits und EPO-Serumspiegels. Diese Daten stehen in Einklang mit den von uns erhobenen Daten. In einem gentherapeutischen Ansatz der renalen Anämie, konnte in anämischen Mäusen nach subkutaner Transplantation einer Collagen-Matrix mit EPO-produzierenden MSC (viral transduziert) die Hämatokritwerte auf Normalwerte oder supraphysiologische Werte angehoben werden. Das Ausmaß des Hämatokritanstiegs war von der Zahl der transplantierten Zellen abhängig und hielt über 5 Monate an (Eliopoulos et al. 2006). Durch Änderung des Applikationsweges oder durch Verwendung einer solchen Polymermatrix ließen sich möglicherweise auch mit den hier verwendeten EPO-sezernierenden mMSC langfristig systemische Effekte *in vivo* produzieren und die Eignung nonviral transfizierter MSC für gentherapeutische Applikationen besser prüfen. Dabei ließe sich die Frage klären, ob mMSC *in vivo* EPO langfristig sezernieren. Limitierende Faktoren, wie das sukzessive Absterben des Transplantats oder das ungewollte Einwandern der mMSC in verschiedene Organe, könnten so umgangen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war es – nach Etablierung eines Zellkulturmodells für murine Mesenchymale Stromazellen (mMSC) des Knochenmarks – das regenerative Potential der Zellen im Schlaganfallmodell *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

Im Zellkulturschlaganfallmodell des kombinierten Sauerstoff – Glukose – Entzugs (OGD) konnten MSC in signifikantem Ausmaß Neurone vor dem Zelluntergang durch Apoptose schützen. Für diesen Effekt war kein direkter Zell- Zellkontakt zwischen Neuronenkulturen und MSC notwendig. Durch Kokultivierung der MSC mit Neuronen in einem Transwell-Kokultursystem, konnten MSC über einen parakrinen Mechanismus, d.h. durch Produktion trophischer Faktoren, das Überleben der Neurone nach ischämischer Schädigung verbessern. Die Effekte waren an eine Zeit- und Dosisabhängigkeit gekoppelt. In weiterführenden proteinbiochemischen Analysen gilt es prospektiv Kandidaten zu identifizieren, die die neuroprotektiven Eigenschaften der MSC vermitteln. Bisherige Daten ergeben, dass bei der Reduktion des apoptotisch-neuronalen Zelltodes durch MSC die intrazelluläre Phosphorylierung von STAT3 und AKT eine Rolle spielen. Zur Validierung dieser Ergebnisse sind weitere Experimente mit Inhibitoren der PI3K-AKT-Signalkaskade notwendig.

Die neuroprotektiven Eigenschaften der MSC *in vitro* haben sich im tierexperimentellen Schlaganfallmodell der Maus nicht bestätigen lassen. Nach systemischer Applikation der MSC in den MCAo-Tieren konnte weder eine Reduktion der Schlaganfallvolumina, noch eine verbesserte funktionelle Regeneration der Mäuse objektiviert werden. Gründe hierfür sind zum einen, dass die MSC trotz offener Blut-Hirn-Schranke nach dem Schlaganfall nicht in das Hirnparenchym – also den eigentlichen Läsionsort – einwanderten. Die über einen parakrinen Wirkmechanismus vermittelten neuroprotektiven Eigenschaften der MSC können bei fehlender lokalisatorischer Nähe zwischen MSC und Schädigungsort nicht wirksam werden. Die direkte Applikation von MSC an den Schädigungsort, z.B. durch intrazerebrale Injektion der Zellen, würde eine mögliche Alternative bilden, um parakrine Effekte der MSC im Schlaganfallkontext weiterführend untersuchen zu können.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurden nonvirale Transfektionsmethoden auf ihre Fähigkeit zur stabilen Transgenexpression in MSC *in vitro* und *in vivo* geprüft.

Im Vergleich zur viralen Transduktion zeigten nonvirale Methoden eine deutlich geringere Effizienz bei der Generierung stabil transfizierter MSC. Dennoch konnten durch antibiotischen Selektionsdruck und FACS-Sortierung – unabhängig von der transienten Transfektionsmethode – zuverlässig stabil transfizierte MSC-Klone generiert werden. Die stabile Transgenexpression hatte keinen Einfluß auf das Proliferations- und Differenzierungspotential der MSC. Die genetisch modifizierten Zellen zeigten eine dauerhafte Expression und biologische Aktivität ihrer Transgene (EGFP/EPO) *in vitro*. Nach intraperitonealer Injektion von stabil EPO/EGFP-exprimierenden MSC in C57BL/6 Mäuse wurde *in vivo* die Transgenexpression durch pharmakologisch relevante Anstiege von Hämatokrit, Hämoglobin- und EPO-Serumspiegel nachgewiesen. Die langfristige Expression von EGFP wurde in immunhistochemischen Untersuchungen durch Persistenz von grün fluoreszierenden Zellen in verschiedenen Organen, 5 Wochen nach Transplantation bestätigt. Die weitgehende Normalisierung von Hämatokrit-, Hämoglobin- und EPO-Serumspiegel im Zeitverlauf ist vermutlich auf das Absterben der MSC *in vivo* und den damit verbundenen Verlust von EPO-produzierenden Zellen zurückzuführen. Um das Zellüberleben der MSC *in vivo* zu erhöhen und die potentielle Einsetzbarkeit nonviral stabil transfizierter MSC für gentherapeutische Applikationen nutzen zu können, gilt es Strategien zu entwickeln, die das langfristige Überleben der Zellen *in vivo*, z.B. in einer Matrix, ermöglichen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abbrecht,P.H. and Littell,J.K., 1972. Erythrocyte life-span in mice acclimatized to different degrees of hypoxia. *J Appl Physiol.* 32, 443-445.
- Aluigi,M., Fogli,M., Curti,A., Isidori,A., Gruppioni,E., Chiodoni,C., Colombo,M.P., Versura,P., D'Errico-Grigioni,A., Ferri,E., Baccarani,M., and Lemoli,R.M., 2006. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 24, 454-461.
- Amado,L.C., Saliaris,A.P., Schuleri,K.H., St John,M., Xie,J.S., Cattaneo,S., Durand,D.J., Fitton,T., Kuang,J.Q., Stewart,G., Lehrke,S., Baumgartner,W.W., Martin,B.J., Heldman,A.W., and Hare,J.M., 2005. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 11474-11479.
- Anjos-Afonso,F. and Bonnet,D., 2007. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1(+) cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood.* 109, 1298-1306.
- Arcasoy,M.O., 2008. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol.* 141, 14-31.
- Ashton,B.A., Allen,T.D., Howlett,C.R., Eaglesom,C.C., Hattori,A., and Owen,M., 1980. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 294-307.
- Aslan,H., Zilberman,Y., Arbeli,V., Sheyn,D., Matan,Y., Liebergall,M., Li,J.Z., Helm,G.A., Gazit,D., and Gazit,Z., 2006. Nucleofection-based ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration. *Tissue Eng.* 12, 877-889.
- Astrup,J., Symon,L., Branston,N.M., and Lassen,N.A., 1977. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke.* 8, 51-57.
- Bab,I., Ashton,B.A., Gazit,D., Marx,G., Williamson,M.C., and Owen,M.E., 1986. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci.* 84, 139-151.
- Baddoo,M., Hill,K., Wilkinson,R., Gaupp,D., Hughes,C., Kopen,G.C., and Phinney,D.G., 2003. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem.* 89, 1235-1249.
- Bederson,J.B., Pitts,L.H., Tsuji,M., Nishimura,M.C., Davis,R.L., and Bartkowski,H., 1986. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke.* 17, 472-476.
- Berlit, P., 2000 [Stroke. Options for primary prevention], *Nervenarzt.* 71, 231-236.
- Bernaudin,M., Marti,H.H., Roussel,S., Divoux,D., Nouvelot,A., MacKenzie,E.T., and Petit,E., 1999. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19, 643-651.
- Bieback,K., Kern,S., Kluter,H., and Eichler,H., 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 22, 625-634.
- Blesch,A., 2004. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods.* 33, 164-172.
- Block,G.J., Ohkouchi,S., Fung,F., Frenkel,J., Gregory,C., Pochampally,R., DiMattia,G., Sullivan,D.E., and Prockop,D.J., 2009. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells.* 27, 670-681.

- Brewer, G.J., 1995. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res.* 42, 674-683.
- Briane, D., Lesage, D., Cao, A., Coudert, R., Lievre, N., Salzman, J.L., and Taillandier, E., 2002. Cellular pathway of plasmids vectorized by cholesterol-based cationic liposomes. *J Histochem Cytochem.* 50, 983-991.
- Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M., and Cerami, A., 2000. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 10526-10531.
- Buhemann, C., Scholz, A., Bernreuther, C., Malik, C.Y., Braun, H., Schachner, M., Reymann, K.G., and Dihne, M., 2006. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain.* 129, 3238-3248.
- Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A., and Felsenfeld, G., 2002. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 Suppl 4, 16433-16437.
- Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A., and Brines, M., 2003. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 4802-4806.
- Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., and Fisk, N.M., 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 98, 2396-2402.
- Campeau, P.M., Rafei, M., Francois, M., Birman, E., Forner, K.A., and Galipeau, J., 2009. Mesenchymal stromal cells engineered to express erythropoietin induce anti-erythropoietin antibodies and anemia in allorecipients. *Mol Ther.* 17, 369-372.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 9, 641-650.
- Caplan, A.I., 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 217, 318-324.
- Caplan, A.I. and Dennis, J.E., 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 98, 1076-1084.
- Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H.E., and Moore, M.A., 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 56, 289-301.
- Cesnulevicius, K., Timmer, M., Wesemann, M., Thomas, T., Barkhausen, T., and Grothe, C., 2006. Nucleofection is the most efficient nonviral transfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephali with no changes in cell composition or dopaminergic fate. *Stem Cells.* 24, 2776-2791.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J., 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 25, 2739-2749.
- Chamberlain, G., Wright, K., Rot, A., Ashton, B., and Middleton, J., 2008. Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *PLoS One.* 3, e2934.
- Chamberlain, J.R., Schwarze, U., Wang, P.R., Hirata, R.K., Hankenson, K.D., Pace, J.M., Underwood, R.A., Song, K.M., Sussman, M., Byers, P.H., and Russell, D.W., 2004. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science.* 303, 1198-1201.

- Chen,J., Li,Y., Katakowski,M., Chen,X., Wang,L., Lu,D., Lu,M., Gautam,S.C., and Chopp,M., 2003a. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res.* 73, 778-786.
- Chen,J., Zhang,Z.G., Li,Y., Wang,L., Xu,Y.X., Gautam,S.C., Lu,M., Zhu,Z., and Chopp,M., 2003b. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res.* 92, 692-699.
- Cherry,S.R., Biniszkiwicz,D., van Parijs,L., Baltimore,D., and Jaenisch,R., 2000. Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol.* 20, 7419-7426.
- Chiellini,C., Cochet,O., Negroni,L., Samson,M., Poggi,M., Ailhaud,G., Alessi,M.C., Dani,C., and Amri,E.Z., 2008. Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol.* 9, 26.
- Chikuma,M., Masuda,S., Kobayashi,T., Nagao,M., and Sasaki,R., 2000. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279, E1242-E1248.
- Cho,P.S., Messina,D.J., Hirsh,E.L., Chi,N., Goldman,S.N., Lo,D.P., Harris,I.R., Popma,S.H., Sachs,D.H., and Huang,C.A., 2008. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood.* 111, 430-438.
- Colleoni,S., Donofrio,G., Lagutina,I., Duchi,R., Galli,C., and Lazzari,G., 2005. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells.* 7, 154-166.
- Colter,D.C., Class,R., DiGirolamo,C.M., and Prockop,D.J., 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 3213-3218.
- Costa,M., Dottori,M., Ng,E., Hawes,S.M., Sourris,K., Jamshidi,P., Pera,M.F., Elefanty,A.G., and Stanley,E.G., 2005. The hESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny. *Nat Methods.* 2, 259-260.
- Cui,X., Chen,J., Zacharek,A., Li,Y., Roberts,C., Kapke,A., Savant-Bhonsale,S., and Chopp,M., 2007. Nitric oxide donor upregulation of stromal cell-derived factor-1/chemokine (CXC motif) receptor 4 enhances bone marrow stromal cell migration into ischemic brain after stroke. *Stem Cells.* 25, 2777-2785.
- Daga,A., Muraglia,A., Quarto,R., Cancedda,R., and Corte,G., 2002. Enhanced engraftment of EPO-transduced human bone marrow stromal cells transplanted in a 3D matrix in non-conditioned NOD/SCID mice. *Gene Ther.* 9, 915-921.
- Dazzi,F., Ramasamy,R., Glennie,S., Jones,S.P., and Roberts,I., 2006. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 20, 161-171.
- De Bari,C., Dell'Accio,F., Tylzanowski,P., and Luyten,F.P., 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44, 1928-1942.
- Dezawa,M., Kanno,H., Hoshino,M., Cho,H., Matsumoto,N., Itokazu,Y., Tajima,N., Yamada,H., Sawada,H., Ishikawa,H., Mimura,T., Kitada,M., Suzuki,Y., and Ide,C., 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest.* 113, 1701-1710.
- DiGirolamo,C.M., Stokes,D., Colter,D., Phinney,D.G., Class,R., and Prockop,D.J., 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple

- colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology*. 107, 275-281.
- Dirnagl,U., Iadecola,C., and Moskowitz,M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*. 22, 391-397.
- Djouad,F., Bony,C., Haupl,T., Uze,G., Lahlou,N., Louis-Plence,P., Apparailly,F., Canovas,F., Reme,T., Sany,J., Jorgensen,C., and Noel,D., 2005. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*. 7, R1304-R1315.
- Dobson,J., 2006. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene Ther*. 13, 283-287.
- Dominici,M., Le Blanc,K., Mueller,I., Slaper-Cortenbach,I., Marini,F., Krause,D., Deans,R., Keating,A., Prockop,D., and Horwitz,E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8, 315-317.
- Ehrenreich,H., Fischer,B., Norra,C., Schellenberger,F., Stender,N., Stiefel,M., Siren,A.L., Paulus,W., Nave,K.A., Gold,R., and Bartels,C., 2007a. Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain*. 130, 2577-2588.
- Ehrenreich,H., Hasselblatt,M., Dembowski,C., Cepek,L., Lewczuk,P., Stiefel,M., Rustenbeck,H.H., Breiter,N., Jacob,S., Knerlich,F., Bohn,M., Poser,W., Ruther,E., Kochen,M., Gefeller,O., Gleiter,C., Wessel,T.C., De Ryck,M., Itri,L., Prange,H., Cerami,A., Brines,M., and Siren,A.L., 2002. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*. 8, 495-505.
- Ehrenreich,H., Hinze-Selch,D., Stawicki,S., Aust,C., Knolle-Veentjer,S., Wilms,S., Heinz,G., Erdag,S., Jahn,H., Degner,D., Ritzen,M., Mohr,A., Wagner,M., Schneider,U., Bohn,M., Huber,M., Czernik,A., Pollmacher,T., Maier,W., Siren,A.L., Klosterkötter,J., Falkai,P., Ruther,E., Aldenhoff,J.B., and Krampe,H., 2007b. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry*. 12, 206-220.
- Eliopoulos,N., Al Khaldi,A., Crosato,M., Lachapelle,K., and Galipeau,J., 2003. A neovascularized organoid derived from retrovirally engineered bone marrow stroma leads to prolonged in vivo systemic delivery of erythropoietin in nonmyeloablated, immunocompetent mice. *Gene Ther*. 10, 478-489.
- Eliopoulos,N., Gagnon,R.F., Francois,M., and Galipeau,J., 2006. Erythropoietin delivery by genetically engineered bone marrow stromal cells for correction of anemia in mice with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 17, 1576-1584.
- Ellis,J., 2005. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther*. 16, 1241-1246.
- Endres,M., Laufs,U., Liao,J.K., and Moskowitz,M.A., 2004. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends in Neurosciences*. 27, 283-289.
- Felgner,P.L., Gadek,T.R., Holm,M., Roman,R., Chan,H.W., Wenz,M., Northrop,J.P., Ringold,G.M., and Danielsen,M., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84, 7413-7417.
- Ferreira,E., Potier,E., Logeart-Avramoglou,D., Salomskaite-Davalgiene,S., Mir,L.M., and Petite,H., 2008. Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection. *Gene Ther*. 15, 537-544.
- Friedenstein,A.J., Gorskaja,J.F., and Kulagina,N.N., 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 4, 267-274.

- Gao,Q., Li,Y., Shen,L., Zhang,J., Zheng,X., Qu,R., Liu,Z., and Chopp,M., 2008. Bone marrow stromal cells reduce ischemia-induced astrocytic activation in vitro. *Neuroscience*. 152, 646-655.
- Gao,X., Kim,K.S., and Liu,D., 2007. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J*. 9, E92-104.
- Geddis,A.E. and Kaushansky,K., 2004. Megakaryocytes express functional Aurora-B kinase in endomitosis. *Blood*. 104, 1017-1024.
- Gersting,S.W., Schillinger,U., Lausier,J., Nicklaus,P., Rudolph,C., Plank,C., Reinhardt,D., and Rosenecker,J., 2004. Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection. *J Gene Med*. 6, 913-922.
- Gnecchi,M., He,H., Liang,O.D., Melo,L.G., Morello,F., Mu,H., Noiseux,N., Zhang,L., Pratt,R.E., Ingwall,J.S., and Dzau,V.J., 2005. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 11, 367-368.
- Goldberg,M.P. and Choi,D.W., 1990. Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose. *Stroke*. 21, III75-III77.
- Goldberg,M.P. and Choi,D.W., 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci*. 13, 3510-3524.
- Graham,F.L. and van der Eb,A.J., 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52, 456-467.
- Grinnemo,K.H., Mansson,A., Dellgren,G., Klingberg,D., Wardell,E., Drvota,V., Tammik,C., Holgersson,J., Ringden,O., Sylven,C., and Le Blanc,K., 2004. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 127, 1293-1300.
- Hanabusa,K., Nagaya,N., Iwase,T., Itoh,T., Murakami,S., Shimizu,Y., Taki,W., Miyatake,K., and Kangawa,K., 2005. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke*. 36, 853-858.
- Haynesworth,S.E., Baber,M.A., and Caplan,A.I., 1996. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*. 166, 585-592.
- Heller,L.C., Ugen,K., and Heller,R., 2005. Electroporation for targeted gene transfer. *Expert Opin Drug Deliv*. 2, 255-268.
- Heyde,M., Partridge,K.A., Oreffo,R.O., Howdle,S.M., Shakesheff,K.M., and Garnett,M.C., 2007. Gene therapy used for tissue engineering applications. *J Pharm Pharmacol*. 59, 329-350.
- Hohenstein,K.A., Pyle,A.D., Chern,J.Y., Lock,L.F., and Donovan,P.J., 2008. Nucleofection mediates high-efficiency stable gene knockdown and transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 26, 1436-1443.
- Honczarenko,M., Le,Y., Swierkowski,M., Ghiran,I., Glodek,A.M., and Silberstein,L.E., 2006. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 24, 1030-1041.
- Honma,T., Honmou,O., Iihoshi,S., Harada,K., Houkin,K., Hamada,H., and Kocsis,J.D., 2006. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp Neurol*. 199, 56-66.
- Horita,Y., Honmou,O., Harada,K., Houkin,K., Hamada,H., and Kocsis,J.D., 2006. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-

- modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *J Neurosci Res.* 84, 1495-1504.
- Horn,A.P., Frozza,R.L., Grudzinski,P.B., Gerhardt,D., Hoppe,J.B., Bruno,A.N., Chagastelles,P., Nardi,N.B., Lenz,G., and Salbego,C., 2009. Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Res.* 63, 35-41.
- Horwitz,E.M., Prockop,D.J., Fitzpatrick,L.A., Koo,W.W., Gordon,P.L., Neel,M., Sussman,M., Orchard,P., Marx,J.C., Pyeritz,R.E., and Brenner,M.K., 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 5, 309-313.
- Hossmann,K.A., 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* 36, 557-565.
- Hung,S.C., Pochampally,R.R., Chen,S.C., Hsu,S.C., and Prockop,D.J., 2007. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells.* 25, 2363-2370.
- Huth,S., Lausier,J., Gersting,S.W., Rudolph,C., Plank,C., Welsch,U., and Rosenecker,J., 2004. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med.* 6, 923-936.
- Igura,K., Zhang,X., Takahashi,K., Mitsuru,A., Yamaguchi,S., and Takashi,T.A., 2004. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 6, 543-553.
- In 't Anker,P.S., Scherjon,S.A., Kleijburg-van der Keur,C., Groot-Swings,G.M., Claas,F.H., Fibbe,W.E., and Kanhai,H.H., 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells.* 22, 1338-1345.
- Jackson,C.W., Steward,S.A., Hutson,N.K., and McDonald,T.P., 1990. Genetic and physiological variations in megakaryocyte DNA content distributions. *Int J Cell Cloning.* 8, 260-266.
- JACOBSON,L.O., GOLDWASSER,E., GURNEY,C.W., FRIED,W., and PLZAK,L., 1959. Studies of erythropoietin: the hormone regulating red cell production. *Ann N Y Acad Sci.* 77, 551-573.
- Jakobsson,J., Rosenqvist,N., Thompson,L., Barraud,P., and Lundberg,C., 2004. Dynamics of transgene expression in a neural stem cell line transduced with lentiviral vectors incorporating the cHS4 insulator. *Exp Cell Res.* 298, 611-623.
- Javazon,E.H., Colter,D.C., Schwarz,E.J., and Prockop,D.J., 2001. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells.* 19, 219-225.
- Jiang,Y., Henderson,D., Blackstad,M., Chen,A., Miller,R.F., and Verfaillie,C.M., 2003. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 Suppl 1, 11854-11860.
- Kasper,G., Dankert,N., Tuischer,J., Hoefl,M., Gaber,T., Glaeser,J.D., Zander,D., Tschirschmann,M., Thompson,M., Matziolis,G., and Duda,G.N., 2007. Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment. *Stem Cells.* 25, 903-910.
- Katz,A.J., Tholpady,A., Tholpady,S.S., Shang,H., and Ogle,R.C., 2005. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells.* 23, 412-423.
- Kawada,H., Fujita,J., Kinjo,K., Matsuzaki,Y., Tsuma,M., Miyatake,H., Mugeruma,Y., Tsuboi,K., Itabashi,Y., Ikeda,Y., Ogawa,S., Okano,H., Hotta,T., Ando,K., and

- Fukuda,K., 2004. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 104, 3581-3587.
- Kelly,S., Bliss,T.M., Shah,A.K., Sun,G.H., Ma,M., Foo,W.C., Masel,J., Yenari,M.A., Weissman,I.L., Uchida,N., Palmer,T., and Steinberg,G.K., 2004. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 11839-11844.
- Kim,S.S., Yoo,S.W., Park,T.S., Ahn,S.C., Jeong,H.S., Kim,J.W., Chang,D.Y., Cho,K.G., Kim,S.U., Huh,Y., Lee,J.E., Lee,S.Y., Lee,Y.D., and 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.
- Koh,J.Y. and Choi,D.W., 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods*. 20, 83-90.
- Kurozumi,K., Nakamura,K., Tamiya,T., Kawano,Y., Ishii,K., Kobune,M., Hirai,S., Uchida,H., Sasaki,K., Ito,Y., Kato,K., Honmou,O., Houkin,K., Date,I., and Hamada,H., 2005. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Molecular Therapy*. 11, 96-104.
- Laker,C., Meyer,J., Schopen,A., Friel,J., Heberlein,C., Ostertag,W., and Stocking,C., 1998. Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J Virol*. 72, 339-348.
- Lakshmipathy,U., Pelacho,B., Sudo,K., Linehan,J.L., Coucouvanis,E., Kaufman,D.S., and Verfaillie,C.M., 2004. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells*. 22, 531-543.
- Lavigne,M.D. and Gorecki,D.C., 2006. Emerging vectors and targeting methods for nonviral gene therapy. *Expert Opin Emerg Drugs*. 11, 541-557.
- Lawrie,A., Brisken,A.F., Francis,S.E., Cumberland,D.C., Crossman,D.C., and Newman,C.M., 2000. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther*. 7, 2023-2027.
- Leist,M., Ghezzi,P., Grasso,G., Bianchi,R., Villa,P., Fratelli,M., Savino,C., Bianchi,M., Nielsen,J., Gerwien,J., Kallunki,P., Larsen,A.K., Helboe,L., Christensen,S., Pedersen,L.O., Nielsen,M., Torup,L., Sager,T., Sfacteria,A., Erbayraktar,S., Erbayraktar,Z., Gokmen,N., Yilmaz,O., Cerami-Hand,C., Xie,Q.W., Coleman,T., Cerami,A., and Brines,M., 2004. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*. 305, 239-242.
- Leker,R.R., Soldner,F., Velasco,I., Gavin,D.K., Androutsellis-Theotokis,A., and Mckay,R.D.G., 2007. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke*. 38, 153-161.
- LEVAN,A. and BIESELE,J.J., 1958. Role of chromosomes in cancerogenesis, as studied in serial tissue culture of mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci*. 71, 1022-1053.
- Li,W., Ma,N., Ong,L.L., Nesselmann,C., Klopsch,C., Ladilov,Y., Furlani,D., Piechaczek,C., Moebius,J.M., Lutzow,K., Lendlein,A., Stamm,C., Li,R.K., and Steinhoff,G., 2007. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells*. 25, 2118-2127.
- Li,Y., Chen,J., Chen,X.G., Wang,L., Gautam,S.C., Xu,Y.X., Katakowski,M., Zhang,L.J., Lu,M., Janakiraman,N., and Chopp,M., 2002. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*. 59, 514-523.

- Li, Y., Chen, J., Zhang, C.L., Wang, L., Lu, D., Katakowski, M., Gao, Q., Shen, L.H., Zhang, J., Lu, M., and Chopp, M., 2005. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*. 49, 407-417.
- Liew, C.G., Draper, J.S., Walsh, J., Moore, H., and Andrews, P.W., 2007. Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 25, 1521-1528.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., and ., 1985. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82, 7580-7584.
- Maasho, K., Marusina, A., Reynolds, N.M., Coligan, J.E., and Borrego, F., 2004. Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NK1, using the Amara nucleofection system. *J Immunol Methods*. 284, 133-140.
- McMahon, J.M., Conroy, S., Lyons, M., Greiser, U., O'shea, C., Strappe, P., Howard, L., Murphy, M., Barry, F., and O'Brien, T., 2006. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem Cells Dev*. 15, 87-96.
- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.J., and Jaffres, P.A., 2009. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol*. 157, 166-178.
- Miura, M., Miura, Y., Padilla-Nash, H.M., Molinolo, A.A., Fu, B., Patel, V., Seo, B.M., Sonoyama, W., Zheng, J.J., Baker, C.C., Chen, W., Ried, T., and Shi, S., 2006. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 24, 1095-1103.
- Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S., and Mori, H., 2006. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 12, 459-465.
- Miyazaki, M., Obata, Y., Abe, K., Furusu, A., Koji, T., Tabata, Y., and Kohno, S., 2006. GENE TRANSFER USING NONVIRAL DELIVERY SYSTEMS. *Perit Dial Int*. 26, 633-640.
- Moriscot, C., de Fraipont, F., Richard, M.J., Marchand, M., Savatier, P., Bosco, D., Favrot, M., and Benhamou, P.Y., 2005. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells*. 23, 594-603.
- Munoz, J.R., Stoutenger, B.R., Robinson, A.P., Spees, J.L., and Prockop, D.J., 2005. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 18171-18176.
- Muraglia, A., Cancedda, R., and Quarto, R., 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 113 (Pt 7), 1161-1166.
- Nagai, A., Kim, W.K., Lee, H.J., Jeong, H.S., Kim, K.S., Hong, S.H., Park, I.H., and Kim, S.U., 2007. Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal marrow. *PLoS ONE*. 2, e1272.
- Narhi, L.O., Arakawa, T., Aoki, K.H., Elmore, R., Rohde, M.F., Boone, T., and Strickland, T.W., 1991. The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *J Biol Chem*. 266, 23022-23026.
- Nauta, A.J. and Fibbe, W.E., 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 110, 3499-3506.

- Newman,R.E., Yoo,D., LeRoux,M.A., and Danilkovitch-Miagkova,A., 2009. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 8, 110-123.
- Nomura,S., Osawa,G., and Karai,M., 1990. Treatment of a patient with end-stage renal disease, severe iron overload and ascites by weekly phlebotomy combined with recombinant human erythropoietin. *Nephron*. 55, 210-213.
- Nomura,T., Honmou,O., Harada,K., Houkin,K., Hamada,H., and Kocsis,J.D., 2005. I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*. 136, 161-169.
- Oh,T.K., Quan,G.H., Kim,H.Y., Park,F., and Kim,S.T., 2006. Correction of anemia in uremic rats by intramuscular injection of lentivirus carrying an erythropoietin gene. *Am J Nephrol*. 26, 326-334.
- Ohtaki,H., Ylostalo,J.H., Foraker,J.E., Robinson,A.P., Reger,R.L., Shioda,S., and Prockop,D.J., 2008. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 14638-14643.
- Osada,S., Ebihara,I., Setoguchi,Y., Takahashi,H., Tomino,Y., and Koide,H., 1999. Gene therapy for renal anemia in mice with polycystic kidney using an adenovirus vector encoding the human erythropoietin gene. *Kidney Int*. 55, 1234-1240.
- Park,H.W., Shin,J.S., and Kim,C.W., 2007. Proteome of mesenchymal stem cells. *Proteomics*. 7, 2881-2894.
- Peister,A., Mellad,J.A., Larson,B.L., Hall,B.M., Gibson,L.F., and Prockop,D.J., 2004a. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 103, 1662-1668.
- Peister,A., Mellad,J.A., Wang,M., Tucker,H.A., and Prockop,D.J., 2004b. Stable transfection of MSCs by electroporation. *Gene Ther*. 11, 224-228.
- Pereira,R.F., Halford,K.W., O'Hara,M.D., Leeper,D.B., Sokolov,B.P., Pollard,M.D., Bagasra,O., and Prockop,D.J., 1995. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92, 4857-4861.
- Petzold,G.C., Scheibe,F., Braun,J.S., Freyer,D., Priller,J., Dirnagl,U., and Dreier,J.P., 2005. Nitric oxide modulates calcium entry through P/Q-type calcium channels and N-methyl-d-aspartate receptors in rat cortical neurons. *Brain Res*. 1063, 9-14.
- Phillips,J.E., Gersbach,C.A., and Garcia,A.J., 2007. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. *Biomaterials*. 28, 211-229.
- Piersma,A.H., Ploemacher,R.E., and Brockbank,K.G., 1983. Radiation damage to femoral hemopoietic stroma measured by implant regeneration and quantitation of fibroblastic progenitors. *Exp Hematol*. 11, 884-890.
- Pittenger,M.F., Mackay,A.M., Beck,S.C., Jaiswal,R.K., Douglas,R., Mosca,J.D., Moorman,M.A., Simonetti,D.W., Craig,S., and Marshak,D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284, 143-147.
- Poeck, K., Hacke, W.: *Neurologie*, Springer Verlag, 12. Auflage, 2006.
- Rameshwar,P., 2009. Casting doubt on the safety of "off-the-shelf" mesenchymal stem cells for cell therapy. *Mol Ther*. 17, 216-218.
- Ringe,J., Strassburg,S., Neumann,K., Endres,M., Notter,M., Burmester,G.R., Kaps,C., and Sittinger,M., 2007. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem

- cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 101, 135-146.
- Ross,P.J., Kennedy,M.A., and Parks,R.J., 2009. Host cell detection of noncoding stuffer DNA contained in helper-dependent adenovirus vectors leads to epigenetic repression of transgene expression. *J Virol.* 83, 8409-8417.
- Rubin,H., 2001. Multistage carcinogenesis in cell culture. *Dev Biol (Basel).* 106, 61-66.
- Rubin,H., 2002. The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotechnol.* 20, 675-681.
- Ruscher,K., Freyer,D., Karsch,M., Isaev,N., Megow,D., Sawitzki,B., Priller,J., Dirnagl,U., and Meisel,A., 2002. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: Evidence from an in vitro model. *Journal of Neuroscience.* 22, 10291-10301.
- Ruster,B., Gottig,S., Ludwig,R.J., Bistran,R., Muller,S., Seifried,E., Gille,J., and Henschler,R., 2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 108, 3938-3944.
- Rzeczinski,S., Victorov,I.V., Lyjin,A.A., Aleksandrova,O.P., Harms,C., Kronenberg,G., Freyer,D., Scheibe,F., Priller,J., Endres,M., and Dirnagl,U., 2006. Roller culture of free-floating retinal slices: a new system of organotypic cultures of adult rat retina. *Ophthalmic Res.* 38, 263-269.
- Rzhaninova,A.A., Gornostaeva,S.N., and Goldshtein,D.V., 2005. Isolation and phenotypical characterization of mesenchymal stem cells from human fetal thymus. *Bull Exp Biol Med.* 139, 134-140.
- Sakaguchi,Y., Sekiya,I., Yagishita,K., and Muneta,T., 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 52, 2521-2529.
- Sasaki,H. and Matsui,Y., 2008. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet.* 9, 129-140.
- Scherer,F., Anton,M., Schillinger,U., Henke,J., Bergemann,C., Kruger,A., Gansbacher,B., and Plank,C., 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 9, 102-109.
- Schinkothe,T., Bloch,W., and Schmidt,A., 2008. In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 17, 199-206.
- Schwartz,R.E., Reyes,M., Koodie,L., Jiang,Y., Blackstad,M., Lund,T., Lenvik,T., Johnson,S., Hu,W.S., and Verfaillie,C.M., 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.* 109, 1291-1302.
- Sekiya,I., Larson,B.L., Smith,J.R., Pochampally,R., Cui,J.G., and Prockop,D.J., 2002. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells.* 20, 530-541.
- Sekiya,I., Larson,B.L., Vuoristo,J.T., Reger,R.L., and Prockop,D.J., 2005. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res.* 320, 269-276.
- Serafini,M., Dylla,S.J., Oki,M., Heremans,Y., Tolar,J., Jiang,Y.H., Buckley,S.M., Pelacho,B., Burns,T.C., Frommer,S., Rossi,D.J., Bryder,D., Panoskaltsis-Mortari,A., O'Shaughnessy,M.J., Nelson-Holte,M., Fine,G.C., Weissman,I.L., Blazar,B.R., and Verfaillie,C.M., 2007. Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine.* 204, 129-139.

- Sheyn,D., Pelled,G., Zilberman,Y., Talasazan,F., Frank,J.M., Gazit,D., and Gazit,Z., 2008. Nonvirally engineered porcine adipose tissue-derived stem cells: use in posterior spinal fusion. *Stem Cells*. 26, 1056-1064.
- Shoemaker,C.B. and Mitscock,L.D., 1986. Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. *Mol Cell Biol*. 6, 849-858.
- Siemen,H., Nix,M., Endl,E., Koch,P., Itskovitz-Eldor,J., and Brustle,O., 2005. Nucleofection of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 14, 378-383.
- Sinor,A.D. and Greenberg,D.A., 2000. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett*. 290, 213-215.
- Smith,J.R., Maguire,S., Davis,L.A., Alexander,M., Yang,F., Chandran,S., french-Constant,C., and Pedersen,R.A., 2008. Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVS1-targeted integration. *Stem Cells*. 26, 496-504.
- Spees,J.L., Olson,S.D., Whitney,M.J., and Prockop,D.J., 2006. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 1283-1288.
- Sundin,M., Barrett,A.J., Ringden,O., Uzunel,M., Lonnie,H., Dackland,A.L., Christensson,B., and Blanc,K.L., 2009. HSCT recipients have specific tolerance to MSC but not to the MSC donor. *J Immunother*. 32, 755-764.
- Svensson,E.C., Black,H.B., Dugger,D.L., Tripathy,S.K., Goldwasser,E., Hao,Z., Chu,L., and Leiden,J.M., 1997. Long-term erythropoietin expression in rodents and non-human primates following intramuscular injection of a replication-defective adenoviral vector. *Hum Gene Ther*. 8, 1797-1806.
- Takeuchi,M. and Kobata,A., 1991. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology*. 1, 337-346.
- Thored,P., Arvidsson,A., Cacci,E., Ahlenius,H., Kallur,T., Darsalia,V., Ekdahl,C.T., Kokaia,Z., and Lindvall,O., 2006. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*. 24, 739-747.
- Tolar,J., Nauta,A.J., Osborn,M.J., Panoskaltsis,M.A., McElmurry,R.T., Bell,S., Xia,L., Zhou,N., Riddle,M., Schroeder,T.M., Westendorf,J.J., Mclvor,R.S., Hogendoorn,P.C., Szuhai,K., Oseth,L., Hirsch,B., Yant,S.R., Kay,M.A., Peister,A., Prockop,D.J., Fibbe,W.E., and Blazar,B.R., 2007. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 25, 371-379.
- Tripathy,S.K., Svensson,E.C., Black,H.B., Goldwasser,E., Margalith,M., Hobart,P.M., and Leiden,J.M., 1996. Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 10876-10880.
- Trzaska,K.A., Kuzhikandathil,E.V., and Rameshwar,P., 2007. Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 25, 2797-2808.
- Tse,W.T., Pendleton,J.D., Beyer,W.M., Egalka,M.C., and Guinan,E.C., 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 75, 389-397.
- Tsuda,E., Kawanishi,G., Ueda,M., Masuda,S., and Sasaki,R., 1990. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur J Biochem*. 188, 405-411.
- von Levetzow,G., Spanholtz,J., Beckmann,J., Fischer,J., Kogler,G., Wernet,P., Punzel,M., and Giebel,B., 2006. Nucleofection, an efficient nonviral method to transfer genes into human hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 15, 278-285.

- Vulliet, P.R., Greeley, M., Halloran, S.M., MacDonald, K.A., and Kittleson, M.D., 2004. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 363, 783-784.
- Wagner, W., Roderburg, C., Wein, F., Diehlmann, A., Frankhauser, M., Schubert, R., Eckstein, V., and Ho, A.D., 2007. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 25, 2638-2647.
- Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., and Chopp, M., 2004. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 35, 1732-1737.
- Wang, W. and Zhang, J., 2008. Protective effect of erythropoietin against aristolochic acid-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells. *Eur J Pharmacol*. 588, 135-140.
- Wang, Y., Chen, X., Armstrong, M.A., and Li, G., 2007. Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenotransplantation model. *J Orthop Res*. 25, 926-932.
- Wattiaux, R., Laurent, N., Wattiaux-De Coninck, S., and Jadot, M., 2000. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev*. 41, 201-208.
- Wislet-Gendebien, S., Hans, G., Leprince, P., Rigo, J.M., Moonen, G., and Rogister, B., 2005. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: Switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells*. 23, 392-402.
- Wolf, P.A., Belanger, A.J., and D'Agostino, R.B., 1992. Management of risk factors. *Neurol Clin*. 10, 177-191.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P.L., 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 247, 1465-1468.
- Wynn, R.F., Hart, C.A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C.A., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., and Bellantuono, I., 2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 104, 2643-2645.
- Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., and McCabe, D., 1990. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87, 9568-9572.
- Yang, N.S. and Sun, W.H., 1995. Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nat Med*. 1, 481-483.
- Yao, S., Sukonnik, T., Kean, T., Bharadwaj, R.R., Pasceri, P., and Ellis, J., 2004. Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther*. 10, 27-36.
- Yokoo, T., Fukui, A., Matsumoto, K., Ohashi, T., Sado, Y., Suzuki, H., Kawamura, T., Okabe, M., Hosoya, T., and Kobayashi, E., 2008. Generation of a transplantable erythropoietin-producer derived from human mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 85, 1654-1658.
- Young, R.G., Butler, D.L., Weber, W., Caplan, A.I., Gordon, S.L., and Fink, D.J., 1998. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 16, 406-413.
- Zabner, J., Fasbender, A.J., Moninger, T., Poellinger, K.A., and Welsh, M.J., 1995. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*. 270, 18997-19007.
- Zacco, A., Togo, J., Spence, K., Ellis, A., Lloyd, D., Furlong, S., and Piser, T., 2003. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci*. 23, 11104-11111.

-
- Zaragosi,L.E., Billon,N., Ailhaud,G., and Dani,C., 2007. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*. 25, 790-797.
- Zeitelhofer,M., Vessey,J.P., Xie,Y., Tubing,F., Thomas,S., Kiebler,M., and Dahm,R., 2007. High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc*. 2, 1692-1704.
- Zhang,J., Li,Y., Zheng,X., Gao,Q., Liu,Z., Qu,R., Borneman,J., Elias,S.B., and Chopp,M., 2008. Bone marrow stromal cells protect oligodendrocytes from oxygen-glucose deprivation injury. *J Neurosci Res*. 86, 1501-1510.
- Zhang,L., Zhang,R.L., Wang,Y., Zhang,C., Zhang,Z.G., Meng,H., and Chopp,M., 2005. Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke*. 36, 847-852.
- Zhao,L.R., Duan,W.M., Reyes,M., Keene,C.D., Verfaillie,C.M., and Low,W.C., 2002. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 174, 11-20.
- Zhao,M.Z., Nonoguchi,N., Ikeda,N., Watanabe,T., Furutama,D., Miyazawa,D., Funakoshi,H., Kajimoto,Y., Nakamura,T., Dezawa,M., Shibata,M.A., Otsuki,Y., Coffin,R.S., Liu,W.D., Kuroiwa,T., and Miyatake,S., 2006. Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector. *J Cereb Blood Flow Metab*. 26, 1176-1188.
- Zuk,P.A., Zhu,M., Ashjian,P., De Ugarte,D.A., Huang,J.I., Mizuno,H., Alfonso,Z.C., Fraser,J.K., Benhaim,P., and Hedrick,M.H., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13, 4279-4295.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Aus dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

1. Posterpräsentationen und Vorträge

11/2005	Washington, DC, USA: Annual meeting of the “Society for Neuroscience“ (Posterpräsentation)
04/2006	Teilnahme und Datenpräsentation auf dem Kick-off Meeting des BMBF-Förderschwerpunktes „Zellbasierte, regenerative Medizin“ (Posterpräsentation)
10/2007	European Student’s Conference (Vortrag)
10/2007	BCRT – Retreat (Vortrag)
06/2008	Berlin Neuroscience Forum (Posterpräsentation)
11/2008	Washington, DC, USA: Annual meeting of the “Society for Neuroscience“ (Posterpräsentation)
10/2009	BCRT – Retreat (Vortrag)

2. Publikationen

Petzold GC, **Scheibe F**, Braun JS, Freyer D, Priller J, Dirnagl U, Dreier JP et al. Nitric oxide modulates calcium entry through P/Q-type calcium channels and N-methyl-d-aspartate receptors in rat cortical neurons. *Brain Res.* 2005 Nov 23;1063(1):9-14

Rzeczinski S, Victorov IV, Lyjin AA, Aleksandrova OP, Harms C, Kronenberg G, Freyer D, **Scheibe F**, Priller J, Endres M, Dirnagl U. Roller culture of free-floating retinal slices: a new system of organotypic cultures of adult rat retina. *Ophthalmic Res.* 2006;38(5):263-9.

Scheibe F, Tucker AH, Prockop D, Priller J. Nonviral Gene Delivery of Erythropoietin by Mesenchymal Stromal Cells. (zur Veröffentlichung eingereicht).

Scheibe F, Klein O, Klose J, Priller J. Mesenchymal Stromal Cells rescue rat cortical neurons from apoptotic cell death in the oxygen-glucose deprivation model of ischemia. (Manuskript in Vorbereitung).

DANKSAGUNG

Für die langjährige Betreuung meiner Doktorarbeit und die Überlassung des Promotionsthemas möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Josef Priller sehr herzlich bedanken. Seine stete Diskussionsbereitschaft motivierte mich stets zur kritischen Hinterfragung meiner Arbeit und vertiefte mein wissenschaftliches Interesse. Durch sein Engagement wurde mir ein Forschungsaufenthalt am *Centre for Gene Therapy* der Tulane University in New Orleans, LA, USA ermöglicht. Dem Direktor des dortigen Institutes, Herrn Prof. Darwin Prockop, sowie dessen Mitarbeitern Alan Tucker, Benjamin Larson und Dina Gaupp gilt mein besonderer Dank. Sie haben mir bei der Charakterisierung der murinen MSC maßgeblich geholfen und haben mein Verständnis für die Biologie dieser Zellen erweitert.

Für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei der Karyotypisierung der mMSC danke ich Frau Prof. Dr. Heidemarie Neitzel aus dem Institut für Humangenetik der Charité.

Desweiteren danke ich allen Kollegen des Labors für Molekulare Psychiatrie und der Experimentellen Neurologie, die durch die angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Christel Bonnas und Dr. Chotima Böttcher.

Für die exzellente technische Unterstützung möchte ich mich im Speziellen bei Melanie Lange, Jasmin Jamal el-Din, Sonja Blumenau, Anna Hegele, Katharina Stohlmann und Sabine Cho bedanken.

Ganz besonders schätzte ich die zahlreichen Hilfestellungen und die Diskussionsbereitschaft von Frau Dr. Dorette Freyer. Dadurch konnte so manche Hürde und Tücke des Laboralltags viel leichter überwunden werden.

Darüber hinaus danke ich meinen Eltern, deren liebevolle Unterstützung und stete Ermutigung die Entstehung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Genetische Modifikationen Mesenchymaler Stromazellen des Knochenmarks und deren regeneratives Potential im Schlaganfallmodell“

selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar. Soweit fremde Abbildungen zur Illustration kopiert wurden, sind die Quellen angegeben, wie auch bei sonst verwendeten Hilfsmitteln und Literaturangaben.“

Berlin, den 04.03.2010

Franziska Scheibe