

**Regulation von Ionenkanälen und *Gap Junctions*
während der Zellentwicklung**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Nadine Saskia Dilger, M. Sc.

[2020]

Referent: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo
Korreferentin: Prof. Dr. Andrea Hoffmann
Tag der Promotion: 25.05.2020

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo, meinem Doktorvater, bedanken. Danke Anaclet, dass du mir die Arbeit an diesem so aktuellen und spannenden Forschungsthema ermöglicht und mich dabei unterstützt hast. In der Zeit bei dir habe ich viel lernen dürfen, unter anderem auch durch all den Freiraum, den du mir bei der Bearbeitung und Gestaltung meines Projektes gelassen hast. Danke, dass deine Tür immer offen war!

Prof. Dr. Andrea Hoffmann möchte ich dafür danken, dass sie sich bereiterklärt hat, Korreferentin meiner Dissertation zu sein. Darüber hinaus Andrea, danke ich dir von Herzen für deine fachlichen Rückmeldungen, die Isolierung und das zur Verfügung stellen der MSCs, vor allem aber für deine motivierenden und Mut machenden Worte zur richtigen Zeit, dein Wohlwollen und all deine Unterstützung.

Prof. Dr. Helge Küster danke ich, dass er freundlicherweise den Vorsitz der Promotionskommission übernehmen wird.

Ohne Geld geht bekanntermaßen nicht viel. Deshalb geht mein Dank an die DFG, über die ich im Rahmen des Projekts „Elektrodenoptimierung für Neuroprothesen“ (NG 4/10-1) finanziert war. Und da eben nicht immer alles genauso läuft, wie man es gerne hätte, geht auch ein herzlicher Dank an die Graduiertenakademie, die mich nach dem Ende des DFG-Projekts im Rahmen eines Promotionsabschlussstipendiums finanziell unterstützt hat.

Liebe Kollegen der Biophysik, wo soll ich nur anfangen? Ich danke euch für die wundervolle Arbeitsatmosphäre, das entstandene Vertrauen auch weit über die Arbeit hinaus, dass ihr mir über Unsicherheiten hinweggeholfen und mich motiviert habt, für geteilte Freude, Trost, die vielen gemeinsamen Stunden und das zusammen Lachen. Danke für die schöne Zeit mit euch großartigen Menschen!

Insbesondere danke ich den unverzichtbaren Sekretärinnen Bettina, Andrea und Merle für alle administrativen Angelegenheiten und ihren Einsatz und Unterstützung weit über ihre Pflichten hinaus. Ich danke den technischen Assistentinnen Heidi, Ingrid und Helma, ohne die ich so manches Mal ziemlich aufgeschmissen gewesen wäre, und Frank, dem besten Feinmechaniker und Würstchen-Grillmeister, den ich kenne. Meine lieben Bachelorstudentinnen Anna-Lena und Klaudia, euch danke ich von Herzen für euren Wissensdurst, eure immerwährende Motivation und eure Bereitschaft zu gewissenhafter und selbständiger Arbeit. Klaudia, ich danke dir so sehr für all deine Stunden HiWi-Arbeit bei und mit mir! Es ist so viel schöner, nicht allein zu bangen, zu hoffen und sich zu freuen, wenn es schlussendlich dann doch funktioniert. Durch euch stand ich diesem riesigen Projekt weniger allein gegenüber. Ihr werdet euren Weg gehen. Da bin ich überzeugt von!

Liebe Anne, liebe Fred und liebe Anne, ich danke euch über alles für all euren Rat, die vielen Diskussionen, Krisensitzungen, Treffen außerhalb der Uni und die gegenseitige Unterstützung in allen Lebenslagen. Eure Freundschaft bedeutet mir unendlich viel!

Wo etwas zu Ende geht, beginnt auch immer etwas Neues. Und mit diesem Neuen habe ich riesiges Glück. Liebe Kollegen der Zellbiologie, ich danke euch so sehr für eure mir entgegengebrachte Offenheit, eure Unterstützung und eure Freundschaft. Ich freue mich sehr auf die kommenden Jahre mit euch!

Liebe Connie, ich danke dir von Herzen für dein Vertrauen in mich, deine Geduld, vor allem, was die Fertigstellung dieser Arbeit angeht, und die Wertschätzung, die du mir und meiner Arbeit entgegenbringst. Das war und ist viel wertvoller für mich als du vielleicht vermuten würdest.

Lieber Jörg, lieber Bachchor, lieber Figuralchor, danke für all die hingebungsvollen Stunden mit so wundervoller Musik, in denen ich alles andere so gut wie sonst nirgends ausblenden konnte. Daraus konnte ich sehr viel neue Kraft schöpfen.

Meine liebe Familie! Ohne euch wäre ich nicht hier. Eure uneingeschränkte Unterstützung bei diesem klitzekleinen Großprojekt, euer Zuhören, so manches stundenlange Telefonat und all die schönen Stunden in eurer Nähe haben mich so oft gestärkt, wiederaufgebaut, motiviert und stolz gemacht. Das war soooo wichtig für mich!

Mein wärmster Dank geht an dich, liebster Patrik. Ich bin dir so unendlich dankbar für all deine Unterstützung, den Halt, den du mir gibst, deine Fürsorge, deinen Glauben an mich und all die Freude, die wir miteinander teilen können. Danke, dass es dich gibt!

Danke!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	2
1 Einleitung	3
1.1 Mesenchymale Stamm-/Stromazellen.....	3
1.1.1 Definition und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen	4
1.2 Neuronen.....	5
1.2.1 Aktionspotentiale.....	6
1.2.2 Synapsen.....	7
1.3 <i>Gap Junctions</i>	8
1.3.1 <i>Gap Junction</i> -Halbkanäle	9
1.3.2 <i>Gap Junctions</i> und Connexine in MSCs	11
1.3.3 <i>Gap Junctions</i> und Connexine in neuronalen Zellen.....	11
1.4 Purinerge P2-Rezeptoren	12
1.4.1 Ionotrope P2X-Rezeptoren	13
1.4.2 Metabotrope P2Y-Rezeptoren und ihre physiologische Vielfalt.....	13
1.4.3 Purinerge P2-Rezeptoren in MSCs	14
1.4.4 Purinerge P2-Rezeptoren in neuronalen Zellen.....	16
1.5 Transdifferenzierung	17
1.5.1 Transdifferenzierung mit <i>small molecules</i>	18
1.5.2 Neuronale <i>small molecule</i> -induzierte Transdifferenzierung von MSCs.....	20
1.5.3 Kriterien zum Nachweis einer neuronalen Transdifferenzierung.....	21
1.6 Zielsetzung.....	22

2	Methoden.....	23
2.1	Zellbiologische Methoden.....	23
2.1.1	Zellkultur.....	23
2.1.2	Neuronale Differenzierung von MSCs.....	23
2.1.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	25
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.1	Klonieren eines shRNA-kodierenden Plasmids.....	25
2.2.2	RNA-Isolierung.....	31
2.2.3	cDNA-Synthese.....	31
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.2.5	qRT-PCR.....	32
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.3.1	Protein-Isolierung.....	33
2.3.2	Proteinquantifizierung mittels Bradford-Assay.....	33
2.3.3	SDS-PAGE.....	34
2.3.4	Western-Blot.....	34
2.4	Physiologische Methoden.....	35
2.4.1	<i>Patch-Clamp</i> -Technik.....	35
2.4.2	Zellkopplungsversuche mittels Farbstofftransfer.....	36
2.4.3	Ca^{2+} - <i>Imaging</i>	37
2.4.4	Farbstoffaufnahme-Experimente.....	40
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Charakterisierung von MSCs: Genexpression wichtiger Faktoren.....	43
3.2	Neuronale Transdifferenzierung von MSCs.....	46
3.2.1	shRNA-vermittelter <i>Knockdown</i> von PTBP1 in MSCs.....	46
3.2.2	Charakterisierung der <i>small molecule</i> -basierten Differenzierung von MSCs.....	48
3.3	<i>Gap Junctions</i> in <i>small molecule</i> -induzierten MSCs.....	59

3.3.1	<i>Gap Junction</i> -vermittelte Zellkommunikation in induzierten MSCs	59
3.3.2	Connexin-Expression in induzierten MSCs	63
3.3.3	Einfluss der <i>Gap Junction</i> -Kopplung auf die neuronale Differenzierung	66
3.4	Purinerge Rezeptoren in <i>small molecule</i> -induzierten MSCs	69
3.4.1	ATP-vermittelte Calcium-Signale in induzierten MSCs	69
3.4.2	Expression purinergere Rezeptoren nach Induktion mit <i>small molecules</i>	80
4	Diskussion	82
4.1	Molekularbiologische und physiologische Eigenschaften von MSCs	82
4.2	Neuronale Transdifferenzierung von MSCs	85
4.2.1	shRNA-vermittelter <i>Knockdown</i> von PTBP1 in MSCs	85
4.2.2	Charakterisierung der <i>small molecule</i> -basierten Differenzierung von MSCs	87
4.3	<i>Gap Junctions</i> in <i>small molecule</i> -induzierten MSCs	95
4.3.1	<i>Gap Junction</i> -vermittelte Zellkommunikation in induzierten MSCs	96
4.3.2	Einfluss der <i>Gap Junction</i> -Kopplung auf die neuronale Differenzierung	100
4.4	Purinerge Rezeptoren in <i>small molecule</i> -induzierten MSCs	101
4.4.1	P2X-Rezeptoren in <i>small molecule</i> -induzierten MSCs	103
4.4.2	P2Y-Rezeptoren in <i>small molecule</i> -induzierten MSCs	105
4.5	Zusammenfassung und Ausblick	108
5	Literaturverzeichnis	111
6	Anhang	136
6.1	Zusätzliche Informationen	136
6.2	Zusätzliche Daten	137
6.2.1	ATP-induzierte Ca ²⁺ -Signale unter Anwesenheit von U-73122	137
6.2.2	ATP-induzierte Ca ²⁺ -Signale unter Anwesenheit von 2-APB	138
6.3	Material	140
	Lebenslauf	150
	Publikationsliste	151

Abkürzungsverzeichnis

Ø	ohne; kein
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
AU	nicht spezifizierete Einheit (engl.: <i>arbitrary unit</i>)
BDNF	dem Gehirn entstammender neurotropher Faktor (engl.: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BSA	Rinder-Serumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Calciumionen
CMV	Cytomegalievirus
Cx	Connexin
cDNA	komplementäre (engl.: <i>complementary</i>) DNA
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FCS	fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FGF	fibroblastoider Wachstumsfaktor (engl.: <i>fibroblast growth factor</i>)
G-418	Geneticin
GDNF	Gliazellen entstammender neurotropher Faktor (engl.: <i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KanR	Kanamycin-Resistenz
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> -Medium
M13	Bakteriophage M13
MAT	Maturationsmedium nach Hu <i>et al.</i> (2015)
MSCs	Mesenchymale Stamm-/Stromazellen
NeoR	Neomycin-Resistenz (vermittelt über Neomycin-Protein)
Nestin	Neuro-epitheliales Stammzell-Intermediärfilament (engl.: <i>neuro-epithelial stem cell intermediate filament</i>)
NeuroM	neuronaes Wachstumsmedium nach Hu <i>et al.</i> (2015)
NIM	neuronaes Induktionsmedium
NIM-1	neuronaes Induktionsmedium 1 nach Bi <i>et al.</i> (2010)
NIM-2	neuronaes Induktionsmedium 2 nach Aguilera-Castrejon <i>et al.</i> (2017)

NIM-3	neuronaies Induktionsmedium 3 nach Hu <i>et al.</i> (2015)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PTBP1	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -PCR
RA	all- <i>trans</i> -Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RS	Referenzstimulierung
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>small hairpin</i> -RNA
SOC-Medium	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression Medium</i>
SV40	Simian-Virus 40
U-73122	Inhibitor für die PLC
upm	Umdrehungen pro Minute
VPA	Valproinsäure
XL10-Gold	Stammbezeichnung der verwendeten kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Plasmidkarte des Plasmids pEGFP-U6_anti-PTBP1-shRNA	26
Abbildung 2: Anti-PTBP1-shRNA-Sequenz TRCN0000231420	27
Abbildung 3: Fließschema des in OriginPro 2017 verwendeten Makros zur Peakanalyse	39
Abbildung 4: Schematische Abbildung einer Farbstoffaufnahmemessung.....	41
Abbildung 5: Expressionsmuster auf mRNA-Ebene in humanen MSCs aus dem Knochenmark.....	44
Abbildung 6: <i>Gap Junction</i> -Kopplung in MSCs	45
Abbildung 7: Elektrophysiologische Eigenschaften humaner MSCs	45
Abbildung 8: Repetitive Ca ²⁺ -Signale als Antwort auf wiederholten ATP-Stimulus in humanen MSCs	46
Abbildung 9: Morphologie anti-PTBP1-shRNA-transfizierter MSCs	47
Abbildung 10: Elektrophysiologische Eigenschaften anti-PTBP1-shRNA-transfizierter MSCs	48
Abbildung 11: Morphologische Entwicklung während der <i>small molecule</i> -basierten neuronalen Induktion nach Hu <i>et al.</i> (2015)	49
Abbildung 12: Elektrophysiologische Eigenschaften von induzierten neuronalen Zellen nach der Differenzierung nach Hu <i>et al.</i> (2015)	50
Abbildung 13: Elektrophysiologische Eigenschaften von induzierten neuronalen Zellen durch die alleinige Induktion durch NIM-3	51
Abbildung 14: Morphologische Entwicklung während der <i>small molecule</i> -basierten neuronalen Induktion mit NIM-1 und NIM-2.....	52
Abbildung 15: Elektrophysiologische Eigenschaften NIM-1-differenzierter MSCs.....	53
Abbildung 16: Elektrophysiologische Eigenschaften NIM-2-induzierter MSCs.	53
Abbildung 17: Relative Genexpression von MSC- und neuronalen Markern nach NIM-1- und NIM-2- Induktion.....	55
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung der neuronalen Marker Tuj1, Nestin, MAP-2 und NeuN in unbehandelten und induzierten MSCs.....	56
Abbildung 19: Proteinexpression der neuronalen Marker NeuN und Tuj1 in unbehandelten und induzierten MSCs.....	57
Abbildung 20: Expressionsanalyse der muskulären Marker <i>ACTA2</i> , <i>TAGLN</i> , <i>MYL2</i> und <i>SMYD1</i> in unbehandelten und induzierten MSCs.....	58
Abbildung 21: Analyse der <i>Gap Junction</i> -abhängigen Zell-Zellkopplung mittels Farbstofftransfer- Experimenten	60
Abbildung 22: Quantifizierung der Farbstofftransfer-Experimente.....	61
Abbildung 23: Analyse von <i>Gap Junction</i> -Halbkanälen mittels Farbstoffaufnahme-Experimenten	62
Abbildung 24: Relative Genexpression der <i>Gap Junction</i> -bildenden Connexine	64
Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung der <i>Gap Junction</i> -bildenden Connexine.....	65

Abbildung 26: Proteinexpression der Connexine Cx26, Cx43 und Cx45	66
Abbildung 27: Relative Genexpression von MSC- und neuronalen Markern unter Zusatz von CBX während der Induktion mit NIM-2	67
Abbildung 28: Relative Genexpression von Connexinen unter Zusatz von CBX während der Induktion mit NIM-2	68
Abbildung 29: Repetitive Ca ²⁺ -Signale als Antwort auf wiederholte Stimuli mit 50 µM ATP	70
Abbildung 30: Intrazelluläre Ca ²⁺ -Signale unter Anwesenheit des PLC-Inhibitors U-73122	74
Abbildung 31: Reaktionsintensität bei ATP-Stimulierung unter Anwesenheit des PLC-Inhibitors U-73122	75
Abbildung 32: Intrazelluläre Ca ²⁺ -Signale unter Anwesenheit des IP ₃ -Rezeptor-Inhibitors 2-APB	78
Abbildung 33: Reaktionsintensität bei ATP-Stimulierung unter Anwesenheit des IP ₃ -Rezeptor-Inhibitors 2-APB	79
Abbildung 34: Relative Genexpression purinerger Rezeptoren in MSCs und NIM-2-differenzierten Zellen	81
Abbildung 35: Anzahl der auf ATP-Stimulierung reagierenden Zellen unter Anwesenheit des PLC-Inhibitors U-73122	138
Abbildung 36: Anzahl der auf ATP-Stimulierung reagierenden Zellen unter Anwesenheit des IP ₃ -Rezeptor-Inhibitors 2-APB	140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligo- <i>Annealing</i> -Reaktionsansatz	27
Tabelle 2: Restriktionsverdau mit MssI.....	28
Tabelle 3: Restriktionsverdau mit EcoRI	28
Tabelle 4: Reaktionsansatz für Glykogenfällung.....	29
Tabelle 5: Reaktionsansatz für PEG-Fällung.....	29
Tabelle 6: Ligations-Reaktionsansatz.....	30
Tabelle 7: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamid-Gele.....	34
Tabelle 8: Gen- und Proteinnamenäquivalente.....	136
Tabelle 9: qRT-PCR-Primer.....	140
Tabelle 10: Antikörper	142
Tabelle 11: Geräte	143
Tabelle 12: Medien, Puffer und Lösungen	144
Tabelle 13: Chemikalien, Enzyme und Kits	148
Tabelle 14: Verbrauchsmaterial	149
Tabelle 15: Verwendete Software	149

Zusammenfassung

Humanes neuronales Zellmaterial wird für die regenerative Medizin sowie physiologische und pharmakologische Studien dringend benötigt, ist aber sehr eingeschränkt verfügbar. Es wurden deshalb bereits verschiedene Ansätze entwickelt, neuronale Zellen aus gut zugänglichen und *in vitro* vermehrbaren Zellen zu transdifferenzieren und damit ein neuronales Zellmodell zu kreieren. Für ein aussagekräftiges Zellmodell ist es allerdings notwendig, die generierten Zellen, wie auch das Ausgangszellmaterial, exakt zu kennen und den neuronalen Entwicklungsstand nach der Differenzierung möglichst präzise einordnen zu können.

Sowohl Ionenkanäle als auch *Gap Junctions* sind für die Integration, Funktion und Entwicklung von Zellen in ein Gewebe essenziell, da sie die inter- und intrazelluläre Signalgebung und somit auch die Zellkommunikation sowie Differenzierung maßgeblich beeinflussen, so auch in neuronalem Gewebe. Ziel dieser Dissertation war deshalb die Untersuchung der Regulation von Ionenkanälen und *Gap Junctions* während der Zellentwicklung am *in vitro*-Modell neuronal transdifferenzierter humaner MSCs aus dem Knochenmark.

Die unbehandelten MSCs exprimierten die charakteristischen MSC-Marker CD73, CD90, CD105 und CD166 wie auch den neuronalen Marker Tuj1. Während der neuronalen *small molecule*-induzierten Transdifferenzierungen wurden die MSC-Marker signifikant herunterreguliert und die Expression von Tuj1 gesteigert. Die neuronal transdifferenzierten Zellen entwickelten zudem eine elektrische Erregbarkeit und konnten einzelne Aktionspotentiale erzeugen. In den MSCs und den neuronal differenzierten Zellen konnten verschiedene Isoformen der *Gap Junction*-bildenden Connexine nachgewiesen werden, wobei sich das Expressionsmuster durch die Differenzierung veränderte. Die in den MSCs starke *Gap Junction*-vermittelte Zellkopplung war in den transdifferenzierten Zellen fast vollständig unterdrückt, wobei die Aktivität von *Gap Junction*-Halbkanälen gesteigert war. Bei einer extrazellulären Zugabe des Neurotransmitters ATP reagierten sowohl die MSCs als auch die induzierten neuronalen Zellen mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen, wobei die Reaktionsfähigkeit der MSCs dabei insgesamt höher war. Das Ca^{2+} -Signal in den MSCs wurde vor allem durch die metabotropen P2Y-Rezeptoren und geringfügig durch die ionotropen P2X-Rezeptoren determiniert. Die Aktivität der P2Y-Rezeptoren wurde durch die neuronale Transdifferenzierung deutlich verringert.

Die Analyse verschiedener Marker und die physiologische Charakterisierung der neuronal induzierten Zellen ließen auf eine induzierte Entwicklung unreifer Neuronen oder neuronaler Stamm- oder Vorläuferzellen schließen, die für die Verwendung als neuronales Zellmodell durchaus vielversprechend sind.

Schlagnworte: Mesenchymale Stamm-/Stromazellen, neuronale Transdifferenzierung, small molecules, *Gap Junctions*, purinerge P2-Rezeptoren

Abstract

Human neuronal cell material is highly needed for regenerative medicine as well as for physiological and pharmacological studies but has a very limited availability. Different approaches have been developed to transdifferentiate well-accessible and *in vitro* expandable cells into neuronal cells, thereby creating a neuronal cell model. To establish a sophisticated model it is imperative to know the evolved as well as the initial cells in detail and to be able to precisely assess the neuronal developmental state after differentiation.

Ion channels as well as gap junctions are essential for integration, function and development of cells in tissue, as they strongly influence the inter- and intracellular signalling. Thus, they affect cell communication and differentiation as well, also in neuronal tissue. The aim of this dissertation was to examine the regulation of ion channels and gap junctions during cell development on the *in vitro* model of neuronal transdifferentiated bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells (MSCs).

Untreated MSCs express the characteristic MSC markers CD73, CD90, CD105 and CD166 as well as the neuronal marker Tuj1. During small molecule-induced neuronal transdifferentiation the MSC markers were significantly down-regulated while Tuj1 was up-regulated. The neuronal transdifferentiated cells developed an electrical excitability and were able to evoke single action potentials. In MSCs as well as in the differentiated cells different isoforms of the gap junction-building connexins could be detected, whereby the expression pattern changed during differentiation. The strong gap junction coupling of the MSCs was nearly completely suppressed in the transdifferentiated cells whereas these cells showed an enhanced gap junction hemichannel activity. Upon extracellular stimulation with the neurotransmitter ATP the MSCs as well as the induced neuronal cells reacted by provoking intracellular Ca^{2+} signals. In MSCs, the response capacity was higher than in the neuronal cells and the Ca^{2+} signal was mainly determined by metabotropic P2Y-receptors and only slightly by ionotropic P2X-receptors. The activity of the P2Y-receptors was significantly reduced during neuronal transdifferentiation of the MSCs.

Analysing different markers and physiologically characterising the neuronal induced cells leads to the conclusion that immature neurons or neuronal stem and progenitor cells have been developed, which appear promising concerning their use as a neuronal cell model.

Keywords: Mesenchymal stem/stromal cells, neuronal transdifferentiation, small molecules, gap junctions, purinergic P2-receptors

1 Einleitung

„The study of these mesenchymal stem cells, whether isolated from embryos or adults, provides the basis for the emergence of a new therapeutic technology of self-cell repair” (Caplan, 1991).

„Die Untersuchung dieser mesenchymalen Stammzellen, ob aus Embryos oder Erwachsenen isoliert, schafft die Basis für die Entstehung einer neuen therapeutischen Technologie der Erneuerung mit körpereigenen Zellen“ (übersetzt nach Caplan, 1991).

Heute, knapp 30 Jahre später, können wir uns sicher sein, dass Arnold I. Caplan mit dieser Aussage nicht richtiger hätte liegen können. In Zeiten immerfort neu aufkommender regenerativer Zell- und Gewebeerneuerungsstrategien spielen die mesenchymalen Stammzellen (MSCs), wie auch andere adulte Stammzelltypen, eine tragende Rolle. Was Caplan damals noch nicht ahnte, war, dass sich Forscher weltweit nicht auf die Anwendung der MSCs zur Reparatur von skelettalem Gewebe beschränken würden, worin aus seiner Sicht das große Potential dieser Zellen lag, sondern zusätzlich Differenzierungen von somatischen Zellen in Zellen anderer Keimblätter beschrieben. Die daraus resultierenden Möglichkeiten sowohl für die regenerative Medizin als auch für die zell- und entwicklungsbiologische Grundlagenforschung scheinen kaum limitiert zu sein. Die bekannten Vorgänge in der Zellentwicklung präsentieren sich also längst nicht mehr als so geradlinig, wie es vor einigen Jahrzehnten noch schien. Maßgeblich beeinflusst wurde dieses neue Bild durch die Entdeckung induzierter pluripotenter Stammzellen (Takahashi und Yamanaka, 2006), für die Shinya Yamanaka im Jahr 2012 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. In Anbetracht dieser neuen vielfältigen Möglichkeiten ist ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen und physiologischen Veränderungen während der Zellentwicklung unabdingbar.

Um die zelluläre Entwicklung zu induzieren und während ihres Voranschreitens zu regulieren, ist die Zellkommunikation von essenzieller Bedeutung. Eine solche Zellkommunikation kann entweder durch einen direkten Zellkontakt, über sogenannte *Gap Junctions*, oder durch die Kommunikation über Botenstoffe unter Beteiligung zellulärer Rezeptoren und Ionenkanäle ermöglicht werden. Diese Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Regulation von Ionenkanälen und *Gap Junctions* während der Zellentwicklung, die dabei am Beispiel einer Transdifferenzierung von humanen MSCs zu neuronalen Zellen untersucht wird.

1.1 Mesenchymale Stamm-/Stromazellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die in der Lage sind, sich selbst zu erneuern und sich in andere Zelltypen zu differenzieren. Dabei unterscheidet man totipotente, pluripotente sowie multipotente Stammzellen. Während totipotente Zellen in der Lage sind, unter geeigneten Bedingungen einen vollständigen Organismus hervorzubringen, können pluripotente Stammzellen in Zellen aller embryonalen Keimblätter, das Ektoderm, Endoderm und Mesoderm differenzieren. Eine weitere

Klassifizierung von Stammzellen ist die Einteilung in embryonale und adulte Stammzellen, wobei pluripotente embryonale Stammzellen aus der Blastozyste und multipotente adulte Stammzellen aus einem postnatalen Organismus isoliert werden (Fortier, 2005).

Mesenchymale Stamm-/Stromazellen gehören zu den adulten Stammzellen und sind somit multipotent. Sie entstammen dem Mesoderm und können *in vivo* und *in vitro* zu mesenchymalem Gewebe wie Knochen, Knorpel, Muskeln oder auch zu Fettzellen differenzieren (Pittenger *et al.*, 1999). Die MSCs wurden als nicht-hämatopoetische Stammzellen erstmals im Knochenmark gefunden, wo sie sich zusammen mit hämatopoetischen Stammzellen in einer spezialisierten Stammzellnische befinden (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010), und konnten erfolgreich *in vitro* kultiviert werden (Friedenstein *et al.*, 1970). Inzwischen sind allerdings diverse Quellen für die Isolierung von MSCs bekannt. So konnten diese unter anderem aus Nabelschnurblut (Lee *et al.*, 2004), der Nabelvene (Covas *et al.*, 2003), Fettgewebe (Zuk *et al.*, 2001), der Zahnpulpa (Poltavtseva *et al.*, 2014) oder der Synovialmembran (Bari *et al.*, 2001) gewonnen werden. Aus dem aspirierten oder ausgeschabten Knochenmark werden die MSCs durch verschiedene Verfahren isoliert. Eine der gängigsten Methoden ist die Dichtegradientenzentrifugation, bei der die mononuklearen Zellen, zu denen auch die MSCs gehören, von Erythrozyten separiert werden. In der folgenden *in vitro*-Kultivierung werden die adhären MSCs durch Medienwechsel von nicht-adhären Zellen, wie beispielsweise hämatopoetischen Stammzellen, separiert (Pittenger *et al.*, 1999; Gnechi und Melo, 2009). In Kultur nehmen die MSCs eine spindelartige fibroblastoide Morphologie an und richten sich bei einer ausreichend hohen Zelldichte aneinander aus, sodass wellenartige Strukturen entstehen (Silva *et al.*, 2003).

Der Name der MSCs als „mesenchymale Stammzellen“ wurde von Caplan (1991) geprägt. 2005 positionierte sich die *International Society for Cellular Therapy* zu dem Thema und bezeichnete die MSCs als multipotente mesenchymale Stromazellen (Horwitz *et al.*, 2005). Da Caplan später jedoch Zweifel bezüglich ihres tatsächlichen Stammzellcharakters kamen, schlug er vor, den Namen erneut zu ändern und die MSCs als *Medicinal Signaling Cells* zu bezeichnen (Caplan, 2017). Bis zum jetzigen Zeitpunkt hat sich diese Nomenklatur nicht durchsetzen können.

1.1.1 Definition und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen

Die Isolierung von MSCs aus verschiedensten Gewebetypen und Spendern verschiedenen Alters und Geschlechts, wie auch stark abweichende *in vitro*-Kulturbedingungen, führen zu einer großen Heterogenität der erhaltenen Zellpopulation bezüglich der Expression von Markern, der Morphologie, der Wachstumsrate und ihres Differenzierungspotentials (Vogel *et al.*, 2003; Le Blanc und Pittenger, 2005; Ho *et al.*, 2008; Phinney, 2012; Lv *et al.*, 2014). Um trotz großer Vielfalt an MSCs eine einheitliche Basis für die Definition von humanen MSCs zu schaffen, gab die *International Society for Cellular Therapy* minimale Kriterien zu deren Identifikation heraus (Dominici *et al.*, 2006). Diese minimalen Kriterien beinhalten das adhären Wachstum der MSCs auf Zellkulturplastik und sowohl die Expression ($\geq 95\%$) der Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 als auch die Abwesenheit ($\leq 2\%$ positiv) der Oberflächenantigene CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 und HLA Klasse

II. Als weiteres Kriterium benennen Dominici *et al.* (2006) die Fähigkeit der MSCs, sich unter Standard-*in vitro*-Bedingungen in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren. Sie betonen, dass es sich bei diesen Punkten um minimale Kriterien handle und empfehlen die Untersuchung weiterer Oberflächenmarker zur genaueren Charakterisierung von MSCs.

CD73 ist eine auf der Zelloberfläche der MSCs exprimierte Ektonukleotidase, die AMP zu Adenosin abbaut, das wiederum Adenosinrezeptoren an Zelloberflächen stimulieren und somit Signale autokrin oder parakrin an Zellen übermitteln kann. Auf diese Weise kann sowohl die Proliferation als auch die osteogene, chondrogene und adipogene Entwicklung der MSCs sowie ihre Wechselwirkung mit anderen Zelltypen beeinflusst werden (Katebi *et al.*, 2009; Gharibi *et al.*, 2011; Ode *et al.*, 2013). CD90 (Thy-1) ist ein Glykoprotein auf der Zelloberfläche von MSCs. Über seine Funktionen wird derzeit noch viel spekuliert. Während es in Fibroblasten bei der Zellmigration, der Organisation des Zytoskeletts und der Fokaladhäsion eine Rolle zu spielen scheint (Barker *et al.*, 2004), werden ihm in MSCs eher eine gewisse Einflussnahme bei der Förderung der Selbsterneuerung und Differenzierung zugeschrieben (Maleki *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2016; Saalbach und Anderegg, 2019). CD105 (Endoglin) ist bezüglich der Differenzierung von MSCs ebenfalls relevant. So fördert die reduzierte Expression von CD105 das chondrogene Differenzierungspotential (Fan *et al.*, 2016; Izgi *et al.*, 2017), während eine erhöhte CD105-Synthese die Osteogenese von MSCs begünstigt (Levi *et al.*, 2011).

1.2 Neuronen

Neuronen sind erregbare Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, die Signale verarbeiten und in Form von elektrischen Signalen, den Aktionspotentialen (Abschnitt 1.2.1), oder ausgeschütteten Neurotransmittern an andere Zellen übermitteln. Untereinander bilden sie ein neuronales Netzwerk aus, in dem ein Neuron gleichzeitig mit tausenden weiteren Neuronen in Kontakt stehen kann. Die weiterzuleitenden Signale werden dabei an Synapsen (Abschnitt 1.2.2) von der präsynaptischen an die postsynaptische Zelle übermittelt. (Hammond, 2014).

So wie es viele verschiedene Typen an Neuronen gibt, so unterscheidet sich auch ihre Morphologie in einem gewissen Rahmen. Gemeinsam ist allen Neuronen aber ihre zelluläre Polarisierung und ihr Aufbau aus einem Zellkörper (Soma), einem verästelten Baum aus Dendriten und einem Axon. An den Dendriten erreichen diverse Signale die Zelle, die anschließend im Soma verarbeitet werden. Dort wird gegebenenfalls, je nach Ergebnis der Verarbeitung, ein Aktionspotential ausgelöst, welches das Axon hinunter geleitet wird und an dessen Ende an eine postsynaptische Zelle übermittelt wird. Neuronen können sowohl sehr regional Signale weitergeben als auch weite Distanzen überwinden, wobei mithilfe einer saltatorischen Reizweiterleitung die Geschwindigkeit der Weiterleitung stark erhöht werden kann (Hammond, 2014).

Eine Besonderheit von Neuronen ist, dass sie während ihrer Differenzierung den Zellzyklus verlassen und nicht mehr proliferieren (Herrup und Yang, 2007). Aus diesem Grund müssen Neuronen auch im adulten Organismus bei Bedarf neu differenziert werden. In dem Prozess der Neurogenese entwickeln sie sich aus neuronalen Stammzellen, welche sich in multizellulären neurogenen Nischen befinden

(Doetsch *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2008). In dieser Mikroumgebung werden sowohl die Selbsterneuerung als auch die Regulation und Induktion der Differenzierung zu Neuronen unter anderem von Astrozyten sowie von reifen Neuronen beeinflusst (Song *et al.*, 2002; Deisseroth *et al.*, 2004; Pardal und López Barneo, 2016). Das kann über direkte Zell-Zellkontakte oder parakrine Signalwege erfolgen. Während der Neurogenese entwickeln sich die neuronalen Stammzellen zu den etwas weiter differenzierten *transit-amplifying progenitors* (TAPs), aus denen im weiteren Verlauf Neuroblasten hervorgehen. Diese entwickeln sich zunächst zu immaturren und schließlich durch weitere Reifung zu maturen Neuronen (Kempermann *et al.*, 2015; Liu und Song, 2016).

1.2.1 Aktionspotentiale

Eine der wichtigsten Eigenschaften von Neuronen ist ihre Fähigkeit elektrische Signale in Form von Aktionspotentialen zu erzeugen und diese mit sehr hoher Geschwindigkeit (bis zu 100 m/s) über große Distanzen weiterzuleiten. Ein Signal kann dabei von einem Neuron entweder direkt elektrisch empfangen werden oder es erreicht die Zelle als chemisches Signal und wird dort in ein elektrisches Signal, ein Aktionspotential, übersetzt. Das Ruhemembranpotential von Neuronen liegt bei ungefähr -70 mV. Zum Auslösen eines Aktionspotentials muss es sowohl bei einer elektrischen als auch bei einer chemischen Stimulierung zunächst zu einer Depolarisation der Zellmembran kommen. Wird dabei ein Schwellenwert des Membranpotentials U_m von ungefähr -40 mV überschritten, kommt es zum Öffnen spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle, sodass sich die Permeabilität P für Na^+ -Ionen stark erhöht. Da die extrazelluläre Na^+ -Konzentration um ein Vielfaches höher ist als die Konzentration in der Zelle, kommt es zu einer weiteren Depolarisation der Zellmembran, also zur Erhöhung des Membranpotentials U_m , wie aus der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung ersichtlich wird.

$$U_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+}[K^+]_e + P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_e}$$

Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung. U_m : Membranpotential, R : Allgemeine Gaskonstante, T : Temperatur in Kelvin, F : Faraday-Konstante, P : Membranpermeabilität des als Index dargestellten Ions, die Darstellung des Ionensymbols in eckigen Klammern bezeichnet die Konzentration dieses Ions im intrazellulären (i) bzw. extrazellulären (e) Raum.

Während dieser depolarisierenden Phase des Aktionspotentials kann das Membranpotential deutlich über 0 mV „hinausschießen“ (*overshooting*). Nach einer Offenzeit der Na^+ -Kanäle von nur ungefähr 1 ms kommt es zu deren Inaktivierung, wobei die Kanäle von innen verschlossen werden, ohne dass sich die Pore in der Membran schließt. Dieser inaktive Zustand ist also von dem geschlossenen Zustand der Kanäle zu unterscheiden und verhindert für eine gewisse Zeit ein weiteres Öffnen. Auf diese Weise wird das weiterzuleitende Signal gerichtet transportiert.

Durch die Inaktivierung der Na^+ -Kanäle kommt es zu einer Repolarisation der Zellmembran, die dadurch unterstützt wird, dass die vorherige Depolarisation spannungssensitive K^+ -Kanäle aktiviert hat, die sich nun während der Inaktivierung der Na^+ -Kanäle ebenfalls öffnen. Da K^+ -Ionen in der Zelle

deutlich höher konzentriert sind als außerhalb, führt die erhöhte Permeabilität P für K^+ zu einer Reduktion des Membranpotentials (herzuleiten aus der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung). K^+ -Kanäle haben eine deutlich längere Offenzeit, sodass es nach der Repolarisation kurzfristig zu einer leichten Hyperpolarisation der Zellmembran kommt, da zu diesem Zeitpunkt die Na^+ -Kanäle noch inaktiviert und die K^+ -Kanäle offen sind. Erst wenn die K^+ -Kanäle wieder geschlossen sind, erreicht die Zelle erneut ihr Ruhemembranpotential (Hodgkin und Huxley, 1952; Barnett und Larkman, 2007). Das Erreichen und die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials wird zudem maßgeblich durch einwärts gerichtete K^+ -Kanäle gefördert (Oliver *et al.*, 2000).

Aktionspotentiale sind in allen erregbaren Zellen individuell, wozu unter anderem die hohe Vielfalt an Na^+ - und K^+ -Ionenkanälen beiträgt. Auch verschiedene Neuronentypen unterscheiden sich in der Art ihrer ausgelösten Aktionspotentiale teilweise stark in der Amplitude, Dauer und Frequenz des Signals (Barnett und Larkman, 2007; Hammond, 2014).

1.2.2 Synapsen

Die interzelluläre Weitergabe von Signalen in neuronalem Gewebe findet vor allem an Synapsen statt. Dabei werden elektrische und chemische Synapsen unterschieden, die auf vielfältige Weise kombiniert in einer Synapse vorliegen und eng miteinander interagieren können (Pereda, 2014). Entgegen früherer Kontroversen, ob elektrische Synapsen überhaupt existieren, gibt es inzwischen zahlreiche Belege, dass sie in Säugetiergehirnen weit verbreitet sind (Galarreta und Hestrin, 1999, 2001a; Connors und Long, 2004). Allen Synapsen ist gemeinsam, dass sie aus einer präsynaptischen Zelle, von der das Signal übermittelt wird, und einer postsynaptischen Zelle, die das Signal empfängt, bestehen. Diese beiden Zellen sind durch den sogenannten synaptischen Spalt voneinander getrennt (Bennett, 1999; Hormuzdi *et al.*, 2004).

In chemischen Synapsen hat der synaptische Spalt eine Größenordnung von 20-40 nm. Erreicht ein Aktionspotential die präsynaptische Zelle, so öffnen sich spannungssensitive Ionenkanäle wie zum Beispiel spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, sodass es zu einem Ioneneinstrom in die Zelle kommt. Auf diese Weise wird das zuvor elektrische Signal in ein chemisches übersetzt. Ca^{2+} wirkt in der Zelle als sekundärer Botenstoff und induziert die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Die Neurotransmitter können dann an entsprechende ionotrope oder metabotrope Rezeptoren an der Zellmembran der postsynaptischen Zelle binden, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden können. Diese Signalkaskaden können beispielsweise dazu führen, dass die intrazelluläre Genexpression auf die aktuelle Situation angepasst wird. Bei ionotropen Rezeptoren handelt es sich häufig um unspezifische Kationenkanäle. Deren Öffnung führt zu einer erhöhten Membran-Permeabilität für Na^+ - und K^+ -Ionen und somit zu einer Veränderung des Membranpotentials. Wird dabei ein Schwellenwert von -40 mV erreicht, kann ein Aktionspotential ausgelöst werden und so das zuvor chemische Signal wieder in ein elektrisches Signal übersetzt und an die nächste Zelle weitergegeben werden (Hormuzdi *et al.*, 2004; Pereda, 2014).

In elektrischen Synapsen findet keine derartige Übersetzung des Signals statt. Durch eine direkte zytoplasmatische Verbindung der prä- und postsynaptischen Zelle über sogenannte *Gap Junctions* (Abschnitt 1.3) ist der elektrische Widerstand zwischen den Zellen deutlich reduziert und das Aktionspotential setzt sich in der postsynaptischen Zelle fort. Durch diese direkte Kopplung können Neuronen synchronisiert werden, wodurch eine deutlich höhere Erregbarkeit erreicht wird, sodass sie sensibler auf Stimuli reagieren können (Galarreta und Hestrin, 2001b; Curti *et al.*, 2012). Eine weitere Besonderheit von elektrischen Synapsen ist ihre bidirektionale Leitfähigkeit, die es ermöglicht, Signale in beide Richtungen über den synaptischen Spalt hinweg weiterzuleiten (Bennett und Zukin, 2004). Bei der Bildung von *Gap Junctions* befinden sich die Zellmembranen der benachbarten Zellen sehr nah aneinander, damit die zytoplasmatische Verbindung entstehen kann. Dadurch ist der synaptische Spalt in den elektrischen Synapsen mit 2 - 4 nm deutlich schmaler als in chemischen Synapsen (Bennett und Zukin, 2004; Hormuzdi *et al.*, 2004).

1.3 *Gap Junctions*

Gap Junctions sind interzelluläre Kanäle in der Zellmembran zweier benachbarter Zellen, beispielsweise in elektrischen Synapsen, die deren Zytoplasma direkt miteinander verbinden. Bedingt durch die Länge dieser Kanäle werden die Zellmembranen der benachbarten Zellen dicht zueinander geführt, wodurch eine definierte Lücke (engl.: *gap*) von 2 - 4 nm zwischen den Membranen entsteht (Revel und Karnovsky, 1967). Diese ist namensgebend für die *Gap Junctions*. Eine stabile Annäherung der Zellmembranen geschieht vor allem in Bereichen, in denen eine hohe *Gap Junction*-Kanal-Dichte herrscht, in sogenannten *Gap Junction*-Plaques. In diesen Plaques liegen Ansammlungen von hunderten bis zu mehreren tausenden an *Gap Junction*-Kanälen vor (Gilula *et al.*, 1972; Sosinsky und Nicholson, 2005). Zu einem funktionalen *Gap Junction*-Kanal müssen beide der beteiligten Zellen je einen *Gap Junction*-Halbkanal beisteuern, ein sogenanntes Connexon (Yeager und Nicholson, 1996). Connexone wiederum sind Hexamere aus Connexin-Untereinheiten (Unwin und Zampighi, 1980). Von diesen *Gap Junction*-bildenden Transmembranproteinen sind 21 menschliche Isoformen bekannt, die sich vor allem in ihren C-Termini in Länge und Sequenz unterscheiden. Alle Connexin-Isoformen besitzen den gleichen topologischen Aufbau. Der C-Terminus eines Connexins ist, wie auch der N-Terminus, zytoplasmatisch orientiert. Die vier Transmembrandomänen werden durch zwei extrazelluläre und eine zytoplasmatische Schleife miteinander verbunden (Zimmer *et al.*, 1987; Falk *et al.*, 1994; Willecke *et al.*, 2002; Söhl und Willecke, 2004).

Für die verschiedenen Connexin-Isoformen existieren zwei parallel verwendete Nomenklaturen. Die erste bezeichnet die Connexine nach ihrer strukturellen und genetischen Verwandtschaft, anhand derer sie in fünf Gruppen (α , β , γ , δ und ϵ) eingeteilt werden. Der Name der Connexine setzt sich dann aus den Buchstaben „GJ“ für *Gap Junction*-Protein, dem entsprechenden Buchstaben für die Gruppe (z.B. A für die α -Gruppe) und einer Zahl zusammen, welche die Connexine in ihrer Reihenfolge der Entdeckung innerhalb ihrer Gruppe durchnummeriert. Obwohl diese Nomenklatur für die Connexin-Proteine seltener verwendet wird, ist sie dennoch namensgebend für die offiziellen Gensymbole der

Connexine (Kumar und Gilula, 1992; Harris und Locke, 2008). In dieser Arbeit sind die für die Connexine kodierenden Gene anhand dieser offiziellen Gensymbole benannt.

Die zweite und meistverwendete Nomenklatur richtet sich nach dem vorhergesagten Molekulargewicht des zu bezeichnenden Connexins in kDa. Da sich dieses Gewicht zwischen verschiedenen Organismen leicht unterscheiden kann, sodass es zu unterschiedlichen Benennungen der orthologen Connexine kommt, kann der Herkunftsorganismus durch das Voranstellen eines Präfixes im Namen kenntlich gemacht werden. So ist beispielsweise mCx43 das murine Connexin mit einem Molekulargewicht von 43 kDa. Wird kein Präfix vorangestellt, handelt es sich per Definition um das entsprechende humane Connexin. Um dennoch zu kennzeichnen, dass das humane Connexin gemeint ist, kann entweder das Präfix „h“ vorweggestellt oder die Buchstaben „CX“ beide großgeschrieben werden (Beyer *et al.*, 1987; Harris und Locke, 2008). In dieser Arbeit wird keine weitere Kennzeichnung verwendet, da ausschließlich mit humanen Zellen gearbeitet wurde und somit immer die humanen Connexine gemeint sind. Beispielsweise wird das humane 43 kDa große Connexin auf Proteinebene als Cx43 und auf mRNA-Ebene als *GJA1* bezeichnet (Tabelle 8).

Ein funktionaler *Gap Junction*-Kanal bildet beim Öffnen eine wassergefüllte Pore zwischen den an der Kanalbildung beteiligten Zellen, durch die kleinere Moleküle, wie beispielsweise Metabolite, Ionen, sekundäre Botenstoffe, Neurotransmitter und andere Signalmoleküle bidirektional diffundieren können (Dermietzel und Spray, 1993; Goodenough *et al.*, 1996). Dabei hängt die Permeabilität und Selektivität des Kanals sowohl von dem Gewicht und der Form der diffundierenden Moleküle als auch von der Kanalzusammensetzung ab. Substanzen, die eine globuläre Struktur aufweisen, können den Kanal bis zu einer Größe von ungefähr 1 kDa passieren (Goodenough *et al.*, 1996), während für lineare Peptide bereits eine Durchlässigkeit von bis zu 1,8 kDa nachgewiesen werden konnte (Neijssen *et al.*, 2005). Diese Permeabilität wird zudem durch den Poreninnendurchmesser des *Gap Junction*-Kanals sowie die Ladungen der im Kanallumen befindlichen Seitengruppen bestimmt und variiert, je nachdem welche Connexin-Isoformen an der Kanalbildung beteiligt sind. Da Connexine Membranproteine sind, ist eine Kristallisierung ihrer Kanalstrukturen sehr schwierig, sodass bisher nur die Röntgenkristallstruktur des Cx26-*Gap Junction*-Kanals publiziert wurde. Dabei konnte ein Poreninnendurchmesser von 1,4 nm an der schmalsten Stelle bestimmt werden (Maeda *et al.*, 2009; Maeda und Tsukihara, 2011).

Physiologisch gesehen haben *Gap Junctions* durch die Ausbildung dieser zytoplasmatischen Verbindung zweier benachbarter Zellen einen sehr großen Einfluss auf die Zellkommunikation in fast allen Gewebetypen, da sie die Zellen auf diese Weise metabolisch und elektrisch koppeln können (Söhl *et al.*, 2005). Die Funktionen von Connexinen und *Gap Junctions* in MSCs und neuronalen Zellen werden in den Abschnitten 1.3.2 und 1.3.3 ausführlicher dargestellt.

1.3.1 *Gap Junction*-Halbkanäle

Connexine können nicht nur in Form von vollständigen *Gap Junction*-Kanälen funktionale Ionenkanäle ausbilden. Entgegen anfänglicher Annahmen, dass *Gap Junction*-Halbkanäle nur in einer geschlossenen Form existieren und ausschließlich als Vorrat zur Bildung neuer *Gap Junction*-Kanäle dienen, sind

inzwischen diverse weitere physiologische Funktionen dieser Kanäle bekannt (Burra und Jiang, 2011; Cheung *et al.*, 2014). Den ersten Beleg, dass Connexone ebenfalls funktionale Ionenkanäle sind, lieferten Paul *et al.* (1991), indem sie zeigten, dass sich in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierte Cx46-Halbkanäle spannungsabhängig öffnen ließen. In HeLa-Zellen wurde zunächst festgestellt, dass die exogen exprimierten Connexine Cx30, Cx46 und Cx50 zwar funktionale *Gap Junction*-Halbkanäle ausbildeten, sich diese allerdings unter physiologischen Bedingungen nicht öffneten (Valiunas und Weingart, 2000). Inzwischen ist bekannt, dass auch eine Öffnung unter physiologischen Bedingungen möglich ist, diese aber sehr eng kontrolliert wird. Dabei nehmen Faktoren wie das Membranpotential, ATP-Stimuli, posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, Veränderungen des intrazellulären pH-Werts, das Redoxpotential der Zelle sowie mechanische Stimuli auf vielfältigste Weise Einfluss (Francis *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Trexler *et al.*, 1999; Bao *et al.*, 2004a; Bao *et al.*, 2004c; Bao *et al.*, 2004b; Ripps *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2005; Giaume *et al.*, 2013; Orellana *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Retamal, 2014).

Eine besondere Rolle im Zusammenhang mit der Regulation von *Gap Junction*-Halbkanälen spielt die intrazelluläre und extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Bei einer physiologischen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 1 - 2 mM ist die Offenwahrscheinlichkeit von *Gap Junction*-Halbkanälen in den meisten Fällen sehr gering, was erklärt, warum Valiunas und Weingart (2000) schlussfolgerten, dass die getesteten Connexin-Halbkanäle unter physiologischen Bedingungen geschlossen seien. Verringert sich jedoch die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf wenige nM, wird die Öffnung der Halbkanäle induziert (Quist *et al.*, 2000; Thimm *et al.*, 2005; Allen *et al.*, 2011). Intrazellulär scheinen Ca^{2+} -Konzentrationen bis ungefähr 500 nM die Offenwahrscheinlichkeit der *Gap Junction*-Halbkanäle zu erhöhen. Es wird vermutet, dass eine Ca^{2+} /Calmodulin (CaM)-abhängige Signalkaskade die Öffnung verursacht, bei der auch die CaM-abhängige Proteinkinase II (CaMK-II) und die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) involviert sind (Schalper *et al.*, 2008b; Vuyst *et al.*, 2009). Bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen werden Mechanismen zur Inaktivierung der *Gap Junction*-Halbkanäle induziert (Vuyst *et al.*, 2006; Vuyst *et al.*, 2009).

Gap Junction-Halbkanäle bilden beim Öffnen eine Pore vom Zytoplasma der Zelle in den extrazellulären Raum und können damit zur ionischen Homöostase der Zelle beitragen (Kar *et al.*, 2012). Da diese Kanäle, wie auch interzelluläre *Gap Junction*-Kanäle, nicht selektiv-permeabel für bestimmte Moleküle sind, können durch sie diverse Ionen, Signalmoleküle und Metabolite in den extrazellulären Raum freigesetzt werden, wo sie autokrine oder parakrine Signalkaskaden auslösen können (Kar *et al.*, 2012). Zu diesen Signalmolekülen zählen unter anderem Glutamat (Ye *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2011), Prostaglandin E_2 (Jiang und Cherian, 2003; Cherian *et al.*, 2005; Burra und Jiang, 2009), Glutathion (Rana und Dringen, 2007; Stridh *et al.*, 2008; Stridh *et al.*, 2010) NAD^+ (Bruzzone *et al.*, 2001) und ATP (Zhao *et al.*, 2005; Eltzschig *et al.*, 2006; Vuyst *et al.*, 2006; Sonntag *et al.*, 2009). Die *Gap Junction*-Halbkanäle stehen dabei oft in einer direkten Verbindung zu purinergen Signalkaskaden (Abschnitt 1.4), da durch die ATP-Stimulierung purinergere Rezeptoren die Halbkanäle

geöffnet werden können (Jacobas *et al.*, 2007; Scemes *et al.*, 2009), aber umgekehrt, durch sie auch ATP in den extrazellulären Raum gelangen und dort purinerge Rezeptoren aktivieren kann. Die Möglichkeit einer positiven Rückkopplungsschleife, die das ausgelöste Ca^{2+} -Signal verstärkt, liegt auf der Hand und konnte bereits belegt werden (Anderson *et al.*, 2004; Baroja-Mazo *et al.*, 2013). Die spezifischen Aufgaben von *Gap Junction*-Halbkanälen in MSCs und in neuronalen Zellen werden in den zwei folgenden Abschnitten erläutert.

1.3.2 *Gap Junctions* und Connexine in MSCs

MSCs exprimieren vor allem die Connexine Cx40, Cx43 und Cx45, die für die in den MSCs typische, starke interzelluläre *Gap Junction*-Kopplung verantwortlich sind (Dorshkind *et al.*, 1993; Bodi *et al.*, 2004; Valiunas *et al.*, 2004). MSCs sind sowohl untereinander als auch mit anderen Zelltypen in der Lage, funktionale *Gap Junction*-Kanäle auszubilden, was sie als zelluläre Therapeutika in der regenerativen Medizin hochinteressant macht. Funktionale Kanäle zu Kardiomyozyten (Potapova *et al.*, 2004), ventrikulären Myozyten und Cx40-, Cx43- oder Cx45-transfizierten HeLa-Zellen konnten bereits nachgewiesen werden (Valiunas *et al.*, 2004). Außerdem sind sie in ihrer natürlichen Umgebung, der Stammzellnische im Knochenmark, über *Gap Junctions* mit den hämatopoetischen Stammzellen gekoppelt und fördern dort unter anderem deren Proliferation und die Hämatopoese (Rosendaal *et al.*, 1997; Dürig *et al.*, 2000; Genet *et al.*, 2018). Eine besondere Rolle in MSCs übernimmt Cx43. So ist es nicht nur am stärksten in den MSCs exprimiert und somit vermutlich hauptverantwortlich für die hohe Zellkopplung, sondern es ist auch essentiell für die Erhaltung der Stammzeleigenschaften von MSCs, da es ihre vorzeitige Zellseneszenz verhindert (Shao *et al.*, 2019).

Cx43 ist außerdem in der Lage, die einzigen in MSCs bisher nachgewiesenen funktionalen *Gap Junction*-Halbkanäle zu bilden. Diese konnten experimentell durch die mechanosensitive Stimulierung mit Ultraschall aktiviert werden (Yoon *et al.*, 2018) und scheinen zudem eine Rolle in der osteogenen (Wagner *et al.*, 2017a; Wagner *et al.*, 2017b) wie auch in der chondrogenen Differenzierung von MSCs zu spielen (Schrobback *et al.*, 2015). Wurden MSCs nach einem Herzinfarkt in das geschädigte Gewebe transplantiert, wurde dort durch Cx43 ihre Überlebensrate gesteigert und außerdem die Angiogenese gefördert (Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

1.3.3 *Gap Junctions* und Connexine in neuronalen Zellen

Neuronale Vorläuferzellen sind stark über *Gap Junctions* miteinander gekoppelt (Duval *et al.*, 2002; Eugenin *et al.*, 2012). Diese Kopplung kommt in diesen Zellen vor allem durch eine hohe Expression an Cx43 zustande, in denen es die Zellproliferation fördert und auf diese Weise eine neuronale Differenzierung unterdrückt (Rozenal *et al.*, 2000; Lemcke und Kuznetsov, 2013). Cx43 ist bei der neuronalen Entwicklung unerlässlich, wobei seine Funktionen vielfältiger und teilweise widersprüchlicher Natur sind. In der embryonalen Entwicklung fördert Cx43 die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen, wohingegen es umgekehrt in der adulten Neurogenese die Proliferation hemmt (Swayne und Bennett, 2016). Während der neuronalen Differenzierung muss die Cx43-

Expression und die damit verbundene *Gap Junction*-vermittelte Zellkopplung herunterreguliert werden (Rozenal *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2002; Yamashita, 2013; Rinaldi *et al.*, 2014). Von einigen Autoren wird das als Voraussetzung für das Verlassen des Zellzyklus und somit den Beginn der neuronalen Differenzierung beschrieben (Rozenal *et al.*, 2000; Lemcke *et al.*, 2013; Lemcke und Kuznetsov, 2013; Rinaldi *et al.*, 2014). Shin *et al.* (2015) konnten in der Tat nachweisen, dass die Cx43-Expression schon in aktivierten neuronalen Stammzellen herunterreguliert ist, und auch ein Einfluss von Connexinen auf den Zellzyklus und somit auf Zellwachstum und Differenzierung ist bekannt (Shi *et al.*, 2015).

In reifen Neuronen können je nach Neuronen-Typ diverse Connexine gefunden werden, die meisten jedoch nur sehr schwach exprimiert. In den meisten Studien werden die Connexine Cx26, Cx45 und vor allem Cx36 nachgewiesen (Condorelli *et al.*, 2000; Rozenal *et al.*, 2000; Söhl *et al.*, 2005; Eugenin *et al.*, 2012; Swayne und Bennett, 2016). Cx26 sorgt *in vivo* für eine vollständige neuronale Entwicklung und fördert die damit verbundene Synapsenbildung (Su *et al.*, 2017). Obwohl *Gap Junctions* auch in Neuronen vorhanden sind und eine essenzielle Rolle, beispielsweise für die Bildung elektrischer Synapsen, spielen (Gutnick und Prince, 1981; Lo Turco und Kriegstein, 1991; Yuste *et al.*, 1995; Bittman *et al.*, 1997; Noctor *et al.*, 2001), ist die *Gap Junction*-vermittelte Zellkopplung in Neuronen nicht so stark wie in neuronalen Vorläuferzellen. Die elektrischen Synapsen werden von dem am häufigsten in Neuronen exprimierten Connexin Cx36 gebildet (Belluardo *et al.*, 2000; Condorelli *et al.*, 2000; Gulisano *et al.*, 2000; Söhl *et al.*, 2005; Eugenin *et al.*, 2012; Pereda, 2014). Cx36 scheint außerdem in der Lage zu sein, *in vivo* und *in vitro* eine neuronale Differenzierung zu induzieren (Rozenal *et al.*, 2000; Hartfield *et al.*, 2011).

In Neuronen konnte bisher keine *Gap Junction*-Halbkanalaktivität unter physiologischen Bedingungen gemessen werden. Die in den Neuronen exprimierten Connexin-Isoformen sind prinzipiell imstande, funktionale Halbkanäle auszubilden (Thompson und MacVicar, 2008). So konnten unter pathophysiologischen Bedingungen bereits funktionale Halbkanäle von Cx36 nachgewiesen werden (Schock *et al.*, 2008). In neuronalen Vorläuferzellen ist die Existenz funktionaler *Gap Junction*-Halbkanäle bekannt. Diese dienen dort dem Erhalt der Zellen in einem undifferenzierten proliferierenden Entwicklungsstadium (Talaverón *et al.*, 2015).

1.4 Purinerge P2-Rezeptoren

So gut wie alle bekannten Zellen haben eine Sensitivität für extrazelluläres ATP, da es sich bei der ATP-vermittelten Signalgebung um einen der ursprünglichsten interzellulären Kommunikationswege handelt (Burnstock und Verkhratsky, 2009). ATP stellt dabei evolutionär eines der ersten chemischen Signalmoleküle dar und wurde erstmals 1970 als Neurotransmitter im autonomen Nervensystem identifiziert (Burnstock *et al.*, 1970). Inzwischen ist bekannt, dass ATP auf vielfältigste Weise sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Zellen beeinflusst. Die Erkennung von extrazellulärem ATP findet über sogenannte purinerge P2-Rezeptoren in der Zellmembran statt, die in ionotrope P2X-Rezeptoren (Abschnitt 1.4.1) und metabotrope P2Y-Rezeptoren (Abschnitt 1.4.2) klassifiziert werden können (Abbraccio und Burnstock, 1994). Durch Signalkaskaden, in denen sekundäre Botenstoffe wie cAMP

oder Ca^{2+} beteiligt sind, können diverse zelluläre Reaktionen ausgelöst werden, die beispielsweise Migration, Zellmetabolismus, Sekretion, Proliferation oder Differenzierung beeinflussen (Berridge, 2016). Dabei unterscheidet man kurzfristige Signalgebungen, bei denen es sich um die direkte, oft synaptische Übermittlung von Signalen handelt, und langfristige (trophische) Signalgebungen, die Prozesse wie die Zellproliferation, Differenzierung oder den Zelltod bezeichnen (Burnstock, 2016). Die ausgelöste Reaktion in der Zelle ist dabei sowohl abhängig von der Anzahl und Zusammensetzung der exprimierten P2-Rezeptoren als auch von der extrazellulären ATP-Konzentration, da nicht alle P2-Rezeptoren gleich sensitiv auf ATP reagieren (Xing *et al.*, 2016).

1.4.1 Ionotrope P2X-Rezeptoren

Die purinergen P2X-Rezeptoren gehören zu den ligandengesteuerten Ionenkanal-Rezeptoren, deren natürlicher Ligand ATP ist, und bestehen aus sieben Subtypen P2X1-P2X7 (Ralevic und Burnstock, 1998). Diese Isoformen können entweder Homo- oder Heterotrimerer und so einen funktionalen P2X-Rezeptor bilden (North, 2002; Saul *et al.*, 2013). Auf diese Weise kann je nach den Voraussetzungen des entsprechenden Gewebes eine hohe Vielfalt an Rezeptoren kreiert werden. Eine P2X-Untereinheit ist durch zwei Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert, die durch eine extrazelluläre Schleife miteinander verbunden sind. Der N- und der C-Terminus des Proteins befinden sich im Zytoplasma (Valera *et al.*, 1994; North, 1996; North, 2002).

Bindet ATP an einen P2X-Rezeptor, kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Pore des Ionenkanals öffnet. Je nach P2X-Isoform ist der geöffnete Ionenkanal permeabel für Na^+ , K^+ und vor allem Ca^{2+} , die entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zelle diffundieren können (Burnstock, 2007). Durch den Einstrom des sekundären Botenstoffs Ca^{2+} werden in der Zelle diverse Signalkaskaden ausgelöst (Berridge, 2016). Eine besondere Rolle spielt der P2X7-Rezeptor. Dieser Rezeptor ist in der Lage, bei andauernder ATP-Stimulierung eine immer größer werdende Pore zu bilden, sodass er schließlich für Moleküle über 900 Da permeabel wird (North, 2002). Inzwischen gibt es immer mehr Belege dafür, dass er auf diese Weise auch die Freisetzung von ATP in den extrazellulären Raum ermöglichen könnte (Pellegatti *et al.*, 2005; Suadecani *et al.*, 2006; Ohshima *et al.*, 2010; Brandao-Burch *et al.*, 2012).

1.4.2 Metabotrope P2Y-Rezeptoren und ihre physiologische Vielfalt

Bei den metabotropen P2Y-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte, purinerge Rezeptoren, für die acht Isoformen, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 und P2Y14, bekannt sind (Abbraccio *et al.*, 2003). Diese Rezeptoren werden ebenfalls alle von ATP stimuliert. Im Unterschied zu den P2X-Rezeptoren können diese Rezeptoren allerdings auch von weiteren Liganden wie ADP, UTP, UDP und UDP-Zucker aktiviert werden (Abbraccio *et al.*, 2006). Die Struktur der P2Y-Rezeptor-Proteine weist sieben Transmembrandomänen auf, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der C-Terminus befindet sich im Zytoplasma, während der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist. Für die Bildung eines funktionalen Rezeptors wird nur eine P2Y-

Untereinheit benötigt, sodass lange angenommen wurde, dass nur monomere Rezeptoren existieren (Ralevic und Burnstock, 1998). Inzwischen ist bekannt, dass diese Rezeptoren auch Homo- oder Heterodimere mit anderen P2Y-Rezeptoren oder mit anderen Transmitter-Rezeptoren wie beispielsweise Adenosin-Rezeptoren bilden können (Abbraccio *et al.*, 2009).

Die P2Y-Rezeptoren sind an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt, sodass für eine intrazellulär auszulösende Signalkaskade wichtig ist, welche P2Y-Rezeptoren von der Zelle exprimiert sind, und bei der extrazelluläre vorhandenen ATP-Konzentration stimuliert werden, sodass ein entsprechend gekoppeltes G-Protein Enzyme gezielt aktiviert oder inhibiert. Die Rezeptoren P2Y12, P2Y13 und P2Y14 sind $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelt, welches bei einer ATP-induzierten Rezeptor-vermittelten Aktivierung intrazellulär die Adenylatcyclase inhibiert und somit die Bildung von cAMP unterbindet. Aktiviert werden kann die Adenylatcyclase andersherum durch den G_s -Protein-gekoppelten Rezeptor P2Y11 (Köles *et al.*, 2008). Viele P2Y-Rezeptoren sind an mehrere G-Proteine gekoppelt, die abhängig von der Rezeptorkomposition und dem stimulierenden Liganden aktiviert werden können. Auch eine P2Y-abhängige Aktivierung kleiner GTPasen ist möglich, was unter anderem für die Migration von hämatopoetischen Stammzellen gezeigt werden konnte (Rossi *et al.*, 2007). Die meisten P2Y-Rezeptoren sind ebenfalls oder ausschließlich mit G-Proteinen wie dem $G_{q/11}$ -Protein gekoppelt (Köles *et al.*, 2008), welche die Phospholipase C (PLC) aktivieren, die daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) spaltet. IP_3 kann anschließend an seine IP_3 -Rezeptoren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums binden. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle, die durch die IP_3 -Bindung geöffnet werden, sodass Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern des Endoplasmatischen Retikulums in das Zytoplasma strömen kann, wo es Ca^{2+} -abhängige Enzyme aktivieren kann (Berridge, 2016). Zusätzlich befinden sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums Ryanodinrezeptoren, die ebenfalls Ca^{2+} -permeabel sind. Diese Rezeptoren werden *in vivo* von verschiedenen Liganden aktiviert, wobei sie am häufigsten durch bereits im Zytoplasma eingeströmtes Ca^{2+} aktiviert werden und so für eine positive Feedback-Schleife sorgen (Fruscione *et al.*, 2011; Berridge, 2016; Chen-Engerer *et al.*, 2019; Karagas und Venkatachalam, 2019).

1.4.3 Purinerge P2-Rezeptoren in MSCs

Eine Stimulierung von MSCs mit ATP induziert in MSCs Ca^{2+} -Signale, die sowohl auf die Aktivierung von P2X- als auch von P2Y-Rezeptoren zurückzuführen sind (Coppi *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2016). Dabei spielt die purinerge Signalgebung in diversen zellulären Prozessen der MSCs eine essenzielle Rolle. So werden mesenchymale Stammzellfunktionen maßgeblich beeinflusst, zu denen unter anderem der Erhalt eines undifferenzierten Zustands, ihre Migration und die Anlage zur Selbsterneuerung sowie die damit verbundene Proliferationsfähigkeit und ihre Zellviabilität zählen (Riddle *et al.*, 2007; Riddle *et al.*, 2008; Scarfi, 2014; Jiang *et al.*, 2017a; Jiang *et al.*, 2017b; Roszek und Wujak, 2018). Auch diverse Prozesse der osteogenen und adipogenen Differenzierung werden durch ATP-induzierte Signale reguliert (Zippel *et al.*, 2012; Ciciarello *et al.*, 2013; Cavaliere *et al.*,

2015; Roszek und Wujak, 2018). Das ATP kann dabei von MSCs (Kawano *et al.*, 2006; Riddle *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2018) oder anderen Zellen in ihrer direkten Umgebung freigesetzt werden. Dafür in Frage kommen beispielsweise Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten (Orriss *et al.*, 2010; Brandao-Burch *et al.*, 2012). Die Freisetzung von ATP kann dabei über verschiedenste Transmembrankanäle erfolgen (Taruno, 2018). Auch für die neuronale Transdifferenzierung ist eine purinerge Signalgebung bedeutend (Tu *et al.*, 2014; Czarnecka *et al.*, 2017).

In den MSCs wurden bisher die purinergen Rezeptoren P2X1, P2X3 - P2X7 sowie alle P2Y-Rezeptoren nachgewiesen, wobei es Abweichungen zwischen den Resultaten unterschiedlicher Autoren und zwischen den Expressionsniveaus auf mRNA- und Proteinebene gibt (Riddle *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2011; Zippel *et al.*, 2012). Die Variabilität der P2-Rezeptorexpression ist außerdem Donor-abhängig (Peng *et al.*, 2016). Durch diese hohe Rezeptorvielfalt sind vielfältige und genau regulierbare Reaktionen auf ATP-Stimuli in MSCs möglich.

MSCs sind durch eine autokrine Stimulierung des P2Y1-Rezeptors in der Lage, spontane Ca^{2+} -Oszillationen hervorzurufen. Das dafür nötige ATP wird dabei aus *Gap Junction*-Halbkanälen in den extrazellulären Raum sezerniert. Für diese spontanen Oszillationen ist noch keine genaue Funktion bekannt, vermutet wird allerdings eine Beteiligung an Differenzierungsprozessen (Kawano *et al.*, 2002; Kawano *et al.*, 2006). Die Rezeptoren P2Y2, P2Y4 und P2Y13 regulieren die adipogene Differenzierung von MSCs, wobei P2Y13 zusätzlich die osteogene Differenzierung beeinflusst (Ferrari *et al.*, 2011; Biver *et al.*, 2013; Ciciarello *et al.*, 2013). Die Proliferation und Migration von MSCs wird maßgeblich durch den P2Y11-Rezeptor gesteuert, der G_s -Protein-gekoppelt ist und somit die cDNA-Synthese stimuliert (Fruscione *et al.*, 2011). Die Zellmigration wird zusätzlich zum P2Y11-Rezeptor auch von den Rezeptoren P2Y1 und P2X7 beeinflusst (Peng *et al.*, 2016).

Ferrari *et al.* (2011) konnten zeigen, dass P2X7-Rezeptoren in MSCs von allen P2X-Rezeptoren den größten Anteil an den hervorgerufenen intrazellulären Ca^{2+} -Signalen besitzen. Aufgrund dessen sind ihnen auch diverse physiologische Rollen zuzuschreiben, wie zum Beispiel ein wesentlicher Beitrag zum Erhalt der Zellhomöostase (Yang *et al.*, 2018). Wie auch die Rezeptoren P2X5 und P2X6, beeinflussen die P2X7-Rezeptoren die Osteogenese von MSCs. Dabei fördern sie bei ATP-Stimulierung die Osteogenese und Mineralisierung (Sun *et al.*, 2013; Noronha-Matos *et al.*, 2014), während die P2X5- und P2X6-Rezeptoren dieser entgegenwirken (Zippel *et al.*, 2012). Die Aktivierung des P2X4-Rezeptors führt zu extrazellulären ATP-Oszillationen, die durch eine autokrine Signalgebung induziert wird (Kwon, 2012). P2X-Rezeptoren spielen auch im Prozess der neuronalen Transdifferenzierung eine Rolle. So förderten sie in Ratten-MSCs bei Anwesenheit von extrazellulärem ATP die neuronale Differenzierung der MSCs. Das gelang auch *in vivo*, indem Astrozyten ATP freisetzen und so die neuronale Differenzierung transplanteder MSCs induzierten. Welche P2X-Rezeptoren dabei genau diesen Einfluss ausübten, zeigten die Autoren nicht. Es wurden allerdings die Rezeptoren P2X1 und P2X4 - P2X7 nachgewiesen, wobei P2X4 und P2X6 am stärksten exprimiert waren (Tu *et al.*, 2014).

1.4.4 Purinerge P2-Rezeptoren in neuronalen Zellen

In neuronalen Zellen sind purinerge Rezeptoren an diversen Prozessen beteiligt. So sind die ionotropen P2X-Rezeptoren vor allem verantwortlich für schnelle exzitatorische Prozesse wie die Neurotransmission an Synapsen (Abschnitt 1.2.2) und für die Neuromodulation und sekretorische Mechanismen (Burnstock und Verkhratsky, 2010), während für die metabotropen P2Y-Rezeptoren in Neuronen bisher nur wenige Aufgaben im Bereich der langsamen synaptischen Erregung bekannt sind (Neary *et al.*, 1996; Burnstock und Knight, 2004; Ren und Bertrand, 2008). Auch nicht-synaptische Prozesse können in neuronalen Zellen ATP-vermittelt induziert werden. Beispielsweise wird auf diese Weise in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen die Proliferation und neuronale Differenzierung entscheidend beeinflusst (Ryu *et al.*, 2003; Pearson *et al.*, 2005; Tsao *et al.*, 2013) und auch apoptotische Mechanismen können durch ATP-Stimuli induziert werden (Delarasse *et al.*, 2009). Das extrazelluläre ATP kann durch verschiedene Transmembrankanäle wie *Gap Junction*-Halbkanäle, Pannexin-Kanäle oder volumenregulierte Ionenkanäle aus den neuronalen Zellen selbst oder aus benachbarten Zellen wie beispielsweise Astrozyten freigesetzt werden (Coco *et al.*, 2003; Suadicani *et al.*, 2006; Abudara *et al.*, 2018).

In Neurosphären konnte die Expression der Rezeptoren P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12 und P2Y14 detektiert werden, die während der neuronalen Differenzierung herunterreguliert werden (Oliveira *et al.*, 2015). In neuronalen Vorläuferzellen führt die Aktivierung der Rezeptoren P2Y1 und P2Y2 zur Proliferation und Migration und schließlich auch zur neuronalen Differenzierung (Tang und Illes, 2017). In Neuronen sind nur noch wenige P2Y-Isoformen exprimiert, wobei vor allem P2Y1, P2Y2 und P2Y6 nachgewiesen wurden und in besagten langsamen synaptischen Übertragungen eine Rolle zu spielen scheinen (Burnstock und Knight, 2004; Calvert *et al.*, 2004).

Neuronale Vorläuferzellen exprimieren alle P2X-Rezeptoren mit Ausnahme von P2X1. Während einer neuronalen Differenzierung werden die Rezeptoren P2X4 und P2X7 herunterreguliert und P2X2 und P2X6 werden verstärkt exprimiert (Wu *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2015). Durch die Aktivierung des P2X7-Rezeptors konnte in neuronalen Vorläuferzellen die Proliferation inhibiert und dadurch die Differenzierung initiiert werden (Tsao *et al.*, 2013). Auch apoptotische Mechanismen können in diesen Zellen von dem P2X7-Rezeptor eingeleitet werden (Delarasse *et al.*, 2009). Dieser Rezeptor scheint also für eine neuronale Differenzierung unabdingbar zu sein, muss aber anschließend herunterreguliert werden, damit es zu einer neuronalen Reifung kommen kann, denn dieser Rezeptor würde das Axonwachstum inhibieren, wenn er weiterhin exprimiert wäre (Tsao *et al.*, 2013). In vollständig ausgereiften Neuronen sind, je nach Neuronen-Typ, alle P2X-Rezeptoren außer P2X5 detektierbar. Am stärksten exprimiert und am meisten synaptisch aktiv sind dabei P2X2, P2X4 und P2X6 (Fields und Burnstock, 2006).

1.5 Transdifferenzierung

In der regenerativen Medizin werden Zellen in geschädigtes Gewebe transplantiert, um dieses zu ersetzen oder zur Regeneration anzuregen. Um immunologische Abstoßungsreaktionen zu reduzieren, ist man dabei größtenteils auf humane Zellen des entsprechenden Zielgewebes angewiesen, was häufig Spenderengpässe und ethische Komplikationen birgt, sodass das verfügbare Transplantatmaterial sehr begrenzt ist. Doch auch bei einer ausreichenden Menge an erhältlichen Zellen kann es bei einer allogenen Transplantation immer noch zu Abstoßungsreaktionen kommen. Eine mögliche Lösung dafür wäre, patienteneigene gut zugängliche Zellen zu entnehmen, sie *in vitro* zu Zellen des benötigten Zelltyps zu entwickeln und sie anschließend autolog zu transplantieren. Zusätzlich zu den direkten therapeutischen Möglichkeiten dieser Zellen können mit ihnen auch patientenspezifische Krankheitsmodelle erstellt und erforscht werden, sodass beispielsweise die genaue medikamentöse Zusammenstellung vor der Verabreichung getestet und auf die genauen Bedürfnisse des Patienten angepasst werden kann (Soldner und Jaenisch, 2018).

Ein Problem hierbei ist, dass das intrinsische Differenzierungspotential gut erreichbarer körpereigener Zellen sehr begrenzt ist, da diese je nach Zelltyp und Gewebe bereits entsprechend spezialisiert sind und natürlicherweise nicht mehr in Zelltypen aller Keimblätter differenzieren können. Seit der erfolgreichen Induktion von Fibroblasten zu pluripotenten Stammzellen (iPSCs) durch Takahashi und Yamanaka (2006) ist bekannt, dass der Differenzierungszustand einer Zelle nicht so endgültig ist wie lange angenommen, sondern durch eine entsprechende Beeinflussung modifiziert werden kann. Aus den iPSCs können wieder somatische Zellen aller Keimblätter differenziert werden. Neben all ihren Vorzügen bergen die iPSCs bei einer Transplantation jedoch gewisse Risiken, da sie ein tumorigenes Potential besitzen. Das aus der Induktion von iPSCs gewonnene Wissen zugrunde gelegt, wurden diverse Ansätze entwickelt, aus einer ausdifferenzierten somatischen Zelle direkt einen anderen Zelltyp zu generieren und dabei den artifiziellen Zwischenschritt der Dedifferenzierung zu pluripotenten Zellen zu umgehen.

Dieser Prozess wird als Transdifferenzierung bezeichnet und beschreibt die Entwicklung einer bereits spezialisierten Zelle in eine andere, ebenfalls spezialisierte, Zelle eines anderen Gewebetyps und schließt dabei die Entwicklung zu einem Zelltyp eines anderen Keimblattes nicht aus (Krabbe *et al.*, 2005). Während der Transdifferenzierung werden epigenetische Veränderungen herbeigeführt, welche die Genexpression der Zelle modifizieren und an die des neuen Zelltyps angleichen (Jopling *et al.*, 2011).

Für den Ablauf experimenteller Transdifferenzierungen gibt es zwei verschiedene Modelle. Die erste Theorie ist, dass zunächst eine Dedifferenzierung zu einem pluripotenten Zelltyp stattfindet, bevor im Anschluss die spezifische Differenzierung eingeleitet wird. In dem anderen Modell wird in der Idee einer direkten Konversion des ursprünglichen Zelltyps zum Zielzelltyp die Existenz eines unnatürlichen Übergangszustandes angenommen, in dem die genetischen Programme beider Zelltypen zu ähnlichen Anteilen ablaufen (Jopling *et al.*, 2011). Zu unterscheiden ist die Transdifferenzierung von der

Reprogrammierung. Während bei der Reprogrammierung durch die Expression von Pluripotenz-erhaltenden Transkriptionsfaktoren stabil proliferierende pluripotente Zellen erzeugt werden, ist ein bei der Transdifferenzierung gegebenenfalls durchlaufener pluripotenter Zustand der Zellen nicht stabil und die erneute Differenzierung setzt sofort ein (Jopling *et al.*, 2011). Bei experimentellen Transdifferenzierungen kann man unterscheiden zwischen Transdifferenzierungen, bei denen die epigenetischen Veränderungen durch die exogene Expression Zielzell-spezifischer Transkriptionsfaktoren herbeigeführt werden, und Transdifferenzierungen, bei denen diese Veränderungen nur durch die Zugabe spezifischer Wachstumsfaktoren sowie kleiner chemischer Moleküle, sogenannter *small molecules*, zum Zellkulturmedium induziert werden. *Small molecules* können zudem auch zur Verstärkung einer Transkriptionsfaktor-vermittelten Transdifferenzierung eingesetzt werden (Qin *et al.*, 2017).

1.5.1 Transdifferenzierung mit *small molecules*

Die Transdifferenzierung mit *small molecules* hat gegenüber der Transkriptionsfaktor-induzierten Transdifferenzierung den Vorteil, dass dabei keine gentechnische Veränderung der Zellen stattfindet. In Hinblick auf eine therapeutische Anwendung ist das zu bevorzugen, da keine gentechnisch veränderten Zellen in den menschlichen Körper eingebracht werden, was immer gewisse Risiken wie beispielsweise eine Tumorbildung oder unerwünschte Nebeneffekte birgt. Allerdings ist eine durch *small molecules* induzierte Transdifferenzierung häufig nicht so effektiv und langfristig stabil wie eine Transkriptionsfaktor-vermittelte Transdifferenzierung. Die verwendeten *small molecules* und Wachstumsfaktoren können vor einer Transplantation durch einen Medienwechsel in der Zellkultur problemlos wieder entfernt werden. Zudem werden die ausgelösten biologischen Veränderungen der Zellen mit *small molecules* vergleichsweise schnell herbeigeführt und sind durch die Zusammenstellung der verschiedenen chemischen Substanzen und die Variation ihrer Konzentration fein regulierbar (Qin *et al.*, 2017).

Small molecules sind kleine chemische Moleküle, die in verschiedenste Signalkaskaden der Zelle eingreifen. Auf diese Weise inhibieren oder aktivieren sie gängige Signalwege, regulieren epigenetische Barrieren, die von der Zelle im Zuge einer Transdifferenzierung überbrückt werden müssen, oder modifizieren den Metabolismus, um dadurch, je nach Bedürfnis der Zielzelle, deren Proliferation zu fördern oder zu inhibieren. Für eine erfolgreiche Transdifferenzierung sollte sich im Rahmen dieser Möglichkeiten an den Bedürfnissen der Zielzelle orientiert werden. So sollten beispielsweise Signalwege, die in der Zielzelle aktiviert sind, durch die Chemikalien stimuliert werden, während exprimierte Gene der Ausgangszelle, die in der Zielzelle keine Rolle spielen, unterdrückt werden sollten. Es ist leicht vorstellbar, wie groß die dadurch entstehenden Möglichkeiten zum gezielten Eingreifen in die Entwicklung einer Zelle sind, sodass eine zentrale Aufgabe bei dieser Art der Transdifferenzierung darin besteht, herauszufinden, welche Veränderungen in den zellulären Programmen minimal stattfinden müssen, um eine Transdifferenzierung zu ermöglichen (Eisinger und Zhao, 2017). Auf diesem Wege wurden bereits diverse Transdifferenzierungen erreicht. So konnten aus Fibroblasten

Kardiomyozyten (Fu *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2016), Endothelzellen (Sayed *et al.*, 2015), Insulinsekretierende Zellen (Pennarossa *et al.*, 2014), Astrozyten (Tian *et al.*, 2016), induzierte mesenchymale Stammzellen (Lai *et al.*, 2017), neuronale Stammzellen (Thier *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015b; Zheng *et al.*, 2016) und Neuronen (Pfisterer *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015) generiert werden. Auch ausgehend von anderen Zelltypen wie Astrozyten (Zhang *et al.*, 2015) oder mesenchymalen Stammzellen wurde dies beschrieben (Kim *et al.*, 2009; Bi *et al.*, 2010; Bahrami *et al.*, 2016; Aguilera-Castrejon *et al.*, 2017). Von der enormen Vielfalt der bereits publizierten Protokolle für *small molecule*-basierte Transdifferenzierungen sei dies als eine kleine Auswahl genannt.

Da in dieser Arbeit *small molecule*-induzierte neuronale Transdifferenzierungen von MSCs verwendet werden, sollen diese im Folgenden etwas genauer beleuchtet werden. Die bereits erwähnte Vielfalt an Protokollen beinhaltet ebenfalls eine hohe Varietät an unterschiedlichen verwendeten *small molecules*, sodass diese hier nicht alle betrachtet werden können. Allerdings fällt auf, dass sich bestimmte Moleküle immer wieder in den Medien finden und von den Autoren als essenziell bezeichnet werden. Es ist problematisch, die Substanzen einzeln in ihrer Wirkung betrachten zu wollen, da die unterschiedlichen stimulierten oder inhibierten Signalwege sich wiederum gegenseitig beeinflussen, sodass sich das gleiche Molekül in zwei verschiedenen Medien bzw. biologischen Zielsetzungen sehr variabel auswirken kann. Das Wnt-Signalweg-aktivierende Molekül CHIR99021 beispielsweise fördert zum einen die Induktion und Proliferation kardialer Vorläuferzellen (Qyang *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2015) und unterstützt zum anderen in neuronalen Induktionsmedien die Differenzierung der Zellen zu einem nicht-proliferierenden Zelltyp, den Neuronen (Ladewig *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2015; Aguilera-Castrejon *et al.*, 2017). Für eine neuronale Transdifferenzierung scheint es notwendig zu sein, den Wnt-Signalweg zu aktivieren, z. B. durch Zusatz des GSK-3 β -Inhibitors CHIR99021, und den TGF- β -Signalweg zu inhibieren. Letzteres führt zu einer Förderung der MET (*mesenchymal-to-epithelial-transition*) und kann beispielsweise durch die Zugabe von Repsox erreicht werden (Li *et al.*, 2010). Die GSK-3-vermittelte Signalgebung scheint diverse zentrale Prozesse während der neuronalen Entwicklung zu beeinflussen (Hur und Zhou, 2010). VPA (Valproinsäure) wiederum scheint die Effizienz der Transdifferenzierung zu erhöhen, indem es die Histondeacetylase inhibiert und somit die Histonacetylierungen erhöht und Genaktivierungen ermöglicht. Das erleichtert die für eine Transdifferenzierung notwendige Veränderung der Genexpression. Forskolin ist ein Stimulator der Adenylatcyclase und sorgt somit für eine intrazellulär erhöhte cAMP-Konzentration. Dadurch kann wiederum die PKA aktiviert werden, die diverse zelluläre Reaktionen auslösen kann. Für I-BET151 wurde in murinen Fibroblasten gezeigt, dass durch diesen Inhibitor die Fibroblasten-typische Genexpression unterdrückt und auf diese Weise eine Umprogrammierung zu Neuronen erleichtert wird (Li *et al.*, 2015). Y-27632 ist ein ROCK-Inhibitor. Dieses Molekül verbessert die Viabilität von neuronalen Vorläuferzellen und beschleunigt die neuronale Reifung (Koyanagi *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2015).

1.5.2 Neuronale *small molecule*-induzierte Transdifferenzierung von MSCs

Da MSCs aufgrund ihres multipotenten Stammzellcharakters ein größeres Differenzierungspotential haben als Fibroblasten, kein tumorerzeugendes Potential zu besitzen scheinen und sie sich *in vitro* sehr gut vermehren lassen, gewinnen sie für die Verwendung als Ausgangsmaterial für Differenzierungen und Transdifferenzierungen an Beliebtheit. Inzwischen wird ihnen, zusätzlich zu ihren Möglichkeiten der Differenzierung in Zellen des Skelettsystems, auch ein neurogenes Differenzierungspotential *in vivo* und *in vitro* zugeschrieben (Taran *et al.*, 2014), sodass ihr zukünftiger Einsatz in Therapien neurodegenerativer Erkrankungen gut vorstellbar ist.

MSCs entstammen, wie bereits beschrieben (Abschnitt 1.1), dem Mesoderm, sodass sie normalerweise Zellen mesodermalen Ursprungs hervorbringen. Eine Transdifferenzierung meint in diesem Fall, dass es sich bei den Zielzellen um Zellen des endodermalen (z. B. Hepatozyten oder β -Zellen) oder ektodermalen Keimblattes (z. B. Keratinozyten oder neuronale Zellen) handelt (Woodbury *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2015a; Qin *et al.*, 2015; Miladpour *et al.*, 2017; Murugan Girija *et al.*, 2018). Dabei wurden sowohl Transkriptionsfaktor-vermittelte als auch *small molecule*-basierte Protokolle publiziert. Bei einer neuronalen Transdifferenzierung konnte zudem gezeigt werden, dass die Kulturoberfläche einen wesentlichen Einfluss auf die Differenzierung hat. So konnten Materialien wie bioaktive Nanofasern oder synthetische Nanorillenstrukturen die neuronale Induktion fördern (Yim *et al.*, 2007; Bahrami *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2018). Eine neuronale Differenzierung von MSCs sollte sich theoretisch nicht allzu sehr von den Erfordernissen einer neuronalen Differenzierung von Fibroblasten unterscheiden, für die es diverse Protokolle gibt, da die Zellen gut zugänglich sind und das nötige Potential zu haben scheinen. So wurden Fibroblasten bereits durch die exogene Expression der Transkriptionsfaktoren Brn-2, Ascl1 und MyT1-L zu neuronalen Zellen konvertiert (Pang *et al.*, 2011). Die gleichen Transkriptionsfaktoren konnten durch die Expression einer anti-PTBP1-shRNA in der Zelle hochreguliert werden, was ebenfalls zu einer neuronalen Differenzierung von Fibroblasten führte (Xue *et al.*, 2013). Ein wachsendes Forschungsfeld stellt die Transdifferenzierung mit *small molecules* dar, mit deren Hilfe die gentechnische Veränderung der Zellen entweder unterstützt oder gänzlich vermieden wird (Ladewig *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2015b; Hu *et al.*, 2015).

Für eine neuronale Transdifferenzierung von MSCs mithilfe von *small molecules* gibt es inzwischen ebenfalls diverse Protokolle (Woodbury *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2010; Alexanian *et al.*, 2013; Aguilera-Castrejon *et al.*, 2017). All diese Protokolle sehen vor, die Zellen für eine begrenzte Zeit von fünf Stunden bis zu vier Wochen in einem oder mehreren neuronalen Induktionsmedium zu kultivieren und anschließend auf unterschiedliche Weise zu charakterisieren. In dieser Induktionszeit sind die Zellen einem in mancher Hinsicht sehr aggressiven Medium ausgesetzt, da teilweise hohe Konzentrationen an zytotoxischen Substanzen, wie z. B. VPA oder Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet werden. Aufgrund dessen ist die entwickelte neuronale Morphologie während der Induktion zu hinterfragen, da sich Zellen unter zytotoxischen Bedingungen zusammenziehen bzw. schrumpfen können und ebenfalls eine Morphologie ausbilden, die der von Neuronen ähnelt (Lu *et al.*, 2004). Besonders bei einer

Induktionszeit von wenigen Stunden oder Tagen (Woodbury *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2010) ist eine tatsächliche neuronale Entwicklung fraglich, da sich die Zellen bei einer Transdifferenzierung zellulär neu organisieren und ihre Proteinsynthese und Genexpression zum Teil stark modifizieren müssen. Ob das in einem derart kurzen Zeitraum erfolgen kann, sei dahingestellt (Krabbe *et al.*, 2005). Analysen der generierten Zellen sind zwar in vielen Studien zu finden, allerdings beschränkt sich die Charakterisierung nach der Transdifferenzierung häufig auf Untersuchungen der Morphologie und Expressionsanalysen neuronaler Marker, während funktionelle Untersuchungen wie die Analyse der elektrischen Erregbarkeit meist fehlen. Die generierten Zellen sollten somit stets umfassend analysiert werden, um Fehlinterpretationen zu minimieren.

1.5.3 Kriterien zum Nachweis einer neuronalen Transdifferenzierung

Je nach Anwendung werden für die Qualitätskontrolle einer neuronalen Transdifferenzierung unterschiedliche Kriterien angelegt. Während für *in vitro*-Anwendungen vor allem die Identität und *in vitro*-Funktionalität der Zellen entscheidend sind, sind für den *in vivo*-Einsatz auch die Überprüfung der *in vivo*-Funktionalität und der biologischen Sicherheit der generierten Zellen im Zielgewebe erforderlich (Ladewig *et al.*, 2013). Das benötigt sehr anwendungsspezifische Experimente und Nachweise und wird an dieser Stelle nicht weiter betrachtet.

Die Identität neuronaler Zellen sollte anhand von verschiedenen Faktoren überprüft werden. So ist ein zentrales Kriterium die typische neuronale Morphologie, die einen polarisierten Zelltyp mit einem langen Axon auf der einen Seite des Zellkörpers und einem verästelten Baum aus dendritischen Zellfortsätzen auf der anderen Seite aufweist. Die morphologischen Veränderungen sind während einer neuronalen Transdifferenzierung meist als erstes Kriterium nachweisbar und können schon nach wenigen Minuten oder Stunden deutlich sichtbar sein. Neuronen exprimieren neuronale Marker, zu denen unter anderem Tuj1, MAP-2, NeuN, Tau und Synapsin gehören. Diese Marker sollten auch in den induzierten Zellen nachweisbar sein, da diese Proteine wesentlich zu den charakteristischen neuronalen Funktionen wie z. B. der polarisierten Zellstruktur oder der Synapsenbildung beitragen. Die Expression dieser Marker ist notwendig, aber allein noch kein ausreichender Beleg für eine komplette neuronale Entwicklung zu reifen Neuronen. Dieser Nachweis muss über funktionelle Studien erbracht werden. Dafür können Neuronen elektrophysiologisch auf ihre Fähigkeit zur Erzeugung von Aktionspotentialen und ihre synaptische Aktivität mit vielfältigen Methoden untersucht werden (Krabbe *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011). Beispielsweise kann mit dem Ca^{2+} -Imaging die Aktivität charakteristischer Neurotransmitterrezeptoren, die in Synapsen zu finden sind, gemessen werden oder es können Farbstoff-basierte Zellkopplungsversuche durchgeführt werden, um die Anwesenheit funktionaler elektrischer Synapsen nachzuweisen. Selbstverständlich können die induzierten Zellen genauer identifiziert werden, wenn mehr und unterschiedliche Experimente durchgeführt werden. Es ist somit ratsam, die mit *small molecules* behandelten Zellen sowohl durch die Analyse der Morphologie, der Expression spezifischer Marker sowie ihrer Neuronen-typischen Physiologie zu charakterisieren.

1.6 Zielsetzung

Die Analyse humaner neuronaler Zellen gestaltet sich als schwierig, da das entsprechende humane Zellmaterial schwer zugänglich und somit sehr limitiert ist. Es wird deshalb schon seit einigen Jahren nach Alternativen gesucht, die mithilfe gut zugänglicher, im besten Fall patienteneigener, humaner Zellen ein neuronales Modellsystem schaffen, anhand dessen beispielsweise physiologische oder pharmakologische Studien durchgeführt werden können. Für ein derartiges Modell ist es essenziell, dass sich die verwendeten Zellen in ihrer artifiziellen Umgebung wie neuronale Zellen *in vivo* entwickeln und verhalten. An dieser Stelle knüpft die vorliegende Dissertation an, deren Ziel es war, am Modell der induzierten neuronalen Transdifferenzierung von humanen MSCs aus dem Knochenmark die Regulation von Ionenkanälen und *Gap Junctions* während der Zellentwicklung zu untersuchen.

Mithilfe von unterschiedlichen bereits existierenden Transdifferenzierungsprotokollen sollte die neuronale Entwicklung von MSCs vergleichend analysiert werden. Dabei sollte sowohl auf molekularbiologische, proteinbiochemische und physiologische Methoden zurückgegriffen werden, um die induzierte Differenzierung bestmöglich zu verfolgen.

Die Transdifferenzierungen sollten einerseits durch den shRNA-vermittelten *Knockdown* des Proteins PTBP1 induziert werden, während die anderen zu verwendenden Protokolle die Induktion über den Zusatz von *small molecules* zum Zellkulturmedium erreichen sollten. Molekularbiologisch und proteinbiochemisch sollten typische Marker von MSCs und neuronalen Zellen nachgewiesen werden und deren Veränderungen durch die Differenzierung nachvollzogen werden. Für die physiologische Charakterisierung sollten zum einen elektrophysiologische *Patch-Clamp*-Messungen durchgeführt werden, mit deren Hilfe Aktionspotentiale analysiert werden können, die eines der bedeutsamsten Merkmale von Neuronen darstellen. Zum anderen sollte die Ausbildung funktionaler elektrischer und chemischer Synapsen überprüft werden, die wie auch die Aktionspotentiale essenziell für die Neurotransmission und die Aktivität neuronaler Netzwerke ist. In elektrischen Synapsen findet die Kommunikation zwischen den Zellen über *Gap Junctions* statt. Um eine mögliche *Gap Junction*-vermittelte Zellkopplung zu untersuchen, sollten Farbstofftransferversuche vergleichend zwischen den MSCs und den induzierten neuronalen Zellen durchgeführt werden, wobei eine *Gap Junction*-Kopplung *in vivo* für beide Zelltypen bekannt ist. Zusätzlich sollte auch die Aktivität von *Gap Junction*-Halbkanälen in diesen Zellen untersucht werden, da sie beispielsweise an der chemischen Synapsenbildung beteiligt sein können, indem sie Neurotransmitter in den synaptischen Spalt entlassen. An chemischen Synapsen wird ein Signal durch Neurotransmitter zwischen den beteiligten Zellen übertragen. ATP kann einen derartigen Neurotransmitter darstellen und vielfältige Reaktionen auslösen. Die Anwesenheit und Aktivität der von ATP stimulierten purinergen ionotropen P2X- und die metabotropen P2Y-Rezeptoren sollten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls sowohl in den MSCs als auch in den neuronal induzierten Zellen mithilfe der Ca^{2+} -*Imaging*-Methode untersucht werden.

2 Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark verwendet, die freundlicherweise von der AG Hoffmann (Medizinische Hochschule Hannover) isoliert (Jungwirth *et al.*, 2018) und zur Verfügung gestellt wurden. Diese stammten von dem Patienten 131 (weiblich, Alter unbekannt) und wurden für bis zu neun Passagen verwendet. Die MSCs wurden in MSC-Zellkulturmedium (Tabelle 12) kultiviert, wobei das Medium alle 2 - 3 Tage vollständig gewechselt wurde. Die Inkubation erfolgte in feuchter Umgebung bei 37 °C mit 5 % CO₂-Begasung. Wenn eine Konfluenz der Zellen von ca. 70-80 % erreicht wurde, wurden die Zellen mithilfe von Trypsin (0,125 % (w/v) in PBS) passagiert. Diese wie auch alle weiteren Zellkulturarbeiten wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Je nach experimentellem Ablauf wurden die Zellen auf Zellkulturschalen (Durchmesser 100 mm, Sarstedt) oder Deckgläschen (Durchmesser 10 mm) kultiviert. Zellkulturschalen wurden verwendet, wenn die Zellen vermehrt und zur RNA- oder Proteinisolierung verwendet werden sollten. Für alle physiologischen Untersuchungen oder Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf Deckgläschen benötigt. Dafür wurden die Deckgläser zunächst mit 0,15 mg/mL Rattenkollagen Typ I beschichtet und die Zellen im Anschluss darauf ausgesät.

2.1.2 Neuronale Differenzierung von MSCs

Die neuronale Differenzierung der MSCs erfolgte auf zwei verschiedene Weisen. Zum einen wurden die Zellen mittels shRNA-vermitteltem PTBP1-*Knockdown* differenziert, zum anderen durch die Kultivierung in neuronalen Induktionsmedien unter Zusatz von *small molecules*. Dabei wurden die MSCs entweder in Zellkulturschalen differenziert oder für Experimente, bei denen die zu untersuchenden Zellen auf Deckgläschen benötigt wurden, direkt auf den Deckgläschen differenziert. Die Differenzierungen wurden induziert, wenn die MSCs eine Konfluenz von ca. 70-80 % erreicht hatten. Nach oder während einer Differenzierung wurden die Zellen nicht trypsiniert.

2.1.2.1 Neuronale Differenzierung mittels anti-PTBP1-shRNA

Für die von Xue *et al.* (2013) beschriebene neuronale Differenzierung mittels shRNA-vermitteltem PTBP1-*Knockdown* wurden die MSCs zunächst mit dem Plasmid pEGFP-U6_anti-PTBP1-shRNA (Abschnitt 2.2.1) transfiziert und anschließend mittels Geneticin (G-418) selektiert. Die MSCs wurden dafür auf Kollagen I-beschichteten Deckgläschen mit einem Durchmesser von 10 mm in einer 24-Lochplatte bis zu einer Konfluenz von 70-80 % in MSC-Medium kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamine 2000, von dem pro Ansatz 2 µL mit 23 µL Opti-MEM™ versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Pro Ansatz wurden 500 ng Plasmid-DNA

in 25 μL Opti-MEMTM verdünnt, gründlich gevortext und zu den 25 μL Lipofectamine 2000 in Opti-MEMTM gegeben. Nach erneutem gründlichem Mischen wurde dieser Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich ein DNA-Lipid-Komplex ausbilden konnte. Dabei wurde zwischendurch ca. alle 5 min erneut gevortext. Währenddessen wurde das Zellkulturmedium gegen 500 μL Opti-MEMTM pro Vertiefung ausgetauscht. Nach der 20-minütigen Inkubation wurden 50 μL Lipofectamine 2000-DNA-Komplex pro Vertiefung zugegeben und gründlich verteilt. Nach 4-6 h Inkubation im Brutschrank wurde der Transfektionsansatz abgenommen und Antibiotika-freies neuronales Wachstumsmedium (NeuroM, Tabelle 12) zu den Zellen gegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium zu Antibiotika-haltigem NeuroM unter Zusatz von 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G-418 gewechselt, um die transfizierten Zellen zu selektieren und ein Überwachsen dieser Zellen mit untransfizierten Zellen zu verhindern. Nach 7 d Selektion wurden Fluoreszenzaufnahmen der Zellen in einem inversen Fluoreszenzmikroskop gemacht. Das Reporterprotein EGFP wurde dabei mit einem Polychrome V-Monochromator bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenzsignale mit einer CMOS ORCA-Flash 4.0 Kamera aufgenommen.

2.1.2.2 Neuronale Differenzierung mithilfe von *small molecules*

Die MSCs wurden entweder auf 100 mm-Zellkulturschalen oder auf Kollagen I-beschichteten Deckgläsern kultiviert bis sie eine Konfluenz von ungefähr 70-80 % erreicht hatten. Anschließend wurden sie mit den verschiedenen *small molecule*-basierten Differenzierungsmedien behandelt, die auf Protokollen von Bi *et al.* (2010), Hu *et al.* (2015) und Aguilera-Castrejon *et al.* (2017) basieren. Vor Zugabe der jeweiligen neuronalen Induktionsmedien wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um mögliche FCS-Rückstände zu entfernen.

Das Protokoll von Bi *et al.* (im Folgenden NIM-1-Protokoll genannt) sieht eine Präinkubation der MSCs in MSC-Medium unter Zusatz von 1 μM RA für 24 h vor, bevor die eigentliche neuronale Induktion für weitere 24 h in einem neuronalen Induktionsmedium (NIM-1, Tabelle 12) erfolgt. Alle Experimente wurden nach der vollständigen Durchführung dieses Protokolls begonnen.

Hu *et al.* publizierten ein Protokoll, in dem in ihrem Fall Fibroblasten für 8 Tage in einem neuronalen Induktionsmedium (NIM-3, Tabelle 12) inkubiert wurden, das einmal nach 4 Tagen komplett gewechselt wurde. Im Folgenden wurden die Zellen für weitere 6 Tage in dem Maturationsmedium (MAT, Tabelle 12) und anschließend bis zur Durchführung der Experimente, mindestens aber für 2 Tage, in einem neuronalen Wachstumsmedium (NeuroM, Tabelle 12) kultiviert. Sowohl MAT als auch NeuroM wurden alle 2 Tage zur Hälfte gewechselt. Die in dieser Arbeit verwendeten MSCs wurden nach diesem Protokoll differenziert und morphologisch und elektrophysiologisch untersucht.

Für die Differenzierung nach Aguilera-Castrejon *et al.* wurden die MSCs wie von den Autoren beschrieben für 7 d in einem neuronalen Induktionsmedium (NIM-2, Tabelle 12) kultiviert (im Folgenden bezeichnet als 7 d NIM-2-Protokoll). Da die Zellen nach diesem Zeitraum noch keine Merkmale vollständig entwickelter Neuronen aufwiesen, wurde das Protokoll auf eine Inkubationszeit von 30 d in NIM-2 verlängert (30 d NIM-2-Protokoll). NIM-2 wurde jeden zweiten Tag zur Hälfte

gewechselt. Nach der 30-tägigen Kultivierung in NIM-2 stellten sich die Zellen als instabil heraus, sodass das Maturationsmedium von Hu *et al.* (MAT, Tabelle 12) für 1 d verwendet wurde, um die differenzierten Zellen zu stabilisieren (30 d NIM-2 1 d MAT-Protokoll). Zu diesen drei Zeitpunkten wurden die Zellen für Protein- und RNA-Isolierungen, immunzytochemische Färbungen oder physiologische Funktionsuntersuchungen verwendet.

2.1.3 Immunfluoreszenzfärbung

Auf Deckgläschen kultivierte Kontroll-MSCs und differenzierte Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 10 min mit 4 % *para*-Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte in einem Schritt die Permeabilisierung der Zellen und das Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen unter Verwendung von 0.1 % Triton X-100 und 1 % BSA in PBS für 30 min bei 37 °C. Wurde eine Cx45-Färbung durchgeführt, wurden die Zellen nicht mit Formaldehyd, sondern für 5 min bei -20 °C in eiskaltem Aceton/Methanol (1:1) fixiert. Bei dieser Methode ist eine Permeabilisierung nicht notwendig, weshalb während des Blockierens kein Triton X-100 zugesetzt wurde. Die Primärantikörper anti-Cx26, anti-Cx43, anti-Cx45, anti-Tuj1, anti-Nestin und anti-MAP2 wurden wie angegeben (Tabelle 10) in 1 % BSA in PBS verdünnt. Der Primärantikörper anti-NeuN (Tabelle 10) wurde ausschließlich in PBS verdünnt. Die zu färbenden Zellen wurden über Nacht bei 4 °C in den entsprechenden Primärantikörperlösungen inkubiert. Proben für die Sekundärantikörper-Kontrollen wurden in 1 % BSA in PBS bei ansonsten identischen Bedingungen inkubiert. Die sekundären iFluor™488-konjugierten anti-*mouse*- und anti-*rabbit*-Antikörper wurden 1:500 in 1 % BSA in PBS verdünnt. Diese Lösung wurde mit 2 µM DAPI versetzt und für 1 h bei 37 °C zu den Zellen gegeben, nachdem diese gründlich mit PBS gewaschen wurden. Nach der Inkubation mit den Sekundärantikörpern wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und darin bei 4 °C gelagert bis sie mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop unter Verwendung eines 60x-Wasserimmersionsobjektivs und der zugehörigen Software EZ-C1 fotografiert wurden. Die Immunfluoreszenzfärbungen dienten nicht zur Quantifizierung der Proteinexpression, sondern ausschließlich dem Zweck der Visualisierung.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonieren eines shRNA-kodierenden Plasmids

Für die neuronale Differenzierung mittels anti-PTBP1-shRNA (Abschnitt 2.1.2.1) wurde unter sterilen Bedingungen ein Plasmid erstellt (Abbildung 1), das, hinter einem U6-Promotor gelegen, eine gegen PTBP1 gerichtete *small hairpin* RNA (shRNA) enthält. Im Bereich des U6-Promotors kann die zur RNA-Synthese benötigte RNA-Polymerase binden und mit der Transkription beginnen. Der U6-Promotor ist ein speziell für eine hohe RNA-Produktion optimierter Promotor. Außerdem weist das Plasmid ein unter der Kontrolle eines SV40-Promotors (Promotor des Simian-Virus 40) gelegenes Neomycin-Geneticin-Resistenzgen (NeoR) auf, das die transfizierten Zellen zur Resistenz gegen G-418 befähigt und somit eine Selektion der transfizierten Zellen mithilfe dieses Antibiotikums ermöglicht. Diese Sequenz kodiert überdies für eine Kanamycin-Resistenz (KanR) und dient während der

bakteriellen Anzucht und Vermehrung des Plasmids zur Selektion der Bakterien. Zusätzlich enthält das Plasmid eine für EGFP-kodierende Gensequenz, sodass transfizierte Zellen auch durch ihre grüne Fluoreszenz identifiziert werden können. Der davor gelegene Promotor des Cytomegalievirus (CMV-Promotor) ist für die Überexpression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen optimiert.

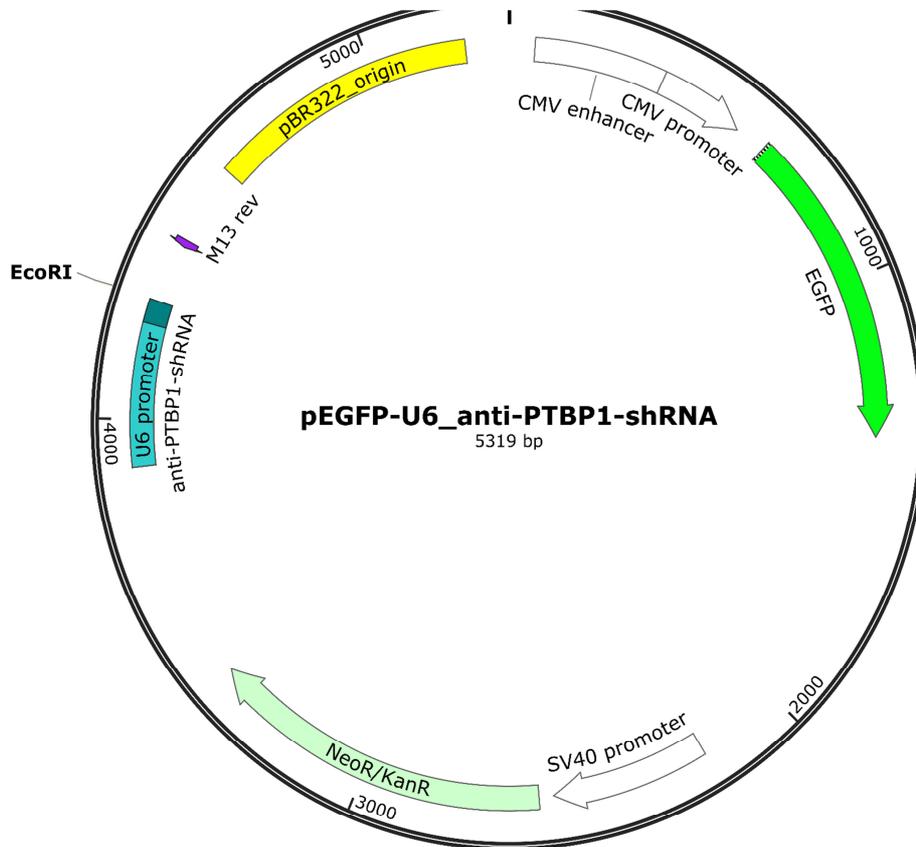


Abbildung 1: Plasmidkarte des Plasmids pEGFP-U6_anti-PTBP1-shRNA. *pBR322 origin*: bakterieller *Origin of replication* zur Vermehrung des Plasmids in Bakterien. *CMV enhancer/promoter*: Promotor des Cytomegalievirus, der für die Überexpression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen optimiert ist. *EGFP*: Gen kodierend für das verbesserte grün-fluoreszierende Protein (EGFP), das zur Identifikation transfizierter Zellen verwendet wurde. *SV40 promoter*: Promotor des Simian-Virus 40. *NeoR/KanR*: Gen, kodierend für eine Neomycin-, Geneticin- und Kanamycinresistenz. *U6 Promoter*: In dem Bereich des Promotors kann die RNA-Polymerase binden und die Transkription beginnen. *anti-PTBP1-shRNA*: gegen PTBP1 gerichtete shRNA, die hinter den U6-Promotor kloniert wurde. Die shRNA soll einen *Knockdown* von PTBP1 induzieren. *M13 rev*: Bindestelle für einen rückwärtsgerichteten M13-Primer, mit dem das Konstrukt nach erfolgter Klonierung sequenziert wurde. Das gesamte Plasmid weist eine Größe von 5319 bp auf.

Zur Herstellung dieses pEGFP-U6_anti-PTBP1-shRNA-Plasmids wurde zunächst die shRNA mittels *Annealing* komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotid-Sequenzen erzeugt (Abschnitt 2.2.1.1), das Zielpasmid durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI und MssI hinter dem U6-Promotor linearisiert (Abschnitt 2.2.1.2), mittels Fällung aufgereinigt (Abschnitt 2.2.1.3) und die shRNA durch eine Ligation in die offene Stelle des Plasmidrückgrats eingesetzt (Abschnitt 2.2.1.4). Chemisch kompetente *Escherichia coli* XL10-Gold (*E. coli*) wurden zur Vervielfältigung und Rücklage mit dem fertigen Plasmid transformiert (Abschnitt 2.2.1.5) und vermehrt. Aus den *E. coli* wurde im Anschluss das

Plasmid isoliert (Abschnitt 2.2.1.6), das mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft und für die Transfektion von MSCs (Abschnitt 2.1.2.1) verwendet wurde.

2.2.1.1 *Annealing* komplementärer Oligonukleotid-Sequenzen

Als shRNA wurde die von Xue *et al.* (2013) verwendete shRNA-Sequenz kloniert (Abbildung 2), die als TRCN0000231420 im „*Genetic Perturbation Platform (GPP) Web-Portal*“ des Broad Institute registriert ist. Diese doppelsträngige Sequenz wurde in Form von zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden bestellt und dabei an einem Ende so erweitert, dass nach dem *Annealing* ein EcoRI-kompatibler Überhang und ein stumpfes Ende entstanden, die ein direktes Ligieren in das Vektorrückgrat ermöglichten.

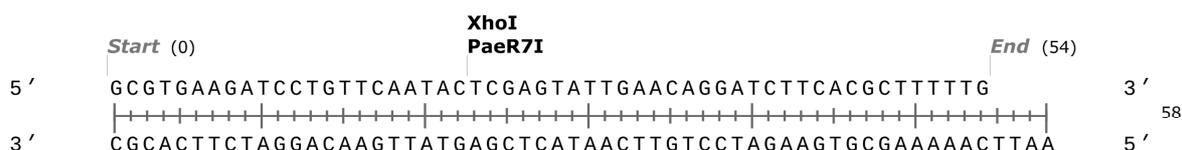


Abbildung 2: Anti-PTBP1-shRNA-Sequenz TRCN0000231420. Die shRNA wurde aus zwei Oligonukleotidsträngen durch *Annealing* hergestellt. Die interne XhoI-Schnittstelle ermöglichte nach erfolgter Klonierung einen Kontroll-Restriktionsverdau mit XhoI. Der entstandene einzelsträngige Überhang „TTAA“ ist kompatibel mit einem Überhang nach EcoRI-Verdau.

Für das *Annealing* wurden die bestellten Oligonukleotide in DNase/RNase-freiem Wasser gelöst, sodass sie in einer Konzentration von 200 μ M vorlagen. Der Reaktionsansatz wurde, wie in Tabelle 1 angegeben, hergestellt und für 4 min bei 95 °C in einem Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz aus dem Cycler genommen und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Zeit des Abkühlens diente dem *Annealing* der Oligonukleotide.

Tabelle 1: Oligo-*Annealing*-Reaktionsansatz

Reagenz	Menge
200 μ M Oligonukleotidstrang 1	5 μ L
200 μ M Oligonukleotidstrang 2	5 μ L
10x Oligo- <i>Annealing</i> -Puffer	2 μ L
DNase/RNase-freies Wasser	8 μ L
Gesamtvolumen	20 μ L

1 μ L dieses Ansatzes wurde 1:100 mit DNase/RNase-freiem Wasser verdünnt, sodass die Oligonukleotidkonzentration nun 500 nM betrug. 1 μ L dieser 500 nM Oligonukleotidlösung wurde anschließend 1:100 mit 1x Oligo-*Annealing*-Puffer verdünnt, sodass eine finale Konzentration von 5 nM erreicht wurde. Diese Lösung wurde für die Ligation (Abschnitt 2.2.1.4) verwendet. Der Erfolg des Oligonukleotid-*Annealings* wurde mithilfe eines 4 %-igen Agarosegels (Abschnitt 2.2.6) überprüft.

2.2.1.2 Restriktionsverdau

Um das Plasmid zu linearisieren, damit die *annealte* shRNA eingefügt werden konnte, wurde ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen MssI und EcoRI durchgeführt. Zunächst wurde

das Plasmid mit MssI linearisiert. Dafür wurde ein Reaktionsansatz hergestellt (Tabelle 2), dieser zum eigentlichen Restriktionsverdau für 2 h bei 37 °C inkubiert und abschließend zur Inaktivierung des Enzyms für weitere 20 min auf 65 °C erhitzt.

Tabelle 2: Restriktionsverdau mit MssI

Reagenz	Menge
DNase/RNase-freies Wasser	77,3 µL
10x Puffer B	10 µL
5 µg pEGFP-U6-Plasmid (649,3 ng/µL)	7,7 µL
MssI	5 µL
Gesamtvolumen	100 µL

Um das linearisierte Plasmid aus dem 100 µL-Ansatz aufzukonzentrieren und den Puffer B wie auch das Enzym MssI zu entfernen, wurde eine Ethanolpräzipitation (Abschnitt 2.2.1.3) durchgeführt. Mithilfe dieser Fällung wurde das Volumen auf 10 µL reduziert. Das bereits MssI-geschnittene Plasmid wurde im Folgenden mit EcoRI verdaut, indem ein entsprechender Reaktionsansatz hergestellt (Tabelle 3) und für 2 h bei 37 °C inkubiert wurde. Die Hitzeinaktivierung von EcoRI erfolgte für 20 min bei 65 °C.

Tabelle 3: Restriktionsverdau mit EcoRI

Reagenz	Menge
DNase/RNase-freies Wasser	32,5 µL
10x Puffer EcoRI	5 µL
5 µg MssI-geschnittenes pEGFP-U6-Plasmid (649,3 ng/µL)	10 µL
EcoRI	2,5 µL
Gesamtvolumen	50 µL

Das durch MssI- und EcoRI-Verdau ausgeschnittene Fragment, wie auch EcoRI und sein zugehöriger Puffer, müssen vor der Ligation (Abschnitt 2.2.1.4) aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Dafür wurde eine PEG-Fällung verwendet (Abschnitt 2.2.1.3). Schließlich wurde der Erfolg der Linearisierung des Plasmids und das erfolgreiche Ausschneiden des Fragments mithilfe eines 1 %igen Agarosegels überprüft (Abschnitt 2.2.6).

2.2.1.3 Fällungsmethoden

Ethanolpräzipitation

Glykogen ist ein sogenannter *Carrier* und unterstützt das Fällen von DNA. DNA fällt normalerweise durch Interaktion mit anderen DNA-Molekülen aus, was aber auch durch Glykogen hervorgerufen

werden kann. Bei niedrigen DNA-Konzentrationen sollte während einer Fällung folglich Glykogen zugesetzt werden, um die Ausbeute zu erhöhen. Der Reaktionsansatz für die Fällung wurde zusammenpipettiert und für eine möglichst vollständige Fällung über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Tabelle 4: Reaktionsansatz für Glykogenfällung

Reagenz	Menge
DNA-Lösung	100 μL
Glykogen	1 μL
7,5 M Ammoniumacetat	50 μL
100 % Ethanol unvergällt	250 μL
Gesamtvolumen	401 μL

Am nächsten Tag wurden die Ansätze mit der gefällten DNA für 30 min bei $18.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, zum Waschen des Pellets 100 μL 75 % Ethanol (unvergällt) zugegeben und erneut für 10 min bei $18.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals verworfen und das Pellet für mindestens 5 min bei geöffnetem Reaktionsgefäßdeckel an der Luft getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 10 μL DNase/RNase-freiem Wasser gelöst.

PEG-Fällung

Mithilfe einer Fällung mit PEG 8000 können DNA-Fragmente, die kleiner sind als 300 bp, von größeren Fragmenten abgetrennt werden. So können beispielsweise amplifizierte PCR-Fragmente von den Primern im PCR-Ansatz getrennt werden, oder es kann, wie hier verwendet, das Plasmidrückgrat von einem kleinen ausgeschnittenen DNA-Fragment separiert werden. Diese Fällung wurde nach dem Restriktionsverdau mit MssI und EcoRI durchgeführt. Dafür wurde ein entsprechender Reaktionsansatz hergestellt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Reaktionsansatz für PEG-Fällung

Reagenz	Menge
DNA-Lösung nach EcoRI-Verdau	50 μL
TE-Puffer	150 μL
30 % PEG 8000, 30 mM MgCl_2 in H_2O	100 μL
Gesamtvolumen	300 μL

Nach gründlichem Vortexen wurde für 30 min bei $14.100 \times g$ zentrifugiert und vorsichtig der Überstand entfernt. Optional ist an dieser Stelle ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei $14.100 \times g$, um den Überstand anschließend so vollständig wie möglich abnehmen zu können. Dieser optionale Schritt wurde ausgeführt. Das Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes in 25 μL TE-Puffer (Tabelle 12) resuspendiert und der DNA-Gehalt mittels NanoDrop™ bestimmt.

2.2.1.4 Ligation

Die *annealte* shRNA (Abschnitt 2.2.1.1) wurde durch eine Ligation mit dem linearisierten Plasmidrückgrat (Abschnitt 2.2.1.2) verbunden, indem ein Ligations-Reaktionsansatz (Tabelle 6) hergestellt und dieser über Nacht bei 14 °C inkubiert wurde.

Tabelle 6: Ligations-Reaktionsansatz

Reagenz	Menge
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	2 µL
pEGFP-U6 (1 ng; 1,38 ng/µL)	0,72 µL
<i>annealte</i> anti-PTBP1-shRNA (5 nM)	1 µL
DNase/RNase-freies Wasser	15,28 µL
T4-DNA-Ligase	1 µL
Gesamtvolumen	20 µL

Kompetente *E. coli* wurden zur Vervielfältigung und Rücklage mit dem fertig klonierten Plasmid pEGFP-U6_anti-PTBP1 transformiert (Abschnitt 2.2.1.5).

2.2.1.5 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

70 µL chemisch-kompetenter *E. coli* XL10-Gold-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 2 µL des Ligationsansatzes (Abschnitt 2.2.1.4) hinzugegeben und vorsichtig durch leichtes Schnipsen gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde für 1 min bei 42 °C der Hitzeschock der Bakterien durchgeführt. Es folgte eine sofortige Inkubation auf Eis für 3 min, um die Temperatur zu senken. 250 µL eines antibiotikafreien SOC-Mediums wurden zu den Zellen gegeben und diese 1 h bei 37 °C und schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf 30 µg/mL Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C angezogen. Das Kanamycin erzeugt dabei einen Selektionsdruck auf die *E. coli*-Zellen, die nur mit aufgenommenem Plasmid in der Lage waren, eine Kanamycin-Resistenz auszubilden und zu überleben. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien jeweils in einen Erlenmeyerkolben mit 30 µg/mL Kanamycin-haltigem LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Am nächsten Tag wurden aus den Zellsuspensionen der verschiedenen Klone zum Einen Kryostocks zur Rücklage hergestellt und zum Anderen die Plasmide isoliert (Abschnitt 2.2.1.6).

2.2.1.6 Plasmidisolierung

Um das klonierte Plasmid pEGFP-U6_anti-PTBP1 auf seine Richtigkeit überprüfen und schließlich MSCs damit transfizieren zu können, musste zuerst das Plasmid aus der *E. coli*-Zellsuspension (Abschnitt 2.2.1.5) isoliert werden. Dafür wurde mithilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* nach Anleitung des Kit-Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. Dabei wurde die DNA von der DNA-bindenden Säule in zwei Schritten mit jeweils 25 µL 56 °C warmem DNase/RNase-freiem Wasser eluiert, um die

Ausbeute zu erhöhen. Nach Zugabe des Wassers wurde die Säule vor der Zentrifugation jeweils 10 min mit dem Wasser inkubiert, was ebenfalls der Erhöhung der Ausbeute diene.

Mittels Sanger-Sequenzierung (durchgeführt von der Firma SeqLab/Microsynth, Göttingen, Deutschland) wurde anschließend die Richtigkeit des Plasmides überprüft. Für die Sequenzierung wurde ein rückwärts-gerichteter M13-Primer verwendet (Abbildung 1). MSCs wurden während weiterer Experimente mit dem erstellten Plasmid transfiziert, um diese zu neuronalen Zellen zu differenzieren (Abschnitt 2.1.2.1).

2.2.2 RNA-Isolierung

Aus den verschiedenen Zellproben wurde mithilfe des *PeqGOLD Total RNA Kits* die Gesamt-RNA isoliert. Dabei wurde der Anleitung des Herstellers für adhärent wachsende Monolayer-Zellen gefolgt, die auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm kultiviert und je nach Probe differenziert (Abschnitt 2.1.2) worden waren. Der im Protokoll optionale DNase I-Verdau wurde an dieser Stelle ausgelassen, da dieser vor der folgenden cDNA-Synthese (Abschnitt 2.2.3) durchgeführt wurde. Eluiert wurde die RNA in zwei Schritten mit 56 °C warmem DNase/RNase-freiem Wasser, wobei im ersten Schritt 25 µL H₂O und im zweiten Schritt 50 µL H₂O verwendet wurden. Wie auch bei der Plasmidisolierung wurde die Säule mit dem zugegebenen Wasser vor der Zentrifugation für 10 min inkubiert, um die Ausbeute der erhaltenen RNA zu erhöhen.

2.2.3 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA (Abschnitt 2.2.2) wurde revers in cDNA transkribiert. Dafür wurde das Kit *Maxima First Strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR with dsDNase* verwendet und der Anleitung des Herstellers gefolgt. So wurde zunächst ein dsDNase-Verdau durchgeführt, um die verbliebene genomische DNA zu entfernen. Von der dsDNase-verdauten RNA wurde 1 µL abgenommen, um in einer PCR (Abschnitt 2.2.4) zu überprüfen, ob die DNA vollständig degradiert wurde. Es folgte die cDNA-Synthese. Abschließend wurde die cDNA mit DNase/RNase-freiem Wasser verdünnt, bis eine Konzentration von 12,5 ng/µL erreicht war.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA. Damit kann sie sowohl für gentechnische Arbeiten wie Klonierungen als auch qualitativ oder quantitativ (qRT-PCR, Abschnitt 2.2.5) zu Nachweiszwecken eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde die qualitative PCR verwendet, um die Vollständigkeit der Degradation genomischer DNA zu überprüfen. Dafür wurden Primer benötigt, die in der Lage waren, an genomische DNA zu binden, wie zum Beispiel die hier verwendeten gegen *SOX2* gerichteten Primer (Tabelle 9). Als Template dienten die isolierte RNA (Abschnitt 2.2.2), die genomische DNA enthalten sollte, und die isolierte RNA nach dem dsDNase-Verdau (Abschnitt 2.2.3), in der die genomische DNA degradiert vorliegen und somit nicht mehr amplifizierbar sein sollte. Wäre in dieser Probe nach der PCR ein Amplifikat sichtbar, wäre der dsDNase-Verdau nicht erfolgreich gewesen und müsste wiederholt werden. Der Reaktionsansatz der PCR bestand aus 1 µL Template, je

200 nM vorwärts- und rückwärts-gerichteten Primern, 5 μ L OneTaq® 2x Mastermix und H₂O (*ad* 10 μ L). Die PCR wurde in einem PCR-Cycler durchgeführt. Auf einen initialen Denaturierungsschritt für 3 min bei 95 °C folgten 35 Zyklen, die jeweils aus einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 15 s, einem Schritt zum Primer-Annealing für 30 s bei 60 °C und einem Elongationsschritt bei 72 °C für 45 s bestanden. Zum Abschluss wurde eine finale Elongation für 5 min bei 72 °C durchgeführt. Die PCR-Proben wurden zur Visualisierung auf ein 2 %iges Agarosegel (Abschnitt 2.2.6) aufgetragen und elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt.

2.2.5 qRT-PCR

Mithilfe der quantitativen *real-time*-PCR (qRT-PCR) wird die in Zellen vorhandene mRNA-Menge relativ zu einem internen Standard bestimmt. In dieser Arbeit wurden Kontroll-MSCs und differenzierte Zellen (Abschnitt 2.1.2.2) mittels qRT-PCR verglichen, wobei das Expressionslevel verschiedener MSC- und neuronaler Marker, sowie verschiedener Connexin-Isoformen untersucht wurde. Der Reaktionsansatz bestand aus 12,5 ng cDNA (Abschnitt 2.2.3) als Template, jeweils 200 nM vorwärts- und rückwärts-gerichteten Primern (Tabelle 9), 5 μ L KAPA SYBR® FAST Universal Mastermix (2x) und H₂O (*ad* 10 μ L). Das verwendete PCR-Programm des peqSTAR 96Q real time PCR-Cyclers beinhaltet eine initiale Denaturierung für 3 min bei 95 °C, gefolgt von 40 zweischrittigen Zyklen, die jeweils aus einem Denaturierungsschritt für 15 s bei 95 °C und einem Schritt zum Primer-*Annealing* und zur Elongation für 30 s bei 60 °C bestanden. Nach Abschluss eines Zyklus wurde jeweils die Fluoreszenz der Proben gemessen. Nach dem Ende dieses Programms wurde eine Schmelzkurve aufgenommen, um die spezifische Amplifikation des Zielgens zu überprüfen. Vor ihrer experimentellen Verwendung wurden alle Primerpaare auf ihre Effizienz überprüft, die zwischen 90 % und 110 % liegen musste. War dies bei einem Primerpaar nicht der Fall, wurden für dieses Zielgen neue Primer designt. Die korrekte Amplifikation des Zielgens wurde durch eine Sequenzierung des Amplifikats bestätigt. In einem Experiment wurden pro Probe und Primerpaar jeweils drei technische Replikate gemessen. Außerdem wurden pro Primerpaar drei Reaktionsansätze mit H₂O anstelle des cDNA-Templates untersucht, die als Negativkontrollen dienten. Jedes qRT-PCR-Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt, wobei jeweils cDNA aus unabhängigen Differenzierungsansätzen verwendet wurde. Die Quantifizierung des relativen mRNA-Levels wurde mithilfe der 2^{- Δ Ct}-Methode (Formel (1)) durchgeführt, wobei das Zielgen (ZG) auf das Haushaltsgen *RPS29* normiert wurde.

$$relative\ cDNA-Menge = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{(ZG)} - Ct_{(RPS29)})} \quad (1)$$

Signifikante Veränderungen wurden mittels eines gepaarten zweiseitigen Studentischen *t*-Tests berechnet, bei dem die Proben der differenzierten Zellen jeweils mit unbehandelten MSCs verglichen wurden. Die *p*-Werte dienen dem Abschätzen von Signifikanzen, die als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt wurden.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Anwendung und Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 1 %, 2 % oder 4 % Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer (Tabelle 12) aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war, und anschließend auf etwa 60 °C abkühlen gelassen. Je hochprozentiger das Agarosegel ist, desto kleinere Fragmente können darin hochauflösend aufgetrennt werden. 20 mL Agaroselösung wurden anschließend mit 1 µL des in DNA interkalierenden Farbstoffs GelRed® versetzt, gemischt und in einen Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde dieses mit 1x TAE-Puffer überschichtet und beladen. Es wurden je 5 µL der Proben und 3 µL eines 100 bp DNA-Markers (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder*) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte für 40-45 min bei 80 V. Das Gel wurde anschließend unter UV-Anregung des GelRed®-Farbstoffs mit einer Belichtungszeit von 15 s fotografiert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Protein-Isolierung

Die Protein-Isolierung erfolgte aus undifferenzierten und differenzierten (Abschnitt 2.1.2) MSCs, die auf Zellkulturschalen kultiviert wurden. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 mL PBS zu den Zellen gegeben, die mithilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt wurden. Nach einer Zentrifugation bei 1.000 x g und 4 °C für 4 min wurde das Zellpellet zur Zelllyse in 50 µL RIPA-Puffer (Tabelle 12) resuspendiert. Die Suspension wurde für 15 min auf Eis inkubiert und im Folgenden für 15 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand, in dem die Proteine der Zellen enthalten waren, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die erreichte Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay (Abschnitt 2.3.2) abgeschätzt.

2.3.2 Proteinquantifizierung mittels Bradford-Assay

Die Proteinproben (Abschnitt 2.3.1) wurden 1:20 mit H₂O verdünnt. Außerdem wurde eine Standardreihe mit BSA in 5 %igem RIPA-Puffer in den Konzentrationen 1500 ng/µL, 1000 ng/µL, 750 ng/µL, 500 ng/µL, 250 ng/µL, 125 ng/µL, 50 ng/µL und 0 ng/µL angesetzt. In eine 96-Lochplatte wurden jeweils in drei Vertiefungen je 5 µL jeder Konzentration der Standardreihe und jeder Proteinprobe vorgelegt. Im Anschluss wurden 250 µL Bradford-Reagenz zu jeder Probe hinzugegeben und in einem Plate-Reader die Absorption bei 620 nm gemessen. Die Messung der Proteinkonzentration mit dem Bradford-Reagenz basiert auf der Komplexbildung des Farbstoffs Brilliant Blue G mit Proteinen, wobei sich das Extinktionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Aus den Messwerten der Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt und daraus im Anschluss unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von 20 die unbekannte Proteinkonzentration ermittelt.

2.3.3 SDS-PAGE

Um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die Proteinlösung (Abschnitt 2.3.1) wurde mit H₂O und danach 1:5 mit 5x Lämmli-Puffer (Tabelle 12) verdünnt, sodass pro benötigter Probe 15 µL mit 20 µg Protein erhalten wurden, die anschließend für 10 min auf 70 °C erhitzt wurden. Auf ein SDS-Polyacrylamidgel mit einem 5 % Polyacrylamid-haltigen Sammelgel und einem 12 %igen Trenngel (Tabelle 7), das sich in einem SDS-Laufpuffer (Tabelle 12) in einer Gelkammer befand, wurden pro Gelbahn die 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Mittels Elektrophorese wurden die Proteine der Größe nach aufgetrennt. Während sich die Lauffront im Sammelgel befand, wurde pro Gel ein Strom von 20 mA appliziert, der nach Eintritt der Lauffront in das Trenngel auf 40 mA pro Gel erhöht wurde.

Tabelle 7: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamid-Gele (für 5 Gele)

12 % Trenngel		5 % Sammelgel	
H ₂ O	8,25 mL	H ₂ O	4,76 mL
Rotiphorese® Gel 30	10,0 mL	Rotiphorese® Gel 30	1,19 mL
1,5 M TRIS pH 8.8	6,25 mL	1 M TRIS pH 6.8	0,91 µL
10 % SDS	250 µL	10 % SDS	70 µL
10 % APS	250 µL	10 % APS	70 µL
TEMED	25 µL	TEMED	7 µL

2.3.4 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung eines *semi-dry* Western-Blot-Systems (Biometra Fasblot, Analytik Jena AG) und eines Transfer-Puffers (Tabelle 12) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Während des Blotting-Vorgangs wurde für 1,5 h ein Strom von 1 mA/cm² appliziert. Im Anschluss wurde eine Ponceau-Färbung der Membran durchgeführt, um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen. Dafür wurde die Membran für 5 min unter Schütteln in Ponceau-Lösung (Tabelle 12) inkubiert und anschließend mit H₂O entfärbt bis ein ausreichender Kontrast der gefärbten Proteine zum Hintergrund erreicht war. Nach dem Blotten wurde die Membran in 5 % fettfreiem Trockenmilchpulver, gelöst in PBS-T (Tabelle 12), für 3 h schüttelnd bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindestellen der Antikörper abzusättigen. Es folgten fünf Waschschrte für je 3 min in PBS-T unter Schütteln. Anschließend wurde die entsprechende in PBS-T verdünnte Primärantikörperlösung (Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 10) zu der Membran gegeben und diese darin über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Je nach Molekülmasse des untersuchten Proteins, wurde entweder GAPDH oder β-Tubulin als interner Standard verwendet. Die Membran für die Negativkontrollen der Sekundärantikörper wurde ausschließlich in PBS-T bei ansonsten identischen Bedingungen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgten auf die Primärantikörperinkubation erneut fünf Waschschrte in PBS-T, jeweils 3 min schüttelnd bei Raumtemperatur, um Primärantikörperreste gründlich zu entfernen und somit Hintergrundsignale zu minimieren. Danach wurde die sekundäre anti-rabbit-

Antikörperlösung unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur zu den Membranen gegeben, erneut fünfmal mit PBS-T gewaschen und die Membranen im Anschluss 1 h bei gleichen Bedingungen in der sekundären anti-*mouse*-Antikörperlösung inkubiert. Nach drei Waschschrritten in PBS-T und zwei weiteren Waschschrritten in PBS wurden die Membranen entwickelt. Dafür wurden die Membranen in einer Entwicklerlösung (Tabelle 12) geschwenkt und die resultierenden Chemilumineszenz-Signale anschließend mit einem CCD-Kamera-*Imaging*-System detektiert. Alle Experimente wurden mindestens viermal durchgeführt, um eine statistisch belastbare Quantifizierung mittels Gelanalyse-Tool der Software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) zu ermöglichen. Die damit gemessenen Bandenintensitäten des analysierten Proteins wurden zunächst auf die Intensitäten der internen Kontrolle (GAPDH oder β -Tubulin) normiert. Die resultierenden Werte wurden im Anschluss auf den Wert der unbehandelten Kontroll-*MSCs* normiert, gefolgt von einer statistischen Analyse der Ergebnisse mittels eines ungepaarten zweiseitigen Studentischen *t*-Tests im Vergleich zu unbehandelten *MSCs*. Anhand des *p*-Werts wurden Signifikanzen abgeschätzt und als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

2.4 Physiologische Methoden

2.4.1 Patch-Clamp-Technik

Mithilfe der *Patch-Clamp*-Technik können Ionenströme, die durch Ionenkanäle in der Zellmembran fließen, gemessen werden, wie auch das Membranpotential der gepatchten Zelle. Es können verschiedene *Patch-Clamp*-Konfigurationen verwendet werden, die entscheidend sind, ob einzelne Ionenkanäle oder alle Kanäle der Zelle gemessen werden (Hamill *et al.*, 1981). In dieser Arbeit wurde ausschließlich die *Whole-Cell*-Konfiguration verwendet, mit der alle Ionenkanäle in der Zellmembran der ganzen Zelle analysiert werden. Dafür wurden die zu untersuchenden Zellen auf Deckgläschen kultiviert und nach Bedarf differenziert (Abschnitt 2.1.2). Für die *Patch-Clamp*-Experimente wurde ein entsprechendes Deckglas mit einzeln vorliegenden Zellen in eine mit Badmedium (Tabelle 12) gefüllte Messkammer gelegt, die auf ein inverses Fluoreszenzmikroskop montiert wurde. Der gesamte Versuchsaufbau befand sich in einem Faraday-Käfig auf einem schwingungsgedämpften Tisch, um Störsignale und Erschütterungen zu reduzieren, die die Experimente beeinträchtigen würden. An einen EPC 10 USB Double Patch-Clamp-Amplifier wurden zwei Elektroden angeschlossen, von denen sich eine als Referenzelektrode in einem mit Pipettenmedium (Tabelle 12) gefüllten Gummischlauch im Badmedium und die andere als Messelektrode in einer ebenfalls mit Pipettenmedium gefüllten Glaskapillare befand. Die Glaskapillaren wurden zuvor mit einem Kapillarziehgerät dünn ausgezogen, sodass sie bei den Messungen einen Eingangswiderstand von 4-6 M Ω aufwiesen. Mithilfe einer solchen auf einem Mikromanipulator montierten Glaskapillare und unter Verwendung der Software PatchMaster 2.9 wurde die *Whole-Cell*-Konfiguration bei einer einzelnen Zelle hergestellt und die geöffnete Zelle auf eine Spannung von -60 mV geklemmt. Im *Current-Clamp*-Modus wurden depolarisierende Ströme

bis 200 pA in die Zelle injiziert und ihr resultierendes Membranpotential gemessen, um zu überprüfen, ob sie in der Lage war, Aktionspotentiale als Antwort auf depolarisierende Ströme zu induzieren.

2.4.2 Zellkopplungsversuche mittels Farbstofftransfer

Um den Einfluss der verschiedenen Differenzierungen auf die *Gap Junction*-Kopplung zu untersuchen, wurden Farbstofftransferexperimente mit Lucifer Yellow (LY) durchgeführt. MSCs wurden auf Kollagen I-beschichteten Deckgläschen kultiviert und nach Bedarf differenziert (Abschnitt 2.1.2). Da hier die Zell-Zellkopplung untersucht wurde, war es diesmal wichtig, dass die Deckgläschen dicht bewachsen waren. Wie auch bei den Patch Clamp-Versuchen (Abschnitt 2.4.1) wurde das besiedelte Deckgläschen in eine Messkammer mit Badmedium (Tabelle 12) gelegt, die auf ein inverses Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossenem Polychrome V und CMOS ORCA-Flash-Digitalkamera montiert wurde. Bei einer Zelle inmitten eines Zellverbands wurde, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, eine *Whole-Cell*-Konfiguration hergestellt, wobei dem Pipettenmedium (Tabelle 12) 1 mg/mL LY zugesetzt wurde. Nach dem erfolgreichen Öffnen der Zelle konnte der Farbstoff für 10 min aus der Kapillare in die Zelle hineindiffundieren, bevor die Kapillare wieder entfernt wurde. Waren die untersuchten Zellen über *Gap Junctions* miteinander gekoppelt, konnte der Farbstoff von der gepatchten Zelle über *Gap Junctions* in die Nachbarzellen diffundieren. Unter Verwendung der Mikroskopsoftware NIS-Elements AR 4.4 wurde vor dem Versuch ein durchlichtmikroskopisches Bild des betreffenden Ausschnitts aufgenommen. Außerdem wurden vor Beginn des Versuchs, während der Diffusionszeit mit der Kapillare an der Zelle und direkt nach dem Entfernen der Kapillare Fluoreszenzaufnahmen gemacht, für die LY bei 410 nm mit dem Polychrome V angeregt wurde.

Die entstandenen Bilder wurden mithilfe der Software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) ausgewertet. Um unspezifische Hintergrundsignale zu eliminieren, wurde die Fluoreszenzaufnahme, die vor dem Herstellen einer *Whole-Cell*-Konfiguration gemacht wurde, von der subtrahiert, die nach Entfernen der Kapillare aufgenommen wurde. Das resultierende erstellte Bild wurde weiter ausgewertet. Um die Kopplungsrate zu quantifizieren, wurde die integrierte Dichte des Fluoreszenzsignals in allen Zellen außer der gepatchten gemessen und anschließend auf die integrierte Dichte aller Zellen, einschließlich der gepatchten Zelle, normiert. Dieser Wert wird in dieser Arbeit forthin als LY-Farbstoff-Transferrate bezeichnet und liegt zwischen 0 und 1. Je größer der Wert, desto mehr Farbstoff war aus der gepatchten Zelle in gekoppelte Zellen diffundiert. Ist der Wert 0, war keine Zelle mit der gepatchten Zelle gekoppelt. Wäre der Wert 1, wäre der gesamte Farbstoff aus der gepatchten Zelle in benachbarte Zellen diffundiert. Das ist jedoch lediglich ein theoretischer Wert, da sich bei einer Diffusion ein Gleichgewicht einstellt und der Farbstoff bei Erreichen dieses Gleichgewichts in keiner der beteiligten Zellen höhere Konzentrationen erreichen würde. Die LY-Farbstoff-Transferrate wurde statistisch mit einem ungepaarten zweiseitigen Studentschen *t*-Test untersucht und damit Signifikanzen im Vergleich zu undifferenzierten MSCs abgeschätzt und als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

2.4.3 Ca²⁺-Imaging

Die Fähigkeit der MSCs und differenzierten Zellen auf extrazellulär applizierte sekundäre Botenstoffe, wie ATP, mit intrazellulären Ca²⁺-Signalen zu reagieren, kann mit der fluoreszenzbasierten Ca²⁺-Imaging-Methode untersucht werden. Dafür wurden die Zellen zunächst auf Deckgläschen kultiviert und 7 d mit NIM-2 differenziert. Die Deckgläschen wurden erst mit einem Ca²⁺-haltigen Badmedium (Tabelle 12) gewaschen und anschließend für 30 min in dem Badmedium unter Zusatz von 1 µM des membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffs Indo-1 AM bei 37 °C unter Lichtausschluss im Brutschrank inkubiert. Nach 30 min wurde der Farbstoff entfernt, die Zellen mit dem Badmedium gewaschen und anschließend für weitere 30 min bei 37 °C ohne Licht im Brutschrank inkubiert. Auf diese Weise wurden die Zellen mit dem Farbstoff Indo-1 AM beladen, der in den Zellen durch zelleigene Esterasen zu dem membranimpermeablen Indo-1 prozessiert wird. Mithilfe dieses Farbstoffs konnte emissionsratiometrisch der relative Ca²⁺-Gehalt in den Zellen bestimmt werden. Dafür wurden die Zellen in einer Durchflussmesskammer auf ein inverses Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossenem Polychrome V, Optosplit II mit zugehörigem Indo-1-Filterblock (406/15 nm, 485/20 nm) und CMOS ORCA-Flash-Digitalkamera montiert. Ein Perfusionssystem mit peristaltischer Pumpe war mit der Messkammer verbunden und ermöglichte einen kontinuierlichen Medienaustausch mit einer Flussrate von 3 mL/min. Während der verschiedenen Messungen wurde Indo-1 mit einer Wellenlänge von 360 nm zur Fluoreszenz angeregt und mithilfe des Optosplit II sowohl bei 406/15 nm als auch bei 485/20 nm detektiert, da sich das Emissionsmaximum von Indo-1 durch Komplexierung von Ca²⁺ von 485 nm zu 405 nm verschiebt. Je mehr Ca²⁺ in einer Zelle vorhanden ist, desto mehr Ca²⁺ kann von Indo-1 komplexiert werden und desto größer wird das Verhältnis $F_{406\text{ nm}}/F_{485\text{ nm}}$. Es wurde pro Sekunde eine Fluoreszenzaufnahme mit einer Belichtungszeit von 20 ms und einem 4x4-Binning gemacht.

2.4.3.1 Ablauf der Messungen

Zu Beginn jedes Versuches befanden sich die Zellen unter kontinuierlichem Medienfluss in einem Ca²⁺-haltigen Badmedium (Tabelle 12), das als Kontrollmedium diente. Die einzelnen Zellen wurden mithilfe der Mikroskopsoftware NIS-Elements AR 4.4 als *regions of interest* (ROIs) markiert und darin das Verhältnis 406 nm/485 nm im zeitlichen Verlauf des Experiments gemessen. Um eine Reaktion der Zellen durch einen mechanischen Einfluss des Medienstroms auszuschließen, wurden die Zellen zu Beginn der Messung für 60 s mit dem Kontrollmedium perfundiert. Es folgte eine Applikation von 50 µM ATP (in Ca²⁺-haltigem Badmedium) für 5 s, das im Anschluss für 175 s mit Ca²⁺-haltigem Badmedium ausgewaschen wurde. Anhand dieser ersten Stimulierung wurde die prozentuale Reaktion der Kontroll-MSCs und differenzierten Zellen auf 50 µM ATP bestimmt und sie diente als Referenz (Referenzstimulierung, RS) für die Stimulierungen im weiteren Verlauf der Messung.

Im zweiten Versuchsabschnitt folgten drei weitere ATP-Stimulierungen (S1, S2 und S3), wobei jeweils für 5 s 50 µM ATP appliziert und dieses im Anschluss für 175 s wieder ausgewaschen wurde. Zuvor wurde durch einen Medienwechsel das extrazelluläre Ca²⁺ entzogen und/oder verschiedene Inhibitoren zu den Zellen gegeben, um die induzierten Ca²⁺-Signalwege näher zu charakterisieren. Das Entfernen

des extrazellulären Ca^{2+} gibt dabei Aufschluss über die Aktivität von P2X-Kanälen, während die Inhibitoren 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) und U-73122 an unterschiedlichen Stellen in die P2Y-Rezeptor-induzierte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern eingreifen. 2-APB ist ein unspezifischer Blocker von IP_3 -Rezeptoren, sodass die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern inhibiert wird (Peppiatt *et al.*, 2003). U-73122 greift früher in diesen Signalweg ein. Durch die Inhibierung der Phospholipase C (PLC) wird die Produktion von IP_3 unterbunden und somit ebenfalls die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern verhindert (Bleasdale *et al.*, 1990).

Je nach zugegebenem Inhibitor wurde die erforderliche Inkubationsdauer vor der nächsten ATP-Stimulierung ermittelt, damit der Inhibitor in die Zellen gelangen und wirken konnte. So benötigte der Inhibitor 2-APB in einer Konzentration von 100 μM eine Inkubationsdauer von 7 min, während für 2 μM U-73122 eine Zeit von 4 min ausreichend war. Um die Stabilität der Zellen möglichst lange zu gewährleisten, wurde das extrazelluläre Ca^{2+} in allen Versuchen erst 60 s vor der ersten ATP-Stimulierung im zweiten Versuchsabschnitt (S1) entzogen. Auf diese Weise bestand ein zusammengehöriges Versuchssset aus 4 verschiedenen Experimenten, die jeweils sechs- bis zwölfmal durchgeführt wurden. Nach der RS wurden die ATP-Stimulierungen S1-S3 jeweils in Ca^{2+} -haltigem Badmedium \emptyset Inhibitor (Kontrolle), Ca^{2+} -haltigem Badmedium mit Inhibitor, Badmedium \emptyset Ca^{2+} \emptyset Inhibitor und Badmedium \emptyset Ca^{2+} mit Inhibitor induziert und zwischen den Induktionen das ATP mit den entsprechenden Medien ausgewaschen.

2.4.3.2 Ca^{2+} -Imaging-Auswertung

Während der Messungen wurde innerhalb der markierten ROIs die Fluoreszenzintensität bei 406/15 nm und bei 485/20 nm gemessen und das Verhältnis 406 nm/485 nm im zeitlichen Verlauf dargestellt. Diese Daten wurden im Anschluss an die Messung als Excel-Dateien exportiert und weiter mit OriginPro 2017 analysiert.

Anhand der Referenzstimulierung (RS) wurde ermittelt, wie viele der markierten Zellen prozentual auf ATP reagierten. Zum Abschätzen von signifikanten Veränderungen der differenzierten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-MSCs wurde ein zweiseitiger ungepaarter Studentischer *t*-Test im Vergleich zu unbehandelten MSCs durchgeführt.

Die ATP-Stimuli im zweiten Versuchsabschnitt unter variierenden Bedingungen wurden auf zwei verschiedene Weisen ausgewertet. Die erste Art der Auswertung beinhaltete das manuelle Auszählen von Peaks, indem binär entschieden wurde, ob ein Peak vorhanden war oder nicht. Für die Stimulierungen RS und S1-S3 wurde ein Peak registriert, wenn in direktem Zusammenhang mit der ATP-Applikation ein Peak erkennbar war. Es wurden nur Zellen in die weitere Auswertung einbezogen, wenn diese auf RS reagiert hatten. Die Anzahl der Reaktionen wurde pro Stimulus (S1-S3) normiert auf die Anzahl an untersuchten Zellen dargestellt, die auf RS reagiert hatten. RS entsprach somit immer einer Reaktionsfähigkeit von 100 %.

Die zweite Art der Auswertung basierte auf einer automatisierten Peaksuche und Bestimmung der relativen Peakhöhe mithilfe eines eigens für diese Anwendung im Verlauf dieser Arbeit geschriebenen

Makros für die Software OriginPro 2017 (Abbildung 3). Zu diesem Zweck wurden die exportierten Excel-Daten, die die Messwerte der ROIs der analysierten Zellen eines Deckgläschens enthielten, in OriginPro 2017 importiert und Zeitpunkte und Art der Medienwechsel eingegeben. Zunächst erfolgte eine Glättung der Daten mittels FFT-Filter (engl. *fast fourier transformation*) mit einer Fenstergröße von 40 Messpunkten. Anhand der eingegebenen Zeitpunkte als Ankerpunkte wurde anschließend eine Basislinie berechnet und von den geglätteten Daten subtrahiert.

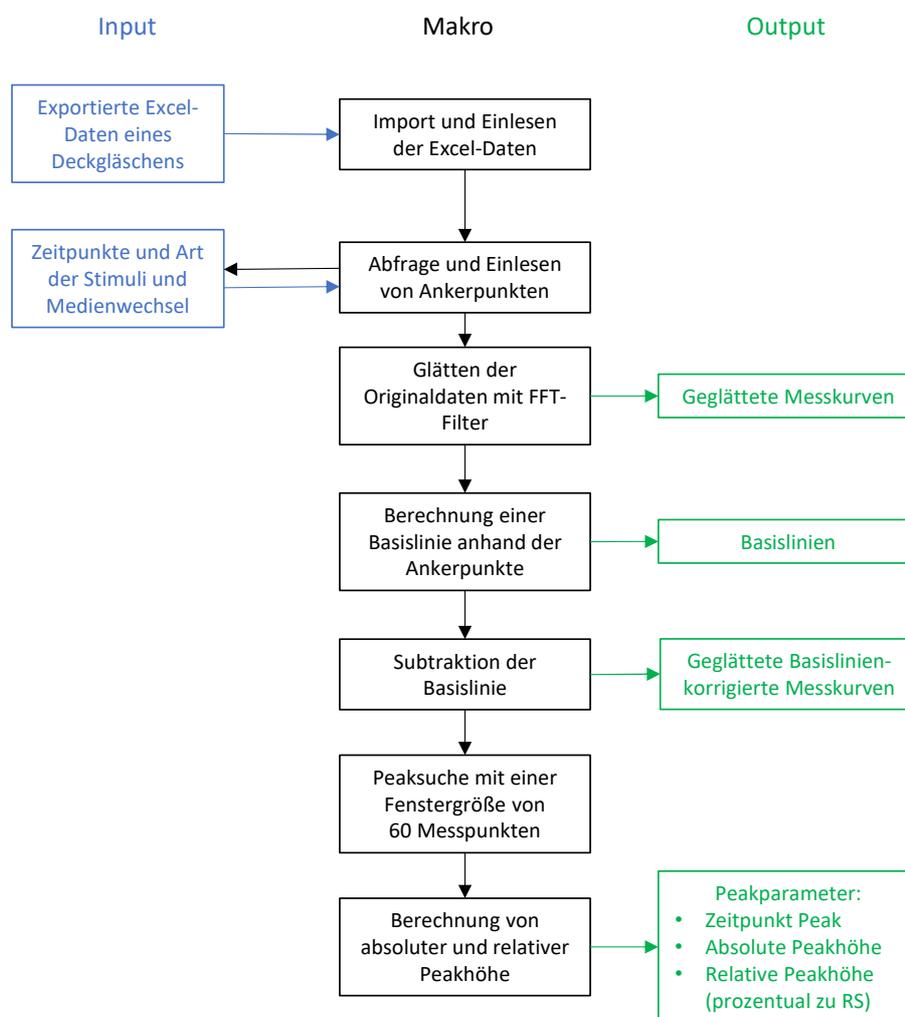


Abbildung 3: Fließschema des in OriginPro 2017 verwendeten Makros zur Peakanalyse.

In den geglätteten und Basislinien-korrigierten Messkurven wurde eine Peaksuche durchgeführt mit einer Fenstergröße von 60 Messpunkten und einem Schwellenwert von 0,0135. Pro ATP-Stimulus wurde dem Makro nur das Finden eines Peaks erlaubt, um Artefakte und Doppelpeaks auszuschließen. Das Makro gab am Ende der Suche für jeden ATP-Stimulus den höchsten Peak aus. Im Anschluss wurden die relative Peakhöhen von S1-S3 berechnet. Dabei wurde die ermittelte Peakhöhe von S1, S2 und S3 jeweils auf RS derselben Zelle normiert. Die relative Peakhöhe von RS betrug somit immer 100 %. Auch in dieser Auswertungsmethode wurden nur die Zellen betrachtet, die auf RS reagierten. Sowohl die geglätteten und Basislinien-korrigierten Messkurven als auch die Basislinien selber wurden grafisch und numerisch als Grafiken und Worksheets ausgegeben. Die Resultate der Peaksuche und

Normierung wurden ebenfalls in einem Worksheet ausgegeben. In dem Worksheet wurden sowohl die Zeitpunkte, zu denen die Peaks gefunden wurden, eingetragen, wie auch die Basislinien-korrigierten absoluten und relativen Peakhöhen. Mit den berechneten Peakhöhen wurde im Anschluss ein Ausreißertest nach Nalimov durchgeführt (Kaiser und Gottschalk, 1972), um stark von der Grundgesamtheit abweichende Werte zu eliminieren.

Aus den prozentualen Reaktionsfähigkeiten und relativen Peakhöhen wurde zunächst pro untersuchtem Deckgläschen, also pro Experiment, der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde aus den Werten der einzelnen Deckgläschen pro Behandlung der Mittelwert und SEM aus allen Deckgläschen berechnet und im direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Kombinationen aus Medien und Inhibitor dargestellt, wobei Signifikanzen mithilfe eines zweiseitigen ungepaarten Studentischen t -Tests im Vergleich zum Ca^{2+} -haltigen Badmedium abgeschätzt wurden. Die Ca^{2+} -Signale der MSCs im zweiten Versuchsabschnitt wurden dabei stets mit den entsprechenden Ca^{2+} -Signalen der MSCs im zweiten Versuchsabschnitt in Ca^{2+} -haltigem Badmedium verglichen. Beispielsweise wurden die Ergebnisse von S2, induziert in MSCs in Ca^{2+} -freiem Badmedium mit U-73122, mit denen von S2, induziert in MSCs in Ca^{2+} -haltigem Badmedium, verglichen. Die Experimente der NIM-2-differenzierten Zellen wurden ebenso analysiert. Signifikanzen wurden als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

Direkte Vergleiche zwischen MSCs und NIM-2-induzierten Zellen zum gleichen Zeitpunkt (gleiche Stimulierung) unter gleichen Messbedingungen (Medien, Inhibitoren) fanden ebenfalls statt. Signifikante Abweichungen der 7 d NIM-2-differenzierten Zellen wurden mithilfe eines zweiseitigen ungepaarten Studentischen t -Tests im Vergleich zu Kontroll-MSCs abgeschätzt. Beispielsweise wurden die Ergebnisse von S2, induziert in NIM-2-behandelten Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium, mit denen von S2, induziert in MSCs in Ca^{2+} -freiem Medium, verglichen. Signifikanzen wurden als # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ und ### $p \leq 0,001$ dargestellt.

2.4.4 Farbstoffaufnahme-Experimente

Wie in Abschnitt 1.3 erläutert, weisen auch *Gap Junction*-Halbkanäle in vielen Zelltypen eine Aktivität auf. Diese kann unter anderem mit Farbstoffaufnahme-Experimenten, wie zum Beispiel von Schalper *et al.* (2008a) beschrieben, untersucht werden. Dabei wird ein Farbstoff verwendet, hier das sehr sensitive Ethidiumbromid (EtdBr), der nicht durch die Zellmembran diffundieren kann, sondern ausschließlich durch entsprechende geöffnete Kanäle in der Zellmembran wie *Gap Junction*-Halbkanäle (Schadzek *et al.*, 2018).

MSCs wurden auf Kollagen I-beschichteten Deckgläschen kultiviert und nach Bedarf differenziert (Abschnitt 2.1.2). Ein Deckgläschen wurde in eine Messkammer mit EtdBr-Badmedium gelegt und diese auf ein inverses Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossenem Polychrome V und CMOS ORCA-Flash-Digitalkamera montiert. Die Messkammer war an ein Perfusionssystem mit einer peristaltischen Pumpe angeschlossen, sodass ein kontinuierlicher Medienaustausch ermöglicht wurde. Ein Experiment mit drei Versuchsabschnitten dauerte insgesamt 30 min. Während der ersten 10 min wurden die Zellen kontinuierlich mit 1 mL/min mit 37 °C warmem EtdBr-Badmedium perfundiert, welches 2 mM

Calcium enthält. Die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen (vor allem Calciumionen) verringerte die Offenwahrscheinlichkeit von *Gap Junction*-Halbkanälen stark, sodass während dieses Versuchsabschnitts lediglich eine schwache Farbstoffaufnahme messbar sein sollte. Während der zweiten 10 min wurden die Zellen mit 1 mL/min 37 °C warmem EtdBr-Badmedium \emptyset Ca^{2+} \emptyset Mg^{2+} (Tabelle 12) perfundiert, sodass die zweiwertigen Magnesium- und Calciumionen entzogen wurden und vorhandene Halbkanäle eine erhöhte Aktivität zeigen sollten. Während dieses Versuchsabschnitts sollte somit mehr Farbstoff in die Zellen gelangen, wenn die Zellen über aktive *Gap Junction*-Halbkanäle verfügen. Im letzten zehnminütigen Versuchsabschnitt wurde dem EtdBr-Badmedium \emptyset Ca^{2+} \emptyset Mg^{2+} 100 μM Carbenoxolon (CBX) zugesetzt. Das ist ein *Gap Junction*-Blocker, der die Aktivität der *Gap Junction*-Halbkanäle und somit der EtdBr-Aufnahme reduzieren sollte. Während des gesamten Experiments wurde alle 15 s eine Fluoreszenzaufnahme gemacht, bei der EtdBr mit einer Wellenlänge von 535 nm bei einem Absorptionsnebenmaximum angeregt und eine Belichtungszeit von 700 ms gewählt wurde. Mithilfe der Mikroskopsoftware NIS-Elements AR 4.4 wurden die Zellen als ROIs markiert und für jedes Bild die Fluoreszenzintensität innerhalb der ROIs gemessen und im zeitlichen Verlauf dargestellt.

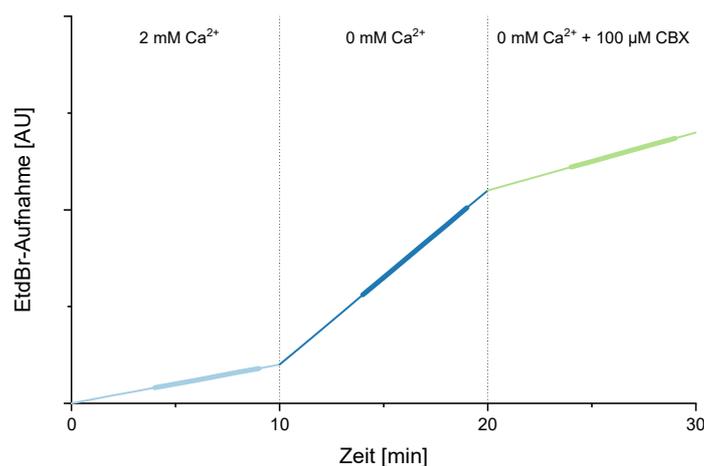


Abbildung 4: Schematische Abbildung einer Farbstoffaufnahmemessung. Dargestellt ist der schematische Kurvenverlauf der gemessenen EtdBr-Aufnahme im zeitlichen Verlauf während einer Farbstoffaufnahme-Messung. Im ersten Versuchsabschnitt werden die Zellen für 10 min mit einem Badmedium mit 2 mM Ca^{2+} perfundiert, gefolgt von 10 min in Badmedium ohne Ca^{2+} im zweiten Versuchsabschnitt. Während des dritten Versuchsabschnitts wurde dem Ca^{2+} -freien Medium 100 μM CBX zugesetzt. Die verstärkten Linien in den drei Versuchsteilen repräsentieren jeweils den Abschnitt, in dem die Steigung der Fluoreszenzkurve ermittelt wurde.

In den drei Versuchsabschnitten wurde jeweils die Farbstoffaufnahmerate (EtdBr AU/min) bestimmt, indem mit der Software Microsoft Excel 2016 jeweils die Steigung der Fluoreszenzintensitätskurve von Minute 4-9, von Minute 14-19 und von Minute 24-29 berechnet wurde (Abbildung 4). Die Farbstoffaufnahmeraten wurden jeweils für die Differenzierungen und die drei Experimentabschnitte als Differenz zur Farbstoffaufnahmerate des entsprechenden Versuchsabschnitts der Kontroll-MSCs als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Beispielsweise wurde die EtdBr-Farbstoffaufnahmerate der Kontroll-

MSCs im zweiten Versuchsabschnitt von der Farbstoffaufnahme der 7 d NIM-2-differenzierten Zellen im zweiten Versuchsabschnitt subtrahiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem paarweisen Studentschen t -Test im Vergleich zu unbehandelten MSCs. Es wurden pro Behandlung mindestens 990 Zellen analysiert, wobei sich diese auf mindestens 18 unterschiedlichen Deckgläschen befanden. Anhand des p -Werts wurden Signifikanzen abgeschätzt und als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene für MSCs und Fibroblasten publizierte neuronale Differenzierungsmethoden adaptiert und physiologische Experimente durchgeführt, um eine ausführliche Charakterisierung der unterschiedlich differenzierten Zellen zu ermöglichen.

Als Ausgangsmaterial dienten MSCs aus dem Knochenmark, die in einem ersten Schritt molekularbiologisch und physiologisch charakterisiert wurden (Abschnitt 3.1), um sie in den folgenden Abschnitten mit den unterschiedlichen Differenzierungen vergleichen zu können. Um die Transdifferenzierung zu induzieren, wurden die MSCs einerseits mit einer anti-PTBP1-shRNA transfiziert und andererseits mit *small molecule*-haltigen neuronalen Induktionsmedien behandelt und anschließend charakterisiert (Abschnitt 3.2). Außerdem wurde untersucht, wie die *Gap Junction*-abhängige Zell-Zellkopplung (Abschnitt 3.3) wie auch ATP-vermittelte Calcium-Signale (Abschnitt 3.4) durch die *small molecule*-induzierte Transdifferenzierung beeinflusst werden.

3.1 Charakterisierung von MSCs: Genexpression wichtiger Faktoren

MSCs müssen bestimmte Kriterien erfüllen, um als solche definiert und bezeichnet werden zu können (Dominici *et al.*, 2006). So müssen sie unter anderem die Marker CD73 (Gensymbol *NT5E*, für Gen- und Proteinäquivalente siehe Tabelle 8), CD90 (Gensymbol *THY1*) und CD105 (Gensymbol *ENG*) exprimieren. Auch CD166 (Gensymbol *ALCAM*) wird häufig für eine Charakterisierung herangezogen. Diese Marker konnten mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene in den verwendeten humanen MSCs aus dem Knochenmark auf einem im Vergleich zum Haushaltsgen *RPS29* hohen Expressionsniveau nachgewiesen werden (Abbildung 5). Für die folgende Differenzierung war es wichtig, den genauen Ausgangszustand der MSCs vor der Differenzierung zu kennen. Im Rahmen einer genaueren Charakterisierung wurden deshalb auch neuronale und muskuläre Marker betrachtet, um die MSCs nach der erfolgten Transdifferenzierung mit den differenzierten Zellen vergleichen zu können. Die neuronalen Marker *NES* und *TUBB3* wie auch die muskulären Marker *ACTA2* und *TAGLN* waren deutlich exprimiert. Auch der neuronale Marker *MAP2* war exprimiert. Ein weiterer neuronaler Marker, *RBFOX3*, und die Transkriptionsfaktoren *POU3F2*, *SOX2* und *MYT1L* wie auch die muskulären Marker *MYL2* und *SMYDI* waren nur sehr schwach nachweisbar (Abbildung 5).

Die Zellkommunikation in einem Gewebe ist sowohl in multipotenten als auch in final differenzierten Zellen von essenzieller Bedeutung für die physiologische Funktionalität des Gewebes wie auch für den Erhalt von spezifischen Zelleigenschaften. Diese Zellkommunikation kann über *Gap Junctions* stattfinden, die das Zytoplasma von benachbarten Zellen miteinander verbinden und aus Connexinen gebildet werden. Es sind im Menschen derzeit 21 verschiedene Connexin-Isoformen bekannt, die spezifisch je nach Gewebe- und Zelltyp exprimiert werden. Auch auf Differenzierungsprozesse hat die Connexin-Zusammensetzung und *Gap Junction*-Kopplung einen essenziellen Einfluss. Aus diesem Grund wurde das Expressionsverhalten verschiedener Connexin-Isoformen in den verwendeten MSCs

untersucht. Es zeigte sich, dass vor allem *GJA1* (kodierend für Cx43) sehr stark exprimiert war, gefolgt von *GJC1* (kodierend für Cx45), während *GJB2* (kodierend für Cx26), *GJA4* (kodierend für Cx37) und *GJA5* (kodierend für Cx40) schwach exprimiert waren und *GJD2* (kodierend für Cx36) kaum nachweisbar war (Abbildung 5).

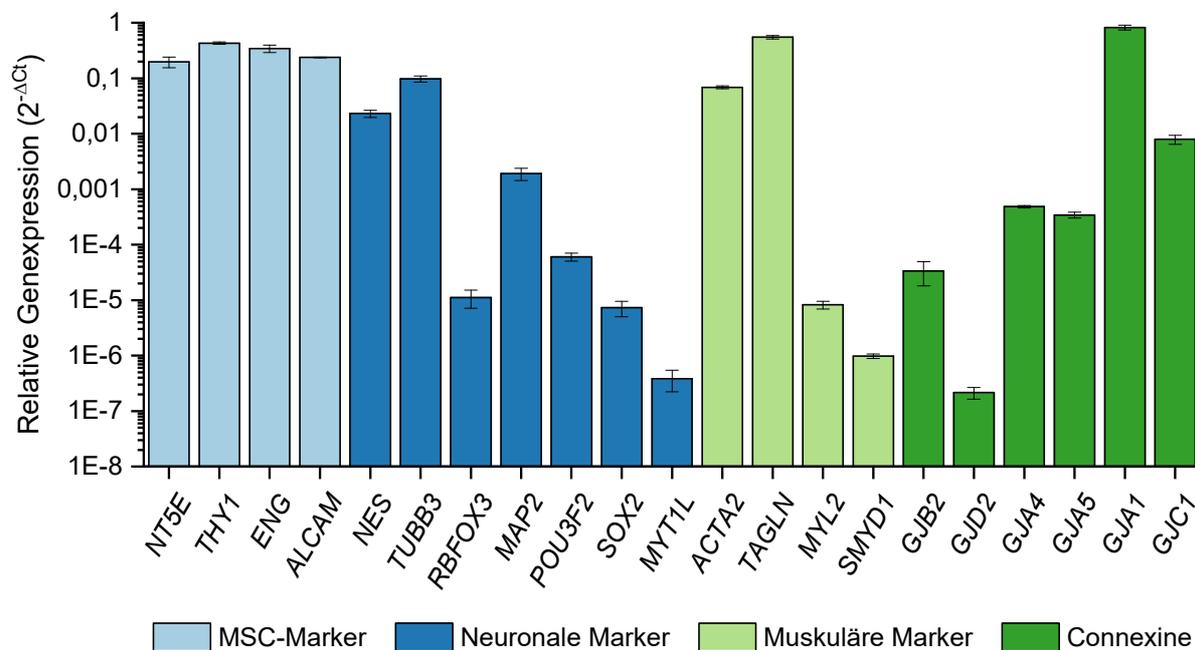


Abbildung 5: Expressionsmuster auf mRNA-Ebene in humanen MSCs aus dem Knochenmark. Mittels qRT-PCR wurde die relative Genexpression von MSC-Markern, neuronalen Markern und Transkriptionsfaktoren, muskulären Markern und verschiedenen Connexinen untersucht. In den MSCs konnten alle MSC-Marker, die neuronalen Marker *NES* und *TUBB3*, die muskulären Marker *ACTA2* und *TAGLN*, sowie die Connexine *GJA1* und *GJC1* deutlich nachgewiesen werden. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 3$) dargestellt.

Die verwendeten MSCs waren adhärent wachsende Zellen mit einer Fibroblasten-ähnlichen, spindelförmigen Morphologie (Abbildung 6). In Farbstofftransfer-Experimenten wurden die Zellen physiologisch auf ihre *Gap Junction*-Kopplungsfähigkeit untersucht. Dafür wurde mit einer mit LY-haltiger Lösung befüllten Kapillare eine *Whole-Cell*-Konfiguration bei einer Zelle inmitten eines Zellrasens hergestellt, die auf diese Weise mit LY beladen wurde, und für 10 min inkubiert. Während dieser 10 min konnte der Farbstoff von der Donorzelle über *Gap Junctions* in benachbarte Zellen diffundieren, sofern diese Zellen untereinander über *Gap Junctions* gekoppelt waren. Wäre das nicht der Fall, würde der Farbstoff nicht in Nachbarzellen diffundieren und sich nach dem Experiment nur in der farbstoffbeladenen Zelle befinden. Nach der Inkubationszeit von 10 min wurde die Kapillare entfernt und eine Fluoreszenzaufnahme im LY-Kanal gemacht.

Der Farbstoff diffundierte während der Inkubationszeit in eine Vielzahl benachbarter Zellen, was somit eine starke *Gap Junction*-abhängige Zell-Zellkopplung der MSCs zeigte (Abbildung 6).

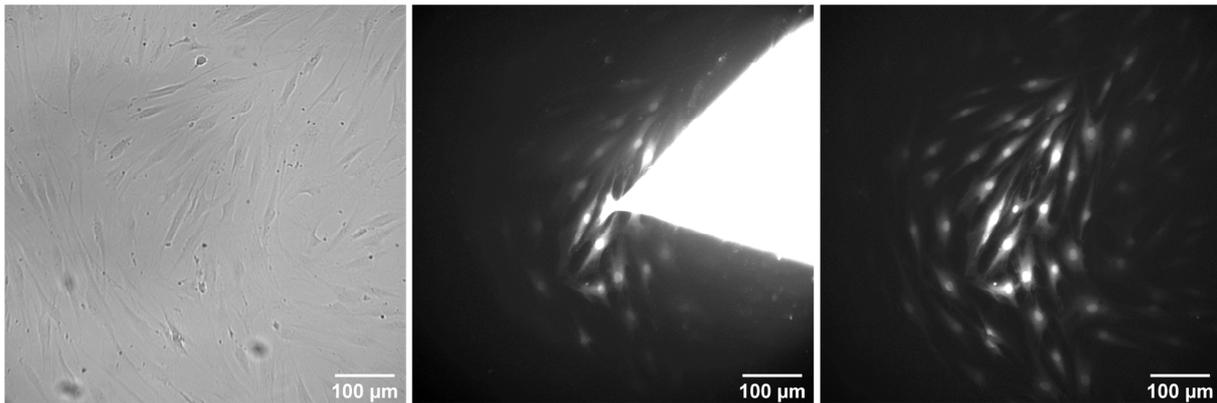


Abbildung 6: Gap Junction-Kopplung in MSCs. Die Zell-Zellkopplung wurde mithilfe von LY-basierten Farbstofftransferexperimenten untersucht. Dargestellt sind beispielhaft eine durchlichtmikroskopische Aufnahme der Zellen vor dem Experiment (links), eine Fluoreszenzaufnahme im LY-Kanal während des Experiments (Mitte), sowie eine weitere Fluoreszenzaufnahme im LY-Kanal nach Entfernen der Kapillare (rechts). Zu erkennen ist, dass der Farbstoff von der farbstoffbeladenen Zelle in eine Vielzahl an benachbarten Zellen diffundieren konnte. Der Maßstabsbalken bezeichnet 100 µm.

Um den Ausgangszustand der MSCs weiter physiologisch zu untersuchen, wurden die Zellen mithilfe der *Patch-Clamp*-Technik untersucht. Bei einer ausgewählten einzelnen Zelle wurde eine *Whole-Cell Patch-Clamp*-Konfiguration hergestellt und die Zelle im *Current-Clamp*-Modus vermessen. Während dieser Messungen wurden Ströme von 20 pA bis 180 pA in die Zelle injiziert und ihr Membranpotential im zeitlichen Verlauf gemessen und aufgezeichnet. Die MSCs erzeugten keine Aktionspotentiale und waren somit nicht elektrisch erregbar (Abbildung 7).

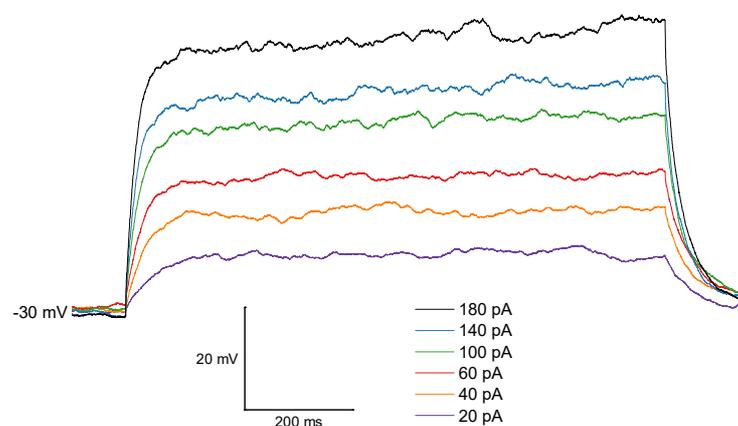


Abbildung 7: Elektrophysiologische Eigenschaften humaner MSCs. *Patch-Clamp*-Analysen im *Current Clamp*-Modus zeigten, dass MSCs nicht elektrisch erregbar sind und keine Aktionspotentiale erzeugen können. Beispielhaft ist eine Messung dargestellt, wobei Ströme von 20 pA bis 180 pA in die gepatchte Zelle injiziert wurden. Das Membranpotential wurde im zeitlichen Verlauf gemessen und dargestellt.

Zusätzlich zu der *Gap Junction*-vermittelten Zellkommunikation und der elektrischen Signalweiterleitung mittels Aktionspotentialen findet eine weitere Art der Zellkommunikation chemisch über Botenstoffe statt. Botenstoffe, oder Neurotransmitter, wie beispielsweise ATP werden von einer Zelle ausgeschüttet und können parakrin oder autokrin an Rezeptoren einer Zelle binden, wodurch unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst werden können, die unter anderem zu einem transienten

Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen können. Dieses sogenannte Ca^{2+} -*Signaling* kann mithilfe der Ca^{2+} -*Imaging*-Methode untersucht werden, wobei die Zellen Stimuli unterschiedlicher Botenstoffe ausgesetzt werden können. Bei dieser Methode werden die Zellen mit einem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff beladen, dessen Emissionsmaximum sich bei einer Bindung von Ca^{2+} verändert, sodass eine Veränderung in der Ca^{2+} -Konzentration gemessen werden kann.

In dieser Arbeit wurden intrazelluläre Ca^{2+} -Signale als Antwort auf repetitive ATP-Stimuli untersucht. Dafür wurden die MSCs alle 3 min für 5 s ATP in einer Konzentration von 50 μM ausgesetzt. Diese sequentiellen Stimuli führten zu wiederholbaren intrazellulären Ca^{2+} -Signalen. Im Verlauf des Experiments wurden die Signale zwar stetig schwächer, es kam während der Messungen jedoch nie zu einer vollständigen Desensibilisierung der beteiligten Rezeptoren (Abbildung 8).

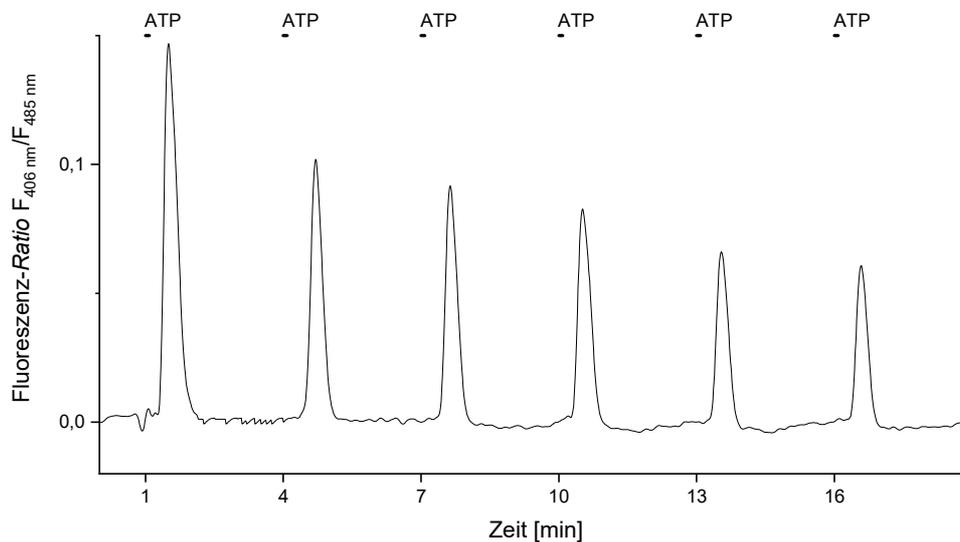


Abbildung 8: Repetitive Ca^{2+} -Signale als Antwort auf wiederholten ATP-Stimulus in humanen MSCs. In Ca^{2+} -*Imaging*-Experimenten wurden MSCs alle 3 min für 5 s mit 50 μM ATP stimuliert und die resultierende intrazelluläre Ca^{2+} -Antwort gemessen. Beispielhaft ist eine derartige Messung im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Ca^{2+} -Reaktion auf die ATP-Stimuli ist wiederholbar, wobei das Signal nach und nach etwas schwächer wird.

3.2 Neuronale Transdifferenzierung von MSCs

Die MSCs wurden im Folgenden für verschiedene neuronale Differenzierungsansätze verwendet. Die generierten Zellen wurden ebenfalls molekularbiologisch und physiologisch charakterisiert und mit den undifferenzierten MSCs (Abschnitt 3.1) verglichen.

3.2.1 shRNA-vermittelter *Knockdown* von PTBP1 in MSCs

In Anlehnung an die Publikation von Xue *et al.* (2013) wurden die MSCs in dieser Arbeit mit einer anti-PTBP1-shRNA transfiziert (Abbildung 2) und für 7 d in NeuroM kultiviert, um auf diese Weise eine neuronale Differenzierung herbeizuführen. Dafür wurden die Zellen mit dem Plasmid pEGFP-U6_anti-PTBP1-shRNA transfiziert, das außer der gewünschten shRNA zusätzlich ein Gen für das

Reporterprotein EGFP und ein Resistenzgen gegen Geneticin (G 418) besitzt (Abbildung 1). Durch die zusätzliche Expression von EGFP konnten transfizierte von untransfizierten Zellen unterschieden und mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Nach ersten Versuchen zeigte sich, dass eine Transfektionseffizienz von bis zu 20 % erreicht werden konnte und dass die transfizierten Zellen einen deutlich proliferationsgehemmten Phänotyp aufwiesen. Folglich wurden sie innerhalb weniger Tage von untransfizierten normal proliferierenden MSCs überwachsen. Aus diesem Grund wurden dem Wachstumsmedium NeuroM in weiteren Versuchen 300 µg/mL G 418 zugesetzt, für das die transfizierten Zellen durch das Plasmid ein Resistenzgen besaßen, nicht aber die untransfizierten Zellen. Nach einer Selektions- und Wachstumszeit von 7 d wurde die Morphologie der Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Insgesamt waren nur vereinzelt Zellen zu finden, da die untransfizierten Zellen nicht überlebt hatten und die transfizierten Zellen nicht weiter proliferierten. Die zuvor spindelförmigen MSCs (Abbildung 6) bildeten durch die Transfektion und die entsprechende Kultivierung kleine, runde Zellkörper mit langen Zellfortsätzen aus und ähnelten morphologisch neuronalen Zellen (Abbildung 9).

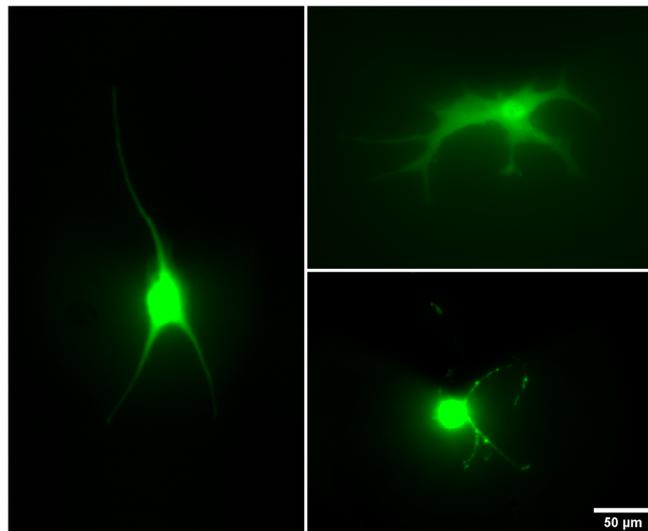


Abbildung 9: Morphologie anti-PTBP1-shRNA-transfizierter MSCs. MSCs wurden mit dem Plasmid pEGFP-U6_anti-PTBP1-shRNA transfiziert und für 7 d in NeuroM unter Zusatz von 300 µg/mL G 418 kultiviert, um die transfizierten Zellen zu selektieren und ein Überwachsen dieser Zellen mit untransfizierten Zellen zu verhindern. Nach 7 d Selektion wurden Fluoreszenzaufnahmen der Zellen mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop gemacht. Das Reporterprotein EGFP wurde dabei bei 488 nm angeregt. Beispielhaft sind hier Fluoreszenzaufnahmen von drei transfizierten Zellen im GFP-Kanal dargestellt. Nur vereinzelt sind grün fluoreszierende Zellen erkennbar. Diese haben eine Zellmorphologie, die meist durch runde, kleine Zellkörper mit langen Zellfortsätzen geprägt ist und einer neuronalen Zellmorphologie ähnelt. Der Maßstabsbalken bezeichnet 50 µm.

Die Physiologie der generierten Zellen wurde elektrophysiologisch mittels *Patch-Clamp*-Technik untersucht. Nach dem Herstellen einer *Whole-Cell*-Konfiguration wurden im *Current-Clamp*-Modus Ströme von 20 pA bis 180 pA in die gepatchte Zelle injiziert und das resultierende Membranpotential im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Im Vergleich zu den zuvor nicht elektrisch aktivierbaren MSCs (Abbildung 7) zeigten die differenzierten Zellen deutliche Eigenschaften elektrisch erregbarer Zellen. Ab einem applizierten Strom von 40 pA waren sie in der Lage breite Aktionspotentiale zu erzeugen.

Wurde ein Strom von 100 pA oder mehr injiziert, konnten die Zellen nach der hervorgerufenen Depolarisation ihrer Membran nicht wieder repolarisieren (Abbildung 10).

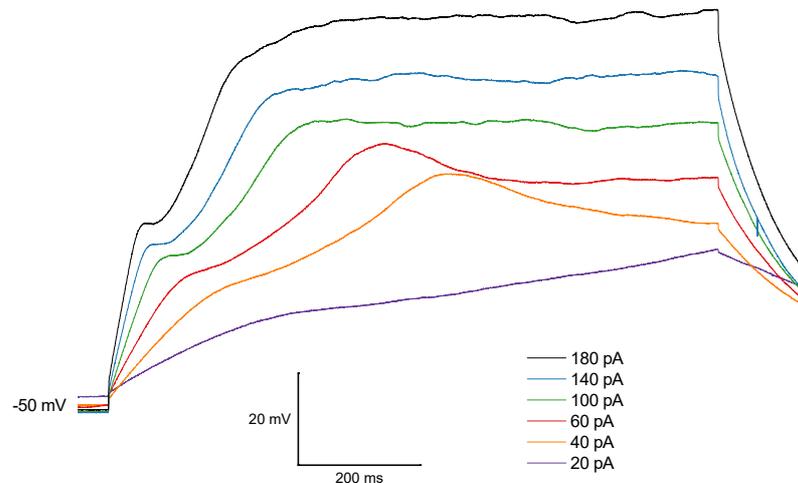


Abbildung 10: Elektrophysiologische Eigenschaften anti-PTBP1-shRNA-transfizierter MSCs. *Patch-Clamp*-Analysen im *Current-Clamp*-Modus zeigten, dass die anti-PTBP1-shRNA-transfizierten Zellen elektrisch erregbar sind und breite Aktionspotentiale erzeugen können. Beispielhaft ist eine Messung dargestellt, wobei Ströme von 20 pA bis 180 pA in die gepatchte Zelle injiziert wurden. Das Membranpotential wurde im zeitlichen Verlauf gemessen und dargestellt.

Die physiologischen *Patch-Clamp*-Messungen waren aufgrund der sichtbaren Aktionspotentiale hinsichtlich einer neuronalen Entwicklung der MSCs sehr vielversprechend. Weitere physiologische oder molekularbiologische Studien waren allerdings wegen der geringen Zellzahl nicht möglich, sodass nach alternativen Differenzierungsmethoden gesucht wurde.

3.2.2 Charakterisierung der *small molecule*-basierten Differenzierung von MSCs

Eine solche alternative Differenzierungsmethode stellte die Verwendung von *small molecules* dar. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene *small molecule*-haltige Induktionsmedien im Vergleich getestet: die Differenzierung nach Hu *et al.* (2015), die für humane Fibroblasten entwickelt wurde (Abschnitt 3.2.2.1), die Differenzierung mit RA-Präinduktion nach Bi *et al.* (2010), die mit Ratten-MSCs gearbeitet hatten, und der Ansatz nach Aguilera-Castrejon *et al.* (2017), die ihr Protokoll für humane MSCs entwickelt hatten (Abschnitt 3.2.2.2).

3.2.2.1 *Small molecule*-basierte neuronale Differenzierung von MSCs nach Hu *et al.*

Hu *et al.* publizierten 2015 ihr Protokoll für die *small molecule*-basierte Differenzierung von humanen Fibroblasten in neuronale Zellen, die die Autoren umfangreich charakterisierten und auch physiologisch untersuchten. Da Fibroblasten und MSCs dem gleichen Keimblatt angehören und MSCs als adulte Stammzellen theoretisch ein höheres Differenzierungspotential haben als voll ausdifferenzierte Fibroblasten, war dieses Protokoll ein vielversprechender Ansatz für eine neuronale Differenzierung von humanen MSCs.

Die MSCs wurden für 8 d in dem von Hu *et al.* (2015) publizierten *small molecule*-haltigen neuronalen Induktionsmedium (NIM-3) kultiviert, gefolgt von einer 6-tägigen Inkubation in einem neuronalen

Maturationsmedium (MAT). Anschließend wurden die Zellen bis zu ihrer experimentellen Verwendung in einem neuronalen Wachstumsmedium (NeuroM) kultiviert. Während des gesamten Differenzierungsprozesses wurden mithilfe eines Mikroskops durchlichtmikroskopische Aufnahmen gemacht, um die Entwicklung der Zellmorphologie zu untersuchen. Bereits 2 d nach der Zugabe des NIM-3 hatte sich die Zellmorphologie der MSCs deutlich verändert. Die Zellkörper wurden kleiner und runder und es bildeten sich lange Zellfortsätze aus. Dieser Zustand verstärkte sich mit zunehmender Inkubationsdauer in NIM-3, sodass die Zellen nach 8 d in dem Induktionsmedium eine Morphologie aufwiesen, die der neuronaler Zellen ähnelte (Abbildung 11 oben). Hu *et al.* konnten in ihrer Publikation zeigen, dass durch die Induktion mit NIM-3 jedoch noch kein Entwicklungszustand reifer neuronaler Zellen erreicht werden konnte, sondern, dass dafür die weitere Inkubation in MAT zur weiteren Reifung erforderlich war. Dieses Medium wurde deshalb im Anschluss an die 8 d in NIM-3 zu den Zellen gegeben. Dabei fand jedoch eine weitere morphologische Veränderung der Zellen statt. Die Zellkörper streckten sich innerhalb des verwendeten Zeitraums von 6 Tagen wieder sichtbar mehr aus und wurden weniger rund. Diese Morphologie verstärkte sich durch den Medienwechsel zu NeuroM weiter, sodass sehr lange, schmale Zellen beobachtet werden konnten (Abbildung 11 unten).

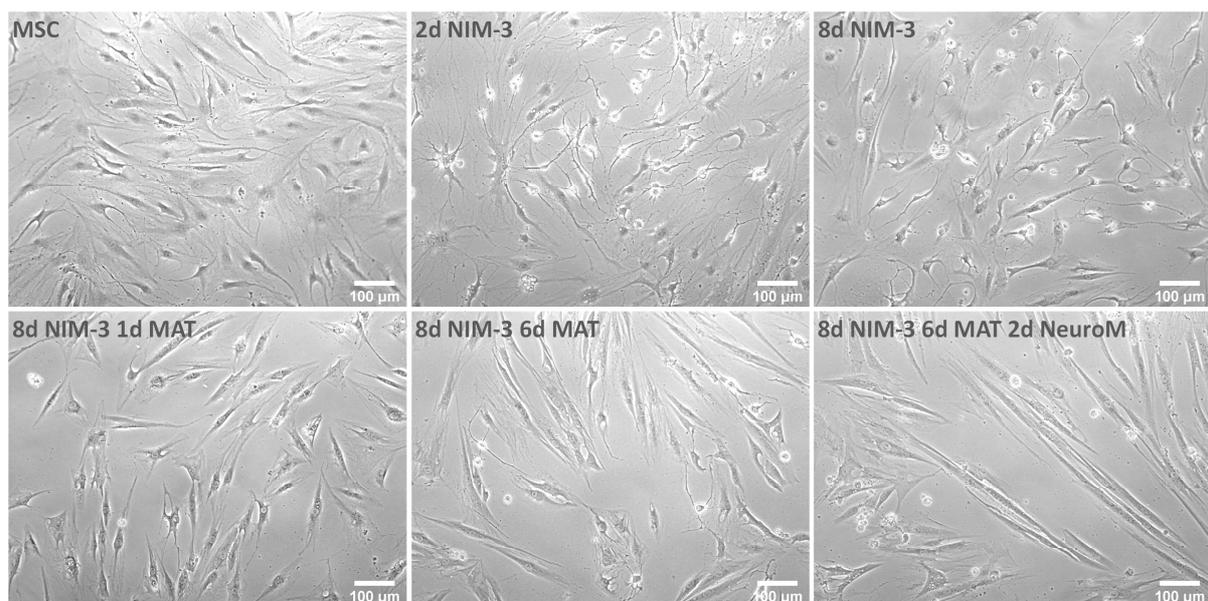


Abbildung 11: Morphologische Entwicklung während der *small molecule*-basierten neuronalen Induktion nach Hu *et al.* (2015). Die MSCs wurden, wie von Hu *et al.* (2015) für Fibroblasten publiziert, für 8 d in NIM-3 kultiviert, gefolgt von einer 6-tägigen Inkubation in MAT. Im Anschluss wurden die Zellen bis zu ihrer Verwendung, mindestens aber für 2 d, in NeuroM kultiviert. Dargestellt sind repräsentative durchlichtmikroskopische Aufnahmen des Differenzierungsprozesses zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In der oberen Reihe sind die MSCs vor Beginn der Differenzierung, nach 2 d in NIM-3 und nach 8 d in NIM-3 zu sehen (von links nach rechts). In der unteren Reihe sind die MSCs nach 8 d in NIM-3 und 1 d in MAT, nach 8 d in NIM-3 und 6 d in MAT und schließlich nach 8 d in NIM-3, 6 d in MAT und 2 d in NeuroM dargestellt (von links nach rechts). Bereits nach 2 d in NIM-3 ist eine deutliche morphologische Veränderung der Zellen zu erkennen. Die Zellen zeichnen sich durch kleinere und rundere Zellkörper und lange Zellfortsätze aus. Diese Tendenz ist nach einer längeren Inkubationszeit in NIM-3 noch stärker ausgeprägt. Durch den Wechsel zu MAT ist diese Entwicklung rückläufig und die Zellen bilden eine lange und schmale Zellform ohne runde Zellkörper aus, was durch die Kultivierung in NeuroM weiter verstärkt wird. Der Maßstabsbalken bezeichnet 100 µm.

Nach diesem vollständigen Durchlaufen des von Hu *et al.* (2015) publizierten Protokolls für eine *small molecule*-basierte neuronale Differenzierung wurden die generierten Zellen elektrophysiologisch mittels *Patch-Clamp*-Technik untersucht. Wie auch zuvor bei den undifferenzierten MSCs wurde bei einer einzeln vorliegenden Zelle eine *Whole-Cell*-Konfiguration hergestellt und diese Zelle anschließend im *Current-Clamp*-Modus vermessen. Dabei wurden Ströme von 20 pA bis 160 pA in die Zelle injiziert und das resultierende Membranpotential der Zelle im zeitlichen Verlauf gemessen und aufgezeichnet. Ab einem injizierten Strom von über 100 pA konnten Aktionspotentiale in den Zellen ausgelöst werden. Diese waren zwar in ihrer Form sehr breit und nicht repetitiv, zeigten aber dennoch die elektrische Erregbarkeit der differenzierten Zellen (Abbildung 12). Da Hu *et al.* (2015) in ihrer Publikation allerdings Aktionspotential-Messungen mit sehr schmalen und repetitiven Aktionspotentialen präsentieren konnten und die Zellmorphologie zum Zeitpunkt der *Patch-Clamp*-Messungen nicht mehr der neuronalen Zellen ähnelte (Abbildung 11), wurde versucht, das Protokoll für die Verwendung von MSCs als Ausgangsmaterial für die Differenzierung zu optimieren.

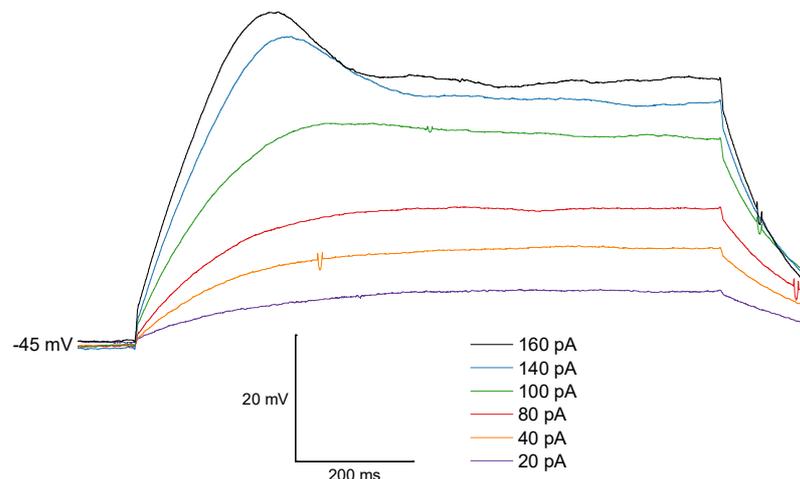


Abbildung 12: Elektrophysiologische Eigenschaften von induzierten neuronalen Zellen nach der Differenzierung nach Hu *et al.* (2015). MSCs wurden differenziert, indem sie 8 d in NIM-3, 6 d in MAT und mindestens 2 d in NeuroM kultiviert wurden. Diese Zellen wurden elektrophysiologisch mittels *Patch-Clamp*-Technik untersucht. In der *Whole-Cell*-Konfiguration wurden im *Current-Clamp*-Modus Ströme zwischen 20 pA und 160 pA in die Zellen injiziert und das resultierende Membranpotential im zeitlichen Verlauf gemessen. Exemplarisch ist hier eine solche Messung dargestellt. Dabei zeigten die Zellen eine elektrische Erregbarkeit. Bei applizierten Strömen über 100 pA konnten Aktionspotentiale ausgelöst werden. Diese waren in ihrer Form breit und nicht repetitiv.

Als Anhaltspunkt dienten dabei zunächst die Beobachtungen während des Differenzierungsprozesses, die bezüglich der Zellmorphologie gemacht wurden. Dabei war auffallend, dass die Entwicklung einer neuronalen Morphologie rückläufig war, sobald MAT zu den Zellen gegeben wurde. Eine mögliche Ursache dafür wäre, dass die MSCs eine längere Inkubationszeit in NIM-3 benötigen könnten, um sich ausreichend weit zu differenzieren. Aus diesem Grund wurde die Induktion mit NIM-3 auf 11 d verlängert und ohne einen Medienwechsel zu MAT erneut *Patch-Clamp*-Messungen durchgeführt. In der *Whole-Cell*-Konfiguration wurden im *Current-Clamp*-Modus Ströme zwischen 20 pA und 180 pA

in die gepatchte Zelle injiziert und das resultierende Membranpotential während dieser Testpulse gemessen. Wurden Ströme mit mehr als 100 pA injiziert, reagierten die Zellen mit Aktionspotentialen und zeigten deutlich eine elektrische Erregbarkeit (Abbildung 13). Im Vergleich zu den zuvor ausgelösten Aktionspotentialen nach dem vollständigen Durchlaufen der Differenzierung unter Verwendung aller drei Medien waren die Aktionspotentiale deutlich schmaler in ihrer Form, allerdings weiterhin nicht repetitiv. Es war somit offensichtlich, dass der Differenzierungszustand der Zellen, der von Hu *et al.* (2015) ausgehend von Fibroblasten publiziert worden war, hier noch nicht erreicht war. Wurde nach 11 d das Medium von NIM-3 zu MAT gewechselt, konnte erneut beobachtet werden, dass sich die Zellen in ihrem Erscheinungsbild von der Morphologie neuronaler Zellen entfernten.

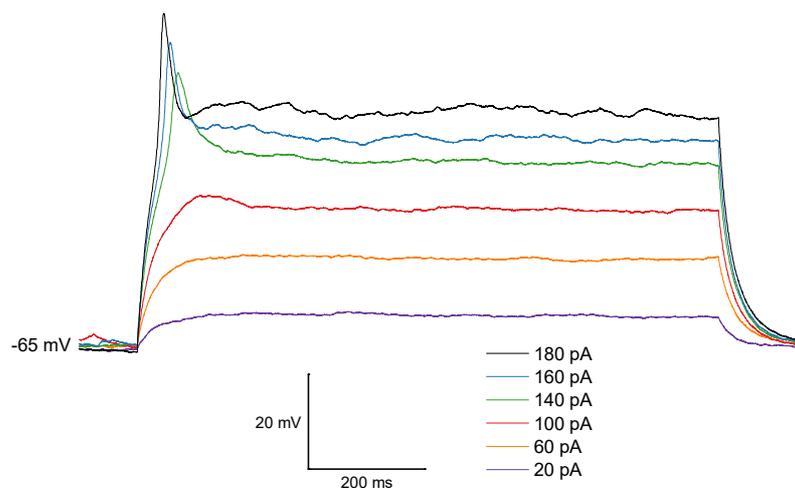


Abbildung 13: Elektrophysiologische Eigenschaften von induzierten neuronalen Zellen durch die alleinige Induktion durch NIM-3. MSCs wurden durch eine Inkubation für 11 d in NIM-3 neuronal induziert und mittels *Patch-Clamp*-Technik untersucht. Exemplarisch ist hier eine Messung dargestellt, während der nach der Herstellung einer *Whole-Cell*-Konfiguration im *Current-Clamp*-Modus Ströme zwischen 20 pA und 180 pA in die gepatchte Zelle injiziert wurden. Dabei konnten bei applizierten Strömen über 100 pA Aktionspotentiale ausgelöst werden, die schmal in ihrer Form, aber nicht repetitiv waren.

Es folgten deshalb weitere Versuche, während derer die Inkubationszeit in NIM-3 weiter verlängert und das Medium im Anschluss zu MAT gewechselt wurde. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zellen ihre Neuronen-ähnliche Morphologie beibehielten, solange sie in NIM-3 kultiviert wurden. Wurde das Medium zu MAT gewechselt, war das nicht mehr der Fall. Durch längere Inkubationszeiten in NIM-3 kam es zu einem erhöhten Zellverlust, da die Zellen nicht mehr proliferierten. Reife neuronale Zellen, wie von Hu *et al.* (2015) publiziert, konnten mit MSCs als Ausgangsmaterial nicht erreicht werden. Im Folgenden wurde deshalb gezielt nach Protokollen gesucht, die für MSCs entwickelt worden waren.

3.2.2.2 *Small molecule*-basierte neuronale Induktion nach Bi *et al.* und Aguilera-Castrejon *et al.*

Für weitere Differenzierungsansätze wurden die Protokolle von Bi *et al.* (2010) und Aguilera-Castrejon *et al.* (2017) ausgewählt, die mit MSCs gearbeitet und diese durch Induktion mit *small molecules* differenziert hatten. Das Protokoll von Bi *et al.* (NIM-1) wurde für Ratten-MSCs entwickelt und arbeitet mit einer kurzen Induktionszeit von einem Tag, der eine Präinduktion mit 1 μ M RA für einen weiteren Tag vorausgeht. Aguilera-Castrejon *et al.* verwendeten humane MSCs und differenzierten diese für 7 d

in einem *small-molecule*-haltigen Induktionsmedium (NIM-2). In dieser Arbeit wurden beide Protokolle parallel verfolgt und analysiert. Außerdem wurde die Differenzierung in NIM-2 auf 30 d verlängert und in einem weiteren Ansatz um eine eintägige Inkubation in MAT erweitert.

Als erstes vergleichendes Kriterium wurde erneut die Veränderung der Morphologie während der Differenzierung herangezogen. Die zuvor spindelförmigen MSCs entwickelten sowohl durch das NIM-1-Protokoll als auch durch die 7 d NIM-2-Induktion eine Neuronen-ähnliche Morphologie, die sich durch kleine, runde Zellkörper und die Ausbildung langer Zellfortsätze auszeichnet. Durch die Verlängerung der Inkubation in NIM-2 auf 30 d verringerte sich die vorhandene Zellzahl deutlich. Morphologisch zeigten die vorhandenen Zellen neuronale Charakteristika wie lange Zellfortsätze deutlich ausgeprägter. Diese Entwicklung war bei einer eintägigen Inkubation in MAT nicht rückläufig (Abbildung 14).

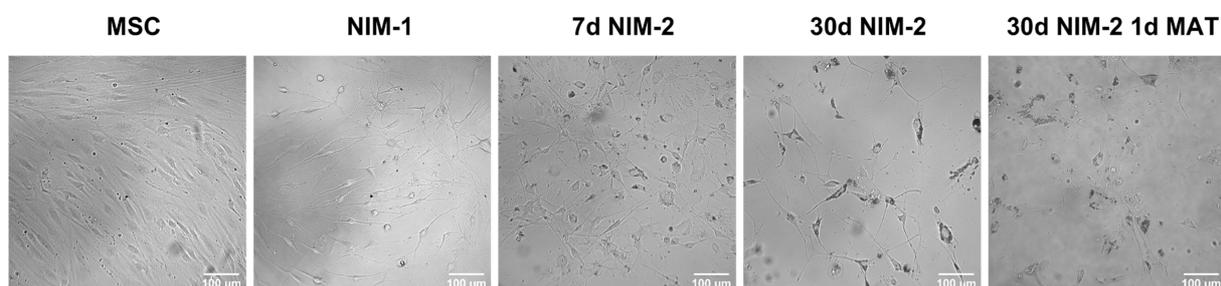


Abbildung 14: Morphologische Entwicklung während der *small molecule*-basierten neuronalen Induktion mit NIM-1 und NIM-2. Von MSCs und mit NIM-1 und NIM-2 induzierten Zellen wurden durchlichtmikroskopische Aufnahmen gemacht, von denen hier exemplarisch für jede Differenzierung ein Bild dargestellt ist. Die Maßstabsbalken zeigen 100 µm an. Die spindelförmigen MSCs entwickeln durch Inkubation mit den *small-molecule*-basierten Induktionsmedien NIM-1 (Bi *et al.*, 2010) und NIM-2 (Aguilera-Castrejon *et al.*, 2017) eine Neuronen-ähnliche Morphologie, die durch kleine, runde Zellkörper und lange Zellfortsätze geprägt ist. Durch eine längere Behandlung mit NIM-2 wurde diese Tendenz stärker sichtbar. Bei einer eintägigen Inkubation mit MAT war diese Entwicklung nicht rückläufig.

Die NIM1- und NIM-2-differenzierten Zellen wurden ebenfalls physiologisch mittels *Patch-Clamp*-Technik untersucht. Im *Current-Clamp*-Modus wurden depolarisierende Ströme in die gepatchte Zelle injiziert, um Aktionspotentiale auszulösen. Dabei zeigte sich, dass die NIM-1-induzierten Zellen keine Aktionspotentiale auslösen konnten und somit nicht elektrisch erregbar waren (Abbildung 15).

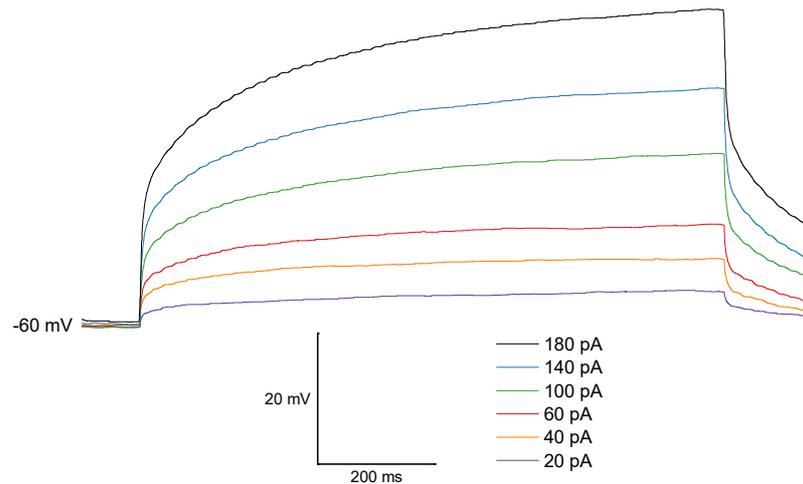


Abbildung 15: Elektrophysiologische Eigenschaften NIM-1-differenzierter MSCs. MSCs wurden differenziert, indem sie 1 d in $1 \mu\text{M}$ RA und 1 d in NIM-1 kultiviert wurden. Diese Zellen wurden elektrophysiologisch mittels *Patch-Clamp*-Technik untersucht. In der *Whole-Cell*-Konfiguration wurden im *Current-Clamp*-Modus Ströme zwischen 20 pA und 180 pA in die Zellen injiziert und das resultierende Membranpotential im zeitlichen Verlauf gemessen. Exemplarisch ist hier eine solche Messung dargestellt. Dabei zeigten die Zellen keine elektrische Erregbarkeit.

Nach der Differenzierung für 7 d in NIM-2 konnten ebenfalls keine Aktionspotentiale ausgelöst werden (Daten nicht gezeigt), wobei die Zellen nach 30 d in dem Induktionsmedium so instabil waren, dass *Patch-Clamp*-Messungen nicht möglich waren. Das deswegen erweiterte Protokoll, das die 30-tägige Inkubation in NIM-2 um einen Tag in MAT ergänzt, konnte die Zellen ausreichend stabilisieren, um *Patch-Clamp*-Experimente zu ermöglichen. Es gelang in den 30 d NIM-2 1 d MAT-induzierten Zellen, Aktionspotentiale auszulösen. Diese dauerten mit über 200 ms relativ lange und waren nicht repetitiv. Es konnte damit allerdings eine elektrische Erregbarkeit der Zellen gezeigt werden (Abbildung 16).

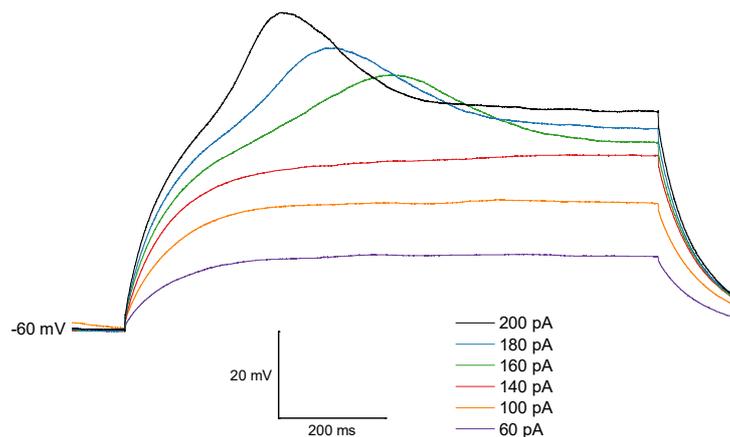


Abbildung 16: Elektrophysiologische Eigenschaften NIM-2-induzierter MSCs. MSCs wurden differenziert, indem sie 30 d in NIM-2 und 1 d in MAT kultiviert wurden. Diese Zellen wurden elektrophysiologisch mittels *Patch-Clamp*-Technik untersucht. In der *Whole-Cell*-Konfiguration wurden im *Current-Clamp*-Modus Ströme zwischen 60 pA und 200 pA in die Zellen injiziert und das resultierende Membranpotential im zeitlichen Verlauf gemessen. Exemplarisch ist hier eine solche Messung dargestellt. Dabei zeigten die Zellen eine elektrische Erregbarkeit. Bei applizierten Strömen über 140 pA konnten Aktionspotentiale ausgelöst werden. Diese waren in ihrer Form breit und nicht repetitiv.

Wenn Zellen sich differenzieren, ändert sich dabei ihr spezifisches zelltypabhängiges Expressionsmuster. Für verschiedene Zelltypen können somit spezifische Marker zur Identifizierung und Charakterisierung herangezogen werden. Typische Marker für MSCs sind, wie bereits erwähnt, CD73 (kodiert durch das Gen *NT5E*), CD90 (kodiert durch *THY1*), CD105 (kodiert durch *ENG*) und CD166 (kodiert durch *ALCAM*). Das Expressionsniveau dieser Marker wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR in unbehandelten und induzierten MSCs vergleichend untersucht.

NT5E und *ENG* wurden durch die Differenzierungen nur geringfügig beeinflusst, während *THY1* und *ALCAM* vor allem durch die NIM-2-Induktion stark herunterreguliert wurden. Die *NT5E*-Expression wurde in den NIM-1- und 30 d NIM-2 1 d MAT-Proben leicht reduziert. Bei einer Induktion von 7 d und 30 d in NIM-2 war das Expressionsniveau unverändert. *ENG* blieb durch NIM-1-Behandlung nahezu unverändert, wohingegen die Differenzierung mit NIM-2 zu allen drei Zeitpunkten zu einer Reduktion dieses Markers führte. Die *THY1*-Expression wurde durch alle Differenzierungsansätze herunterreguliert. Dabei führte das NIM-1-Protokoll zu einer leichten und die beiden 30 d NIM-2-Ansätze zu einer sehr starken Reduktion. Ähnlich verhielt es sich mit dem Marker *ALCAM*, der durch NIM-1 eine leichte Senkung des Expressionsniveaus und durch alle NIM-2-Ansätze eine starke Reduktion erfuhr. Die getesteten MSC-Marker waren nach den verschiedenen Differenzierungen somit schwächer exprimiert als bei den unbehandelten MSCs. Die längere Inkubation von 30 d in NIM-2 wies dabei eine stärkere Veränderung des Expressionsmusters der MSC-Marker auf (Abbildung 17).

Um eine mögliche neuronale Differenzierung zu charakterisieren, wurden auf die gleiche Weise außerdem verschiedene neuronale Marker und Transkriptionsfaktoren untersucht. *NES* (kodiert für Nestin) ist vor allem in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen zu finden (Wislet-Gendebien *et al.*, 2003) und dient diesen Zellen als Marker. Die getesteten MSCs exprimierten diesen Marker. Ein ähnliches Expressionsniveau war nach der NIM-1-Differenzierung messbar, wohingegen die *NES*-Expression durch Induktion mit NIM-2 signifikant reduziert wurde. 7 d und 30 d Inkubationszeit in NIM-2 hatten dabei ähnliche Auswirkungen, während die Erweiterung des Protokolls um 1 d MAT wieder eine etwas höhere Expression von *NES* zeigte. *TUBB3* kodiert für Tuj1, einen Marker unreifer bzw. früher Neuronen. Die MSCs exprimierten diesen Marker nur geringfügig schwächer als die MSC-typischen Marker. Während der 7 d Induktion in NIM-2 wurde die *TUBB3*-Expression hochreguliert. Als Marker für reife Neuronen wurden *RBFOX3* und *MAP2* (kodieren für NeuN und MAP-2) getestet. *RBFOX3* ist in den unbehandelten und induzierten Zellen nur schwach exprimiert. *MAP2* ist in den MSCs etwas stärker exprimiert als *RBFOX3*, allerdings deutlich schwächer als *NES* und *TUBB3*. Durch NIM-1-Induktion wurde die Expression verstärkt, während sie durch NIM-2-Induktion abnahm. Die neuronalen Transkriptionsfaktoren *POU3F2*, *SOX2* und *MYT1L* (kodieren für Brn-2, SOX-2 und MyT1-L) waren in MSCs nur schwach exprimiert, was sich für *SOX2* und *MYT1L* während der Differenzierung nicht änderte. Das Expressionsniveau von *POU3F2* war nach 7 d und 30 d in NIM-2 noch weiter reduziert (Abbildung 17).

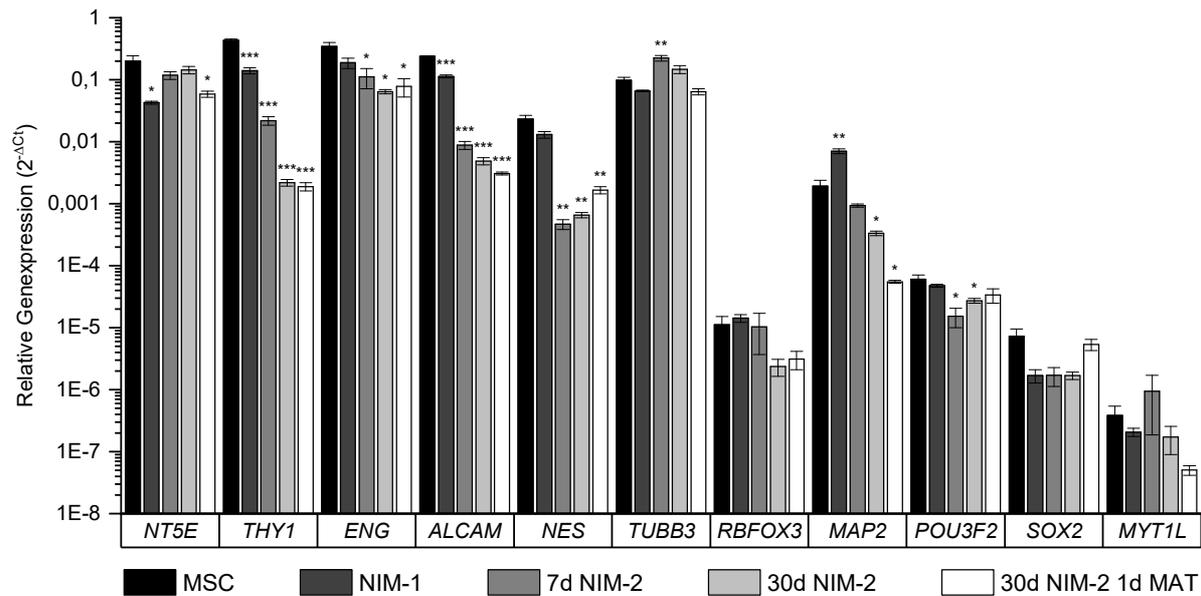


Abbildung 17: Relative Genexpression von MSC- und neuronalen Markern nach NIM-1- und NIM-2-Induktion. Mittels qRT-PCR wurden MSCs und NIM-1- und NIM-2-induzierte MSCs auf ihr Expressionsmuster von MSC-Markern (*NT5E*, *THY1*, *ENG* und *ALCAM*) und neuronalen Markern (*NES*, *TUBB3*, *RBFOX3*, *MAP2*, *POU3F2*, *SOX2* und *MYT1L*) untersucht. Die Protokolle NIM-1, 7 d NIM-2, 30 d NIM-2 und 30 d NIM-2 1 d MAT wurden mit unbehandelten MSCs verglichen, um eine mögliche neuronale Differenzierung zu analysieren. Während der Differenzierung wurde die Expression von MSC-Markern deutlich reduziert, während die der neuronalen Marker *TUBB3* (7 d NIM-2) und *MAP2* (NIM-1) signifikant erhöht wurde. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n = 4$) dargestellt. Signifikante Abweichungen im Vergleich zu den unbehandelten MSCs wurden mittels Studentstest t -Test abgeschätzt und sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

Die vorhandene mRNA-Menge, die mittels qRT-PCR gemessen wurde, und die entsprechende Proteinmenge des aus der mRNA hervorgehenden Proteins hängen zwar zusammen, müssen sich allerdings nicht proportional verhalten. So könnte beispielsweise viel mRNA eines Gens synthetisiert werden, diese aber dann nicht weiter prozessiert, sondern abgebaut werden, und es wäre trotz viel vorhandener mRNA wenig Protein nachweisbar (Maier *et al.*, 2009). Da das Protein in den meisten Fällen aber die biologisch relevantere Form darstellt, wurden die unbehandelten und induzierten MSCs auch auf der Proteinebene auf die Expression neuronaler Marker hin untersucht.

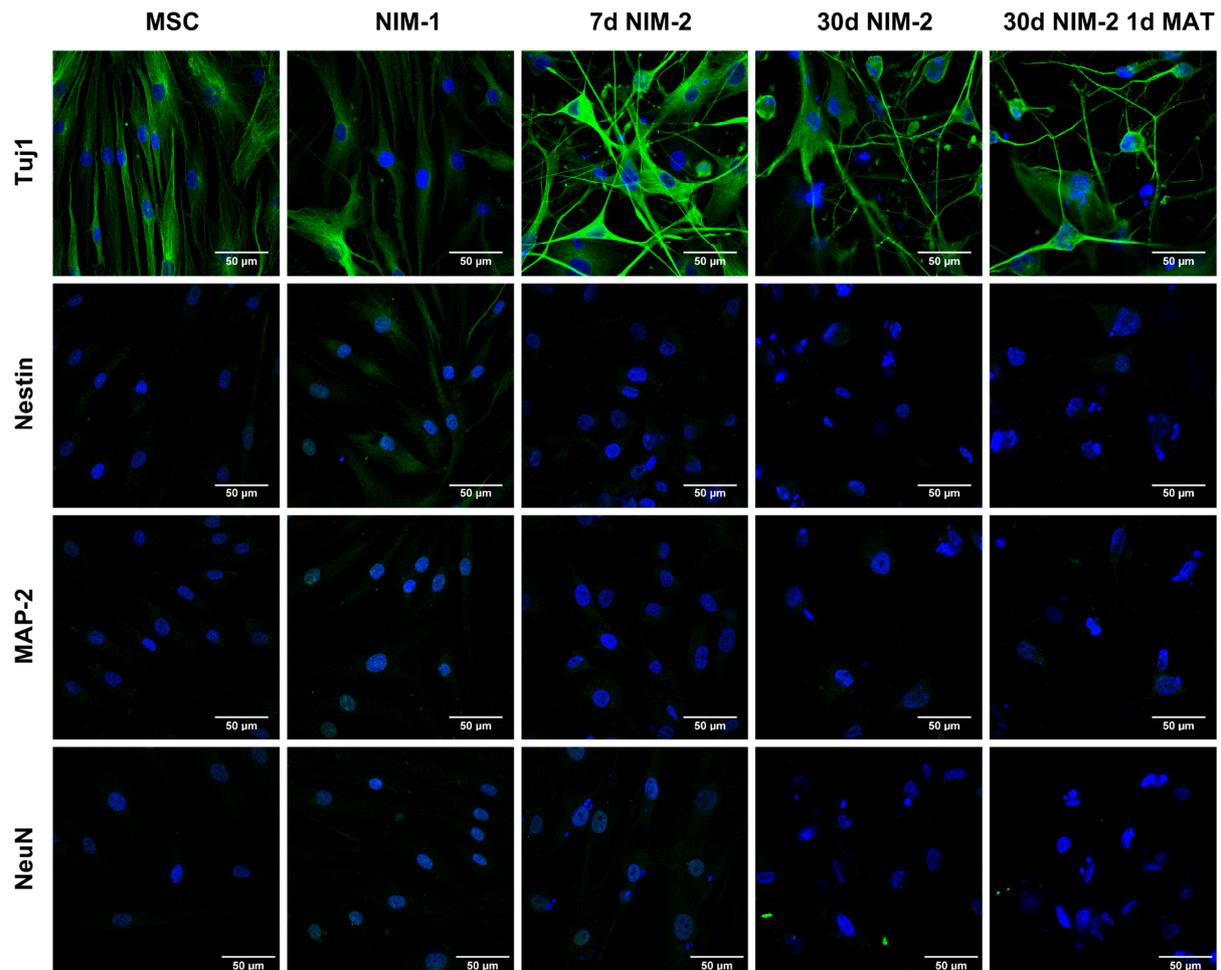


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung der neuronalen Marker Tuj1, Nestin, MAP-2 und NeuN in unbehandelten und induzierten MSCs. Der frühe neuronale Marker Tuj1 war in MSCs und allen Differenzierungsansätzen deutlich nachweisbar. Die stärkste Fluoreszenz war nach 7 d in NIM-2 erkennbar. Auffällig in allen NIM-2-differenzierten Proben war die veränderte Morphologie der MSCs. Der Marker Nestin, der vor allem für neuronale Stammzellen charakteristisch ist, war in allen Proben kaum nachweisbar. Lediglich nach NIM-1-Behandlung war eine schwache Fluoreszenz erkennbar. Ebenso verhielt es sich mit MAP-2, einem Marker für reife Neuronen. Nur die NIM-1-induzierten Zellen zeigten nach der Färbung eine schwache Fluoreszenz. Die Färbung von NeuN war ebenfalls schwach, wobei bei den MSCs und den NIM-1- und 7 d NIM-2-differenzierten Zellen eine grüne Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns sichtbar war. Der jeweilige Marker wurde mit iFluor™488 (grün) gefärbt, während die Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt wurden. Die Maßstabsbalken zeigen 50 µm.

Für eine erste qualitative Analyse wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Marker Tuj1, Nestin, MAP-2 und NeuN durchgeführt. Insgesamt auffällig war dabei erneut die sichtbar reduzierte Zellzahl der 30 d NIM-2- und 30 d NIM-2 1 d MAT-kultivierten Zellen. Tuj1 war in allen Proben deutlich nachweisbar. Die MSCs waren dabei als spindelförmige Zellen sichtbar, die sowohl an den Zellgrenzen und Ausläufern als auch im Zellinneren definierte Tuj1-Signale zeigten. Nach der NIM-1-Behandlung konnten teilweise Zellen mit einer Neuronen-ähnlichen Zellmorphologie beobachtet werden, die ein schwächeres, aber ähnlich strukturiertes Fluoreszenzsignal zeigten. Nach der NIM-2-Induktion zeigten die Zellen eine entscheidend veränderte Neuronen-ähnliche Morphologie und eine insgesamt, aber vor allem auch in den Zellfortsätzen, deutlich stärkere Tuj1-Fluoreszenzfärbung. Nestin war nur sehr schwach in den MSCs nachweisbar, wohingegen die Färbung in den NIM-1-differenzierten Zellen etwas

stärker sichtbar war. In den NIM-2-induzierten Proben war Nestin nicht nachweisbar. MAP-2 konnte nur in den NIM-1-behandelten Zellen schwach sichtbar angefärbt werden und war in allen anderen Proben nicht nachweisbar. Die Nestin- und MAP-2-Signale waren ebenfalls im gesamten Zellkörper sichtbar. NeuN war in MSCs kaum wahrnehmbar angefärbt, während es in den NIM-1-differenzierten Zellen etwas deutlicher sichtbar war. In NIM-2-induzierten Zellen konnte nach 7 d ein ausgesprochen schwaches NeuN-Signal detektiert und nach 30 d kein NeuN mittels Immunfluoreszenzfärbung mehr nachgewiesen werden. Wenn vorhanden, war das NeuN-Signal im Zellkern sichtbar. (Abbildung 18). Diese Ergebnisse wurden mithilfe von Western-Blots überprüft und quantifiziert. Dafür wurde Tuj1 als Marker für unreife Neuronen und NeuN als Marker für reife Neuronen ausgewählt. Zusätzlich zu Tuj1 und NeuN wurde GAPDH als interner Standard gefärbt und zum Normieren verwendet. NeuN war in den unbehandelten MSCs auch im Western-Blot nur schwach in einigen der Proben nachweisbar. Die NIM-1-differenzierten Zellen hingegen exprimierten NeuN, wobei die analysierten Proben sehr heterogen waren und einige Proben NeuN sehr deutlich und andere es fast gar nicht exprimierten, sodass sich aufgrund des daraus resultierenden hohen Standardfehlers keine signifikante Änderung im Vergleich zu den MSCs ergab. In den Proben der NIM-2 induzierten MSCs konnte kein NeuN nachgewiesen werden, sodass statistisch eine signifikante Reduktion der NeuN-Expression errechnet wurde. Tuj1 war in allen Proben deutlich nachweisbar. Die NIM-1- und NIM-2-Differenzierungen führten zu einer gesteigerten Tuj1-Expression. Auffällig an der Tuj1-Färbung war, dass ein multiples Bandenmuster mit jeweils 3-5 nahe beieinanderliegenden Banden, anstelle einer einzelnen Bande, nachgewiesen wurde (Abbildung 19).

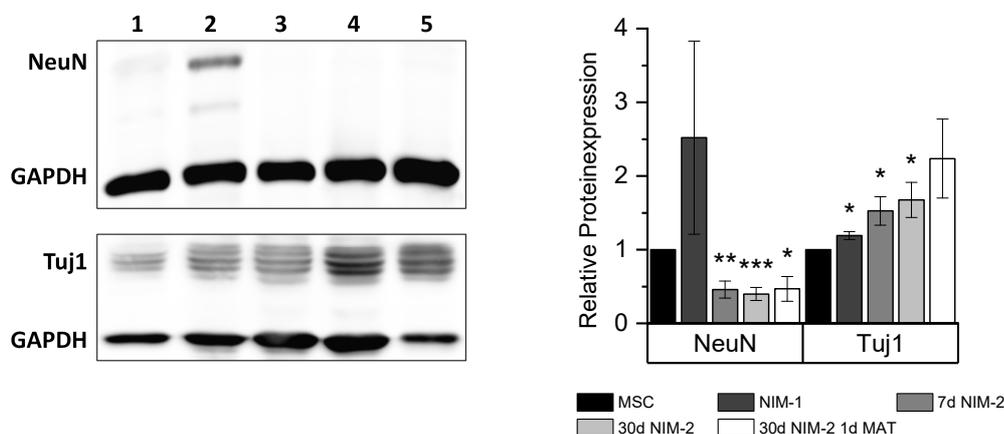


Abbildung 19: Proteinexpression der neuronalen Marker NeuN und Tuj1 in unbehandelten und induzierten MSCs. Zur Untersuchung der Proteinexpression von NeuN und Tuj1 wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt. Links sind exemplarisch entwickelte und fotografierte Western-Blots dargestellt. Bahn 1: MSCs, Bahn 2: NIM-1, Bahn 3: 7 d NIM-2, Bahn 4: 30 d NIM-2 und Bahn 5: 30 d NIM-2 1 d MAT. Als interne Referenz wurde GAPDH verwendet. Die Quantifizierung der Western-Blots ist rechts dargestellt. Es ist zu erkennen, dass NeuN lediglich in der NIM-1-Behandlung erhöht exprimiert wurde, jedoch nicht signifikant. Alle NIM-2-Differenzierungen führten zu einer signifikant reduzierten NeuN-Expression. Bei dem frühen neuronalen Marker Tuj1 führten alle Differenzierungen zu einer erhöhten Expression. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 3$) dargestellt. Signifikante Abweichungen im Vergleich zu den unbehandelten MSCs wurden mittels Studentischem *t*-Test abgeschätzt und sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

Auch Muskelzellen sind elektrisch erregbar und können Aktionspotentiale auslösen, welche in ihrer Form eine gewisse Ähnlichkeit zu den hier gemessenen aufweisen können. Um eine mögliche muskuläre Entwicklung der induzierten MSCs auszuschließen, wurde das Expressionsniveau der muskulären Marker *ACTA2*, *TAGLN*, *MYL2* und *SMYD1* in den unbehandelten und differenzierten MSCs mittels qRT-PCR untersucht. *ACTA2* und *TAGLN* waren in den MSCs deutlich exprimiert. Durch die verschiedenen Differenzierungsansätze wurden diese Marker signifikant herunterreguliert. *MYL2* und *SMYD1* waren schon in MSCs in nur geringen Mengen nachweisbar. Das Niveau blieb bei fast allen Differenzierungen unverändert. Lediglich die 30 d NIM-2-Induktion führte zu einer signifikanten Reduktion des Expressionsniveaus. Eine signifikant erhöhte Expression eines Markers nach den Differenzierungen war nicht messbar.

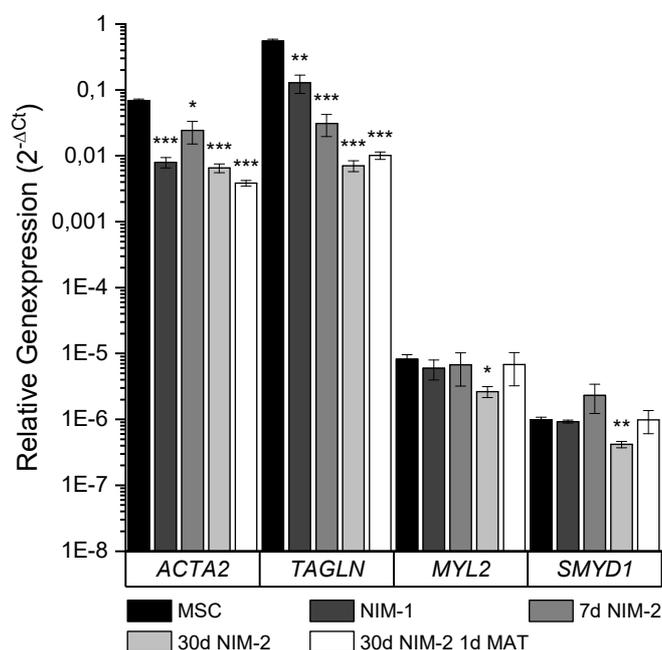


Abbildung 20: Expressionsanalyse der muskulären Marker *ACTA2*, *TAGLN*, *MYL2* und *SMYD1* in unbehandelten und induzierten MSCs. Mittels qRT-PCR wurden MSCs und NIM-1- und NIM-2-differenzierte Zellen auf ihre Expression der muskulären Marker *ACTA2*, *TAGLN*, *MYL2* und *SMYD1* auf mRNA-Ebene untersucht. Keine der Behandlungen führte dabei zur signifikant erhöhten Expression eines muskulären Markers. *ACTA2* und *TAGLN* wurden nach allen Differenzierungen signifikant schwächer exprimiert, während *MYL2* und *SMYD1* ein relativ konstantes Expressionsniveau aufwiesen. Lediglich die Induktion für 30 d in NIM-2 führte bei beiden Markern zu einer reduzierten Expression. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n = 3$) dargestellt. Signifikante Abweichungen im Vergleich zu den unbehandelten MSCs wurden mittels Studentischem t -Test abgeschätzt und sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

Die induzierten MSCs entwickelten somit eine Neuronen-ähnliche Morphologie, exprimierten MSC-Marker signifikant schwächer, während neuronale Marker hochreguliert und muskuläre Marker herunterreguliert wurden. Die Zellen waren außerdem elektrisch erregbar, wenn sie 30 d in NIM-2 und 1 d in MAT kultiviert wurden. Die Zellen wurden im Folgenden tiefergehend physiologisch charakterisiert, um weitere Einflüsse der neuronalen Induktion zu erforschen.

3.3 *Gap Junctions* in small molecule-induzierten MSCs

Die *Gap Junction*-vermittelte Zell-Zellkommunikation ist für jeden Zelltyp und jedes Gewebe spezifisch und sehr vielfältig. Durch Differenzierung von Zellen kann es zu bedeutsamen Änderungen in dem Kopplungsverhalten der Zellen kommen. Weiterhin spielt die Art und Stärke der Zell-Zellkopplung eine wichtige Rolle während der Zellentwicklung und kann den Differenzierungsvorgang direkt beeinflussen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Untersuchung der *Gap Junctions* und *Gap Junction*-bildenden Proteine, der Connexine, in unbehandelten und induzierten MSCs gelegt.

3.3.1 *Gap Junction*-vermittelte Zellkommunikation in induzierten MSCs

Die *Gap Junction*-abhängige Zell-Zellkommunikation wurde vergleichend in den MSCs und den NIM-1- und NIM-2-induzierten Zellen untersucht. Diese Analyse wurde mittels Lucifer Yellow (LY)-Farbstofftransfer-Experimenten durchgeführt. Mittels einer mit LY-Lösung befüllten *Patch-Clamp*-Kapillare wurde eine Zelle inmitten eines Zellverbandes mit dem *Gap Junction*-gängigen, aber Membran-impermeablen Farbstoff befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Kapillare entfernt und eine Fluoreszenzaufnahme im LY-Kanal gemacht. Waren die Zellen in dem Zellverband *Gap Junction*-gekoppelt, konnte der Farbstoff aus der Donorzelle über *Gap Junctions* in Nachbarzellen diffundieren, sodass nach dem Experiment auch dort eine Fluoreszenz detektiert werden konnte.

Eine sehr starke Kopplung konnte für die unbehandelten MSCs beobachtet werden, die in den NIM-1-differenzierten Zellen in vergleichbarem Maß sichtbar war. Die NIM-2-induzierten Proben zeigten allerdings eine deutlich schwächere *Gap Junction*-Kopplung. So war beispielsweise in den 30 d NIM-2-behandelten Proben nur in Einzelfällen überhaupt ein Farbstofftransfer in eine Nachbarzelle sichtbar. Wurde die Differenzierung um 1 d in MAT erweitert, konnte wieder häufiger eine Kopplung beobachtet werden. Im Vergleich zu den MSCs war bei allen differenzierten Zellen eine Zellmorphologie mit sehr langen Zellfortsätzen auffällig, die auch einen direkten Kontakt zweier weit voneinander entfernt wachsender Zellen herstellen konnten (Abbildung 21).

Aufgrund der langen Zellausläufer der differenzierten Zellen war es unmöglich, direkte Nachbarzellen der gepatchten Zelle zu identifizieren. Deshalb musste anstelle einer Auswertungsmethode, bei der der prozentuale Anteil fluoreszierender Nachbarzellen durch Zählen ermittelt wird, eine Methode verwendet werden, die unabhängig von einer zu bestimmenden Zellanzahl verlässliche Resultate liefert. In allen LY-Fluoreszenzaufnahmen wurde die integrierte Dichte des Fluoreszenzsignals in allen Zellen, mit Ausnahme der farbstoffbeladenen Zelle, gemessen und anschließend auf die integrierte Dichte aller Zellen, einschließlich der beladenen Zelle, normiert. Dieser Wert stellt die LY-Farbstoff-Kopplungsrate dar und liegt zwischen null und eins, wobei ein höherer Wert auch eine größere *Gap Junction*-Kopplung bezeichnet.

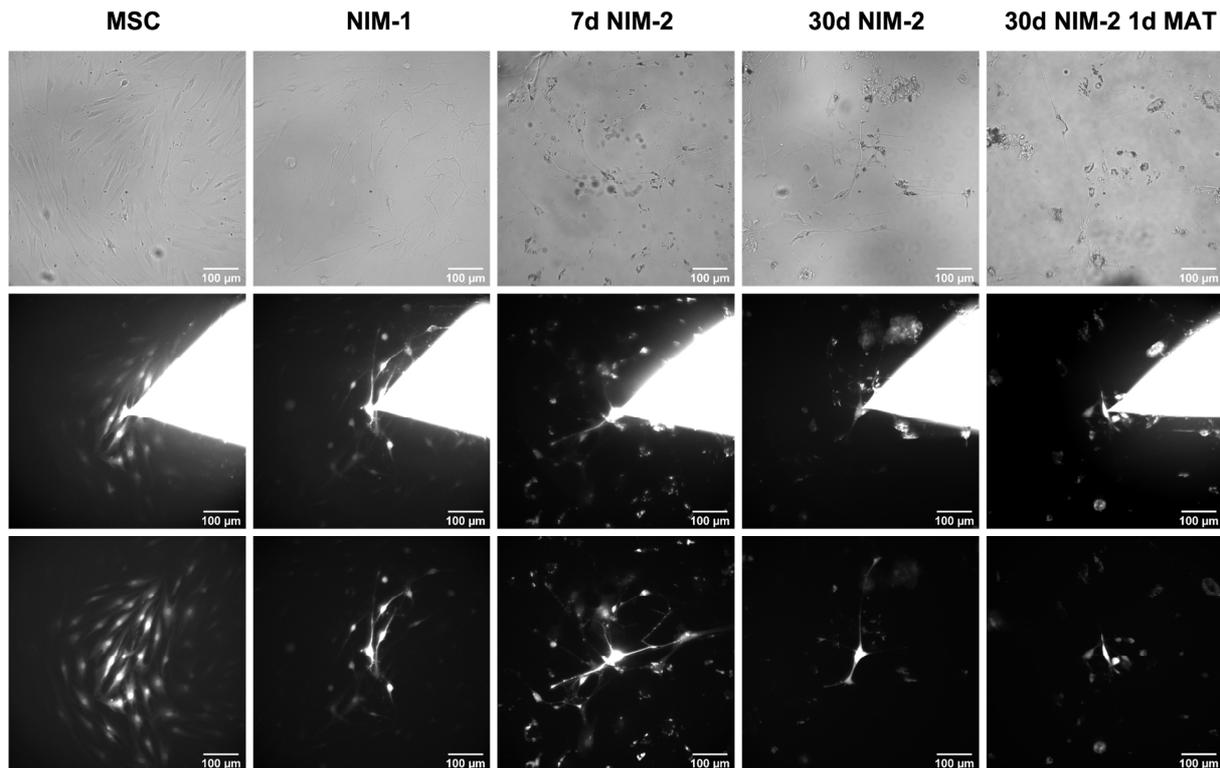


Abbildung 21: Analyse der *Gap Junction*-abhängigen Zell-Zellkopplung mittels Farbstofftransfer-Experimenten. Mithilfe einer mit Lucifer Yellow (LY)-Lösung befüllten *Patch-Clamp*-Kapillare wurde eine Zelle in einem Zellverband mit dem Farbstoff beladen. Dieser konnte in einer 10-minütigen Inkubationszeit in benachbarte Zellen diffundieren, wenn die Zellen über *Gap Junctions* miteinander gekoppelt waren. Nach 10 min wurde die Kapillare wieder von der Zelle entfernt. Die MSCs und die NIM-1-induzierten Zellen waren deutlich *Gap Junction*-gekoppelt. 7 d und 30 d Induktion in NIM-2 reduzierten die Kopplung auf ein kaum sichtbares Maß. Der zusätzliche Tag in MAT stellte die Kopplung in Teilen wieder her. Exemplarisch sind hier für jede Behandlung drei Fotografien gezeigt, bestehend aus einer Durchlichtaufnahme vor Beginn des Experiments (oben), einer Fluoreszenzaufnahme im LY-Kanal während des Experiments, mit der Kapillare an der Zelle (Mitte), und einer Fluoreszenzaufnahme im LY-Kanal nach Entfernen der Kapillare und Beenden des Experiments. Die Maßstabsbalken zeigen 100 µm an.

Die Quantifizierung der Farbstofftransfer-Experimente bestätigte den Eindruck, der beim Betrachten der Aufnahmen entstanden war. Die MSCs und NIM-1-differenzierten Zellen zeigten eine ähnlich hohe, starke Zell-Zellkopplung mit einer LY-Farbstoff-Kopplungsrate von jeweils etwa 0,65. Wurden die Zellen für 7 d mit NIM-2 induziert, sank die Kopplungsrate signifikant auf ungefähr 0,35, während eine 30 d-Differenzierung sogar zu einer signifikanten Reduktion der Kopplungsrate auf etwa 0,15 führte. Wurde diese Behandlung um einen weiteren Tag in MAT erweitert, waren die Zellen wieder etwas stärker *Gap Junction*-gekoppelt, allerdings mit einer Kopplungsrate von ungefähr 0,30 immer noch signifikant schwächer als die unbehandelten MSCs (Abbildung 22). Die NIM-2-differenzierten Zellen wiesen somit alle eine deutlich schwächere *Gap Junction*-vermittelte Zell-Zellkopplung auf als die unbehandelten MSCs.

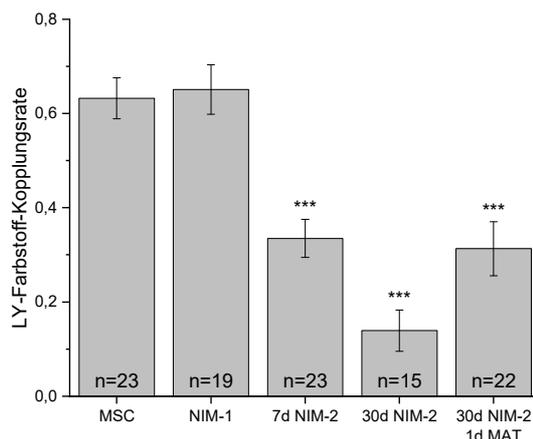


Abbildung 22: Quantifizierung der Farbstofftransfer-Experimente. Anhand der Fluoreszenzaufnahmen der Farbstofftransfer-Experimente wurde für die verschiedenen Zellproben die jeweilige Kopplungsrate bestimmt und als Mittelwert \pm SEM (die Anzahl der Experimente n ist dem Diagramm zu entnehmen) dargestellt. Signifikante Abweichungen im Vergleich zu den unbehandelten MSCs wurden mittels Studentischem t -Test abgeschätzt und sind als *** $p \leq 0,001$ dargestellt. Die NIM-2-induzierten Zellen zeigten im Vergleich zu den MSCs eine signifikant reduzierte Zell-Zellkopplung.

Gap Junctions bestehen aus zwei *Gap Junction*-Halbkanälen, die selbst ebenfalls funktionale Kanäle darstellen und die Diffusion kleiner Moleküle und Botenstoffe zwischen dem Zytoplasma und dem extrazellulären Raum ermöglichen.

Die Aktivität vorhandener *Gap Junction*-Halbkanäle kann mithilfe von Farbstoffaufnahme-Experimenten analysiert werden. Zu Beginn eines solchen Experiments befinden sich die Zellen in einem Ca^{2+} -haltigen Badmedium, das die Offenwahrscheinlichkeit der Halbkanäle stark reduziert. In einem zweiten Versuchsabschnitt wird dann das Ca^{2+} entzogen und die Offenwahrscheinlichkeit der Halbkanäle somit erhöht. Abgeschlossen wird das Experiment mit einem Abschnitt, in welchem dem Ca^{2+} -freien Badmedium ein *Gap Junction*-Blocker wie CBX oder La^{3+} zugesetzt wird, sodass die theoretisch offenen Halbkanäle durch den Inhibitor blockiert und die Farbstoffaufnahme gesenkt wird. Dem Badmedium ist in allen Versuchsteilen ein Farbstoff wie Ethidiumbromid (EtdBr) zugesetzt, der nur sehr schwach membrangängig, aber *Gap Junction*-Halbkanal-permeabel ist. Anhand der Farbstoffaufnahme rate können Rückschlüsse auf die Aktivität der *Gap Junction*-Halbkanäle gezogen werden. In dieser Arbeit wurden die Experimente mit EtdBr als *Tracer*-Farbstoff und CBX als *Gap Junction*-Inhibitor durchgeführt.

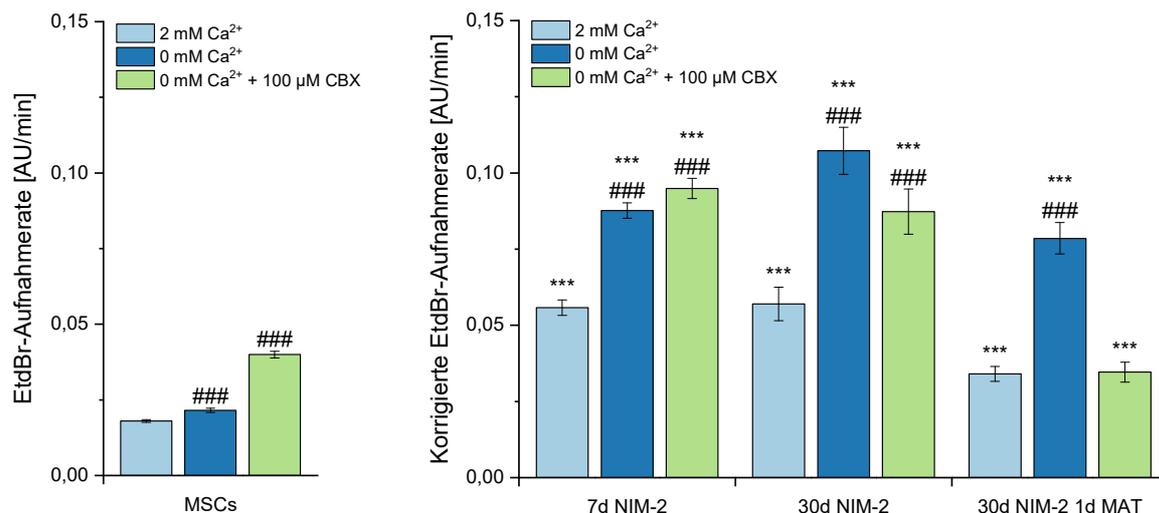


Abbildung 23: Analyse von *Gap Junction*-Halbkanälen mittels Farbstoffaufnahme-Experimenten. MSCs, 7 d NIM-2-, 30 d NIM-2- und 30 d NIM-2 1 d MAT-differenzierte Zellen wurden für jeweils 10 min erst einem Ethidiumbromid (EtdBr)-haltigen Badmedium mit 2 mM Ca²⁺, dann einem EtdBr-haltigen Badmedium ohne Ca²⁺ und schließlich einem EtdBr-haltigen Badmedium ohne Ca²⁺ mit 100 µM CBX ausgesetzt. Für alle drei Versuchsabschnitte wurde jeweils die EtdBr-Aufnahmerate bestimmt. Dargestellt ist die EtdBr-Aufnahmerate der MSCs (links) und die um die Aufnahmerate der MSCs korrigierte EtdBr-Aufnahmerate der NIM-2-induzierten Proben (rechts). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM (Zellanzahl n ≥ 990) dargestellt. Signifikante Abweichungen im Vergleich zum entsprechenden Versuchsabschnitt der unbehandelten MSCs wurden mittels Studentischem *t*-Test abgeschätzt und sind als *** $p \leq 0,001$ dargestellt. Signifikante Abweichungen im Vergleich zum ersten Versuchsabschnitt der entsprechenden Probe wurden ebenfalls mit dem Studentischen *t*-Test abgeschätzt und sind als ### $p \leq 0,001$ dargestellt.

Es wurde jeweils die EtdBr-Aufnahmerate von unbehandelten und NIM-2-differenzierten Zellen bestimmt. Die MSCs zeigten bei Anwesenheit von Ca²⁺ eine sehr schwache EtdBr-Farbstoffaufnahme, die durch den Entzug von Ca²⁺ zwar signifikant, aber dennoch nur schwach erhöht wurde. Eine deutlichere Steigerung war durch den *Gap Junction*-Inhibitor CBX erkennbar (Abbildung 23 links). Da vor allem die Veränderung der Halbkanal-Aktivität durch die NIM-2-Behandlung von Interesse war, wurden die Messwerte der unbehandelten MSCs in den drei Versuchsabschnitten als Ausgangspunkt gewertet und von den Messwerten der differenzierten Zellen in den entsprechenden Versuchsteilen subtrahiert. Die korrigierten EtdBr-Aufnahmeraten in den verschiedenen Versuchsteilen der differenzierten Zellen wurden sowohl jeweils innerhalb des Versuchs mit den Kontrollbedingungen mit 2 mM Ca²⁺ verglichen als auch mit den Aufnahmeraten der unbehandelten MSCs in den entsprechenden Versuchsabschnitten.

Insgesamt war zu beobachten, dass die korrigierte EtdBr-Aufnahmerate in allen Proben der differenzierten Zellen und in allen Versuchsabschnitten im Vergleich zu den unbehandelten MSCs signifikant erhöht war. Der Entzug von Ca²⁺ im zweiten Versuchsabschnitt führte im Vergleich zum ersten Abschnitt mit 2 mM Ca²⁺ in allen Proben NIM-2-induzierter Zellen zu einem starken, signifikanten Anstieg der Farbstoffaufnahme. Bei der 7 d NIM-2-Differenzierung blieb die Rate durch Zugabe von CBX im dritten Versuchsabschnitt annähernd gleich, wobei sie bei der 30 d NIM-2-Induktion leicht sank und durch die Erweiterung der Differenzierung um 1 d MAT so stark sank, dass

das Ausgangsniveau der EtdBr-Aufnahmerate des ersten Versuchsabschnitts wieder erreicht wurde (Abbildung 23 rechts). Die NIM-2-differenzierten Zellen wiesen folglich eine signifikant gesteigerte EtdBr-Farbstoffaufnahme im Vergleich zu unbehandelten MSCs auf.

3.3.2 Connexin-Expression in induzierten MSCs

Sowohl in Hinblick auf die *Gap Junction*-vermittelte Zell-Zellkopplung als auch durch die Analyse der *Gap Junction*-Halbkanal-Aktivität konnte ein großer Einfluss durch die verschiedenen Differenzierungsmethoden, vor allem der NIM-2-Induktion, festgestellt werden. Es wurde deshalb überprüft, ob diese Veränderungen sich auch in einem veränderten Expressionsverhalten der *Gap Junction*-bildenden Connexine widerspiegeln und welche Connexin-Isoformen möglicherweise für die physiologischen Veränderungen der Zellen verantwortlich sein könnten.

Zunächst wurde das Expressionsniveau der Connexine unter den verschiedenen Induktionsbedingungen auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. *GJA1* (Gen kodierend für Cx43, Gen- und Proteinbezeichnungen siehe Tabelle 8) war in den MSCs sehr stark exprimiert und erreichte ein ähnlich hohes Expressionsniveau wie das Haushaltsgen *RPS29*. Durch alle durchgeführten Differenzierungen wurde die Genexpression von *GJA1* signifikant reduziert. *GJC1* (Gen kodierend für Cx45) war ebenfalls in den MSCs exprimiert, jedoch ca. 100-mal schwächer als *GJA1*. Auch dieses Connexin wurde nach den unterschiedlichen Induktionen herunterreguliert. Allerdings hatte die NIM-1-Differenzierung dabei eine geringere Auswirkung als die NIM-2-Behandlung. So war die stärkste Reduktion nach einer Kultivierung für 30 d in NIM-2 und 1 d in MAT messbar. *GJA4* und *GJA5* (Gene kodierend für Cx37 und Cx40) waren in unbehandelten MSCs ähnlich stark und geringer als *GJC1* exprimiert. Beide Gene waren nach den drei verschiedenen NIM-2-Protokollen signifikant schwächer exprimiert, wobei die stärkste Reduktion jeweils in der Probe der 30 d NIM-2-induzierten Zelle sichtbar war. *GJB2* (Gen kodierend für Cx26) war in den MSCs eher schwach exprimiert. Es zeigte sich jedoch, dass dieses Gen als einziges der getesteten Connexin-Gene nach den NIM-2-Differenzierungen signifikant hochreguliert war. *GJD2* (Gen kodierend für Cx36) war sowohl in den unbehandelten MSCs als auch in den induzierten Zellen nur in Spuren nachweisbar, wobei keine Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den verschiedenen Behandlungen messbar waren (Abbildung 24).

Um diese Erkenntnisse auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden für die Connexine Cx26, Cx43 und Cx45 Immunfluoreszenzfärbungen und Western-Blot-Experimente durchgeführt.

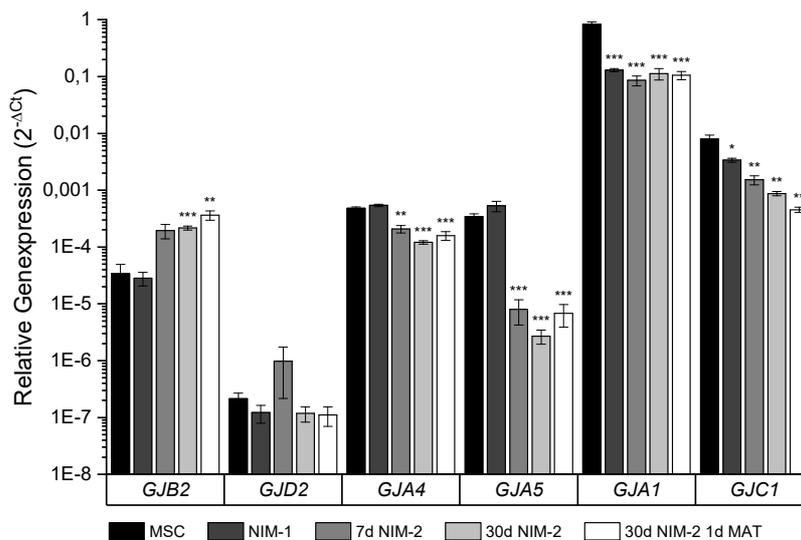


Abbildung 24: Relative Genexpression der Gap Junction-bildenden Connexine. Mittels qRT-PCR wurden Kontroll-MSCs, NIM-1- und NIM-2-induzierte MSCs auf ihr Expressionsmuster verschiedener Connexine (*GJB2*, *GJD2*, *GJA4*, *GJA5*, *GJA1* und *GJC1*) untersucht. Die behandelten Proben NIM-1, 7 d NIM-2, 30 d NIM-2 und 30 d NIM-2 1 d MAT wurden mit unbehandelten MSCs verglichen, um eine mögliche Veränderung der Connexin-Expression durch die Induktion zu analysieren. *GJA1* war in MSCs sehr stark exprimiert. Auch *GJB2*, *GJA4*, *GJA5* und *GJC1* waren exprimiert, wenn auch teilweise schwächer, wohingegen *GJD2* nur in Spuren nachweisbar war. Im Verlauf der Differenzierung wurde die Expression der meisten Connexine deutlich reduziert (*GJA4*, *GJA5*, *GJA1* und *GJC1*), während *GJD2* unverändert blieb und *GJB2* signifikant erhöht wurde. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n = 4$) dargestellt. Signifikante Abweichungen im Vergleich zu den unbehandelten MSCs wurden mittels Studentschem *t*-Test abgeschätzt und sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

In der Immunfluoreszenzfärbung konnten in allen Proben die drei getesteten Connexine nachgewiesen werden, wobei sich die Beobachtungen aus der qRT-PCR bestätigten. Cx26 war in MSCs nur relativ schwach als gleichmäßiges Signal in den Zellen detektierbar, wobei die Fluoreszenzintensität in den NIM-2-differenzierten Proben zunahm. Das Fluoreszenzsignal schien in diesen Proben vor allem in den Zellausläufern stärker zu sein. Cx43 war deutlich in den unbehandelten MSCs nachweisbar. Das Cx43-Signal war am stärksten in Form von *Gap Junction*-Plaques an der Zellmembran zu erkennen, was sich auch in den differenzierten Zellen nicht veränderte. Lediglich die Intensität und Häufigkeit der Cx43-Signale wurde in den NIM-2-induzierten Zellen ein wenig geringer. Auch Cx45 konnte in allen Proben in Form von *Gap Junction*-Plaques detektiert werden. Intensität und Häufigkeit der Signale ähnelten sich in allen getesteten Behandlungen (Abbildung 25).

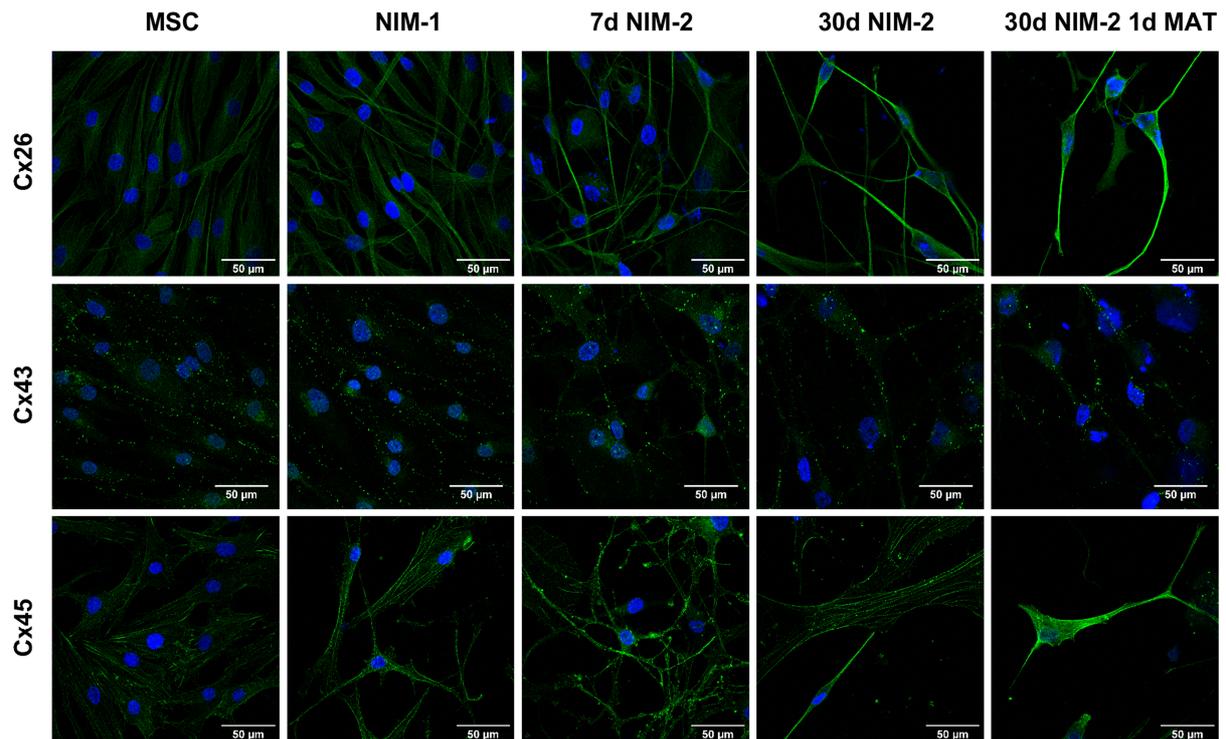


Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung der *Gap Junction*-bildenden Connexine. In unbehandelten und differenzierten MSCs wurden Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis der Connexine Cx26, Cx43 und Cx45 durchgeführt, wobei alle getesteten Connexine in allen Proben nachweisbar waren. Cx26 war in MSCs schwach nachweisbar, wohingegen das Fluoreszenzsignal in den NIM-2-differenzierten Proben deutlich stärker war. Cx43 war in den MSCs stark exprimiert und nahm in den NIM-2-induzierten Proben ein wenig ab. In allen Proben konnte das Connexin in Form von *Gap Junction*-Plaques an den Zellgrenzen detektiert werden. Cx45 war in allen Proben detektierbar und war teilweise in *Gap Junction*-Plaques sichtbar. Das jeweilige Connexin wurde mit iFluor™488 (grün) gefärbt, während die Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt wurden. Die Maßstabsbalken repräsentieren 50 µm.

Diese Beobachtungen wurden im Folgenden mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert. Als interner Standard wurde je nach Größe des nachzuweisenden Proteins entweder GAPDH oder β -Tubulin verwendet. Die gemessenen Bandenintensitäten wurden zunächst auf den internen Standard und anschließend auf die unbehandelten MSCs normiert. Für Cx26 und Cx45 diente GAPDH als interner Standard, für Cx43 wurde β -Tubulin verwendet. In den entwickelten Western-Blots waren Cx26 und Cx45 als einzelne Bande sichtbar, wohingegen der Cx43-Nachweis ein Bandenmuster von 2 - 3 Banden ergab (Abbildung 26 links). Die Quantifizierung der Western-Blots bestätigte den Eindruck der Immunfluoreszenzfärbungen. Cx26 war in den MSCs und in den NIM-1-differenzierten Zellen nur schwach nachweisbar, wurde durch die Induktion mit NIM-2 aber hochreguliert, im Falle der 30-tägigen Differenzierung signifikant. Dabei war Cx26 in einigen Proben kaum höher exprimiert als in den MSCs, während in anderen Proben eine sehr deutliche Steigerung messbar war. Im Gegensatz dazu war Cx43 in den MSCs und NIM-1-behandelten Zellen sehr stark exprimiert und war nach den NIM-2-Differenzierungen kaum noch nachweisbar, sodass das Expressionsniveau auch auf Proteinebene in allen NIM-2-Proben signifikant reduziert war. Cx45 war im Western-Blot nur sehr schwach in den MSCs nachweisbar, was sich auch durch die Differenzierungen nicht änderte (Abbildung 26 rechts).

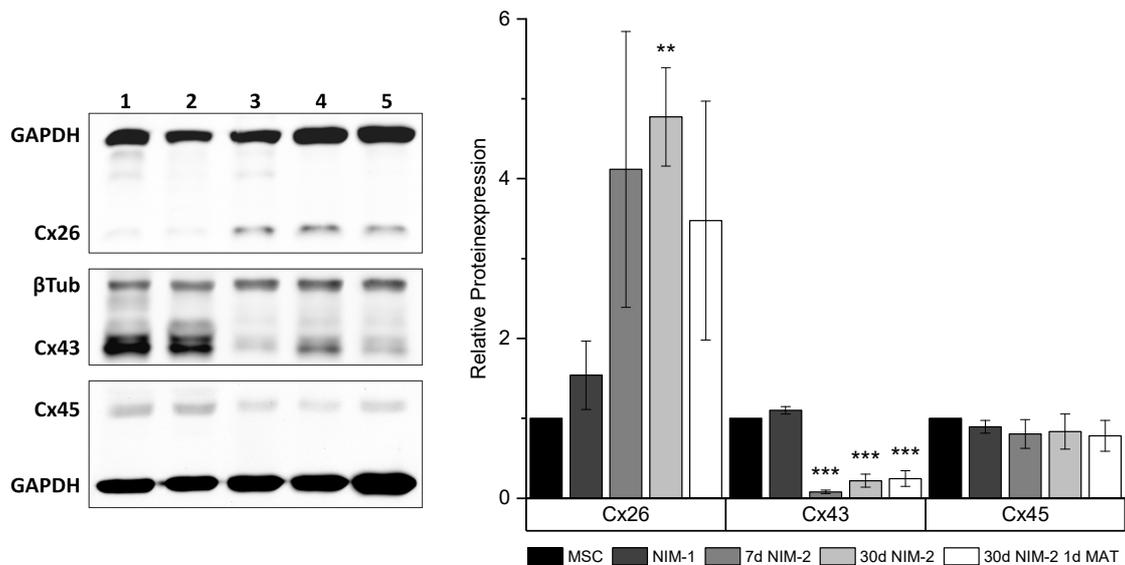


Abbildung 26: Proteinexpression der Connexine Cx26, Cx43 und Cx45. Zur Quantifizierung der Proteinexpression von Cx26, Cx43 und Cx45 wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt. Exemplarisch sind links entwickelte und fotografierte Western-Blots dargestellt. Bahn 1: MSCs, Bahn 2: NIM-1, Bahn 3: 7 d NIM-2, Bahn 4: 30 d NIM-2 und Bahn 5: 30 d NIM-2 1 d MAT. Als interne Referenz wurde je nach Größe des nachzuweisenden Proteins GAPDH oder β -Tubulin verwendet. Die Quantifizierung der Western-Blots ist rechts dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Cx26 in den NIM-2-Behandlungen erhöht exprimiert wurde, jedoch nur bei 30 d NIM-2-Induktion signifikant. Alle NIM-2-Differenzierungen führten außerdem zu einer signifikant reduzierten Cx43-Expression, während das Cx45-Expressionsniveau in allen untersuchten Proben unverändert blieb. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 3$) dargestellt. Signifikante Abweichungen im Vergleich zu den unbehandelten MSCs wurden mittels Studentischem *t*-Test abgeschätzt und sind als ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

Insgesamt hatten die Differenzierungen, vor allem die Induktion mit NIM-2, einen bedeutsamen Einfluss auf die Connexin-Expression und, wie zuvor gezeigt, auch auf die *Gap Junction*-Kopplung und *Gap Junction*-Halbkanal-Aktivität. Ob auch, umgekehrt betrachtet, die Inhibition der *Gap Junction*-Kopplung die Differenzierung beeinflusst, wurde nachfolgend untersucht.

3.3.3 Einfluss der *Gap Junction*-Kopplung auf die neuronale Differenzierung

Während der neuronalen Differenzierung mit NIM-2 für 7 d wurde dem Induktionsmedium 0 μ M, 50 μ M oder 100 μ M des *Gap Junction*-Blockers CBX zugesetzt, um die Auswirkungen einer inhibierten *Gap Junction*-Kopplung während der Differenzierung zu untersuchen. Zur Kontrolle wurden auch dem normalen Wachstumsmedium der MSCs die gleichen Konzentrationen an CBX zugesetzt und die MSCs darin für 7 d kultiviert. Nach dieser 7-tägigen Inkubation wurde aus allen Proben die mRNA isoliert und das Expressionsniveau verschiedener MSC-Marker, neuronaler Marker und Connexine mittels qRT-PCR untersucht.

Die MSC-Marker waren in den undifferenzierten MSCs bei allen CBX-Konzentrationen gleichermaßen stark exprimiert. *NT5E* war ebenso stark auch in den Proben der differenzierten Zellen vorhanden, wohingegen *THY1*, *ENG* und *ALCAM* durch die 7 d Behandlung in NIM-2 signifikant herunterreguliert wurden. Der Zusatz von CBX hatte auf diese Reduktion keinerlei Einfluss. Für *NES* stellten sich die Ergebnisse sehr ähnlich dar. Während die unbehandelten Zellen diesen Marker, unabhängig von der

Anwesenheit von CBX im Medium, moderat exprimierten, wurde die Expression durch die Differenzierung signifikant gesenkt. Auch hierbei war kein Einfluss durch CBX messbar. Nach einer in den unbehandelten MSCs schon starken Expression wurde *TUBB3* durch die Differenzierung noch weiter hochreguliert. Dieser signifikante Anstieg der Expression wurde durch die Zugabe von CBX abgeschwächt, sodass die 7 d in NIM-2 differenzierten Zellen unter Zusatz von 100 μM CBX signifikant weniger *TUBB3* exprimierten als ohne CBX-Zugabe. Die Analyse von *MAP2* zeigte keine Veränderung des Expressionsniveaus durch die Differenzierung in NIM-2. Allerdings wurde durch die Zugabe von CBX die Expression von *MAP2* leicht verringert. Bei den differenzierten Zellen kam es unter Zusatz von 100 μM CBX zu einer signifikanten Verringerung im Vergleich zu der entsprechenden Probe ohne CBX-Zusatz. Im Expressionsniveau der neuronalen Transkriptionsfaktoren *SOX2*, *MYT1L* und *POU3F2* kam es in keiner Probe zu signifikanten Veränderungen. Ein Einfluss von CBX auf das Expressionsverhalten der getesteten Marker ist also nur geringfügig erkennbar (Abbildung 27).

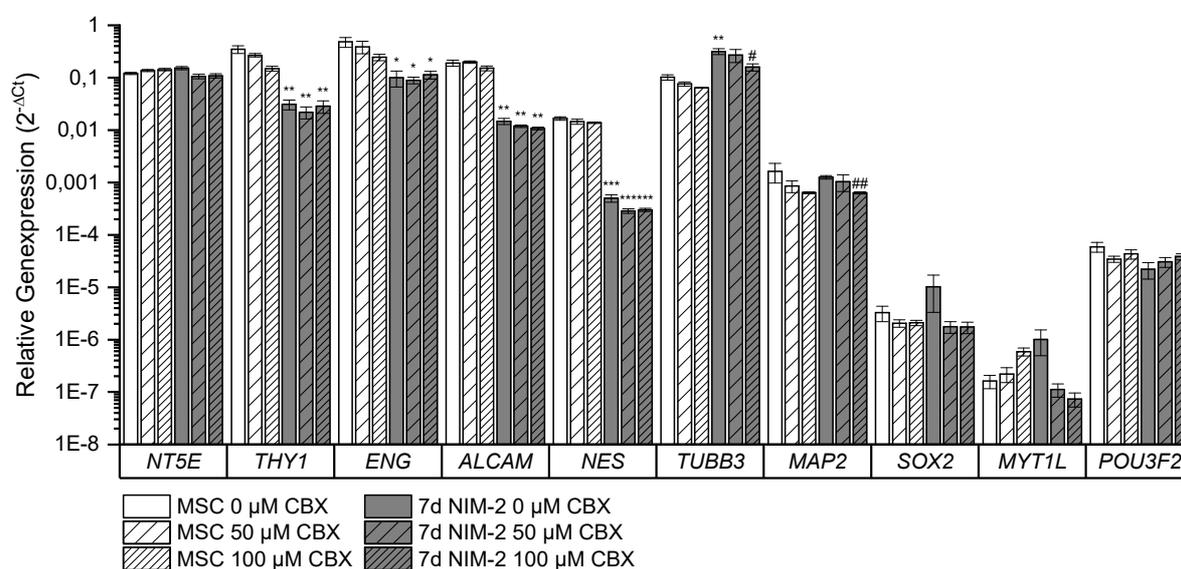


Abbildung 27: Relative Genexpression von MSC- und neuronalen Markern unter Zusatz von CBX während der Induktion mit NIM-2. MSCs wurden für 7 d unter Zusatz von 0 μM , 50 μM oder 100 μM CBX kultiviert. Ebenso wurden diese CBX-Konzentrationen dem Induktionsmedium während der 7 d NIM-2-Differenzierung hinzugefügt. Im Anschluss an die 7 d Kultivierung wurden die Zellen mittels qRT-PCR auf ihre Genexpression verschiedener MSC-Marker (*NT5E*, *THY1*, *ENG* und *ALCAM*) und neuronaler Marker (*NES*, *TUBB3*, *MAP2*, *SOX2*, *MYT1L* und *POU3F2*) hin untersucht. Die Marker *THY1*, *ENG*, *ALCAM* und *NES* wurden durch die Differenzierung für 7 d in NIM-2 herunterreguliert. Der gleiche Effekt trat auch unter Zusatz von 50 μM und 100 μM CBX auf. *TUBB3* wurde durch die Induktion in NIM-2 signifikant hochreguliert. Durch den Zusatz von 100 μM CBX war diese Expressionssteigerung im Vergleich zu 0 μM CBX in NIM-2 signifikant geringer. Auch auf die Expression von *MAP2* hatte der Zusatz von CBX einen geringfügigen Einfluss. Durch die Zugabe von 100 μM CBX zum Induktionsmedium NIM-2 war nach 7 d eine reduzierte *MAP2*-Expression zu beobachten. Auch ohne Differenzierungsmedium war diese Tendenz durch Zugabe von 100 μM CBX erkennbar. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n = 3$) angegeben. Statistische Signifikanzen wurden mit einem Studentschen *t*-Test abgeschätzt und sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zu unbehandelten MSCs mit 0 μM CBX und als # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ und ### $p \leq 0,001$ im Vergleich zu 7 d NIM-2-induzierten Zellen mit 0 μM CBX dargestellt.

Weiterhin wurde auch das Expressionsniveau verschiedener Connexine untersucht. Es zeigte sich, dass *GJD2* und *GJA4* weder durch die Induktion mit NIM-2 noch durch die Zugabe verschiedener CBX-Konzentrationen signifikant beeinflusst wurden, wohingegen *GJB2* durch die Differenzierung signifikant hochreguliert wurde, durch CBX-Zusatz aber kein weiterer Einfluss messbar war. *GJA5*, *GJA1* und *GJC1* wurden durch die Behandlung für 7 d in NIM-2 signifikant reduziert. Bei *GJA5* und *GJA1* gab es keine weitere Veränderung durch den Zusatz von CBX, während die Zugabe von 50 μM und 100 μM CBX in den NIM-2-differenzierten Zellen im Vergleich zu den NIM-2-behandelten Zellen ohne CBX-Zusatz zu einer weiteren signifikanten Reduktion des Expressionsniveaus von *GJC1* führte (Abbildung 28).

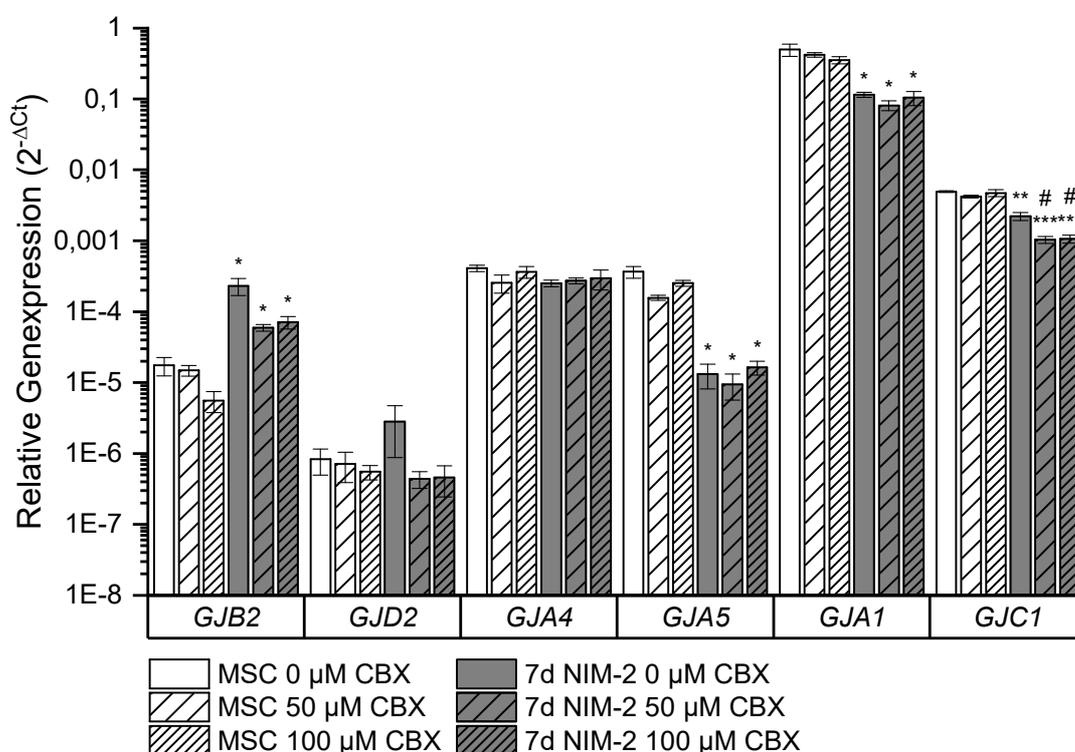


Abbildung 28: Relative Genexpression von Connexinen unter Zusatz von CBX während der Induktion mit NIM-2. MSCs wurden für 7 d unter Zusatz von 0 μM , 50 μM oder 100 μM CBX kultiviert. Ebenso wurden diese CBX-Konzentrationen dem Induktionsmedium während der 7 d NIM-2-Differenzierung hinzugefügt. Im Anschluss an die 7 d Kultivierung wurden die Zellen mittels qRT-PCR auf ihre Genexpression verschiedener Connexine (*GJB2*, *GJD2*, *GJA4*, *GJA5*, *GJA1* und *GJC1*) hin untersucht. *GJB2* wurde durch die Induktion für 7 d in NIM-2 signifikant hochreguliert. Die Zugabe von CBX zeigte keinen weiteren Einfluss auf das Expressionsniveau. *GJA5*, *GJA1* und *GJC1* wurden durch die Differenzierung signifikant herunterreguliert. Der Zusatz von CBX hatte nur auf die Expression von *GJC1* einen zusätzlich reduzierenden Einfluss. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n = 3$) angegeben. Statistische Signifikanzen wurden mit einem Studentischen t -Test abgeschätzt und sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zu unbehandelten MSCs mit 0 μM CBX und als # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ und ### $p \leq 0,001$ im Vergleich zu 7 d NIM-2-induzierten Zellen mit 0 μM CBX dargestellt.

3.4 Purinerge Rezeptoren in *small molecule*-induzierten MSCs

Purinerge Rezeptoren spielen sowohl in neuronalen als auch nicht-neuronalen Zellen eine essenzielle Rolle in diversen zellulären Prozessen. So sind sie beispielsweise in der Zellkommunikation, Zellproliferation und bei verschiedenen Differenzierungen unerlässlich. Ob diese Rezeptoren auch in der NIM-2-induzierten Differenzierung mittels *small molecules* von Relevanz sind oder ob ATP in den entwickelten Zellen eine Rolle als Neurotransmitter spielt, wie es in reifen Neuronen der Fall ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

3.4.1 ATP-vermittelte Calcium-Signale in induzierten MSCs

Die Bindung von ATP an purinerge P2X- oder P2Y-Rezeptoren führt durch Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum oder durch die Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern intrazellulär zu Anstiegen der Ca^{2+} -Konzentration. Dieses freigesetzte Ca^{2+} kann emissionsratiometrisch mithilfe der fluoreszenzbasierten Ca^{2+} -*Imaging*-Methode unter Verwendung des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffs Indo-1 AM gemessen werden.

Zunächst wurde überprüft, ob die MSCs und NIM-2-induzierten Zellen in der Lage waren, auf wiederholte ATP-Stimuli mit repetitiven Ca^{2+} -Signalen zu reagieren. Dafür wurden die Zellen unter dauerhafter Perfusion mit einem Ca^{2+} -haltigen Badmedium insgesamt 6-mal alle 3 min für 5 s mit 50 μM ATP stimuliert. Auf die wiederholten Stimulierungen reagierten die verwendeten Zellen in allen Fällen mit repetitiven intrazellulären Ca^{2+} -Antworten, die in ihrer Signalstärke im Laufe der Messung ein wenig schwächer wurden. Eine Desensibilisierung der Rezeptoren war nie erkennbar (Abbildung 29). Bei der wiederholten Stimulierung der MSCs mit ATP kam es zu Ca^{2+} -Antworten, die als einzelne und klar erkennbare Peaks während der Messung sichtbar waren (Abbildung 29 oben). Um zu überprüfen, ob die Dauer von 5 s und die Frequenz von 3 min der 50 μM ATP-Zugabe auch für die differenzierten Zellen geeignet war, wurde die Messung mit den 7 d NIM-2-induzierten Zellen wiederholt. Die Resultate waren denen der MSCs sehr ähnlich. Einzig die Peakform erschien ein wenig breiter und nicht so schmal wie bei den MSCs (Abbildung 29 unten). Die Peaks der Ca^{2+} -*Imaging*-Messung mit 5 s andauernden Stimulierungen mit 50 μM ATP erschienen sowohl unter Verwendung von MSCs als auch unter Verwendung von NIM-2-induzierten Zellen sehr definiert und waren gut voneinander und vom Hintergrund zu unterscheiden, weshalb diese Methode im Weiteren zur genaueren Charakterisierung der purinergen Signaltransduktion verwendet wurde.

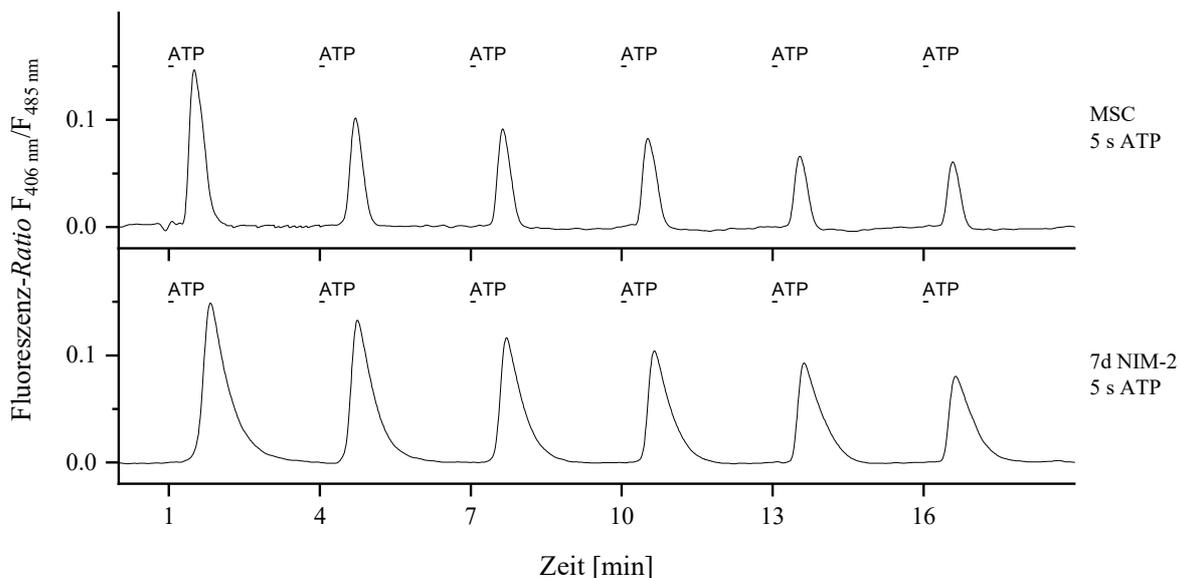


Abbildung 29: Repetitive Ca^{2+} -Signale als Antwort auf wiederholte Stimuli mit $50 \mu\text{M}$ ATP. MSCs und 7 d NIM-2-differenzierte Zellen wurden mittels Ca^{2+} -Imaging-Methode physiologisch untersucht, ob sie auf extrazelluläre ATP-Stimuli mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen reagieren. Die verwendeten Zellen wurden permanent mit einem Ca^{2+} -haltigen Badmedium perfundiert. Alle 3 min wurde für 5 s insgesamt 6-mal $50 \mu\text{M}$ ATP appliziert und danach wieder mit dem Badmedium ausgewaschen. Die Stimulierung für 5 s führte in den MSCs zu einzelnen, klar erkennbaren Peaks. Auch die induzierten Zellen reagierten auf die 5 s andauernden ATP-Stimulierungen mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen in Form von einzelnen deutlichen Peaks. Die dargestellten Messkurven sind basislinienkorrigiert.

Um einen ersten Eindruck über die jeweils auf ATP-Stimulus reagierenden Zellen zu gewinnen, wurde in allen Messungen analysiert, wie viele MSCs und NIM-induzierten Zellen prozentual von allen jeweils gemessenen Zellen auf die erste ATP-Applikation mit einem Ca^{2+} -Signal reagieren. Die unbehandelten MSCs zeigten bei der ersten ATP-Stimulierung eine Reaktionsfähigkeit von $87 \pm 2,7 \%$, während die 7 d NIM-2-differenzierten Zellen lediglich zu $36 \pm 4,9 \%$ mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen auf ATP-Applikation reagierten.

Intrazelluläre Ca^{2+} -Signale als Antwort auf ATP-Stimulierung können auf unterschiedliche Weisen in Zellen hervorgerufen werden, da das Signalmolekül ATP an purinerge P2X- und P2Y-Rezeptoren binden kann. Die dafür in Frage kommenden Mechanismen können durch die Zugabe verschiedener Inhibitoren oder den Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} während der ATP-Stimulierungen untersucht werden.

Die P2X-Rezeptoren sind ionotrope Rezeptoren und gehören zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen. Bindet ATP an diese Rezeptoren, kommt es durch eine Konformationsänderung des Rezeptors zum Öffnen des Ionenkanals und zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Raum, die folglich das intrazelluläre Ca^{2+} -Signal hervorrufen (Abbraccio *et al.*, 2009). Um die Involvierung von P2X-Rezeptoren zu untersuchen, kann dem extrazellulären Milieu, im Experiment durch das Badmedium vorgegeben, das Ca^{2+} entzogen werden, sodass kein Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle möglich ist. Verringern

sich die gemessenen Ca^{2+} -Signale unter diesen Bedingungen oder bleiben sie ganz aus, werden die Signale teilweise oder vollständig von P2X-Rezeptoren hervorgerufen.

P2Y-Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren, die durch Liganden-Bindung, wie beispielsweise ATP, ein gekoppeltes G-Protein aktivieren können, das wiederum die Phospholipase C (PLC) aktivieren kann, wodurch es zur Bildung von IP_3 kommt. IP_3 -Moleküle können daraufhin an IP_3 -Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums binden, die sich dadurch öffnen und den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma ermöglichen und so die intrazellulären Ca^{2+} -Signale auslösen (Burnstock, 2008). Um diese Mechanismen zu untersuchen, kann die Signalkaskade an unterschiedlichen Stellen durch Inhibitoren unterbrochen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen früh in die Kaskade eingegriffen, indem der PLC-Inhibitor U-73122 (Bleasdale *et al.*, 1990) eingesetzt und somit die Bildung von IP_3 unterdrückt wurde (Abschnitt 3.4.1.1). Zum anderen wurde die Signalkaskade mithilfe des IP_3 -Rezeptor-Blockers 2-APB (Peppiatt *et al.*, 2003) zu einem späteren Zeitpunkt unterbrochen (Abschnitt 3.4.1.2).

3.4.1.1 ATP-induzierte Ca^{2+} -Signale unter Anwesenheit des PLC-Inhibitors U-73122

Vorversuche ergaben, dass eine Präinkubation von 2 μM U-73122 für 4 min optimal ist, um sowohl eine möglichst hohe Zellvitalität als auch eine hohe Inhibition des PLC-induzierten IP_3 -Signalwegs während der Versuche zu gewährleisten. Zu Beginn eines jeden Versuchs wurde eine ATP-Referenzstimulierung (RS) der Zellen unter Kontrollbedingungen, also in 2 mM Ca^{2+} -haltigem Badmedium, durchgeführt. Anhand der vorhandenen oder nicht vorhandenen Ca^{2+} -Signale als Antwort auf diese Stimulierung wurden die weiterhin betrachteten Zellen ausgewählt. Außerdem wurde die Höhe dieses Signals als 100 % gewertet und alle folgenden Signale relativ zu diesem Signal dargestellt. Weitere Stimulierungen mit ATP (S1-S3) folgten mit einer Verzögerung von 4 min, um eine Inkubation von 4 min mit U-73122 zwischen RS und S1 zu ermöglichen. S2 und S3 folgten im 3-Minuten-Intervall. Alle anderen Versuche dieses Abschnitts wurden identisch aufgebaut, um einen direkten Vergleich der Signale zu ermöglichen und zeitliche Einflüsse ausschließen zu können. Extrazelluläres Ca^{2+} wurde in den entsprechenden Versuchen 1 min vor S1 entzogen, um ein Leerlaufen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher zu vermeiden.

Die Ca^{2+} -*Imaging*-Versuche unter Zusatz des PLC-Inhibitors U-73122 und unter Ca^{2+} -Entzug wurden sowohl in MSCs als auch in NIM-2-induzierten Zellen durchgeführt, um mögliche Veränderungen in der Aktivität und der Zusammensetzung der verschiedenen P2-Rezeptoren durch die induzierte Differenzierung analysieren zu können (exemplarische Messungen, Abbildung 30). Die Voraussetzung für die weitere Betrachtung einer Zelle unter den verschiedenen Messbedingungen (S1-S3) war, dass die Zelle auf RS mit einer intrazellulären Ca^{2+} -Antwort reagierte.

Wurde das Kontrollmedium mit 2 mM Ca^{2+} während des gesamten Versuchs beibehalten, reagierten sowohl MSCs als auch die differenzierten Zellen mit repetitiven Ca^{2+} -Signalen auf die ATP-Stimuli. Im Verlauf der Messungen wurden die Ca^{2+} -Signale nach und nach ein wenig schwächer, aber es kam zu keiner Desensibilisierung der Rezeptoren, die eine weitere Reaktion auf ATP verhindert hätten. Nahezu

identisch waren die Ca^{2+} -Signale, wenn den MSCs das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen wurde. Im Gegensatz dazu war in den induzierten Zellen erkennbar, dass die Signale sichtbar schwächer wurden oder gar kein Signal messbar war. Die Zugabe des PLC-Inhibitors U-73122 führte in den MSCs zu einer starken Reduktion der Signale, sodass diese schwach oder gar nicht detektiert werden konnten. In den NIM-2-differenzierten Zellen war dieser Effekt ebenfalls sichtbar, allerdings nicht ganz so stark wie in den MSCs. Wurde sowohl das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen als auch U-73122 zu dem Badmedium gegeben, waren in beiden Zelltypen kaum noch Ca^{2+} -Signale messbar (Abbildung 30).

MSCs

7d NIM-2

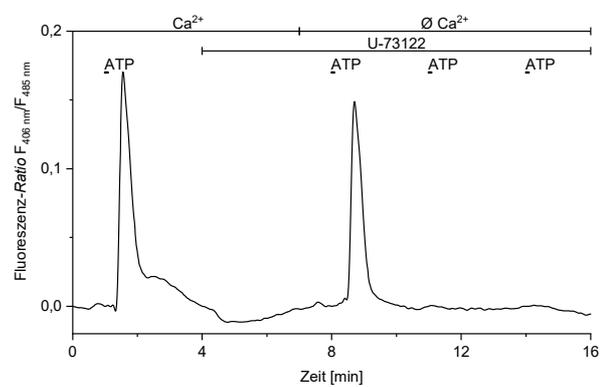
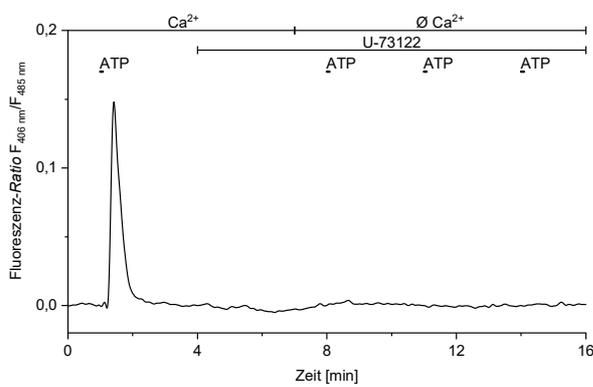
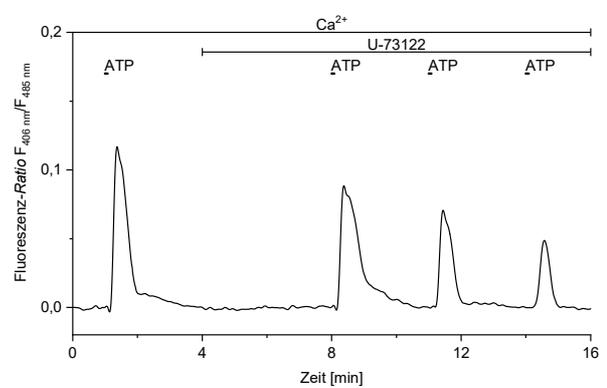
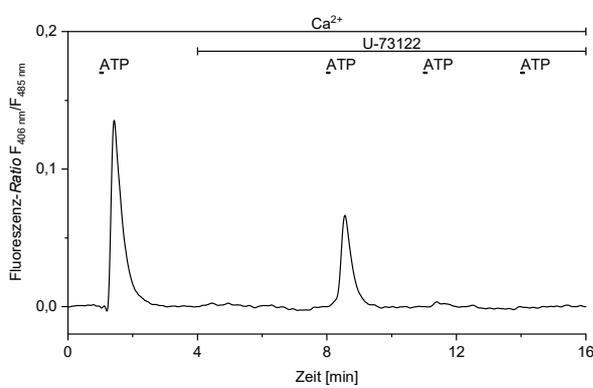
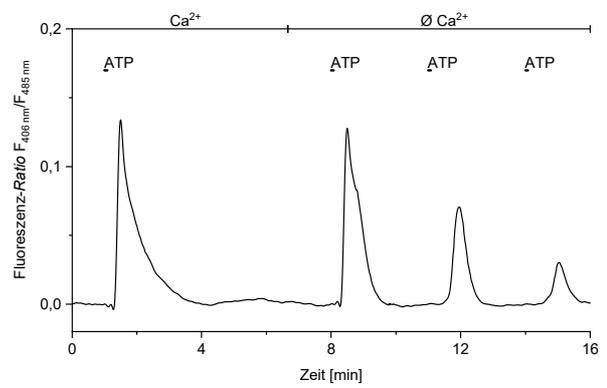
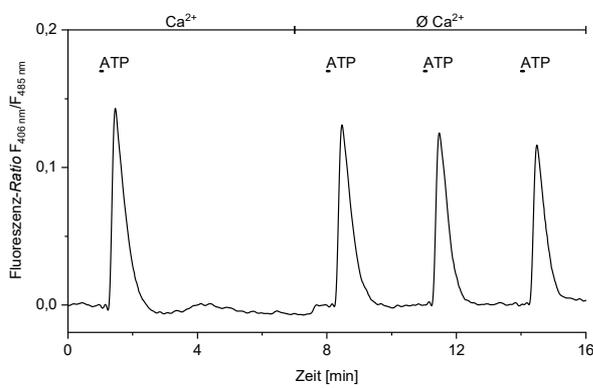
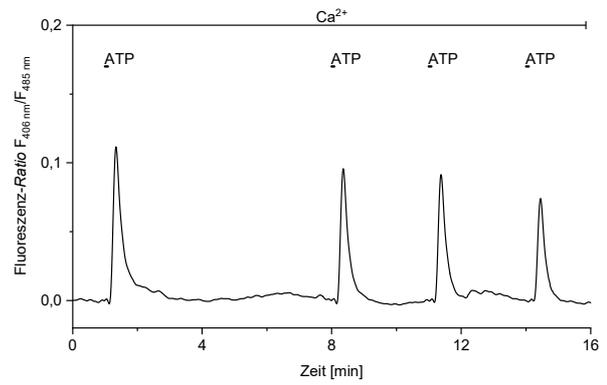
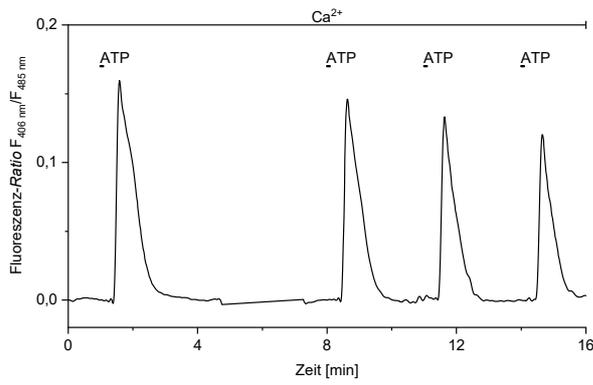


Abbildung 30: Intrazelluläre Ca^{2+} -Signale unter Anwesenheit des PLC-Inhibitors U-73122. Beispielhaft dargestellt sind basislinienkorrigierte Messungen von MSCs (linke Spalte) und 7 d NIM-2-behandelten Zellen (rechte Spalte), in denen die Zellen jeweils einmal unter Kontrollbedingungen (Badmedium mit Ca^{2+}) für 5 s mit 50 μM ATP stimuliert wurden, gefolgt von drei weiteren ATP-Stimulierungen unter vier verschiedenen Testbedingungen. Dafür wurden die Zellen mit ATP stimuliert, während sie sich in Ca^{2+} -haltigem Badmedium (Ca^{2+}), in Ca^{2+} -freiem Badmedium ($\emptyset \text{Ca}^{2+}$), in Ca^{2+} -haltigem Badmedium mit U-73122 oder in Ca^{2+} -freiem Badmedium mit U-73122 befanden (zeilenweise von oben nach unten). Medien (Ca^{2+} bzw. $\emptyset \text{Ca}^{2+}$), Inhibitorzugabe (U-73122) und ATP-Stimulierungen (ATP) sind jeweils oberhalb der Messkurve graphisch dargestellt. MSCs und induzierte Zellen reagierten auf ATP-Stimulierung mit einem intrazellulären Ca^{2+} -Signal. Ca^{2+} -Entzug hatte in den MSCs fast keine Auswirkungen auf dieses ausgelöste Signal, während die Signale in den differenzierten Zellen schwächer wurden. Der PLC-Inhibitor U-73122 unterdrückte die Ca^{2+} -Signale in den MSCs fast vollständig, wohingegen sie in den NIM-2-behandelten Zellen meist vorhanden waren, jedoch schwächer wurden. Der zeitgleiche Entzug von Ca^{2+} und der Zusatz von U-73122 führte in beiden Zelltypen zur vollständigen Unterdrückung der Ca^{2+} -Signale, bei den differenzierten Zellen allerdings zeitlich etwas verzögert.

Um die ATP-Reaktionsfähigkeit der MSCs und NIM-2-differenzierten Zellen unter den verschiedenen Messbedingungen zu quantifizieren, wurde zunächst der prozentuale Anteil der auf ATP reagierenden Zellen bestimmt (Abbildung 35). Es handelte sich hierbei allerdings um ein binäres System zur Auswertung und kann einige Entwicklungen während der Messungen nicht darstellen. Ein sehr viel facettenreicheres Abbild kann durch die Auswertung der Peakhöhe der gemessenen Ca^{2+} -Signale kreiert werden. Dafür wurde die Peakhöhe von den Stimulierungen S1-S3 für jede Zelle prozentual zu der Peakhöhe der Referenzstimulierung (RS) bestimmt, die als 100 % angesetzt wurde (Abbildung 31).

Unter Kontrollbedingungen waren keine signifikanten Abweichungen in der prozentualen Peakhöhe zwischen den MSCs und den NIM-2-differenzierten Zellen messbar. Von S1 zu S3 nahm die Höhe der Ca^{2+} -Signale kontinuierlich ab, sodass sie während der Messungen in den MSCs von 85 % auf 70 % und in den induzierten Zellen von 90 % auf 65 % sank (Abbildung 31).

Bei einem Entzug des extrazellulären Ca^{2+} verhielten sich die Zellen zunächst ähnlich wie zuvor unter Kontrollbedingungen. Bei S1 und S2 waren keine signifikanten Veränderungen zwischen den Zelltypen oder zu den Kontrollbedingungen messbar, obwohl die relative Peakhöhe bei S2 in der Tendenz in beiden Zelltypen etwas niedriger wurde. Erst bei S3 nahm die Peakhöhe der Ca^{2+} -Signale in den differenzierten Zellen signifikant ab im Vergleich zu dem Badmedium mit 2 mM Ca^{2+} . Da die MSCs keine Reaktion auf den Ca^{2+} -Entzug zeigten, ergab sich bei S3 in der relativen Peakhöhe ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den MSCs und den NIM-2-induzierten Zellen (Abbildung 31).

Wurde dem Badmedium der PLC-Inhibitor U-73122 zugesetzt, war in den MSCs von der ersten ATP-Stimulierung nach Inhibitorzugabe an eine signifikante Reduktion der relativen Peakhöhe sichtbar. Während die Peakhöhe bei S1 noch rund 50 % betrug, sank sie anschließend auf 17 % (S2) und schließlich auf 14 % (S3). Die relative Peakhöhe der Ca^{2+} -Signale in den differenzierten Zellen war bei allen drei ATP-Stimulierungen signifikant größer als die der MSCs. Die Reaktion auf S1 (85 %) war nicht signifikant abweichend zu der unter Kontrollbedingungen (90 %). Erst bei S2 war eine Verringerung der Peakhöhe auf 45 % messbar, die bei S3 weiter auf 37 % fiel (Abbildung 31).

Die Kombination aus dem Entzug des extrazellulären Ca^{2+} und der Zugabe des PLC-Inhibitors U-73122 führte zu einer starken und im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikanten Reduktion der relativen Peakhöhe auf 10 % bei S1 in den MSCs. Weitere Ca^{2+} -Signale bei S2 und S3 waren in den MSCs nicht mehr messbar, sodass die relative Peakhöhe in beiden Fällen 0 % betrug. In den NIM-2-differenzierten Zellen kam es zu einer im Vergleich zu den MSCs signifikant schwächeren Reduktion der relativen Peakhöhe unter diesen experimentellen Bedingungen, wobei auch hier deutliche Beeinträchtigungen der intrazellulären Ca^{2+} -Signale als Antwort auf ATP-Stimuli messbar waren. Bei S1 betrug die relative Peakhöhe im Mittel noch 65 %, wobei sie bei S2 bereits auf 35 % sank und schließlich bei S3 auf 10 % fiel (Abbildung 31).

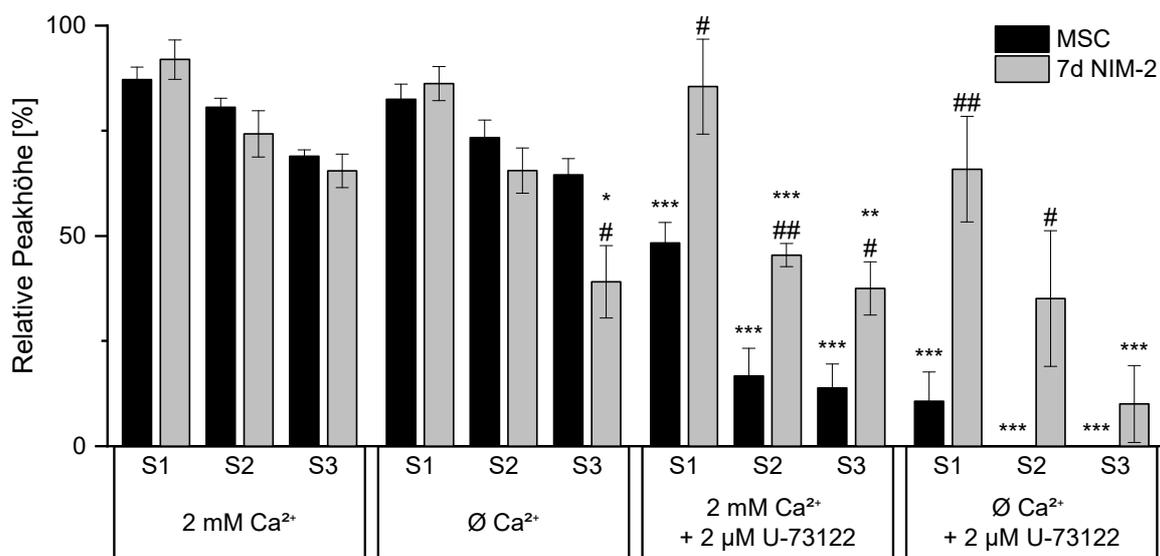


Abbildung 31: Reaktionsintensität bei ATP-Stimulierung unter Anwesenheit des PLC-Inhibitors U-73122. Es ist jeweils die Reaktionsintensität bei ATP-Stimulierungen im zweiten Versuchsabschnitt (S1, S2, S3) als relative Peakhöhe dargestellt. Dabei wurden nur die Zellen betrachtet, die im ersten Versuchsabschnitt mit einem Ca^{2+} -Signal auf die ATP-Referenzstimulierung reagierten. Die Peakhöhe dieses Ca^{2+} -Signals im ersten Versuchsabschnitt wurde als 100 % gesetzt und für die Bestimmung der relativen Peakhöhe von S1, S2 und S3 als Referenz verwendet. Unter Kontrollbedingungen (2 mM Ca^{2+}) nahm die relative Peakhöhe sowohl in den MSCs als auch in den 7 d NIM-2-differenzierten Zellen von S1 zu S3 stetig ab. Zwischen den Zellgruppen gab es dabei keine signifikanten Unterschiede. Unter Ca^{2+} -Entzug ($\emptyset \text{Ca}^{2+}$) gab es bei den MSCs keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen, während die relative Peakhöhe bei S3 in den differenzierten Zellen signifikant reduziert war. Die Zugabe des PLC-Inhibitors U-73122 (2 mM Ca^{2+} + 2 μM U-73122) führte in den MSCs schon ab S1 zum signifikanten Rückgang der relativen Peakhöhe. Bei den NIM-2-induzierten Zellen trat dieser Effekt erst bei S2 und S3 auf. Wurde das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen und U-73122 zugesetzt ($\emptyset \text{Ca}^{2+}$ + 2 μM U-73122), waren in den MSCs bei S1 noch schwache Reaktionen messbar, wohingegen die Zellen auf S2 und S3 nicht mehr mit Ca^{2+} -Signalen reagierten. Die Peakhöhen in den differenzierten Zellen blieben stabiler. Erst bei S3 war ein signifikanter Rückgang der Peakhöhe zu beobachten. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 50$) angegeben. Statistische Signifikanzen wurden mit einem Studentischen t -Test abgeschätzt und sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ (Vergleich eines Ca^{2+} -Signals eines Zelltyps unter Ca^{2+} -Entzug oder Inhibitorzugabe mit dem entsprechenden Signal des gleichen Zelltyps unter Kontrollbedingungen in Ca^{2+} -haltigem Badmedium) und als # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ und ### $p \leq 0,001$ (Vergleich von NIM-2-differenzierten Zellen mit unbehandelten MSCs zum gleichen Zeitpunkt und bei gleicher Medienzusammensetzung) dargestellt.

Der Entzug des extrazellulären Ca^{2+} beeinflusste die NIM-2-induzierten Zellen deutlich stärker als die MSCs, während der PLC-Inhibitor U-73122 einen weitaus größeren Effekt auf die MSCs als auf die differenzierten Zellen hatte. Die Veränderungen waren jeweils sowohl im prozentualen Anteil der reagierenden Zellen als auch in der relativen Peakhöhe der intrazellulären Ca^{2+} -Signale sichtbar.

3.4.1.2 ATP-induzierte Ca^{2+} -Signale unter Anwesenheit des IP_3 -Rezeptor-Inhibitors 2-APB

Inhibitoren können bei ihrer Verwendung unspezifisch reagieren oder ungewollte Nebeneffekte erzeugen. Aus diesem Grund sollten mehrere Inhibitoren getestet und ihre Ergebnisse miteinander verglichen werden. Mithilfe des IP_3 -Rezeptor-Inhibitors 2-APB wurde zu einem späteren Zeitpunkt in die P2Y-Signalkaskade eingegriffen, indem die IP_3 -Rezeptoren blockiert und somit ein Ca^{2+} -Einstrom aus intrazellulären Speichern unterbunden wurde (Peppiatt *et al.*, 2003). Zu Beginn eines jeden Versuchs wurde eine ATP-Referenzstimulierung (RS) der Zellen unter Kontrollbedingungen (Badmedium mit 2 mM Ca^{2+}) durchgeführt, anhand derer die Zellen für eine weitere Betrachtung ausgewählt wurden. Die Höhe der gemessenen Ca^{2+} -Signale bei RS wurde als 100 % gewertet und alle folgenden Signale relativ zu diesem Signal dargestellt. Weitere Stimulierungen mit ATP (S1-S3) folgten mit einer Verzögerung von 7 min, um eine Inkubation von 7 min mit 2-APB zwischen RS und S1 zu ermöglichen. S2 und S3 folgten auf S1 wie zuvor im 3-Minuten-Intervall. Alle Versuche dieses Abschnitts wurden identisch aufgebaut, um einen direkten Vergleich der Signale zu ermöglichen und zeitliche Einflüsse ausschließen zu können. Sollte extrazelluläres Ca^{2+} in einem Versuch entzogen werden, so geschah dies 1 min vor S1, um ein Leerlaufen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher zu vermeiden, was zu falschen Rückschlüssen über die Art der purinergen Rezeptoren hätte führen können.

Die Ca^{2+} -*Imaging*-Versuche unter Zusatz des IP_3 -Rezeptor-Inhibitors 2-APB und unter Ca^{2+} -Entzug wurden sowohl in MSCs als auch in NIM-2-induzierten Zellen durchgeführt, um die zuvor gemessenen Veränderungen in der Aktivität der verschiedenen P2-Rezeptoren durch die induzierte Differenzierung zu überprüfen (exemplarische Messungen, Abbildung 32). Die Voraussetzung für die weitere Betrachtung einer Zelle unter den verschiedenen Messbedingungen (S1-S3) war, wie zuvor, dass die Zelle auf RS mit einer intrazellulären Ca^{2+} -Antwort reagierte.

Unter Kontrollbedingungen mit 2 mM Ca^{2+} während des gesamten Versuchs führten die ATP-Stimuli sowohl in MSCs als auch in den differenzierten Zellen zu wiederholten Ca^{2+} -Signalen. Im Verlauf der Messungen ließ die Intensität der Ca^{2+} -Signale ein wenig nach, doch die Rezeptoren wurden nicht desensibilisiert, sodass keine weitere Reaktion auf ATP möglich gewesen wäre. Die MSCs reagierten vergleichbar, wenn ihnen das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen wurde. Im Gegensatz dazu wurden die Signale in den NIM-2-induzierten Zellen sichtbar schwächer oder Signale blieben ganz aus. Die Zugabe des IP_3 -Rezeptor-Blockers 2-APB führte sowohl in den MSCs als auch in den differenzierten Zellen zu einer starken Reduktion der Signale, sodass diese schwach oder nicht messbar wurden. Wurde sowohl dem Badmedium das Ca^{2+} entzogen als auch 2-APB zugesetzt, waren in beiden Zellpopulationen keine Ca^{2+} -Signale mehr detektierbar (Abbildung 32).

MSCs

7d NIM-2

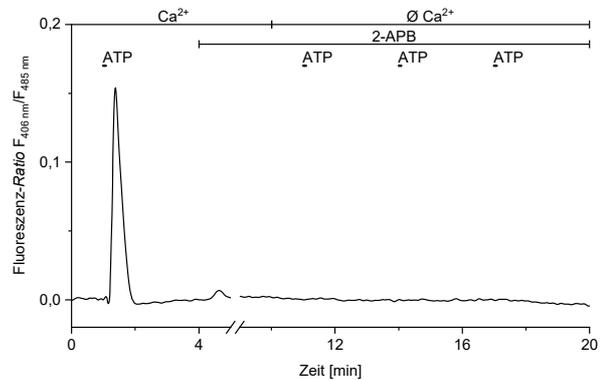
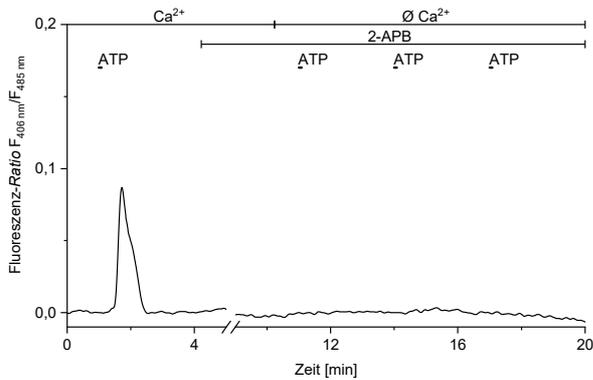
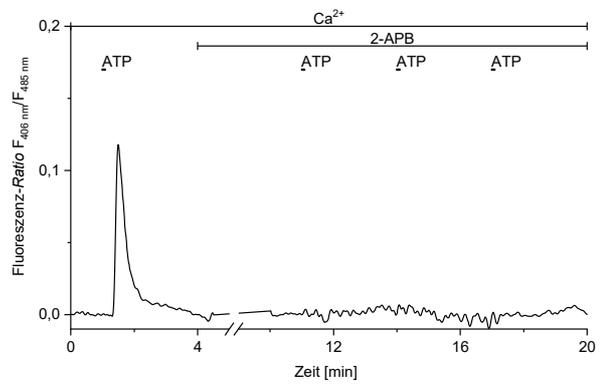
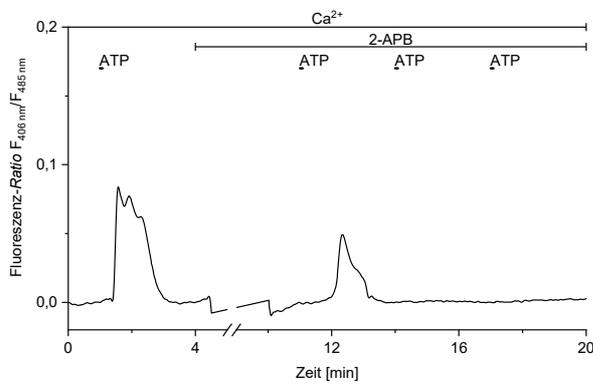
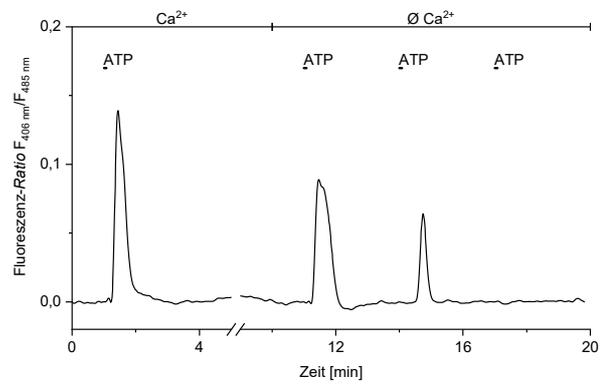
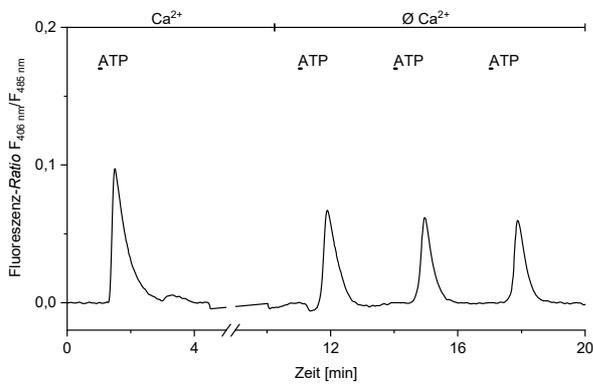
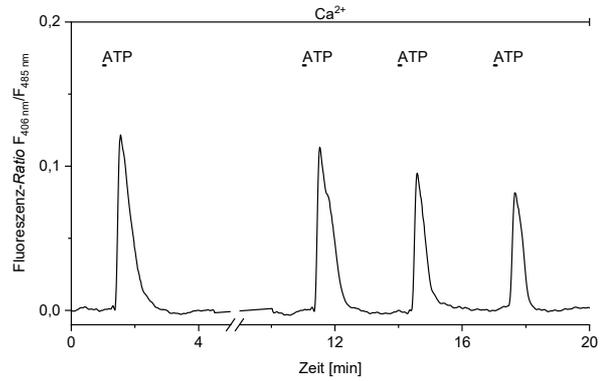
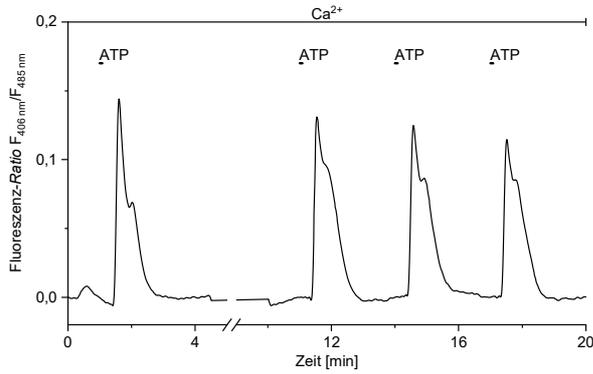


Abbildung 32: Intrazelluläre Ca^{2+} -Signale unter Anwesenheit des IP_3 -Rezeptor-Inhibitors 2-APB. Basislinienkorrigierte Messungen von MSCs (linke Spalte) und 7 d NIM-2-behandelten Zellen (rechte Spalte), in denen die Zellen jeweils einmal unter Kontrollbedingungen (Badmedium mit Ca^{2+}) für 5 s mit $50 \mu\text{M}$ ATP stimuliert wurden, gefolgt von drei weiteren ATP-Stimulierungen unter vier verschiedenen Testbedingungen, sind beispielhaft dargestellt. Dafür wurden die Zellen mit ATP stimuliert, während sie sich in Ca^{2+} -haltigem Badmedium (Ca^{2+}), in Ca^{2+} -freiem Badmedium ($\emptyset \text{Ca}^{2+}$), in Ca^{2+} -haltigem Badmedium mit 2-APB oder in Ca^{2+} -freiem Badmedium mit 2-APB befanden (zeilenweise von oben nach unten). Medien (Ca^{2+} bzw. $\emptyset \text{Ca}^{2+}$), Inhibitorzugabe (2-APB) und ATP-Stimulierungen (ATP) sind jeweils oberhalb der Messkurve grafisch dargestellt. MSCs und induzierte Zellen reagierten auf ATP-Stimulierung mit einem intrazellulären Ca^{2+} -Signal. Ca^{2+} -Entzug hatte in den MSCs fast keine Auswirkungen auf dieses ausgelöste Signal, während die Signale in den differenzierten Zellen schwächer wurden. Der IP_3 -Rezeptor-Inhibitor 2-APB unterdrückte die Ca^{2+} -Signale in den MSCs und NIM-2-differenzierten Zellen fast vollständig. Der zeitgleiche Entzug von Ca^{2+} und der Zusatz von 2-APB führte in beiden Zelltypen zur vollständigen Unterdrückung der Ca^{2+} -Signale.

Es wurde die Fähigkeit der MSCs und NIM-2-differenzierten Zellen, unter den verschiedenen Messbedingungen auf die ATP-Stimuli zu reagieren, quantifiziert. Dafür wurde, wie zuvor beschrieben, zunächst der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt, die auf die ATP-Stimuli reagierten (Abbildung 36). Nach der binären Auswertung des prozentualen Anteils der mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen auf ATP-Stimuli reagierenden Zellen folgte auch für das Versuchssset mit dem IP_3 -Rezeptor-Blocker 2-APB die detailliertere Auswertung anhand der prozentualen Peakhöhe (Abbildung 33).

Unter Kontrollbedingungen waren keine signifikanten Abweichungen zwischen den MSCs und den NIM-2-induzierten Zellen in der prozentualen Peakhöhe messbar. Von S1 zu S3 nahm die Höhe der hervorgerufenen Ca^{2+} -Signale in beiden Zelltypen kontinuierlich ab, sodass sie während der Messungen in den MSCs von 90 % (S1) auf 80 % (S2) und auf 75 % (S3) und in den induzierten Zellen von 85 % (S1) auf 75 % (S2) und schließlich auf 60 % (S3) sank (Abbildung 33).

Bei einem Entzug des extrazellulären Ca^{2+} war zunächst, verglichen mit den Kontrollbedingungen in einem Badmedium mit 2 mM Ca^{2+} , keine Veränderung in der Peakhöhe erkennbar. Die relative Peakhöhe bei S2 war in der Tendenz in beiden Zelltypen reduziert im Vergleich zu S1. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Zelltypen oder zu den Kontrollbedingungen ergaben sich dabei allerdings nicht. Bei S3 nahm die Peakhöhe der Ca^{2+} -Signale schließlich in beiden Zelltypen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikant ab. Die Reduktion der Ca^{2+} -Signale in den NIM-2-differenzierten Zellen war dabei sehr viel stärker, sodass die Peakhöhe dieser Zellen signifikant geringer war als in den unbehandelten MSCs (Abbildung 33).

Durch den Zusatz des IP_3 -Rezeptor-Inhibitors 2-APB wurde die Stärke der intrazellulären Ca^{2+} -Signale in beiden Zelltypen bei allen ATP-Stimulierungen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikant reduziert. Während in den NIM-2-induzierten Zellen keine Ca^{2+} -Signale detektierbar waren und ihre Stärke somit immer bei 0 % lag, wiesen die MSCs bei S1 noch eine relative Peakhöhe von 30 % auf, sodass statistisch eine signifikant stärkere Ca^{2+} -Reaktion als in den differenzierten Zellen gemessen wurde. Nach S2 und S3 betrug die relative Peakhöhe der Ca^{2+} -Antwort in den MSCs lediglich 7 % (Abbildung 33).

Wurde dem Badmedium zusätzlich zu der Inhibitorzugabe des IP₃-Rezeptor-Blockers 2-APB das Ca²⁺ entzogen, war die Stärke der Ca²⁺-Signale als Reaktion auf alle ATP-Stimuli und in allen Proben im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikant reduziert. Während die relative Peakhöhe der Ca²⁺-Signale bei S1 in den MSCs noch 36 % und in den NIM-2-induzierten Zellen noch 8 % betrug, waren bei S2 und S3 in beiden Zelltypen keine Ca²⁺-Signale mehr detektierbar, sodass die relative Peakhöhe bei 0 % lag (Abbildung 33).

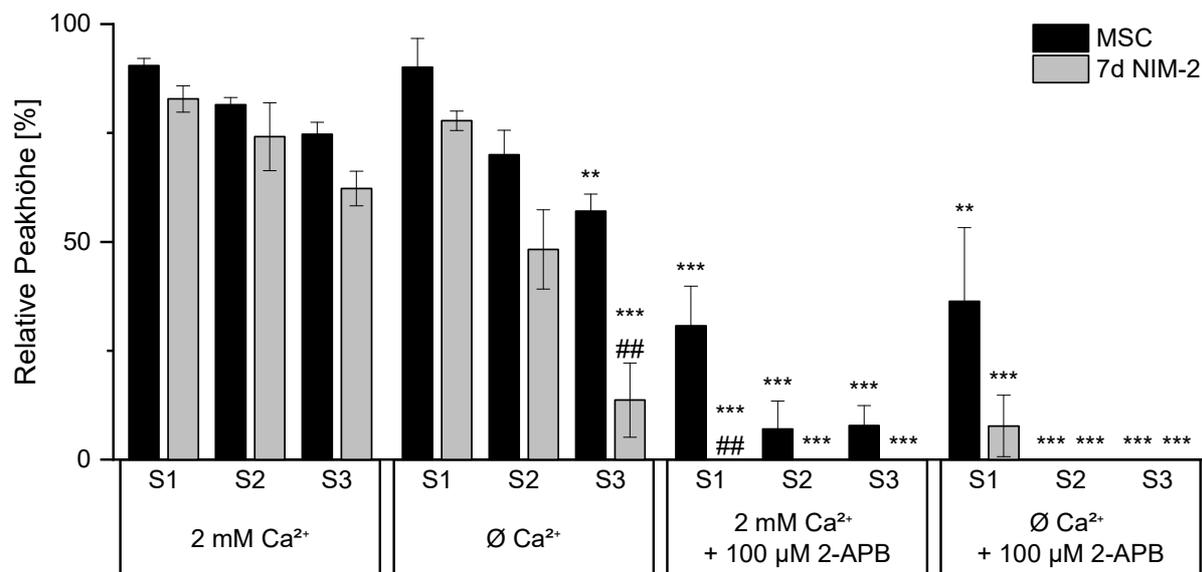


Abbildung 33: Reaktionsintensität bei ATP-Stimulierung unter Anwesenheit des IP₃-Rezeptor-Inhibitors 2-APB. Dargestellt ist jeweils die Reaktionsintensität bei ATP-Stimulierungen im zweiten Versuchsabschnitt (S1, S2, S3) als relative Peakhöhe. Betrachtet wurden dabei nur die Zellen, die im ersten Versuchsabschnitt mit einem Ca²⁺-Signal auf die ATP-Referenzstimulierung reagierten. Die Peakhöhe dieses Ca²⁺-Signals im ersten Versuchsabschnitt wurde als 100 % betrachtet und für die Bestimmung der relativen Peakhöhe von S1, S2 und S3 als Referenz verwendet. Unter Kontrollbedingungen (2 mM Ca²⁺) nahm die relative Peakhöhe sowohl in den MSCs als auch in den 7 d NIM-2-differenzierten Zellen von S1 zu S3 stetig ab. Zwischen den Zellgruppen gab es dabei keine signifikanten Unterschiede. Unter Ca²⁺-Entzug (Ø Ca²⁺) war die relative Peakhöhe bei S3 in den MSCs und in den differenzierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikant reduziert. Durch den Zusatz des IP₃-Rezeptor-Inhibitors 2-APB (2 mM Ca²⁺ + 100 μM 2-APB) wurden alle Ca²⁺-Signale in den MSCs in ihrer Intensität stark verringert, wohingegen in den differenzierten Zellen aufgrund einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Signale keine Peakhöhen messbar waren. Durch den Entzug von extrazellulärem Ca²⁺ unter Zugabe von 2-APB (Ø Ca²⁺ + 100 μM 2-APB) wurde in beiden Proben die relative Peakhöhe bei S1 signifikant gesenkt, gefolgt von einer kompletten Suppression der Signale bei S2 und S3. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM (n ≥ 50) angegeben. Statistische Signifikanzen wurden mit einem Studentischen *t*-Test abgeschätzt und sind als * *p* ≤ 0,05, ** *p* ≤ 0,01 und *** *p* ≤ 0,001 (Vergleich eines Ca²⁺-Signals eines Zelltyps unter Ca²⁺-Entzug oder Inhibitorzugabe mit dem entsprechenden Signal des gleichen Zelltyps unter Kontrollbedingungen in Ca²⁺-haltigem Badmedium) und als # *p* ≤ 0,05, ## *p* ≤ 0,01 und ### *p* ≤ 0,001 (Vergleich von NIM-2-differenzierten Zellen mit unbehandelten MSCs zum gleichen Zeitpunkt und bei gleicher Medienzusammensetzung) dargestellt.

Der Entzug des extrazellulären Ca^{2+} beeinflusste die NIM-2-induzierten Zellen, wie bereits in Abschnitt 3.4.1.1 gezeigt, deutlich stärker als die MSCs. Der IP_3 -Rezeptor-Inhibitor 2-APB führte in beiden Zelltypen zu einer drastischen Reduktion der Ca^{2+} -Signale, wobei der Effekt auf die differenzierten Zellen deutlicher ausfiel. Die Veränderungen waren jeweils sowohl in dem prozentualen Anteil der reagierenden Zellen messbar als auch in der relativen Peakhöhe der intrazellulären Ca^{2+} -Signale.

3.4.2 Expression purinergere Rezeptoren nach Induktion mit *small molecules*

Mithilfe der Ca^{2+} -*Imaging*-Methode konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivität von P2X- und P2Y-Rezeptoren unter verschiedenen Messbedingungen durch die NIM-2-vermittelte Differenzierung von MSCs im Vergleich zu unbehandelten MSCs veränderte (Abschnitt 3.4.1). Im Folgenden wurde untersucht, ob sich diese Beobachtung auch auf molekularbiologischer Ebene in einem veränderten Expressionsmuster der purinergere Rezeptoren widerspiegelt und welche Rezeptoren als Ursache für das veränderte physiologische Verhalten der Zellen in Frage kommen. Dafür wurden MSCs und 7 d NIM-2-induzierte Zellen mittels qRT-PCR auf ihr Expressionsniveau der sieben verschiedenen P2X-Rezeptoren und der acht verschiedenen P2Y-Rezeptoren getestet (Abbildung 34).

Von allen Genen der P2X-Rezeptoren waren *P2X4*, *P2X6* und *P2X7* in den MSCs am stärksten exprimiert. Etwas schwächer nachgewiesen werden konnten *P2X3* und *P2X5*. *P2X1* und *P2X2* waren kaum noch detektierbar. Durch die Differenzierung der MSCs für 7 d in NIM-2 wurden *P2X4*, *P2X5*, *P2X6* und *P2X7* signifikant herunterreguliert, sodass ihre relative Genexpression teilweise um das ca. 10-fache geringer war (Abbildung 34).

P2Y6 und *P2Y11* waren von allen P2Y-Rezeptoren auf mRNA-Ebene in den unbehandelten MSCs am stärksten exprimiert. In geringeren Mengen messbar waren *P2Y2*, *P2Y4* und *P2Y12*, während die Rezeptoren *P2Y1*, *P2Y13* und *P2Y14* kaum noch nachgewiesen werden konnten. Der einzige P2Y-Rezeptor, der durch die 7 d NIM-2-Differenzierung signifikant verändert wurde, war *P2Y6*, der nach der neuronalen Induktion ca. um das 10-fache schwächer exprimiert war. Alle anderen P2Y-Rezeptoren wurden durch die Differenzierung nicht beeinträchtigt (Abbildung 34).

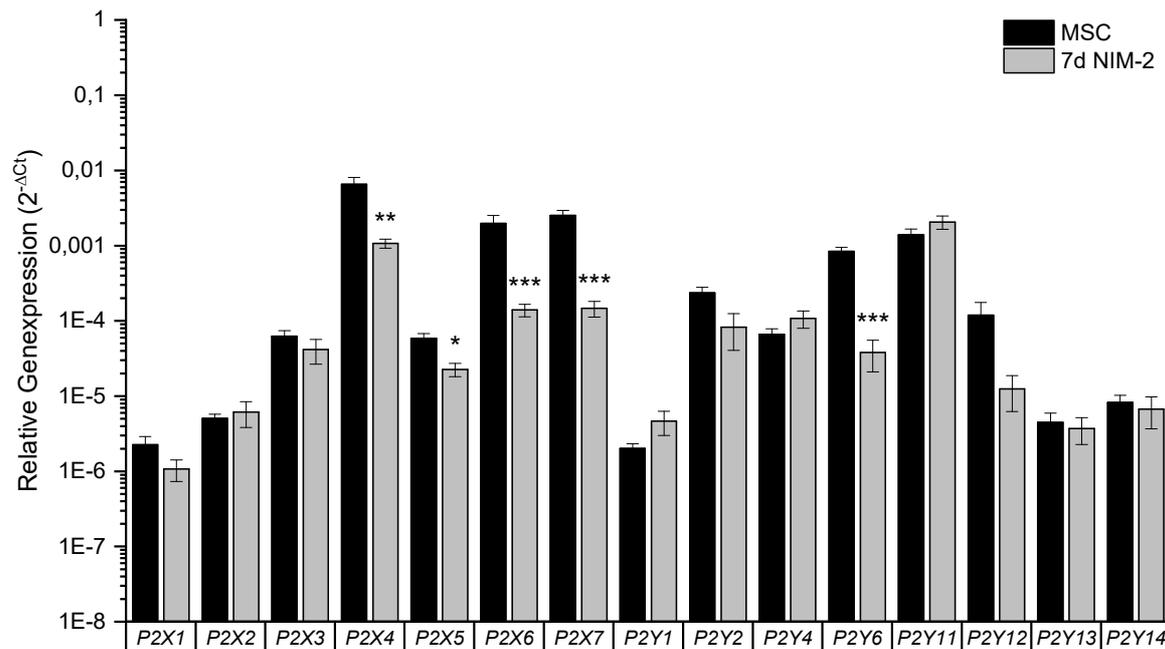


Abbildung 34: Relative Genexpression purinergere Rezeptoren in MSCs und NIM-2-differenzierten Zellen. Mittels qRT-PCR wurden MSCs und 7 d NIM-2-induzierte MSCs auf ihr Expressionsmuster purinergere P2X- und P2Y-Rezeptoren untersucht. Von den P2X-Rezeptoren sind *P2X4*, *P2X6* und *P2X7* am stärksten exprimiert, während bei den P2Y-Rezeptoren *P2Y6* und *P2Y11* dominieren. Durch die Differenzierung mit NIM-2 werden die Rezeptorgene *P2X4*, *P2X5*, *P2X6*, *P2X7* und *P2Y6* signifikant herunterreguliert. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n = 4$) dargestellt. Signifikante Abweichungen im Vergleich zu den unbehandelten MSCs wurden mittels Studentischem t -Test abgeschätzt und sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

In den MSCs waren folglich mehrere Rezeptoren deutlich exprimiert, dominiert von *P2X4*, *P2X6*, *P2X7*, *P2Y6* und *P2Y11*. In den 7 d NIM-2-differenzierten Zellen waren einige Rezeptoren signifikant herunterreguliert und insgesamt deutlich weniger purinergere Rezeptoren stark exprimiert. Dabei zeigten *P2X4* und *P2Y11* das höchste relative Genexpressionsniveau. Des Weiteren war auffallend, dass die relative Genexpression keines Rezeptors durch die Differenzierung signifikant hochreguliert wurde.

4 Diskussion

MSCs sind multipotente adulte Stammzellen, die *in vivo* in der Lage sind, in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren (Berry *et al.*, 1992; Herbertson und Aubin, 1997; Kuznetsov *et al.*, 1997). *In vitro* sind weitere Differenzierungen von MSCs wie auch Transdifferenzierungen zu Zellen unterschiedlicher Keimblätter gelungen, so auch zu ektodermalen neuronalen Zellen (Hermann *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2015; Hwang *et al.*, 2017). Bisher wurde meist das Expressionsmuster der Zellen vor und nach der Differenzierung untersucht und als Beweis für eine vollständige Differenzierung angeführt. Physiologische Studien der generierten Zellen führten dabei meistens nicht über elektrophysiologische Studien zur Untersuchung ihrer elektrischen Erregbarkeit hinaus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die induzierte Zellentwicklung während einer neuronalen Transdifferenzierung von MSCs zu Auswirkungen auf die molekularbiologischen und physiologischen Eigenschaften der Zellen führt. Dafür wurden die MSCs zunächst bezüglich ihres Expressionsmusters unterschiedlicher Marker untersucht sowie physiologisch ihre elektrische Erregbarkeit, ihr *Gap Junction*-vermitteltes Zellkopplungsverhalten und ihre intrazelluläre Ca^{2+} -Reaktion auf ATP-Stimuli analysiert (Abschnitt 4.1). Für die neuronale Transdifferenzierung der MSCs wurden verschiedene Ansätze getestet, die zum einen auf einem shRNA-vermittelten anti-PTBP1-*Knockdown* (Abschnitt 4.2.1) und zum anderen auf der Verwendung von *small molecules* (Abschnitt 4.2.2) basierten. Die *small molecule*-induzierten Zellen wurden anschließend molekularbiologisch und physiologisch charakterisiert. Dabei wurde die Expression verschiedener Marker auf mRNA- und Proteinebene untersucht und die elektrische Erregbarkeit der differenzierten Zellen mittels *Patch-Clamp*-Technik getestet (Abschnitt 4.2.2). Um die generierten Zellen physiologisch umfassender zu charakterisieren, wurden die MSCs und *small molecule*-induzierten Zellen auf ihr *Gap Junction*-vermitteltes Zell-Zellkopplungsverhalten (Abschnitt 4.3) und auf die Expression und Aktivität purinerner Rezeptoren (Abschnitt 4.4) analysiert.

4.1 Molekularbiologische und physiologische Eigenschaften von MSCs

Dominici *et al.* (2006) publizierten im Namen der *International Society for Cellular Therapy* minimale Kriterien zur Definition von MSCs. Diese Kriterien beinhalteten unter anderem ein adhärentes Wachstum auf Plastik unter Standardzellkulturbedingungen und die Expression der Marker CD73 (Gensymbol *NT5E*), CD90 (Gensymbol *THY1*) und CD105 (Gensymbol *ENG*). Die in dieser Arbeit verwendeten MSCs zeigten ein typisches adhärentes Wachstum auf Zellkulturplastik-Petrischalen, wobei sie eine Fibroblasten-ähnliche, spindelförmige Morphologie annahmen und die Fähigkeit zur Proliferation besaßen, was vielfach in der Literatur beschrieben wurde (u. a. Pittenger *et al.*, 1999; Barry und Murphy, 2004). Zusätzlich zu den von Dominici *et al.* (2006) geforderten Markern CD73, CD90 und CD105 wurde auch die Genexpression von CD166 (Gensymbol *ALCAM*) untersucht. Dieses Protein

wurde von Bruder *et al.* (1998) als ein weiterer charakteristischer Marker für undifferenzierte MSCs identifiziert und wird seither ebenfalls zur Analyse und Identifikation von MSCs verwendet (Barry und Murphy, 2004). Die Anwesenheit von *NT5E*, *THY1*, *ENG* und *ALCAM* auf mRNA-Ebene konnte in den in dieser Arbeit verwendeten MSCs bestätigt werden (Abbildung 5).

Außerdem konnten *NES* (kodierend für Nestin), *TUBB3* (kodierend für Tuj1) und *MAP2* (kodierend für MAP-2) in den Zellen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. *NES* kodiert für das neuro-epitheliale Stammzell-Intermediärfilament Nestin, das vor allem in neuro-astroglialen Vorläuferzellen exprimiert wird und häufig als Marker für diese Zellen Verwendung findet (Lendahl *et al.*, 1990; Wislet-Gendebien *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2010; Zhang und Jiao, 2015). In der Literatur sind heterogene Angaben zur Expression von Nestin in MSCs zu finden. Obwohl einige Autoren nur eine geringe Expression dieses Gens nachweisen konnten (Hempton *et al.*, 2004) und andere wiederum gezielt Nestin-exprimierende MSCs untersuchten (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010), so sind sich die meisten Autoren darüber einig, dass es in der Knochenmarknische eine Nestin-exprimierende MSC-Population gibt (Tondreau *et al.*, 2004; Wiese *et al.*, 2004; Schajnovitz *et al.*, 2011; Pacini und Petrini, 2014; Johnstone *et al.*, 2015). Tondreau *et al.* (2004) zeigten außerdem, dass diverse frühe und spätere neuronale Marker in MSCs exprimiert sind. So war beispielsweise Tuj1 ohne jegliche neuronale Induktion deutlich in MSCs exprimiert, während MAP-2 erst nach mehrfachem Passagieren nachweisbar wurde. So ist es nicht verwunderlich, dass die während dieser Arbeit untersuchten MSCs zusätzlich zu *NES* ebenfalls *TUBB3* und *MAP2* exprimierten (Abbildung 5). Außerdem konnte in den MSCs eine Expression von *TAGLN* und *ACTA2* nachgewiesen werden, die für die muskulären Marker Transgelin und α -Aktin-2 kodieren, was kongruent mit bereits publizierten Daten ist (Silva *et al.*, 2003; Talele *et al.*, 2015). Insgesamt zeigte sich bei der Betrachtung verschiedener Publikationen, die das Expressionsmuster unterschiedlicher Marker in MSCs untersuchten, eine große Heterogenität. So spielen zweifellos die Herkunft der isolierten MSCs in Hinblick auf Spender und Gewebe, wie auch das verwendete Isolierungsprotokoll und ihre *in vitro*-Kultivierung bis zur Analyse der Genexpression eine Rolle (Phinney, 2012; Camilleri *et al.*, 2016; Hoffmann *et al.*, 2017; Hoogduijn und Lombardo, 2019).

Eine intrazelluläre *Gap Junction*-Kopplung ist für MSCs essenziell und wurde unter anderem mit stammzellerhaltenden Eigenschaften wie der Inhibition ihrer Differenzierung oder Seneszenz und dem Erhalt ihrer Proliferationsfähigkeit in Verbindung gebracht (Bodi *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2019). Deshalb wurde zusätzlich zu den getesteten Markern auch das Expressionsniveau verschiedener Isoformen der *Gap Junction*-bildenden Connexine untersucht. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Connexine Cx43 (kodiert durch *GJA1*), Cx40 (kodiert durch *GJA5*) und Cx45 (kodiert durch *GJC1*) exprimiert waren. Cx37 (kodiert durch *GJA4*) konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wie auch Cx26 (kodiert durch *GJB2*) in geringen Mengen (Abbildung 5). Es ist bereits bekannt, dass die kardialen Connexine Cx43, Cx40 und Cx45 in MSCs am stärksten exprimiert sind und den größten Einfluss auf die intrazelluläre *Gap Junction*-Kopplung haben, wobei die bedeutsamste Rolle Cx43 zufällt (Dorshkind *et al.*, 1993; Valiunas *et al.*, 2004; Schajnovitz *et al.*, 2011). In Übereinstimmung mit diesen

Publikationen konnte auch in den hier verwendeten MSCs mittels Farbstofftransfer-Experimenten eine starke intrazelluläre *Gap Junction*-abhängige Zell-Zellkopplung nachgewiesen werden (Abbildung 6). Neuronen-typische physiologische Eigenschaften wurden in den MSCs ebenfalls untersucht, um diese nach einer neuronalen Differenzierung besser vergleichen zu können. Aus diesem Grunde wurde sowohl die elektrische Erregbarkeit der MSCs analysiert als auch ihre Fähigkeit, auf Stimuli mit dem Neurotransmitter ATP mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen zu reagieren. Wie vermutet und in der Literatur beschrieben (Liu *et al.*, 2012), waren die undifferenzierten MSCs nicht elektrisch erregbar und waren somit nicht in der Lage, auf mittels *Whole-Cell Patch-Clamp*-Technik injizierte depolarisierende Ströme mit Aktionspotentialen zu reagieren. Wurde ein größerer Strom in die Zelle injiziert, wurde das Membranpotential zwar zunehmend depolarisiert, jedoch fand diese Zunahme proportional zur injizierten Stromstärke statt und führte zu keinem *Overshoot* (Abbildung 7).

Es gibt inzwischen viele Hinweise darauf, dass extrazelluläres ATP wesentlich zum Erhalt des undifferenzierten Zustands der MSCs sowie ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung beiträgt und sowohl die Proliferation und Vitalität als auch die Zellmigration und schließlich auch ihre Differenzierung maßgeblich beeinflusst (Riddle *et al.*, 2007; Riddle *et al.*, 2008; Glaser *et al.*, 2012; Ciciarello *et al.*, 2013; Scarfi, 2014; Jiang *et al.*, 2017a; Jiang *et al.*, 2017b; Roszek und Wujak, 2018). Auf die sequenzielle Zugabe von ATP reagierten die MSCs mit wiederholbaren intrazellulären Ca^{2+} -Signalen, die im Verlauf des Messzeitraums von 19 min zwar schwächer wurden, aber nie ausblieben (Abbildung 8). Derartige ATP-induzierte Ca^{2+} -Signale konnten bereits in MSCs ausgelöst werden (Ferrari *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2016). MSCs sind selbst in der Lage, ATP extrazellulär freizusetzen, was sowohl zu einer autokrinen als auch zu einer parakrinen Signalgebung führen kann. So wurde beispielsweise gezeigt, dass ATP in MSCs durch *Gap Junction*-Halbkanäle in den extrazellulären Raum sezerniert werden kann, wo es den P2Y1-Rezeptor stimuliert, was zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum führt (Kawano *et al.*, 2006).

Eine erste umfassende Analyse der in dieser Arbeit verwendeten MSCs aus dem Knochenmark ergab somit, dass diese Zellen typische MSC-Marker, neuronale und muskuläre Marker sowie verschiedene Connexin-Isoformen exprimierten. Im Zellverband waren sie stark über *Gap Junctions* miteinander gekoppelt und reagierten auf sequenzielle extrazelluläre ATP-Stimuli mit wiederholten intrazellulären Ca^{2+} -Signalen.

4.2 Neuronale Transdifferenzierung von MSCs

Die Charakterisierung der undifferenzierten MSCs (Abschnitt 4.1) diente in den nachfolgenden neuronalen Transdifferenzierungsansätzen (Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2) als Basis und wurde für die Charakterisierung und Identifizierung der generierten Zellen als Referenz herangezogen.

4.2.1 shRNA-vermittelter *Knockdown* von PTBP1 in MSCs

Es gibt diverse Faktoren, die eine neuronale Differenzierung in somatischen Zellen induzieren und die dafür notwendige Reprogrammierung des Transkriptom einleiten können (Li und Jin, 2010). So wurde beispielsweise gezeigt, dass die gezielte Expression weniger und spezifischer Transkriptionsfaktoren ausreichend ist, um eine neuronale Differenzierung von Fibroblasten hervorzurufen (Vierbuchen *et al.*, 2010; Caiazzo *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). Auch Mikro-RNAs spielen in der neuronalen Differenzierung eine regulatorische Rolle (Yoo *et al.*, 2011). Xue *et al.* (2013) zeigten, dass der gezielte *Knockdown* des *polypyrimidine-tract-binding*-Proteins 1 (PTBP1) in Fibroblasten zu einer massiven Reprogrammierung der RNA-Prozessierung und des Expressionsniveaus von mikro-RNAs und dadurch zu einer neuronalen Transdifferenzierung der Fibroblasten führte. Sie stellten außerdem fest, dass die von Vierbuchen *et al.* (2010) exprimierten Transkriptionsfaktoren *Ascl1*, *Brn-2*, und *MyT1-L*, die für eine neuronale Differenzierung nötig waren, durch den PTBP1-*Knockdown* hochreguliert wurden.

Auf der Grundlage dieser Publikationen bestand ein erster Ansatz der neuronalen Transdifferenzierung deshalb in dem shRNA-vermittelten PTBP1-*Knockdown* der MSCs. Mittels transienter Transfektion wurde die shRNA auf einem Plasmid in die Zellen eingebracht, das zusätzlich für das Reporterprotein EGFP kodierte, sodass erfolgreich transfizierte Zellen durch eine grüne Fluoreszenz identifiziert werden konnten. Bei der Betrachtung der transfizierten Zellen nach 48 h fiel auf, dass die Transfektionseffizienz mit ca. 20 % sehr gering war. Eine ähnliche Transfektionseffizienz wurde mit dem gleichen Transfektionsreagenz (Lipofectamine 2000) auch von anderen Autoren erzielt (Hoare *et al.*, 2010). Unter anderen Umständen kann mit einer Transfektionseffizienz von 20 % durchaus gearbeitet werden. Durch die Transfektion mit der anti-PTBP1-shRNA entwickelten die MSCs jedoch einen nicht proliferierenden, also postmitotischen Phänotyp, sodass die untransfizierten ca. 80 % der MSCs in der Lage waren, zu proliferieren, die transfizierten und differenzierten 20 % der Zellen allerdings nicht. Auf diese Weise wurden die transfizierten Zellen von den weiterhin proliferierenden Zellen überwachsen und der Anteil transfizierter Zellen sank innerhalb weniger Tage auf null.

Um die transfizierten Zellen von den nicht-transfizierten MSCs zu selektieren, wurden die Zellen im Anschluss an die Transfektion in 300 µg/mL G 418 kultiviert, wofür die transfizierten Zellen ein Resistenzgen besaßen. Durch diese Selektion war es möglich, eine reine Kultur transfizierter Zellen zu erhalten. Gleichzeitig kam es allerdings auch zu einem Verlust transfizierter Zellen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die erforderliche Konzentration von 300 µg/mL G 418 sein, die auch für resistente Zellen bereits eine gewisse Zytotoxizität darstellt. Negativ verstärkt wurde dieser Effekt durch

die Entwicklung der MSCs zu einem nicht proliferierenden Phänotyp, der dazu führte, dass die Zellzahl der überlebenden Zellen nicht wieder erhöht werden konnte.

Ein nicht proliferierender postmitotischer Phänotyp ist ein typisches Charakteristikum für adulte Neuronen (Herrup und Yang, 2007) und kann somit durchaus als erster Hinweis für eine neuronale Entwicklung der transfizierten Zellen gewertet werden. Auch die Zellmorphologie der induzierten Zellen hatte sich von einer spindelförmigen zu einer Form mit kleinen, runden Zellkörpern und langen Zellfortsätzen entwickelt (Abbildung 9). Diese typische neuronale Morphologie konnte auch *in vitro* während einer neuronalen Reprogrammierung ausgehend von Fibroblasten durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren induziert werden (Vierbuchen *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2011; Ladewig *et al.*, 2012; Connor *et al.*, 2018).

Die wohl bedeutsamste Veränderung, die in den anti-PTBP1-shRNA-induzierten Zellen beobachtet werden konnte, war die Entwicklung einer elektrischen Erregbarkeit dieser Zellen in Form von Aktionspotentialen durch die Injektionen depolarisierender Ströme bei Messungen mit der elektrophysiologischen *Patch-Clamp*-Technik (Abbildung 10). Die gemessenen Aktionspotentiale waren sehr breit, nicht repetitiv und zeigten kaum einen *Overshoot*. Sie ähnelten in ihrer Anzahl und Form mehr denen unreifer Neuronen (Ma *et al.*, 2011; Connor *et al.*, 2018) als denen adulter Neuronen (Vierbuchen *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015). Dennoch ist diese Entwicklung sehr vielversprechend, da sie auf physiologischer Ebene eine Entwicklung von MSCs zu elektrisch erregbaren, möglicherweise neuronalen, Zellen belegt. Die beschriebenen Veränderungen der MSCs durch die Transfektion mit der anti-PTBP1-shRNA weisen deutlich auf einen erfolgreichen PTBP1-*Knockdown* hin.

An dieser Stelle müsste für eine weiterführende Charakterisierung und Identifizierung eine umfassende molekularbiologische Analyse der generierten Zellen folgen, um die Expressionen verschiedener MSC- und neuronaler Marker zu untersuchen. Außerdem sollte der Erfolg des *Knockdowns* von PTBP1 auf mRNA- und Proteinebene überprüft werden. Aufgrund der zu geringen Zellzahl nach 7 d Differenzierung konnten diese Studien bisher nicht durchgeführt werden. Sollte dieser Differenzierungsansatz weiterverfolgt werden, müsste die Zellzahl differenzierter Zellen stark erhöht werden. Das wäre beispielsweise durch eine Anreicherung transfizierter Zellen mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) oder durch die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems möglich. Dafür müsste die shRNA in ein anderes Plasmid kloniert werden, wo sie unter dem Einfluss eines induzierbaren Promotors stünde. Die MSCs könnten mit diesem Plasmid transfiziert und mit G 418 selektiert werden, bevor sie sich differenzieren und einen nicht proliferierenden Phänotyp ausbilden. Eine weitere Vermehrung und Kryokonservierung dieser Zellen wäre auf diese Weise ebenfalls möglich. Wären die Zellen ausreichend vermehrt, könnte der Promotor entsprechend induziert und die shRNA synthetisiert werden, was die Differenzierung einleiten würde. Es wäre aber durchaus möglich, dass auch G 418 die Differenzierung beeinflussen würde. Da bei einer transienten Transfektion auch nach der Selektion nicht auf den Zusatz dieses Antibiotikums verzichtet

werden sollte, wäre es empfehlenswert, mit einer stabilen, beispielsweise lentiviralen, Transfektion zu arbeiten, sodass nach der Transfektion auf weitere Medienzusätze verzichtet werden könnte.

4.2.2 Charakterisierung der *small molecule*-basierten Differenzierung von MSCs

Alternativ zur Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren oder dem *Knockdown* bestimmter zellulärer Proteine mittels shRNA können auch *small molecules* für die Induktion einer neuronalen Differenzierung verwendet werden. Bei diesen kleinen Molekülen handelt es sich um chemische Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht. Diese werden dem neuronalen Induktionsmedium zugegeben, sodass eine genetische Modifikation der Zellen entfällt. Auf diese Weise wäre eine spätere klinische Anwendung weniger bedenklich als bei genetisch veränderten Zellen. Ein die Differenzierung begünstigender Effekt von *small molecules* als Medienzusatz bei der Differenzierung durch die exogene Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren ist bereits bekannt (Ladewig *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Drouin-Ouellet *et al.*, 2017). Auch gibt es einige erfolgreiche Ansätze ausgehend von murinen und humanen Fibroblasten, die ausschließlich *small molecules* für die Differenzierung verwendeten und auch physiologisch eine deutliche neuronale Entwicklung nachweisen konnten (Han *et al.*, 2015b; Hu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). Dienten MSCs als Ausgangsmaterial für die neuronale Differenzierung, konnten ebenfalls Zellen generiert werden, die verschiedene neuronale Marker exprimierten und einige physiologische Eigenschaften neuronaler Zellen aufwiesen. Aktionspotentiale, als eine der wichtigsten Fähigkeiten reifer Neuronen, konnten allerdings bei keinen der generierten Zellen hervorgerufen werden bzw. wurden noch nicht untersucht (Kim *et al.*, 2009; Bi *et al.*, 2010; Alexanian *et al.*, 2013; Bahrami *et al.*, 2016; Aguilera-Castrejon *et al.*, 2017). Hu *et al.* (2015) gelang es erfolgreich, Fibroblasten mithilfe von *small molecules* in Neuronen zu differenzieren, die in der Lage waren, repetitive Aktionspotentiale auszulösen.

Ziel dieser Arbeit war unter anderem die physiologische Charakterisierung von *small molecule*-induzierten, neuronal transdifferenzierten MSCs, um deren Nutzbarkeit als neuronales Zellmodell zu validieren. Aus diesem Grund wurden drei verschiedene bereits publizierte Transdifferenzierungsansätze übernommen und auf die MSCs angewendet, um diese anschließend einer genauen physiologischen Charakterisierung zu unterziehen.

4.2.2.1 *Small molecule*-basierte neuronale Differenzierung von MSCs nach Hu *et al.*

Fibroblasten entstammen, wie auch MSCs, dem Mesoderm. Da MSCs ein höheres Differenzierungspotential als Fibroblasten unterstellt wird, wurde zunächst das bei Fibroblasten erfolgreiche Protokoll von Hu *et al.* (2015) auf die MSCs angewandt.

Diese neuronale Differenzierung erfolgte durch die Inkubation in drei verschiedenen *small molecule*- und Wachstumsfaktor-haltigen Medien: einem neuronalen Induktionsmedium (NIM-3), einem Maturationsmedium (MAT) und einem neuronalen Wachstumsmedium (NeuroM). Zunächst wurden die MSCs für die neuronale Induktion 8 d in NIM-3 kultiviert. Dabei reduzierte sich ihre Proliferationsgeschwindigkeit sichtbar, sodass sich die zu Beginn erreichte Zelldichte während der Differenzierung nicht erhöhte (Abbildung 11). Es kann somit vermutet werden, dass eventuell ein

postmitotischer, zumindest aber ein proliferationsgehemmter, Phänotyp der generierten Zellen erreicht wurde, was ein typisches Charakteristikum für adulte Neuronen ist (Herrup und Yang, 2007). Morphologisch entwickelten sich die Zellen zu einer Zellform mit kleinen, runden Zellkörpern und langen Zellfortsätzen, die nach der Induktion der Morphologie neuronaler Zellen ähnelte. Bereits nach 2 d war diese Tendenz sichtbar und verstärkte sich noch bis zum Medienwechsel nach 8 d. Hu *et al.* (2015) konnten in ihren Experimenten eine ähnliche Entwicklung beobachten, wobei die Zellkörper ihrer induzierten Zellen in ihrer Form noch deutlich runder waren und die Autoren hinterfragen ließen, ob es sich bei diesen Zellen schon um neuronale Zellen handelte.

Sie entwickelten aus diesem Grund ein Maturationsmedium (MAT), welches das Überleben und die weitere Reifung von Neuronen fördern sollte. Dafür setzten sie diesem Medium, neben diversen neuronalen Wachstumsfaktoren (BDNF, GDNF und NT-3), die *small molecules* CHIR99021, Forskolin und Dorsomorphin zu, denen in dieser Zusammensetzung die erwünschten Effekte zugeschrieben werden (Ladewig *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Nach der Kultivierung der induzierten Zellen für 6 d in MAT konnten Hu *et al.* (2015) eine morphologische neuronale Reifung ihrer Zellen beobachten. Im Gegensatz dazu entfernten sich die in dieser Arbeit aus den MSCs entwickelten Zellen durch die Kultivierung in MAT bereits nach 1 d wieder von einer neuronalen Zellform. Sie breiteten sich wieder auf ihrer Wachstumsfläche aus und nahmen erneut eine spindelförmige Morphologie an, sodass sie ihre runden Zellkörper verloren. Nach 6 d in MAT war diese Entwicklung noch deutlicher zu sehen. Morphologisch gesehen entfernten sich die Zellen somit wieder von einer neuronalen Differenzierung. Weiter verändert wurden diese Zellen durch den folgenden Medienwechsel zu NeuroM. Dieses Medium enthält, wie MAT, die neuronalen Wachstumsfaktoren BDNF, GDNF und NT-3, jedoch ohne weiteren Zusatz von *small molecules*. Es diente bei Hu *et al.* (2015) nach der erfolgten Transdifferenzierung lediglich der weiteren Kultivierung der generierten neuronalen Zellen bis zur Durchführung der Experimente. In der vorliegenden Arbeit führte es dahingehend zu einer weiteren morphologischen Veränderung der Zellen, dass sich die Zellen teilweise sehr schmal und lang streckten. Morphologisch ähnelten diese Zellen nun noch weniger neuronalen Zellen, glichen in ihrer Form und Struktur aber auch nicht den MSCs, aus denen sie induziert worden waren. Es wird deshalb vermutet, dass diese Zellen nicht wieder zu ihrem Ausgangszustand entdifferenzierten, sondern zu einem anderen Zelltyp differenziert wurden, wobei nicht die gewünschte neuronale Entwicklung erreicht wurde. Rein aus der morphologischen Entwicklung der MSCs während der Transdifferenzierung mit NIM-3, MAT und NeuroM konnte ein deutlicher Unterschied zu der Entwicklung der von Hu *et al.* (2015) verwendeten Fibroblasten festgestellt werden. Obwohl die MSCs im Vergleich zu Fibroblasten, aufgrund ihrer Stammzelleigenschaften, theoretisch ein höheres Differenzierungspotential aufweisen sollten, führten die Bedingungen während dieser *small molecule*-induzierten Transdifferenzierung in den MSCs zu keiner neuronalen Differenzierung.

Um einen genaueren Eindruck über den Entwicklungsstand der generierten Zellen zu erhalten, wurden diese nach einer weiteren 4-tägigen Inkubation in NeuroM elektrophysiologisch mittels *Patch-Clamp*-

Technik im *Current-Clamp*-Modus untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Zellen elektrisch erregbar und somit in der Lage waren, Aktionspotentiale auszulösen (Abbildung 12). Diese dauerten mit 200 - 300 ms länger als man von neuronalen Zellen erwarten würde, die üblicherweise Aktionspotentiale von 1 - 2 ms erzeugen (Hodgkin und Huxley, 1952; Vierbuchen *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015), und waren nicht repetitiv. Sie glichen in ihrer Form deutlich mehr den Aktionspotentialen, die in unreifen Neuronen gemessen wurden, die aus neuronalen Vorläuferzellen differenziert wurden (Connor *et al.*, 2018). Ebenfalls ähnelten diese Aktionspotentiale denen aus Muskelzellen, Kardiomyozyten eingeschlossen (Lakatta *et al.*, 2010; Voitychuk *et al.*, 2012; Manchanda *et al.*, 2019). Hu *et al.* (2015) waren nach ihrer neuronalen Differenzierung von Fibroblasten in der Lage, schnelle repetitive Aktionspotentiale zu messen, die mit denen reifer Neuronen vergleichbar waren. Diese Diskrepanz unterstützt die zuvor aufgestellte These, dass MSCs mit dem gleichen Protokoll, mit dem adulte humane Fibroblasten erfolgreich zu neuronalen Zellen differenziert werden konnten, nicht neuronal induziert werden konnten.

Da jedoch eindeutig eine Entwicklung der MSCs zu elektrisch erregbaren Zellen stattgefunden hatte und zu Beginn der Differenzierung eine neuronale Morphologie beobachtet werden konnte, wurde im Folgenden versucht, das Protokoll von Hu *et al.* (2015) auf die Verwendung von MSCs anzupassen. Die vielversprechendste morphologische Veränderung der MSCs wurde im Induktionsmedium beobachtet, die rückläufig war, sobald das Medium zu MAT gewechselt wurde. Die Zusammensetzung des MAT in Hinblick auf die zugesetzten *small molecules* unterschied sich von der des NIM-3 vor allem dadurch, dass die differenzierungsfördernden Substanzen Valproinsäure, Repsox, SP600625, Gö6983 und Y-27632 im MAT nicht mehr enthalten waren. Anstelle dessen wurde zusätzlich Dorsomorphin zugegeben, das zusammen mit CHIR99021 und Forskolin das neuronale Überleben und Reifen unterstützen sollte. Wäre die Differenzierung zum Zeitpunkt des Medienwechsels noch nicht ausreichend fortgeschritten, würden also wesentliche neuronale Induktoren fehlen und die Differenzierung würde unterbrochen werden, wie es experimentell beobachtet wurde.

Aus diesem Grund wurde die Induktionszeit der MSCs in NIM-3 auf 11 d verlängert. Dabei entwickelten die Zellen wie zuvor eine neuronale Morphologie und behielten diese bei, bis sie nach 11 d ohne vorherigen Medienwechsel zu MAT elektrophysiologisch mittels *Patch-Clamp*-Technik untersucht wurden. Als Reaktion auf die Injektion depolarisierender Ströme waren die differenzierten Zellen wieder in der Lage, Aktionspotentiale auszulösen (Abbildung 13). Diese dauerten nun deutlich kürzer und waren in ihrer Form bedeutend schmaler und spitzer. Auf diese Weise ähnelten sie neuronalen Aktionspotentialen deutlich mehr als zuvor, obwohl sie weiterhin nicht repetitiv waren. Ma *et al.* (2011) gelang es, aus neuronalen Stammzellen Neuronen zu differenzieren und Aktionspotentiale in ihnen auszulösen, die den hier gemessenen sehr ähneln. Auch diese Aktionspotentiale waren in ihrer Form sehr schmal, dauerten also sehr kurz an, und waren nicht repetitiv.

Durch die Verlängerung der Induktionszeit der MSCs in NIM-3 konnte also eine neuronale Morphologie und eine elektrische Erregbarkeit erreicht werden, was für eine neuronale Entwicklung spricht. Da die Aktionspotentiale nicht repetitiv waren, ist offensichtlich, dass der Entwicklungszustand reifer Neuronen nach 11 d Differenzierung in NIM-3 noch nicht erreicht war. Dementsprechend wurde versucht, durch eine weitere Kultivierung in MAT eine Reifung der generierten Zellen zu erzielen. Auch nach der gestreckten Inkubationsdauer in NIM-3 von 11 d verloren die Zellen nach der Zugabe von MAT ihre neuronale Morphologie, was sich ebenfalls durch weitere Verlängerungen der Kultivierung in NIM-3 nicht vermeiden ließ. Es war somit durch die Medien NIM-3 und MAT in dieser Kombination und Zusammensetzung nicht möglich, MSCs in reife neuronale Zellen zu differenzieren, wie es Hu *et al.* (2015) ausgehend von Fibroblasten gelungen war. Die Autoren konnten zeigen, dass MAT auf bereits ausreichend weit entwickelte neuronale Zellen einen das Überleben und die Reifung fördernden Effekt hatte. Ausgehend von MSCs scheint die Differenzierung diesen „irreversiblen“ Entwicklungszustand auch durch eine deutlich verlängerte Inkubationszeit in NIM-3 nicht zu erreichen. Der Effekt der *small molecule*-haltigen Medien war hinsichtlich der entstandenen Zellmorphologie und elektrischen Erregbarkeit zwar vielversprechend, war aber anscheinend für die MSCs im Vergleich zu Fibroblasten nicht stark genug.

4.2.2.2 *Small molecule*-basierte neuronale Induktion nach Bi *et al.* und Aguilera-Castrejon *et al.*

Da die von Hu *et al.* (2015) in Fibroblasten erreichte neuronale Entwicklung mit dem publizierten, ebenso wie mit dem variierten Protokoll in MSCs nicht erzielt werden konnte, wurden weitere *small molecule*-basierte Protokolle getestet. Dabei wurden nun von MSCs ausgehende Differenzierungsprotokolle gesucht, da sich Fibroblasten und MSCs trotz ihrer Verwandtschaft offensichtlich so sehr unterscheiden, dass sich *small molecule*-basierte Induktionsprotokolle nicht ohne Weiteres übertragen lassen. Ausgewählt wurden die Differenzierungsprotokolle von Bi *et al.* (2010), die mit MSCs aus der Ratte, einer Präinduktion in 1 μ M RA und einer 24 h Inkubationsdauer in einem neuronalen Induktionsmedium (NIM-1) arbeiteten, und Aguilera-Castrejon *et al.* (2017), die für ihre Differenzierung humane MSCs für 7 d im Induktionsmedium (NIM-2) kultivierten. Diese Protokolle wurden in den hier verwendeten MSCs vergleichend durchgeführt und analysiert. Die Kultivierungsdauer von 7 d in NIM-2 wurde in einem zusätzlichen Ansatz auf 30 d in NIM-2 verlängert und in einem weiteren Ansatz zur Stabilisierung der Zellen nach den 30 d in NIM-2 noch um 1 d in MAT (Hu *et al.*, 2015) ergänzt.

Während der Induktion wurde zunächst die Entwicklung der Zellmorphologie betrachtet. Die zuvor in ihrer Form fibroblastoiden MSCs veränderten sich sowohl durch die NIM-1- als auch die NIM-2-Behandlung zu einer Neuronen-typischen Zellform mit kleinen, runden Zellkörpern und langen Neuriten-ähnlichen Zellfortsätzen (Abbildung 14). Nach 30 d in NIM-2 war diese Entwicklung noch stärker sichtbar. Die Zellen hatten nach dieser Induktionszeit deutlich längere Ausläufer gebildet und die Anzahl der nicht morphologisch veränderten Zellen war stark zurückgegangen. Die neuronale Morphologie blieb auch nach der zusätzlichen Kultivierung für 1 d in MAT erhalten. Auffallend war in

allen Ansätzen, wie auch zuvor bei den anderen getesteten Differenzierungen, dass keine Zellproliferation mehr stattfand. Somit kann auch hier die Entwicklung eines postmitotischen Phänotyps vermutet werden, der Voraussetzung für das Erreichen eines reifen neuronalen Entwicklungszustands ist (Herrup und Yang, 2007). Denkbar wäre allerdings auch, dass die MSCs durch die Veränderung ihrer zum Wachstum benötigten Umgebung seneszent wurden und sich deshalb nicht mehr teilten (Burton und Faragher, 2015). Eine mögliche Seneszenz der *small molecule*-behandelten MSCs könnte weiterführend beispielsweise mittels Färbung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase überprüft werden.

Die Zelldichte reduzierte sich stetig während der Induktionszeit in NIM-2, sodass nach 30 d in diesem Medium deutlich weniger Zellen vorhanden waren. Das ist wahrscheinlich auf den Zusatz der *small molecules* zurückzuführen, die teilweise erheblich in zelluläre Prozesse eingreifen, um eine Differenzierung herbeiführen zu können (siehe Abschnitt 1.5.1).

Bei der folgenden *Patch-Clamp*-Analyse zeigte sich, dass auch die verbliebenen Zellen nach 30 d in NIM-2 sehr fragil waren. Ihre Membran war so instabil, dass die Zellen nach 30 d nicht mit dieser Technik messbar waren, da die Membran direkt nach dem Herstellen einer *Whole-Cell*-Konfiguration wieder abbrach. Meist konnte nicht einmal eine *Whole-Cell*-Konfiguration erreicht werden. Um die Stabilität der Zellen wiederzuerlangen und *Patch-Clamp*-Messungen durchführen zu können, wurden die Zellen deshalb für 1 d in MAT kultiviert, das Hu *et al.* (2015) zur Förderung der neuronalen Reifung und Vitalität verwendet hatten. Mit diesem Medium gelang es, die Zellen ausreichend zu stabilisieren, um *Current-Clamp*-Messungen in den differenzierten Zellen durchzuführen. Die elektrophysiologisch analysierten Zellen wiesen hier eine neuronale Zellmorphologie auf. In diesen Messungen wurde nachgewiesen, dass sich die MSCs durch die Differenzierung für 30 d in NIM-2, gefolgt von 1 d in MAT, zu elektrisch erregbaren Zellen entwickelt hatten (Abbildung 16), was sowohl in 7 d NIM-2-differenzierten Zellen (Daten nicht gezeigt) als auch in den MSCs (Abbildung 7) und in den NIM-1-differenzierten Zellen (Abbildung 15) nicht der Fall war. Die generierten Zellen reagierten auf die Injektion depolarisierender Ströme mit Aktionspotentialen. Diese waren nicht repetitiv und dauerten mit bis zu über 200 ms deutlich länger an, als Aktionspotentiale bei reifen Neuronen mit 1-2 ms üblicherweise andauern (Hodgkin und Huxley, 1952; Vierbuchen *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015). Sie ähnelten, wie auch die in den unterschiedlichen NIM-3-induzierten Zellen gemessenen Aktionspotentiale, denen unreifer Neuronen (Ma *et al.*, 2011; Connor *et al.*, 2018) oder Muskelzellen (Lakatta *et al.*, 2010; Marger *et al.*, 2011; Voitychuk *et al.*, 2012; Manchanda *et al.*, 2019).

Da in diesen Zellen, zusätzlich zu den gemessenen Aktionspotentialen, eine neuronale Morphologie ausgeprägt war, kann eine neuronale Entwicklung angenommen werden, die im Folgenden molekular genauer charakterisiert wurde. Dafür wurden die für 30 d in NIM-2 und 1 d in MAT differenzierten Zellen auf ihr Expressionsmuster von typischen MSC-Markern und neuronalen Markern untersucht.

Auch die NIM-1-differenzierten Zellen und die 7 d und 30 d in NIM-2 induzierten Zellen wurden im Vergleich zu unbehandelten MSCs analysiert.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Differenzierung ist, dass die Zellen ihre bisherigen Eigenschaften verlieren oder verändern, um die Identität des neuen Zelltyps anzunehmen (Yang *et al.*, 2011; Vierbuchen und Wernig, 2012). Die Expression typischer MSC-Marker wie *NT5E*, *THY1*, *ENG* und *ALCAM* war in NIM-1- und NIM-2-differenzierten Zellen signifikant reduziert (Abbildung 17). Diese Abnahme an MSC-Markern während der Differenzierung wurde für die NIM-1- und 7 d NIM-2-differenzierten Zellen bereits beschrieben (Bi *et al.*, 2010; Aguilera-Castrejon *et al.*, 2017). Mit Ausnahme von *NT5E* waren alle MSC-Marker in den NIM-2-induzierten Zellen deutlich stärker herunterreguliert als in den NIM-1-differenzierten Zellen, was für einen fortgeschritteneren Differenzierungszustand und einen Verlust an Stammzeleigenschaften spricht. Am größten war der Einfluss auf die Marker *THY1* und *ALCAM*, deren mRNA-Expression sich um mehr als das 100-fache reduzierte. Dabei fiel vor allem bei der Analyse von *THY1* auf, dass die MSC-Marker nach 30-tägiger Kultivierung in NIM-2 ein geringeres Expressionsniveau aufwiesen als nach 7-tägiger Kultivierung, welches für eine stärkere Differenzierung spricht und die Beobachtungen der zellmorphologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigt.

Die NIM-1- und NIM-2-differenzierten Zellen wurden daher zur Analyse einer möglichen neuronalen Differenzierung auf die Expression neuronaler Marker untersucht. Als Marker für eine frühe neuronale Entwicklungsstufe wurde die Anwesenheit von Nestin auf mRNA- und Proteinebene überprüft, welches vor allem in neuro-astroglialen Vorläuferzellen zu finden ist (Lendahl *et al.*, 1990; Wislet-Gendebien *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2010; Zhang und Jiao, 2015). Auf mRNA-Ebene war *NES* in den MSCs nachweisbar. Für die NIM-1-differenzierten Zellen war keine signifikante Veränderung dieses Expressionsniveaus zu beobachten, während es in allen NIM-2-differenzierten Proben zu einer statistisch relevanten Reduktion kam (Abbildung 17). Auf Proteinebene war Nestin in Immunfluoreszenzfärbungen lediglich in den NIM-1-induzierten Zellen eindeutig nachweisbar, wobei auch in diesen Proben keine starke Expression sichtbar war (Abbildung 18). Dass die Mengen an vorhandener mRNA und Protein nicht direkt korrelieren, ist nicht ungewöhnlich und kommt durch diverse Einflussgrößen, wie die Halbwertszeiten der mRNA und des Proteins und Regulationsmechanismen der Zelle während aller Schritte der Proteinbiosynthese, zustande (Maier *et al.*, 2009). Hemptinne *et al.* (2004) stellten fest, dass allein die Veränderung des Wachstumsmediums der MSCs ausreichend war, um Nestin-exprimierende neuro-astrogliale Zellen zu erzeugen. Diese Entwicklung war deutlich wahrscheinlicher, wenn diesem Medium Retinsäure (RA) zugesetzt wurde. Diese Entdeckung könnte auch die höhere *NES*-mRNA-Expression nach der NIM-1-Behandlung, der eine Präinkubation mit 1 μ M RA vorwegging, im Vergleich zu den NIM-2-behandelten Zellen erklären. Bi *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die Nestin-Expression durch die zusätzliche Induktion mit 1 μ M RA im Vergleich zu der alleinigen Differenzierung in NIM-1 gesteigert werden konnte. Aufgrund ihrer Beobachtungen schrieben sie der Retinsäure eine wichtige Rolle während der Initialisierung der

Differenzierung von MSCs zu neuronalen Vorläuferzellen zu. Es könnte somit argumentiert werden, dass die Initialisierung in den NIM-1-induzierten Zellen eventuell aufgrund der höher konzentrierten *small molecules* effizienter stattfand als in den NIM-2-differenzierten Zellen.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Induktion in den NIM-2-differenzierten Zellen ebenfalls sehr erfolgreich war und die generierten Zellen in einem anderen Entwicklungsstadium waren als die NIM-1-behandelten Zellen. Dafür spricht zum einen, dass elektrisch erregbare Zellen mit einer neuronalen Morphologie erzeugt wurden, und zum anderen, dass die Nestin-Expression während der neuronalen Reifung von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen zu Neuronen bekanntermaßen wieder herunterreguliert wird (Zhang und Jiao, 2015). Zusätzlich wird diese These durch die auf mRNA- und Proteinebene gesteigerte Expression des neuronalen Markers Tuj1 in den NIM-2-induzierten Zellen (Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19) gestützt. Tuj1 ist ein Neuronen-typisches Klasse III β -Tubulin, das bereits in unreifen Neuronen exprimiert wird (Tondreau *et al.*, 2004; Zhang und Jiao, 2015).

Obwohl zuvor, sowohl bei den morphologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen als auch bei der Analyse der MSC-Marker, der Eindruck entstand, dass die induzierte Differenzierung durch die verlängerte Inkubation verstärkt wurde, konnte dies bei der Analyse der *NES*- und *TUBB3*-Expression nicht bestätigt werden. Die Entwicklung im Expressionsniveau, die durch die 7 d-Behandlung sichtbar wurde, war nach 30 d wieder rückläufig. Weiter verstärkt wurde dieser Effekt durch den zusätzlichen Tag in MAT, welches auch in der NIM-3-basierten Induktion zu einer Entdifferenzierung geführt hatte (Abschnitt 4.2.2.1).

Im Gegensatz zu den NIM-2-differenzierten Zellen war die Tuj1-Expression in den NIM-1-induzierten Zellen auf mRNA-Ebene nicht und auf Proteinebene nur leicht erhöht. Umgekehrt war die MAP-2- und in einzelnen Ansätzen die NeuN-Expression in den NIM-1-differenzierten Zellen leicht erhöht, während sie in den NIM-2-behandelten Zellen herunterreguliert war. MAP-2 und NeuN sind typische Marker reifer Neuronen und sind somit gute Indizien für eine neuronale Differenzierung der NIM-1-induzierten Zellen. Beide Marker kommen allerdings nicht ausschließlich in Neuronen vor und sollten deshalb nicht die Basis einer neuronalen Charakterisierung bilden (Yang *et al.*, 2011).

Xue *et al.* (2013) konnten zeigen, dass durch die neuronale Differenzierung mittels anti-PTBP1-shRNA die Transkriptionsfaktoren Brn-2 (*POU3F2*) und MyT1-L (*MYT1L*) hochreguliert wurden. Diese Transkriptionsfaktoren sind wie auch SOX-2 (*SOX2*) in der Lage, eine neuronale Entwicklung zu induzieren, wenn sie exogen in somatischen Zellen exprimiert werden (Vierbuchen *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2015). Es wurde untersucht, ob die Induktion dieser Faktoren auch durch die hier verwendeten *small molecule*-basierten Methoden hervorgerufen werden konnte, was nicht der Fall war. Brun *et al.* (2015) gelang eine Differenzierung von MSCs zu glatten, muskellähnlichen Zellen. Auch Muskelzellen sind elektrisch erregbare Zellen. Obwohl die neuronale Morphologie und die bisher analysierten Marker eher für eine neuronale Entwicklung der Zellen sprachen, sollte dennoch überprüft werden, ob auch eine muskuläre Differenzierung stattgefunden haben könnte. Aus diesem Grund

wurden die muskulären Marker *ACTA2*, *TAGLN*, *MYL2* und *SMYDI* auf mRNA-Ebene auf ihr Expressionsverhalten hin untersucht. Eine signifikant erhöhte Expression war nach der Differenzierung für keinen der getesteten muskulären Marker messbar, sodass eine muskuläre Differenzierung der MSCs ausgeschlossen wurde.

Es kann zusammenfassend festgehalten werden, dass sich die NIM-1- und NIM-2-induzierten Zellen nach der jeweiligen Behandlung vermutlich in unterschiedlichen neuronalen Differenzierungsstadien befanden. Anhand der Expressionsniveaus verschiedener Marker allein war keine eindeutige Aussage möglich, welche Zellen in ihrer neuronalen Entwicklung weiter fortgeschritten waren. Während einer induzierten Differenzierung sind die vorhandenen Zellen außerdem nicht alle gleich weit entwickelt, sodass es auch innerhalb der NIM-1- und NIM-2-induzierten Zellpopulationen zu einer größeren Variabilität gekommen sein könnte. Da in den NIM-2-behandelten Zellen eine elektrische Erregbarkeit nachgewiesen werden konnte, scheinen diese Zellen in ihren physiologischen Eigenschaften eher Neuronen zu ähneln. Reife Neuronen konnten mit beiden Induktionsmedien nicht differenziert werden.

4.2.2.3 Vergleich der verwendeten *small molecule*-basierten Differenzierungen

Insgesamt wurden für die neuronale Induktion von humanen MSCs sechs verschiedene Ansätze unter Verwendung von drei unterschiedlichen *small molecule*-basierten Induktionsmedien untersucht.

Das kürzeste Protokoll war die 24-stündige Inkubation in NIM-1 mit vorhergehender 24-stündiger Präinduktion der MSCs in 1 μM RA (Bi *et al.*, 2010). Die auf diese Weise generierten Zellen entwickelten eine neuronale Morphologie und exprimierten einige neuronale Marker stärker als zuvor. Allerdings konnte in diesen Zellen keine elektrische Erregbarkeit nachgewiesen werden, was eine essenzielle Eigenschaft von Neuronen ist (Barnett und Larkman, 2007). Eine Verlängerung dieses Protokolls war aufgrund der hohen Zytotoxizität von NIM-1 nicht möglich. Diese hohe Zytotoxizität könnte durch die relativ hohe Konzentration an Valproinsäure von 1,6 mM, der erhöhten Kaliumkonzentration von 20 mM und dem DMSO-Anteil von 1,6 % zustande kommen, sodass dieses Medium für eine länger andauernde Differenzierung nicht geeignet ist.

Die neuronale Transdifferenzierung nach Hu *et al.* (2015) dauerte mindestens 16 d an, während der die Zellen für 8 d in NIM-3, 6 d in MAT und mindestens 2 d in NeuroM kultiviert wurden. Dabei zeigte sich, dass lediglich das neuronale Induktionsmedium NIM-3 eine neuronale Entwicklung hervorrief, die durch den Medienwechsel zu MAT weder erhalten noch fortgesetzt werden konnte. NIM-3 enthielt neben Valproinsäure (500 μM) die *small molecules* CHIR99021 (3 μM), Forskolin (10 μM), Repsox (1 μM), SP600625 (10 μM), Gö6983 (5 μM), Y-27632 (5 μM) und cAMP (100 μM). In dem Maturationsmedium MAT waren lediglich CHIR99021 und Forskolin weiterhin enthalten. Außerdem wurde dem Medium Dorsomorphin (1 μM) zugesetzt, das zusammen mit CHIR99021 und Forskolin das neuronale Überleben und Reifen unterstützen sollte. Somit waren die differenzierungsfördernden Substanzen Valproinsäure, Repsox, SP600625, Gö6983 und Y-27632 im MAT nicht mehr enthalten. Vermutlich waren die MSCs in ihrer neuronalen Entwicklung noch nicht weit genug fortgeschritten,

sodass es beim Medienwechsel zu MAT nicht zu der beabsichtigten neuronalen Reifung, sondern durch das Fehlen der neuronalen Induktoren zu dem beobachteten Verlust des Differenzierungsfortschritts kam. Obwohl die Zellen bereits eine elektrische Erregbarkeit entwickelten, führte auch eine verlängerte Inkubation in NIM-3 nicht zu einer stabilen neuronalen Entwicklung der MSCs, was durch die Verwendung des neuronalen Induktionsmedium NIM-2 (Aguilera-Castrejon *et al.*, 2017) etwas besser gelang.

Auch durch die Differenzierung in diesem Medium konnten elektrische erregbare Zellen generiert werden. Wurde die Inkubationszeit in NIM-2 von 7 d auf 30 d erhöht, führte ein anschließender Medienwechsel zu MAT nicht zu einer sofortigen Entdifferenzierung der Zellen, sodass von einem fortgeschritteneren neuronalen Differenzierungszustand ausgegangen werden kann, der wahrscheinlich durch die zugesetzten *small molecules* im NIM-2 verursacht wurde. Mit einer Konzentration von 20 μM war CHIR99021 fast 7-fach höher konzentriert als im NIM-3. Auch Forskolin wurde mit 50 μM 5-mal so hoch eingesetzt wie im NIM-3. Zusätzlich wurde 1 μM I-BET151 verwendet. Dieser Substanz schrieben Aguilera-Castrejon *et al.* (2017) die Wirkung zu, das transkriptionale Netzwerk des Ursprungszelltyps zu unterbrechen, sodass ein neues Netzwerk entwickelt werden kann. Die Autoren wiesen nach, dass ihr entwickeltes Protokoll zur neuronalen Transdifferenzierung von MSCs ohne dieses *small molecule* ineffektiver erfolgte, und untermauerten damit ihre Theorie.

Insgesamt konnte allerdings durch keines der verwendeten Medien eine derart stabile Differenzierung erreicht werden, dass die zugesetzten *small molecules* entfernt und die generierten Zellen in gängigen neuronalen Wachstumsmedien hätten weiterkultiviert werden können, ohne ihre neuronalen Eigenschaften zu verlieren. Diesem Ziel am nächsten kamen die in NIM-2 differenzierten Zellen, die zumindest durch einen kurzzeitigen Medienwechsel zu MAT nicht sofort entdifferenzierten. Aus diesem Grund wurde mit der NIM-2-induzierten Transdifferenzierung weitergearbeitet und diese im Folgenden mit der sehr kurzen NIM-1-basierten Differenzierung in physiologischen Experimenten verglichen.

4.3 *Gap Junctions* in *small molecule*-induzierten MSCs

In der Literatur ist eine Vielzahl unterschiedlicher *small molecule*-basierter Transdifferenzierungsprotokolle beschrieben, von denen einzelne in dieser Arbeit Verwendung fanden. Die verwendeten *small molecules* sind Chemikalien, die als Aktivatoren oder Inhibitoren in unterschiedlichste Signaltransduktionswege der Zelle eingreifen. Viele dieser Signalwege spielen in diversen zellulären Prozessen eine zentrale Rolle, sodass neben den gewünschten Veränderungen weitreichende Auswirkungen auf die Zellphysiologie zu erwarten sowie schwer abzusehen sind. Differenzierte und transdifferenzierte Zellen sollten aus diesem Grund umfassend physiologisch analysiert werden, um etwaige Veränderungen, die nicht dem Profil der Zielzellen entsprechen, erkennen und die Folgen besser abschätzen zu können.

Gap Junctions spielen für die Physiologie von Zellen innerhalb eines Gewebes eine essenzielle Rolle und beeinflussen deren Entwicklung maßgeblich (Saez *et al.*, 2003; Bodi *et al.*, 2004; Esseltine *et al.*, 2015). Umgekehrt verändert sich die *Gap Junction*-Kopplung und Connexin-Expression von Zellen

durch deren Differenzierung (Rozenal *et al.*, 2000; Swayne und Bennett, 2016). Um den Einfluss der neuronalen Transdifferenzierung auf die *Gap Junction*-Kopplung zu untersuchen, wurde zunächst die *Gap Junction*-vermittelte Zell-Zellkopplung in unbehandelten MSCs und den NIM-1- und NIM-2-differenzierten Zellen untersucht (Abschnitt 4.3.1). Andersherum wurde auch untersucht, wie sich eine mit dem *Gap Junction*-Blocker CBX unterdrückte *Gap Junction*-Kopplung auf die neuronale Transdifferenzierung auswirkt (Abschnitt 4.3.2).

4.3.1 *Gap Junction*-vermittelte Zellkommunikation in induzierten MSCs

Mithilfe von LY-Farbstofftransferexperimenten konnte gezeigt werden, dass die unbehandelten MSCs sehr stark über *Gap Junctions* miteinander gekoppelt waren (Abbildung 21 und Abbildung 22). So war der in eine Zelle injizierte Farbstoff LY nach einer definierten Inkubationszeit von 10 min in eine Vielzahl an Nachbarzellen diffundiert. Da LY Membran-impermeabel, aber *Gap Junction*-permeabel ist, kann von einem Farbstofftransfer zwischen den Zellen über *Gap Junction*-Kanäle ausgegangen werden. Diese Kopplung der MSCs untereinander ist bereits bekannt und wird vor allem durch die kardialen Connexine Cx40, Cx43 und Cx45 verursacht (Dorshkind *et al.*, 1993; Bodi *et al.*, 2004; Valiunas *et al.*, 2004). In den hier verwendeten MSCs konnte die mRNA der Connexine Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 und in geringeren Mengen auch von Cx26 nachgewiesen werden (Abbildung 24). Dabei war Cx43 mit Abstand am stärksten exprimiert, sodass es naheliegend wäre, dass die starke *Gap Junction*-Kopplung vor allem durch dieses Connexin verursacht wird. Diese These müsste in weiterführenden Experimenten durch die Verwendung von spezifischen *Gap Junction*-Inhibitoren, wie beispielsweise dem mimetischen Peptid ⁴³Gap26, oder durch gezielten siRNA-*Knockdown* von Cx43 überprüft werden.

Todorova *et al.* (2008) konnten bereits zeigen, dass die interzelluläre *Gap Junction*-Kopplung in embryonalen Stammzellen notwendig ist, um diese in einem undifferenzierten und proliferierenden Zustand zu erhalten. Dieser Einfluss von *Gap Junctions* auf die Proliferationsfähigkeit konnte auch in hämatopoetischen und neuralen Vorläuferzellen festgestellt werden (Bodi *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2004). Es wäre somit auch für MSCs denkbar, dass die gemessene hohe *Gap Junction*-vermittelte Zell-Zellkopplung zum Erhalt der Proliferationsfähigkeit beiträgt und eine Differenzierung der Zellen verhindert. MSCs sind außerdem in der Lage, *Gap Junctions* zu anderen Zelltypen zu bilden. So sind sie in ihrer natürlichen Umgebung, der Stammzellnische im Knochenmark, über *Gap Junctions* mit den hämatopoetischen Stammzellen gekoppelt und fördern dort unter anderem deren Proliferation und die Hämatopoese (Rosendaal *et al.*, 1997; Dürig *et al.*, 2000; Genet *et al.*, 2018).

Für die Annahme, dass die *Gap Junction*-vermittelte Zellkopplung in den MSCs einen undifferenzierten und proliferierenden Zustand erhält, spricht ebenfalls, dass die nicht mehr proliferierenden NIM-2-differenzierten Zellen im zeitlichen Verlauf eine zunehmend reduzierte *Gap Junction*-Kopplung aufwiesen, was sich in einer deutlich geringeren LY-Farbstofftransferrate zeigte, die durch die Zugabe von MAT für 1 d wieder leicht erhöht wurde. Die NIM-1-induzierte Differenzierung führte zu keiner reduzierten *Gap Junction*-Kopplung (Abbildung 21 und Abbildung 22).

Es ist bekannt, dass *Gap Junctions* und Connexine, insbesondere Cx36, auch in Neuronen und neuronalem Gewebe ausgebildet sind und eine essenzielle Rolle, beispielsweise für die Bildung elektrischer Synapsen, spielen (Gutnick und Prince, 1981; Lo Turco und Kriegstein, 1991; Yuste *et al.*, 1995; Bittman *et al.*, 1997; Noctor *et al.*, 2001). Bei einer Transdifferenzierung von MSCs zu Neuronen würde erwartet, dass Cx37, Cx40 und Cx43 herunterreguliert würden, während die in Neuronen zu findenden Connexine Cx26, Cx45 und vor allem Cx36 hochreguliert würden (Condorelli *et al.*, 2000; Rozental *et al.*, 2000; Söhl *et al.*, 2005; Eugenin *et al.*, 2012; Swayne und Bennett, 2016). mRNA von Cx36 konnte allerdings vor und nach der neuronalen Induktion nur in derart geringen Spuren gefunden werden, dass diese physiologisch wahrscheinlich keine Relevanz besitzen. Cx37, das vor allem in Endothelzellen diverser Gewebetypen zu finden ist (Kar *et al.*, 2012), und Cx40 waren auf mRNA-Ebene auf einem ähnlich moderaten Niveau exprimiert und wurden durch die NIM-2-induzierte Differenzierung signifikant herunterreguliert, im Fall von Cx40 sogar stark. Auch das zuvor sehr stark exprimierte Cx43 wurde durch die NIM-2- und ebenso durch die NIM-1-vermittelte neuronale Induktion in seiner Expression signifikant reduziert. Die Entwicklungen im Expressionsniveau der Connexine Cx37, Cx40 und Cx43 entsprachen somit den Erwartungen. Für Cx45 wurden die Erwartungen allerdings nicht erfüllt. Die Expression dieses Connexins wurde auf mRNA-Ebene nicht wie vermutet gesteigert, sondern wurde ebenfalls signifikant reduziert. Einzig für Cx26 konnte die erwartete Steigerung im Expressionsniveau auf mRNA-Ebene in den NIM-2-induzierten Proben beobachtet werden.

Auf Proteinebene konnte für Cx45, im Gegensatz zu den Veränderungen auf mRNA-Ebene, keine durch die Differenzierungen hervorgerufene signifikante Reduktion der Expression beobachtet werden. Es zeigte sich, dass Cx45 insgesamt sehr schwach detektierbar war und durch die Differenzierungen nicht verändert wurde (Abbildung 26). Für Cx26 und Cx43 konnten die Beobachtungen aus der qRT-PCR auch im Western Blot im Wesentlichen bestätigt werden. Auf Proteinebene zeigte sich hier, dass die Expression nur durch die NIM-2-induzierte Differenzierung signifikant reduziert wurde. Die NIM-1-vermittelte Induktion der MSCs zeigte keinen Einfluss auf die detektierte Proteinmenge an Cx43. In weiterführenden Experimenten sollten auch die übrigen in der qRT-PCR auf mRNA-Ebene untersuchten Connexine auf Proteinebene quantifiziert werden, da bereits bei Cx45 und Cx43 Abweichungen zwischen dem gemessenen Expressionsniveau auf mRNA- und auf Proteinebene festgestellt wurden.

Die beobachtete, deutliche Reduktion der *Gap Junction*-vermittelten Farbstoffkopplung durch die NIM-2-induzierte Transdifferenzierung liegt somit wahrscheinlich in der verminderten Expression der Connexine Cx37, Cx40 und Cx43 begründet. Die Expressionssteigerung von Cx26 schien diesen Effekt unter den Versuchsbedingungen nicht ausgleichen zu können. Cx43 wurde dabei der größte Einfluss auf die reduzierte *Gap Junction*-Kopplung zugeschrieben, da selbst das herunterregulierte Expressionsniveau noch deutlich höher lag als das der anderen Connexine vor der Reduktion, wie aus den mRNA-Analysen ersichtlich wurde. Um diesen vermuteten dominanten Effekt von Cx43 genauer

zu untersuchen, könnten die Farbstofftransfer-Versuche ausblickend beispielsweise unter gezieltem Cx43-*Knockdown* mittels siRNA oder shRNA wiederholt werden.

Cx26 ist *in vivo* für eine vollständige neuronale Entwicklung und die Synapsenbildung im Neocortex essenziell (Su *et al.*, 2017). Die durch die NIM-2-Induktion hervorgerufene Steigerung im Expressionsniveau könnte somit ein Hinweis auf eine neuronale Differenzierung der MSCs sein. Cx43 wird typischerweise nicht von reifen Neuronen exprimiert, ist allerdings bei der neuronalen Entwicklung unerlässlich, wobei es vielfältige Funktionen hat. Während Cx43 in der embryonalen Entwicklung die Proliferation fördert, hat es in der adulten Neurogenese proliferationshemmende Eigenschaften (Swayne und Bennett, 2016). Shin *et al.* (2015) konnten beobachten, dass die Expression von Cx43 in aktivierten neuronalen Stammzellen und in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen herunterreguliert ist. Die hier gemessene deutliche Reduktion des Expressionsniveaus von Cx43 spricht somit stark für eine neuronale Differenzierung der MSCs. Dass allerdings auch nach der NIM-2-induzierten Differenzierung immer noch eindeutig Cx43 nachgewiesen werden konnte, lässt darauf schließen, dass keine vollständige neuronale Reifung durchlaufen wurde und sich die Zellen möglicherweise auf dem neuronalen Entwicklungsstand von neuronalen Vorläuferzellen oder immaturren Neuronen befanden (Rozenal *et al.*, 2000; Swayne und Bennett, 2016). Auch die fehlende Expression von Cx36 unterstützt diese These, da dieses Connexin für die Bildung elektrischer Synapsen in reifen Neuronen unverzichtbar ist und in diversen Neuronentypen exprimiert wird (Belluardo *et al.*, 2000; Condorelli *et al.*, 2000; Gulisano *et al.*, 2000; Söhl *et al.*, 2005; Eugenin *et al.*, 2012; Pereda, 2014).

Obwohl *Gap Junctions* in Neuronen für die Bildung elektrischer Synapsen essenziell sind, ist die *Gap Junction*-vermittelte Zellkopplung in Neuronen nicht so stark ausgeprägt wie in neuronalen Vorläuferzellen (Duval *et al.*, 2002; Eugenin *et al.*, 2012), was die beobachtete Reduktion der Kopplung während der induzierten Differenzierung begründet. Die wieder leicht erhöhte *Gap Junction*-Kopplung durch die Inkubation in MAT lässt auf eine erneute Entdifferenzierung der NIM-2-induzierten Zellen schließen, wie sie schon zuvor nach der Analyse verschiedener Marker vermutet wurde (Abschnitt 4.2.2.2). Wird angenommen, dass mit der NIM-1-induzierten Transdifferenzierung neuronale Vorläuferzellen erzeugt wurden (vergl. hierzu Abschnitt 4.2.2.2), so erklärt dies die in diesen Zellen gemessene *Gap Junction*-vermittelte LY-Farbstoffkopplung, die mit der von unbehandelten MSCs vergleichbar war (Abbildung 21 und Abbildung 22).

Gap Junctions haben nicht nur als vollständige Zell-Zell-verbindende Kanäle eine physiologische Relevanz. Auch die *Gap Junction*-Halbkanäle, die für einen vollständigen Kanal von beiden beteiligten Zellen jeweils gebildet und zur Kanalbildung beigesteuert werden, sind für sich genommen funktionale Kanäle, die in geöffnetem Zustand eine Diffusion kleinerer Moleküle zwischen dem Zytoplasma und dem extrazellulären Raum ermöglichen. Für die Zellkommunikation spielen sie ebenfalls eine Rolle, da Botenstoffe, wie beispielsweise ATP, durch sie in den extrazellulären Raum freigesetzt und dort autokrin oder parakrin an Rezeptoren binden und zelluläre Signale induzieren können. Natürlich können

auf dem umgekehrten Wege auch Botenstoffe und andere kleine Moleküle in die Zelle gelangen (Goodenough und Paul, 2003; Belousov *et al.*, 2017).

Um die Aktivität eventuell vorhandener *Gap Junction*-Halbkanäle zu untersuchen, wurden mit den unbehandelten MSCs und den NIM-2-differenzierten Zellen Farbstoffaufnahme-Experimente mit EtdBr durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Farbstoffaufnahme-Rate in den unbehandelten MSCs durch den Entzug von Ca^{2+} im Badmedium minimal, jedoch signifikant, erhöht wurde (Abbildung 23). Das spricht für die Anwesenheit weniger aktiver *Gap Junction*-Halbkanäle, die durch den Entzug des extrazellulären Ca^{2+} geöffnet wurden und somit in diesem Versuchsabschnitt eine höhere Farbstoffaufnahme-Rate ermöglichten. Durch Ultraschall geöffnete funktionale Cx43-Halbkanäle wurden in MSCs bereits nachgewiesen (Yoon *et al.*, 2018). In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde dem Ca^{2+} -freien Badmedium zusätzlich 100 μM des unspezifischen *Gap Junction*-Blockers CBX zugesetzt, der die zuvor geöffneten *Gap Junction*-Halbkanäle blockieren und somit die Farbstoffaufnahme-Rate senken sollte (Schalper *et al.*, 2008a; Yi *et al.*, 2016). Beobachtet wurde allerdings ein deutlicher Anstieg der Farbstoffaufnahme-Rate durch die Zugabe von CBX. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass CBX die Zellmembran schädigt und auf diese Weise einen höheren Farbstoffeinstrom ermöglicht. Ein Zellmembran-schädigender Einfluss von CBX konnte in früheren *Patch-Clamp*-Versuchen an der Granulosa-Zelllinie GFSHR-17 bereits festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um die Ergebnisse dennoch abzusichern und einen belastbaren Bezug zu *Gap Junction*-Halbkanälen herzustellen, sollten die Versuche unter Verwendung anderer *Gap Junction*-Halbkanal-Inhibitoren wie La^{3+} oder einem mimetischen Peptid wie Gap26 wiederholt werden (Wang *et al.*, 2013; Saez und Leybaert, 2014; Fiori *et al.*, 2017).

In den Farbstoffaufnahme-Experimenten in den differenzierten Zellen zeigte sich, dass alle Proben in allen Versuchsabschnitten eine im Vergleich zu den MSCs signifikant erhöhte Halbkanalaktivität aufwiesen (Abbildung 23). Unter Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} war das gemessene Aktivitätsniveau in 7 d und 30 d NIM-2-induzierten Zellen ähnlich hoch, sank jedoch nach der Zugabe von MAT für 1 d wieder. Durch den Entzug des extrazellulären Ca^{2+} wurde die Halbkanalaktivität im Vergleich zum Ca^{2+} -haltigen Medium in allen NIM-2-induzierten Proben wiederum signifikant erhöht. Aufgrund dieser Ergebnisse kann von einer erhöhten Halbkanalaktivität in den NIM-2-differenzierten Zellen ausgegangen werden. Naheliegend wäre, dass die gesteigerte Halbkanalaktivität in der erhöhten Expression von Cx26 begründet liegt. Dieses Connexin war das einzige, das durch die neuronale Induktion mit NIM-2 hochreguliert wurde, und aktive *Gap Junction*-Halbkanäle dieses Connexins sind bekannt (Fiori *et al.*, 2012; Valiunas, 2013). Es war außerdem auffällig, dass Cx26 bei einer Überexpression kleinere *Gap Junction*-Plaques ausbildete als Cx46 (Schadzek *et al.*, 2018). Es kann deshalb spekuliert werden, dass im Umkehrschluss mehr Cx26 in Form von *Gap Junction*-Halbkanälen vorhanden sein könnte. Eine *Gap Junction*-Halbkanalaktivität in den MSCs war kaum vorhanden und die in MSCs exprimierten Connexine Cx37, Cx40 und Cx43 wurden durch die Differenzierung herunterreguliert oder waren, wie Cx45, nach wie vor nur schwach exprimiert. Es ist dennoch möglich,

dass diese Connexine nach der Differenzierung eine Halbkanalaktivität ausbildeten, was in verschiedenen Gewebetypen schon gezeigt werden konnte (Wang *et al.*, 2013; Retamal, 2014). Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Cx43 auch nach der Differenzierung immer noch das am stärksten exprimierte Connexin ist. Da die *Gap Junction*-Kopplung drastisch reduziert wurde, wäre es denkbar, dass die vorhandenen Connexine nun als Halbkanäle aktiv wären. Weiterführende Experimente mit gezieltem *Knockdown* einzelner Connexine mittels siRNA oder shRNA könnten über die genaue Involvierung der Connexine in die gesteigerte Halbkanalaktivität Aufschluss geben.

In Neuronen wurde unter physiologischen Bedingungen bisher keine *Gap Junction*-Halbkanalaktivität nachgewiesen. Eine Aktivität verschiedener Connexin-Isoformen ist allerdings denkbar (Thompson und MacVicar, 2008) und eine Existenz funktionaler Halbkanäle des Neuronen-typischen Cx36 unter pathophysiologischen Bedingungen konnte bereits gezeigt werden (Schock *et al.*, 2008). Ebenfalls in Neuronen nachgewiesen, kommen für die gemessene Halbkanalaktivität auch die mit den Connexinen strukturverwandten Pannexine in Frage. Diese Proteine bilden *Gap Junction*-Halbkanal-ähnliche Ionenkanäle in der Zellmembran aus und ermöglichen ebenso die Diffusion von Ionen und Metaboliten (Swayne und Bennett, 2016). Pannexine wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher betrachtet und könnten ausblickend in den NIM-2-differenzierten Zellen untersucht werden.

Während in Neuronen unter physiologischen Bedingungen keine bedeutsame Halbkanal-Aktivität gemessen wurde, wurden in neuronalen Vorläuferzellen aktive *Gap Junction*-Halbkanäle nachgewiesen, die dem Erhalt dieser Zellen in einem undifferenzierten proliferierenden Zustand dienen (Talaverón *et al.*, 2015). Die Anwesenheit funktionaler *Gap Junction*-Halbkanäle in den NIM-2-induzierten Zellen könnte somit für einen neuronalen Entwicklungsstand der Zellen sprechen, der zwischen dem neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen und dem reifer Neuronen einzuordnen ist. Es könnten somit immature Neuronen erzeugt worden sein.

4.3.2 Einfluss der *Gap Junction*-Kopplung auf die neuronale Differenzierung

Verschiedenen Connexinen wird ein essenzieller Einfluss auf die neuronale Differenzierung und Entwicklung nachgesagt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Cx36 neben seiner maßgeblichen Beteiligung an der Ausbildung elektrischer Synapsen auch notwendig zu sein scheint, um *in vivo* und *in vitro* eine neuronale Differenzierung zu induzieren (Rozenal *et al.*, 2000; Hartfield *et al.*, 2011). Die nicht vorhandene Expression dieses Connexins nach der NIM-2-induzierten Differenzierung der MSCs könnte also nicht nur bedeuten, dass kein Entwicklungszustand reifer Neuronen erreicht wurde, sondern könnte dies sogar beeinflusst haben. Cx43 ist in neuronalen Vorläuferzellen stark exprimiert, in denen es die Wachstumsfaktor-abhängige Zellproliferation fördert und auf diese Weise eine neuronale Differenzierung unterdrückt (Rozenal *et al.*, 2000; Lemcke und Kuznetsov, 2013). In MSCs konnte außerdem gezeigt werden, dass Cx43 wichtig ist, um eine vorzeitige Zellseneszenz zu verhindern (Shao *et al.*, 2019). Umgekehrt ist somit die Vermutung naheliegend, dass die Cx43-Expression in den Zellen reduziert werden muss, um eine neuronale Differenzierung einzuleiten. In der

Tat wurde für neuronale Vorläuferzellen bereits festgestellt, dass Cx43 zum Voranschreiten der neuronalen Differenzierung herunterreguliert und die Zellen auf diese Weise entkoppelt werden müssen (Rozenal *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2002; Rinaldi *et al.*, 2014). Diese Unterdrückung der *Gap Junction*-Kopplung wird darum von verschiedenen Autoren als Voraussetzung für das Verlassen des Zellzyklus und somit eine erste Induktion einer neuronalen Differenzierung beschrieben (Rozenal *et al.*, 2000; Lemcke *et al.*, 2013; Lemcke und Kuznetsov, 2013; Rinaldi *et al.*, 2014). Die Regulation des Zellzyklus durch das Linsenconnexin Cx50 und der damit verbundene Einfluss auf das Zellwachstum und die Differenzierung konnten bereits nachgewiesen werden (Shi *et al.*, 2015).

Während der in dieser Arbeit durchgeführten NIM-2-induzierten neuronalen Differenzierung der MSCs konnte eine deutliche Reduktion der Cx43-Expression beobachtet werden, wobei es allerdings zu keinem vollständigen Verlust an Cx43 kam. Das könnte zu der unvollständigen neuronalen Differenzierung beigetragen haben. Da, wie bereits beschrieben, die Entkopplung der Zellen eine Voraussetzung für die neuronale Differenzierung zu sein scheint, wurde dem neuronalen Induktionsmedium zusätzlich der unspezifische *Gap Junction*-Blocker CBX zugesetzt. Auf diese Weise sollte die *Gap Junction*-vermittelte Zell-Zellkopplung während der Differenzierung inhibiert und somit die neuronale Transdifferenzierung der MSCs gefördert werden. Um den Erfolg dieses Vorhabens zu überprüfen, wurden verschiedene neuronale Marker und Connexine auf mRNA-Ebene auf ihr Expressionsniveau hin untersucht und mit der Differenzierung ohne Zusatz von CBX verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die durch CBX unterdrückte *Gap Junction*-Kopplung keinen fördernden Effekt auf die neuronale Transdifferenzierung der MSCs hatte. Weder waren die untersuchten MSC-Marker durch CBX stärker herunterreguliert worden noch waren die neuronalen Marker nach der Induktion stärker exprimiert. Ein ähnliches Bild stellte sich auch für die analysierten Connexin-Isoformen dar. Die meisten Connexine blieben in ihrem Expressionsniveau durch CBX unverändert. Nur Cx45 wurde durch CBX stärker herunterreguliert als zuvor. Dieses Ergebnis sollte ausblickend auf Proteinebene überprüft werden. Da keine differenzierungsfördernden oder -beschleunigenden Effekte einer mit CBX inhibierten *Gap Junction*-Kopplung auf die NIM-2-Induktion sichtbar waren, wird an dieser Stelle geschlossen, dass die Reduktion der *Gap Junction*-Kopplung zwar eine notwendige Konsequenz einer vollständigen neuronalen Entwicklung zu sein scheint, sie allerdings nicht direkt fördert.

4.4 Purinerge Rezeptoren in *small molecule*-induzierten MSCs

In MSCs, wie auch in neuronalen Zellen, spielen neben *Gap Junction*-Kanälen und -Halbkanälen auch purinerge Rezeptoren eine tragende Rolle in der Zellkommunikation. Sowohl in MSCs als auch in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, dass die ATP-vermittelte purinerge Signaltransduktion die Proliferation der Zellen maßgeblich beeinflusst (Ryu *et al.*, 2003; Pearson *et al.*, 2005; Coppi *et al.*, 2007; Riddle *et al.*, 2007). Auch apoptotische Mechanismen können auf diese Weise eingeleitet werden (Delarasse *et al.*, 2009). In neuronalen Vorläuferzellen wurde außerdem beobachtet, dass durch die Stimulierung purinergischer Rezeptoren die neuronale Differenzierung induziert wird (Tsao

et al., 2013). Ähnliches wurde auch für MSCs festgestellt, in denen purinerge Rezeptoren sowohl in der osteogenen als auch in der adipogenen Differenzierung eine tragende Rolle spielen (Zippel *et al.*, 2012; Ciciarello *et al.*, 2013). Es wäre naheliegend, wenn die ATP-vermittelte purinerge Signaltransduktion auch für die neuronale Transdifferenzierung von MSCs wichtig wäre und sich das Expressionsverhalten purinerges P2-Rezeptoren während der Differenzierung ändern würde.

Um die Reaktivität der MSCs und der 7 d NIM-2-induzierten Zellen auf ATP-Stimulierungen physiologisch zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob die induzierten Zellen wie die MSCs (vgl. Abschnitt 4.1) wiederholt auf ATP reagieren, ohne dass es zu einer Desensibilisierung der aktivierten Rezeptoren kommt. Dafür wurden sowohl die MSCs als auch die differenzierten Zellen jeweils alle 3 min für 5 s mit 50 μM ATP perfundiert und währenddessen ihre intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration emissions-ratiometrisch gemessen. Durch die ATP-Zugabe konnte in allen Fällen ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden (Abbildung 29), ein Befund, der wie bereits publiziert, auf die Anwesenheit von purinergen P2-Rezeptoren hindeutete (Zippel *et al.*, 2012). Zwar wurden die Zellen ausschließlich mit ATP behandelt, allerdings ist es dennoch möglich, dass die zelleigenen Rezeptoren nicht nur von ATP sondern auch von Adenosin stimuliert wurden. Auf der Zelloberfläche der MSCs befinden sich charakteristischerweise die Ektonukleotidasen CD39 und CD73, die in der Lage sind, ATP zu Adenosin zu degradieren. CD73 ist ein typischer MSC-Marker und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich in den MSCs nachgewiesen (siehe Abschnitt 4.1). Es ist also anzunehmen, dass ATP sowohl direkt auf P2-Rezeptoren als auch indirekt nach seiner Degradation als Adenosin auf P1-Rezeptoren wirkt, wie es auch von anderen Autoren bereits beschrieben wurde (Ciciarello *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die P1-Rezeptoren nicht näher betrachtet, sondern ausschließlich die P2-Rezeptoren analysiert. Da die P1-Rezeptoren wie auch die P2-Rezeptoren in diversen Zelltypen ein sehr weites physiologisches Wirkungsspektrum abdecken, kann davon ausgegangen werden, dass sich ihr Einfluss und ihr Expressionsmuster während der neuronalen Induktion der MSCs veränderte. In weiterführenden Experimenten wäre es sinnvoll, auch diese Rezeptoren während der NIM-2-induzierten Differenzierung zu untersuchen.

Die ATP-Zugabe für 5 s alle 3 min führte zu transienten intrazellulären Ca^{2+} -Signalen in Form von schmalen, deutlich definierten Peaks. Es konnte bei diesen Intervallen festgestellt werden, dass die Zellen in der Lage waren, auf die wiederholten ATP-Stimuli mit repetitiven Ca^{2+} -Signalen zu reagieren, ohne dass es zu einer vollständigen Desensibilisierung der angesprochenen Rezeptoren und damit zum Ausbleiben weiterer Ca^{2+} -Reaktionen kam. Es konnte allerdings eine sukzessive Reduktion der Signalstärke beobachtet werden, die vermutlich durch ein allmähliches Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes Indo-1 AM zustande kam. Ein deutlicher Unterschied wurde allerdings in der Reaktionsfähigkeit der Zellen sichtbar. So waren 87 % der MSCs in der Lage, mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen auf die ATP-Stimuli zu reagieren, während das nur auf 36 % der 7 d NIM-2-induzierten Zellen zutraf. Diese deutliche Reduktion der Reaktionsfähigkeit in den differenzierten Zellen könnte zum einen

durch einen tatsächlichen Verlust der Sensitivität auf ATP zustande gekommen sein. Zum anderen wurde vor der Durchführung der Ca^{2+} -*Imaging*-Experimente kein eindeutiges Kriterium zur Bestimmung der Zellvitalität angelegt. So könnte es sein, dass ebenfalls Zellen gemessen wurden, die aufgrund ihrer mangelnden Viabilität aus dem Versuch hätten ausgeschlossen werden sollen. Da bekannt war, dass mit dem neuronalen Induktionsmedium ein Kompromiss zwischen einer gewissen Zytotoxizität und der Fähigkeit zur Induktion und Förderung der neuronalen Transdifferenzierung eingegangen werden musste, wäre eine reduzierte Viabilität denkbar. Natürlich könnte sich auch die Zusammensetzung der purinergen Rezeptoren durch die Differenzierung derart verändert haben, dass die zuvor für die MSCs ausgewählte ATP-Konzentration von 50 μM nun zu niedrig war. So gibt es beispielsweise eine Studie, die mithilfe mathematischer Modellierungen für den humanen P2X7-Rezeptor eine minimale ATP-Konzentration von 100 μM zum Auslösen einer Ca^{2+} -Reaktion voraussagt (Xing *et al.*, 2016). Sollten diese Berechnungen auch für MSCs zutreffend sein, würden P2X7-Rezeptoren bei einer Stimulierung mit 50 μM ATP zumindest deutlich seltener oder sogar überhaupt nicht aktiviert werden. Um Zweifel dahingehend auszuräumen, könnte in zukünftigen Experimenten mit einer höheren ATP-Konzentration von zum Beispiel 1 mM, gearbeitet werden.

Im Folgenden wird die Zusammensetzung und physiologische Aktivität der P2X-Rezeptoren (Abschnitt 4.4.1) und P2Y-Rezeptoren (Abschnitt 4.4.2) in den auf extrazelluläres ATP reagierenden Zellen diskutiert.

4.4.1 P2X-Rezeptoren in *small molecule*-induzierten MSCs

Die ionotropen P2X-Rezeptoren sind Ionenkanäle, die sich bei ATP-Stimulierung öffnen und so unter anderem den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Raum in das Zytoplasma ermöglichen (Khakh, 2001; North, 2002). Soll festgestellt werden, ob oder welcher Anteil an purinergem Signaltransduktion durch P2X-Rezeptoren verursacht wird, kann dem extrazellulären Medium das Ca^{2+} entzogen werden. Auf diese Weise ist bei der Stimulierung der P2X-Rezeptoren extrazellulär kein Ca^{2+} vorhanden, das durch den geöffneten Kanal in die Zelle einströmen könnte. Weiterhin messbare intrazelluläre Ca^{2+} -Signale wären dann durch P2Y- oder P1-Rezeptoren verursacht worden.

Unter Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} zeigte sich, dass sich in MSCs die Höhe der Ca^{2+} -Signale in Antwort auf die ATP-Stimuli nur schwach veränderte (Abbildung 31 und Abbildung 33). Die Reduktion um maximal 15 % spricht dafür, dass in MSCs unter diesen Versuchsbedingungen nur ein geringer Anteil der ATP-induzierten Ca^{2+} -Signale durch P2X-Rezeptoren hervorgerufen wurde. Das steht zunächst im Widerspruch zu den Forschungen von Ferrari *et al.* (2011). Diese Autoren zeigten, dass ATP-abhängige Ca^{2+} -Signale auch stark von P2X-Rezeptoren abhängig sind. In weiteren physiologischen Experimenten und unter Verwendung des selektiven P2X7-Antagonisten KN62 konnten sie zeigen, dass die gemessenen Ca^{2+} -Signale sehr stark vom P2X7-Rezeptor beeinflusst wurden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden allerdings mit einer ATP-Konzentration von 50 μM durchgeführt, was für alle P2X-Rezeptoren außer P2X7 eine ausreichend hohe Konzentration für eine Aktivierung wäre (North, 2002). Für die Untersuchung von P2X7-

Rezeptoren wird hingegen üblicherweise eine ATP-Konzentration von 1 mM verwendet, da dieser Rezeptor deutlich weniger sensitiv auf ATP reagiert und somit vermutlich während der durchgeführten Experimente mit 50 μ M ATP nicht stimuliert werden konnte. Darüber hinaus ist wissenschaftlich anerkannt, dass ATP-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Signale in MSCs anteilig sowohl von P2X- als auch P2Y-Rezeptoren erzeugt werden (Coppi *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2016). Ferrari *et al.* (2011) zeigten, dass P2X7-Rezeptoren physiologisch von allen P2X-Rezeptoren den größten Einfluss in MSCs haben, und konnten auf mRNA-Ebene alle P2X-Rezeptoren mit Ausnahme von P2X2 nachweisen, während es auf Proteinebene lediglich P2X1, P2X4 und P2X7 waren (Ferrari *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse sind in den wesentlichen Punkten kongruent mit den hier gemachten Beobachtungen in dem Sinne, dass auf mRNA-Ebene alle P2X-Rezeptoren, auch P2X2, detektiert werden konnten (Abbildung 34). Dabei waren P2X2 und P2X1 auf einem ähnlichen, sehr niedrigen Expressionsniveau nachweisbar, während die Rezeptoren P2X4, P2X6 und P2X7 am stärksten exprimiert waren, sodass eine physiologische Aktivität von P2X7 unter angepassten experimentellen Bedingungen durchaus wahrscheinlich wäre. Eine generelle Variabilität in MSC-Populationen ist nicht verwunderlich, sowohl in Hinblick auf eine Donor- als auch auf eine Populations-abhängige Heterogenität (Phinney, 2012). Eine Donor-abhängige Variabilität der P2-Rezeptorexpression konnte zudem bereits gezeigt werden (Peng *et al.*, 2016). Besonders mit dem Wissen, dass allein durch den *small molecule*-Zusatz zum Zellkulturmedium Differenzierungen in MSCs induziert werden können, ist zudem offensichtlich, dass die Kultivierungsbedingungen von MSCs einen großen Einfluss auf ihr Transkriptom und ihre Physiologie haben. Leichte Abweichungen zwischen den Expressionsanalysen verschiedener Autoren sind somit durchaus erklärbar.

Die P2X-Rezeptoren sind in MSCs auf verschiedene Weise relevant. Sowohl P2X7 als auch P2X6 und P2X5 beeinflussen die Osteogenese von MSCs, allerdings in unterschiedlicher Weise. Während P2X7 die Osteogenese und Mineralisierung fördert (Sun *et al.*, 2013; Noronha-Matos *et al.*, 2014), wirken ihr P2X5 und P2X6 entgegen (Zippel *et al.*, 2012). Für den P2X4-Rezeptor wurde gezeigt, dass er in MSCs ein wichtiger Mediator von ATP-abhängigem Ca^{2+} -Einstrom mit anschließender autokriner Signalgebung ist, die zu extrazellulären ATP-Oszillationen führt (Kwon, 2012). Der schwache Rückgang der intrazellulären Ca^{2+} -Signale durch den Entzug des extrazellulären Ca^{2+} könnte also von der vorherigen Aktivität der Rezeptoren P2X4, P2X5 und P2X6 herrühren.

Im Vergleich zu den MSCs zeigten die 7 d NIM-2-induzierten Zellen durch den extrazellulären Ca^{2+} -Entzug eine deutliche Reduktion in der Stärke der hervorgerufenen intrazellulären Ca^{2+} -Signale, die sich signifikant von denen der MSCs unterschieden (Abbildung 31 und Abbildung 33). Aufgrund der niedrigen ATP-Konzentration blieb auch in diesen Messungen der P2X7-Rezeptor wahrscheinlich unberücksichtigt. Der erhöhte Anteil ionotroper Ca^{2+} -Einströme würde eine höhere Expression von P2X-Rezeptoren erwarten lassen, wobei andere Ca^{2+} -gängige Kanäle in der Zellmembran nicht ausgeschlossen werden können. Entgegen der Erwartung konnte auf mRNA-Ebene kein P2X-

Rezeptor nachgewiesen werden, dessen Expression nach der NIM-2-Induktion erhöht war, sondern, im Gegenteil, die signifikante Abnahme von P2X4, P2X5, P2X6 und P2X7 festgestellt werden. Hierbei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass sich die Anzahl der auf ATP reagierenden Zellen durch die NIM-2-induzierte Differenzierung signifikant reduzierte und nur die Zellen weiterhin betrachtet wurden, die auf den ersten ATP-Stimulus mit einem intrazellulären Ca^{2+} -Signal reagierten. Trotz ihrer reduzierten Expression waren P2X4, P2X6 und P2X7 immer noch die am meisten vorhandenen P2X-Rezeptoren in den 7 d NIM-2-induzierten Zellen.

Während der neuronalen Differenzierung spielen verschiedene P2X-Rezeptoren eine zentrale Rolle. Für P2X7 ist bekannt, dass dieser Rezeptor unterschiedliche Wirkungen auf die neuronale Differenzierung hat. So konnte beispielsweise während der neuronalen Differenzierung der murinen Neuroblastom-Zelllinie Neuro-2A eine Reduktion von P2X7 nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2009). In neuronalen Vorläuferzellen aus der Ratte konnte durch die Aktivierung des P2X7-Rezeptors die Proliferation inhibiert und die neuronale Differenzierung induziert werden (Tsao *et al.*, 2013), während das Axonwachstum, ein sehr wesentlicher Bestandteil der neuronalen Reifung, durch den gleichen Rezeptor inhibiert wurde (Díaz-Hernandez *et al.*, 2008). Auch apoptotische Mechanismen können typischerweise von P2X7-Rezeptoren eingeleitet werden (Delarasse *et al.*, 2009). P2X-Rezeptoren waren in Ratten-MSCs dafür verantwortlich, dass extrazelluläres ATP die neuronale Differenzierung der MSCs förderte. Das gelang auch *in vivo*, indem Astrozyten ATP freisetzen und so die neuronale Differenzierung transplanteder MSCs induzierten (Tu *et al.*, 2014).

In Neuronen sind, je nach Neuronen-Typ, alle P2X-Rezeptoren außer P2X5 detektierbar. Dabei sind P2X2, P2X4 und P2X6 in den meisten Neuronen funktional und stark exprimiert (Fields und Burnstock, 2006). In neuronalen Vorläuferzellen wurden alle P2X-Rezeptoren außer P2X1 nachgewiesen, wobei P2X2 und P2X6 während einer neuronalen Differenzierung hoch- und P2X4 und P2X7 herunterreguliert wurden (Oliveira *et al.*, 2015). Der Rückgang der P2X4- und P2X7-Expression konnte auch in dieser Arbeit während der NIM-2-induzierten Transdifferenzierung beobachtet werden, wobei eine erhöhte Expression von P2X2 und P2X6 ausblieb.

4.4.2 P2Y-Rezeptoren in *small molecule*-induzierten MSCs

Die metabotropen P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die bis auf wenige Ausnahmen die PLC aktivieren, die PIP_2 in DAG und IP_3 spaltet. DAG kann anschließend beispielsweise die PKC aktivieren, die wiederum eine Vielzahl anderer Proteine phosphorylieren kann. IP_3 ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der an IP_3 -Rezeptoren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums binden und die intrinsischen Ca^{2+} -Kanäle dadurch öffnen kann. Auf diese Weise kommt es zum Einstrom von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, wie dem Endoplasmatischen Retikulum, in das Zytoplasma.

U-73122 ist ein selektiver PLC-Inhibitor, der früh in die beschriebene ATP-induzierte Ca^{2+} -Signalkaskade eingreift (Bleasdale *et al.*, 1990). Durch die Verwendung dieses Inhibitors sollte im

Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, wie groß der Anteil an P2Y-Rezeptor-vermittelten intrazellulären Ca^{2+} -Signalen in MSCs und 7 d NIM-2-induzierten Zellen war. Bei der Verwendung von U-73122 fiel zunächst auf, dass die maximale Wirkung des Inhibitors ab der zweiten Stimulierung mit ATP erreicht wurde. Vermutlich verging eine gewisse Zeit, in welcher der Wirkstoff in die Zelle und zu seinem Zielort diffundierte, ehe seine volle inhibitorische Wirkung entfaltet wurde.

In den MSCs reduzierte sich die Amplitude der gemessenen Ca^{2+} -Signale um ca. 75 % durch die U-73122-Zugabe (Abbildung 31). Das bestätigt die zuvor gemachten Beobachtungen bei extrazellulärem Ca^{2+} -Entzug, dass die intrazellulären Ca^{2+} -Signale in MSCs vor allem durch metabotrope P2Y-Rezeptoren ausgelöst wurden (Abschnitt 4.4.1). Wie bereits beschrieben, zeigten mehrere Autoren, auch durch elektrophysiologische Messungen, ein Zusammenspiel beider Rezeptortypen in MSCs, um Ca^{2+} -Antworten hervorzurufen (Coppi *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2016). In der Annahme, dass die Ca^{2+} -Signale vor allem von purinergen Rezeptoren induziert wurden, wurde den Zellen in einem weiteren Versuch unter Zusatz des Inhibitors U-73122 außerdem das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen. Unter diesen Bedingungen sollten in den MSCs keine weiteren intrazellulären Ca^{2+} -Signale mehr messbar sein, was auch der Fall war (Abbildung 31).

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde 2-APB, ein weiterer Inhibitor der ATP-induzierten Ca^{2+} -Signalkaskade, verwendet. 2-APB ist unter anderem ein Inhibitor der IP_3 -Rezeptoren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und verhindert somit das Öffnen der intrinsischen Ca^{2+} -Kanäle dieser Rezeptoren, sodass kein Ca^{2+} ins Zytoplasma strömen kann. Die Resultate unter Zusatz von 2-APB waren vergleichbar mit denen von U-73122. Die Ca^{2+} -Signale in den MSCs wurden durch die Zugabe dieses Inhibitors noch stärker reduziert als durch U-73122 (Abbildung 33). Durch den zusätzlichen Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} konnten die intrazellulären Ca^{2+} -Signale ebenfalls vollständig unterdrückt werden. Mithilfe der durchgeführten Experimente konnte somit plausibel belegt werden, dass der Großteil an intrazellulären Ca^{2+} -Signalen in MSCs durch P2Y-Rezeptoren verursacht wurde. Basierend auf den Ergebnissen der mRNA-Analyse der P2Y-Rezeptoren würden dafür vor allem P2Y2, P2Y6 und P2Y11 infrage kommen (Abbildung 34), die am stärksten in den MSCs exprimiert waren. Diese Rezeptoren konnten von Riddle *et al.* (2007) auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. In anderen Studien hingegen konnten die Rezeptoren P2Y1, P2Y2 und P2Y11 auf Proteinebene gefunden werden, während alle P2Y-Rezeptoren auf mRNA detektiert wurden (Ferrari *et al.*, 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten alle P2Y-Rezeptoren in den MSCs auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, wobei P2Y1, P2Y13 und P2Y14 allerdings nur schwach exprimiert waren. Hier müsste für eine aussagekräftigere Analyse ein Nachweis der P2Y-Rezeptoren auf Proteinebene erfolgen. P2Y-Rezeptoren haben in MSCs vielfältige Funktionen. So wurde beispielsweise der Rezeptor P2Y1 mit spontanen Ca^{2+} -Oszillationen nach ATP-Stimulierung in Verbindung gebracht (Kawano *et al.*, 2006). Die Aktivierung der Rezeptoren P2X7, P2Y1 und P2Y11 durch ATP-Bindung fördert zudem die Migration von MSCs (Peng *et al.*, 2016).

Die 7 d NIM-2-induzierten Zellen reagierten deutlich weniger sensitiv auf U-73122, sodass die hervorgerufenen intrazellulären Ca^{2+} -Signale unter Anwesenheit dieses PLC-Inhibitors signifikant stärker waren als in den MSCs. Es kam hierbei zu einer maximalen Abnahme von ca. 30 %, während in den MSCs ein Signlrückgang von ca. 75 % gemessen wurde. Dieses Ergebnis unterstützt die zuvor aufgestellte These, dass in den NIM-2-differenzierten Zellen ein bedeutender Anteil der intrazellulären Ca^{2+} -Signale durch P2X-Rezeptoren, bzw. andere Ca^{2+} -permeable Kanäle in der Zellmembran ausgelöst wurde (Abschnitt 4.4.1). Oliveira *et al.* (2015) wiesen in Neurosphären die Rezeptoren P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12 und P2Y14 nach, die während der neuronalen Differenzierung herunterreguliert wurden. In neuronalen Vorläuferzellen führte die Aktivierung der Rezeptoren P2Y1 und P2Y2 zur Proliferation und Migration und schließlich auch zur neuronalen Differenzierung (Tang und Illes, 2017). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf mRNA-Ebene lediglich die signifikante Reduktion von P2Y6 nachgewiesen werden, während sich die Expression der anderen Rezeptoren nicht statistisch relevant veränderte (Abbildung 34). Ein Zusammenhang mit einer neuronalen Entwicklung ist daraus nicht ersichtlich.

Überraschenderweise wurden die Ca^{2+} -Signale durch die Verwendung des Inhibitors 2-APB unter Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} vollständig unterdrückt, obwohl hier ähnliche Resultate erwartet wurden, wie unter Zusatz von U-73122. Da P2X-Rezeptoren durch 2-APB in der Regel nicht beeinflusst werden, mussten andere Ca^{2+} -permeable Kanäle in der Zellmembran für die reduzierten Signale beim Entzug des extrazellulären Ca^{2+} verantwortlich sein, die zudem von 2-APB blockiert werden können. Dafür in Frage kommen beispielsweise *store-operated channels* (engl. für: Speicher-betriebene Kanäle) (Bootman *et al.*, 2002), deren Relevanz auch in der neuronalen Differenzierung bekannt ist (Bell *et al.*, 2013), oder *Gap Junction*-Halbkanäle, die ebenfalls durch 2-APB inhibiert werden können (Bai *et al.*, 2006). In Abschnitt 4.3.1 dieser Arbeit konnte in den NIM-2-induzierten Zellen eine erhöhte Halbkanalaktivität gemessen werden, was die Vermutung unterstützt, dass diese Halbkanäle für einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum mitverantwortlich sein könnten. Wurde unter Verwendung von 2-APB zusätzlich das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen, kam es zu keiner weiteren Veränderung, da die Signale schon unter Anwesenheit von Ca^{2+} komplett unterdrückt waren.

Wurde allerdings den U-73122-behandelten Zellen das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen, waren immer noch deutliche Signale messbar. Die einzige Erklärung hierfür ist die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern auf einem IP_3 - bzw. PLC-unabhängigem Weg. Das könnte beispielsweise über Ryanodinrezeptoren geschehen, die sich ebenfalls in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums befinden und Ca^{2+} -permeabel sind. Diese Rezeptoren werden *in vivo* von verschiedenen Liganden aktiviert und sind sowohl in MSCs (Fruscione *et al.*, 2011) als auch in Neuronen (Chen-Engerer *et al.*, 2019; Karagas und Venkatachalam, 2019) von entscheidender Relevanz. Auch während der neuronalen Differenzierung konnte ihnen schon eine wichtige Rolle nachgewiesen werden (Tse *et al.*, 2018), sodass ihre vermehrte Aktivierung in den NIM-2-induzierten Zellen ein Hinweis auf die neuronale Entwicklung dieser Zellen sein könnte.

Die verwendeten Inhibitoren U-73122 und 2-APB zeichneten sich durch eine sehr unterschiedliche Spezifität aus. Während U-73122 spezifisch die PLC inhibierte, blockierte 2-APB unspezifisch diverse Rezeptoren und Kanäle wie die IP₃-Rezeptoren, Ryanodinrezeptoren, *Gap Junction*-Halbkanäle und die *store-operated channels*. In der Kombination eingesetzt, ermöglichten diese Inhibitoren durch ihr unterschiedliches Wirkungsspektrum die Identifikation mehrerer Rezeptoren und Kanäle in den NIM-2-induzierten Zellen. So konnte gezeigt werden, dass unter anderem *Gap Junction*-Halbkanäle, Ryanodinrezeptoren und P2Y-Rezeptoren in diesen Zellen physiologisch aktiv zu sein scheinen.

Diese Vermutung muss ausblickend in weiteren Experimenten durch die Verwendung spezifischer Agonisten und Antagonisten, wie auch durch eine umfassende Expressionsanalyse auf Proteinebene und gezielte *Knockdown*-Versuche von P2X-, P2Y- und Ryanodinrezeptoren validiert werden, wobei eine Diskrepanz zu den bereits vorhandenen Daten der Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene nicht auszuschließen ist (Ferrari *et al.*, 2011).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die Reaktivität der Zellen auf ATP-Stimuli durch die 7 d NIM-2-Induktion drastisch reduzierte. Die weiterhin reagierenden Zellen wiesen einen signifikant geringeren Anteil an aktiven P2Y-Rezeptoren auf als die MSCs und schienen einen messbaren Anteil funktionaler *Gap Junction*-Halbkanäle und Ryanodinrezeptoren zu besitzen. Aufgrund des auf mRNA-Ebene analysierten P2-Rezeptor-Expressionsmusters in den differenzierten Zellen konnte keine eindeutige Zuordnung zu einem neuronalen oder mesenchymalen Zelltyp vorgenommen werden. Die hervorgerufenen Effekte der 7 d NIM-2-induzierten neuronalen Transdifferenzierung konnten durch die Verlängerung auf 30 d verstärkt werden (vgl. Abschnitte 4.2.2.2 und 4.3.1). Es wäre deshalb lohnenswert, in zukünftigen Experimenten die P2-Rezeptor-Aktivität in 30 d NIM-2-induzierten Zellen zu untersuchen.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Neuronales humanes Zellmaterial ist für die regenerative Medizin sowie physiologische und pharmakologische Studien unerlässlich, aber nur schwer zugänglich und somit sehr eingeschränkt verfügbar. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren verschiedene Ansätze entwickelt, neuronale Zellen aus gut zugänglichen und *in vitro* vermehrbaren Zellen zu generieren und damit ein neuronales Zellmodell zu erschaffen. Bei einer Anwendung in der regenerativen Medizin könnten auf diese Weise ebenfalls patienteneigene Zellen entnommen, differenziert und in geschädigtes Gewebe eingesetzt werden. Somit könnten immunologische Abstoßungsreaktionen verhindert oder patientenspezifische Diagnostik durchgeführt werden. Dafür ist es allerdings notwendig, die transdifferenzierten Zellen, wie auch das Ausgangszellmaterial, molekularbiologisch, proteinbiochemisch und physiologisch genauestens zu kennen und den neuronalen Entwicklungsstand nach der Differenzierung einordnen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation von Ionenkanälen und *Gap Junctions* während der Zellentwicklung am Modell neuronal transdifferenzierter humaner MSCs aus dem Knochenmark zu

untersuchen. Sowohl Ionenkanäle als auch *Gap Junctions* sind für die Integration, Funktion und Entwicklung von Zellen in einem Gewebe essenziell, da sie die interzelluläre Signalgebung und somit die Zellkommunikation maßgeblich bestimmen.

Die unbehandelten MSCs zeigten ein charakteristisches Expressionsmuster der typischen MSC-Marker CD73, CD90, CD105 und CD166. Des Weiteren konnte auch der neuronale Marker Tuj1 in den Zellen nachgewiesen werden. Die MSC-Marker wurden während der neuronalen *small molecule*-induzierten Transdifferenzierungen signifikant herunterreguliert, während eine Expressionssteigerung von Tuj1 zu beobachten war. Die neuronal transdifferenzierten Zellen entwickelten zudem eine elektrische Erregbarkeit, sodass sie einzelne Aktionspotentiale erzeugen konnten. Sowohl die MSCs als auch die neuronal induzierten Zellen exprimierten verschiedene Isoformen der *Gap Junction*-bildenden Connexine, wobei sich das Expressionsmuster durch die Differenzierung veränderte. In den MSCs führte vor allem die hohe Cx43-Expression zu einer starken interzellulären *Gap Junction*-vermittelten Zell-Zellkopplung, die in den transdifferenzierten Zellen fast vollständig unterdrückt wurde. In diesen Zellen scheinen die exprimierten Connexine eher in Form von *Gap Junction*-Halbkanälen aktiv zu sein, die einen Stoffaustausch zwischen dem Zytoplasma und dem extrazellulären Raum ermöglichen und auch an der Bildung von Synapsen beteiligt sein können. Durch *Gap Junction*-Halbkanäle kann beispielsweise der Neurotransmitter ATP in den extrazellulären Raum entlassen werden, wo er an purinerge P2-Rezeptoren binden kann, die wiederum intrazellulär diverse Signalkaskaden auslösen können. Sowohl die MSCs als auch die induzierten neuronalen Zellen reagierten mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen auf extrazelluläre ATP-Stimuli. Die Reaktionsfähigkeit der MSCs war dabei insgesamt höher. Bei einer extrazellulären ATP-Konzentration von $50 \mu\text{M}$ wurde das Ca^{2+} -Signal in den MSCs vor allem durch die metabotropen P2Y-Rezeptoren und nur geringfügig durch die ionotropen P2X-Rezeptoren bestimmt. Der Einfluss der P2Y-Rezeptoren wurde durch die neuronale Transdifferenzierung reduziert, während es Hinweise für eine Beteiligung von Ryanodinrezeptoren gibt, denen zukünftig weiter nachgegangen werden sollte.

Die Analyse der neuronalen Marker und die physiologische Charakterisierung der neuronal induzierten Zellen ließen darauf schließen, dass die verwendeten Ansätze zur Transdifferenzierung zwar eine neuronale Entwicklung induzierten, allerdings keine vollständig ausgereiften Neuronen erzeugen konnten. Die aussichtsreichste Veränderung der MSCs konnte mit dem neuronalen Induktionsmedium von Aguilera-Castrejon *et al.* (2017) erreicht werden, in dem die Zellen über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen kultiviert wurden. Dabei kam es allerdings zu deutlichen Verlusten in der Zellzahl. Für ein neuronales Zellmodell scheinen die auf diese Weise generierten Zellen durchaus vielversprechend zu sein, wobei zukünftig sowohl die Vitalität als auch die neuronale Reifung verbessert werden sollte. Da bereits gezeigt wurde, dass Astrozyten die neuronale Differenzierung von MSCs fördern können (Tu *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015), könnten die MSCs in fortführenden Experimenten mit dem neuronalen Induktionsmedium von Aguilera-Castrejon *et al.* (2017) differenziert und anschließend mit Astrozyten ko-kultiviert werden. Das könnte zum einen die benötigte Differenzierungszeit in dem

Induktionsmedium verringern und somit die Überlebensrate der Zellen erhöhen und zum anderen die neuronale Reifung deutlich verbessern. Dabei könnte sowohl ein Ansatz in einer direkten Ko-Kultur als auch ein Ansatz in einer räumlich getrennten Ko-Kultur in *Transwell*-Einsätzen getestet werden, die nur einen Stoffaustausch, aber keine Zellmigration erlauben. Die erreichte neuronale Reifung sollte dann durch elektrophysiologische Untersuchungen zur Messung von Aktionspotentialen und durch die Analyse der synaptischen Transmission überprüft werden. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten könnte dafür die Aktivität weiterer typischer Gliotransmitter- und Neurotransmitterrezeptoren analysiert werden. Zudem wäre es wichtig, die durchgeführten Experimente an MSCs weiterer Spender und an MSCs aus anderem Ursprungsgewebe, wie beispielsweise aus dem Nabelschnurblut oder aus der Synovialmembran, zu wiederholen, um spender- oder gewebespezifische Unterschiede miteinzubeziehen.

Im Gegensatz zu Transkriptionsfaktor-vermittelten Differenzierungen war der Differenzierungszustand der *small molecule*-induzierten Zellen anscheinend weniger stabil, da dieser sich beim Entfernen der *small molecules* und weiteren Kultivierung der Zellen in einem neuronalen Wachstumsmedium zurückentwickelte. Das ist bei der Reprogrammierung durch die exogene Expression von Transkriptionsfaktoren nicht der Fall. Dabei wird eine stabile genetische Veränderung der Zellen vorgenommen und nicht ausschließlich eine transiente chemische Stimulierung verschiedener Signaltransduktionswege. Obwohl eine neuronale Entwicklung, vor allem unter Verwendung des NIM-2 durchaus erkennbar ist, scheint eine stabile Differenzierung durch den ausschließlichen Einsatz von *small molecules* nicht gewährleistet werden zu können. Für medizinische Anwendungen, wie beispielsweise eine Transplantation, sollte dennoch versucht werden, auf eine genetische Veränderung der Zellen zu verzichten. In diesem Fall könnte die Integration von *small molecule*-induzierten Zellen in ein entsprechendes neuronales Gewebe für den Erhalt neuronaler Eigenschaften und die weitere neuronale Entwicklung förderlich sein. Für neuronale *in vitro*-Studien sollte aufgrund der höheren Stabilität und deutlicher ausgeprägten neuronalen Reifung auf Transkriptionsfaktor-basierte Methoden zurückgegriffen werden. Um dabei eine weitere Vermehrung transfizierter Zellen zu gewährleisten, kann auf induzierbare Vektorsysteme zurückgegriffen werden. In diesen Vektorsystemen stünden die zu exprimierenden Transkriptionsfaktoren oder auch eine shRNA unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Auf diese Weise würde eine neuronale Differenzierung der Zellen und die damit verbundene Entwicklung eines nicht-proliferierenden Phänotyps erst durch gezielte Induktion eingeleitet. In allen Differenzierungsansätzen sollte eine Ko-Kultur mit Astrozyten nach der Induktion in Betracht gezogen werden, um den *in vivo* vorherrschenden Bedingungen möglichst nahezukommen.

5 Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M.P., Boeynaems, J.-M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M.T., King, B.F., Gachet, C., Jacobson, K.A. und Weisman, G.A., et al. (2003). Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24: 52-55. DOI: 10.1016/S0165-6147(02)00038-X.
- Abbracchio, M.P. und Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64: 445-475. DOI: 10.1016/0163-7258(94)00048-4.
- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.-M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C. und Jacobson, K.A., et al. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58: 281-341. DOI: 10.1124/pr.58.3.3.
- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. und Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32: 19-29. DOI: 10.1016/j.tins.2008.10.001.
- Abudara, V., Retamal, M.A., Del Rio, R. und Orellana, J.A. (2018). Synaptic Functions of Hemichannels and Pannexons: A Double-Edged Sword. *Front Mol Neurosci* 11: 435. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00435.
- Aguilera-Castrejon, A., Pasantes-Morales, H., Montesinos, J.J., Cortés-Medina, L.V., Castro-Manreza, M.E., Mayani, H. und Ramos-Mandujano, G. (2017). Improved Proliferative Capacity of NP-Like Cells Derived from Human Mesenchymal Stromal Cells and Neuronal Transdifferentiation by Small Molecules. *Neurochem Res* 42: 415-427. DOI: 10.1007/s11064-016-2086-7.
- Alexanian, A.R., Liu, Q.-s. und Zhang, Z. (2013). Enhancing the efficiency of direct reprogramming of human mesenchymal stem cells into mature neuronal-like cells with the combination of small molecule modulators of chromatin modifying enzymes, SMAD signaling and cyclic adenosine monophosphate levels. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 1633-1638. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.04.022.
- Allen, M.J., Gemel, J., Beyer, E.C. und Lal, R. (2011). Atomic force microscopy of Connexin40 gap junction hemichannels reveals calcium-dependent three-dimensional molecular topography and open-closed conformations of both the extracellular and cytoplasmic faces. *J Biol Chem* 286: 22139-22146. DOI: 10.1074/jbc.M111.240002.
- Anderson, C.M., Bergher, J.P. und Swanson, R.A. (2004). ATP-induced ATP release from astrocytes. *J Neurochem* 88: 246-256.
- Bahrami, N., Bayat, M., Mohamadnia, A., Khakbiz, M., Yazdankhah, M., Ai, J. und Ebrahimi-Barough, S. (2016). Purmorphamine as a Shh Signaling Activator Small Molecule Promotes Motor Neuron Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Cultured on Nanofibrous PCL Scaffold. *Mol Neurobiol*: 1-8. DOI: 10.1007/s12035-016-0090-1.

- Bai, D., del Corosso, C., Srinivas, M. und Spray, D.C. (2006). Block of specific gap junction channel subtypes by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1452-1458. DOI: 10.1124/jpet.106.112045.
- Bao, L., Sachs, F. und Dahl, G. (2004a). Connexins are mechanosensitive. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1389-95. DOI: 10.1152/ajpcell.00220.2004.
- Bao, X., Altenberg, G.A. und Reuss, L. (2004b). Mechanism of regulation of the gap junction protein connexin 43 by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C647-54. DOI: 10.1152/ajpcell.00295.2003.
- Bao, X., Reuss, L. und Altenberg, G.A. (2004c). Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by protein kinase C-mediated phosphorylation of Serine 368. *J Biol Chem* 279: 20058-20066. DOI: 10.1074/jbc.M311137200.
- Bari, C. de, Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. und Luyten, F.P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44: 1928-1942. DOI: 10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P.
- Barker, T.H., Grenett, H.E., MacEwen, M.W., Tilden, S.G., Fuller, G.M., Settleman, J., Woods, A., Murphy-Ullrich, J. und Hagoood, J.S. (2004). Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity. *Exp Cell Res* 295: 488-496. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.01.026.
- Barnett, M.W. und Larkman, P.M. (2007). The action potential. *Pract Neurol* 7: 192-197.
- Baroja-Mazo, A., Barberà-Cremades, M. und Pelegrin, P. (2013). The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1828: 79-93. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.01.002.
- Barry, F.P. und Murphy, J.M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 568-584. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.11.001.
- Bell, N., Hann, V., Redfern, C.P.F. und Cheek, T.R. (2013). Store-operated Ca(2+) entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1833: 643-651. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.11.025.
- Belluardo, N., Mudò, G., Trovato-Salinaro, A., Le Gurun, S., Charollais, A., Serre-Beinier, V., Amato, G., Haefliger, J.A., Meda, P. und Condorelli, D.F. (2000). Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res* 865: 121-138.
- Belousov, A.B., Fontes, J.D., Freitas-Andrade, M. und Naus, C.C. (2017). Gap junctions and hemichannels: communicating cell death in neurodevelopment and disease. *BMC Cell Biol* 18: 4. DOI: 10.1186/s12860-016-0120-x.
- Bennett, M.R. (1999). The early history of the synapse: from Plato to Sherrington. *Brain Res Bull* 50: 95-118. DOI: 10.1016/s0361-9230(99)00094-5.
- Bennett, M.V.L. und Zukin, R.S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron* 41: 495-511. DOI: 10.1016/s0896-6273(04)00043-1.

- Berridge, M.J. (2016). The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol Rev* 96: 1261-1296. DOI: 10.1152/physrev.00006.2016.
- Berry, L., Grant, M.E., McClure, J. und Rooney, P. (1992). Bone-marrow-derived chondrogenesis in vitro. *J Cell Sci* 101 (Pt 2): 333-342.
- Beyer, E.C., Paul, D.L. und Goodenough, D.A. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol* 105: 2621-2629.
- Bi, Y., Gong, M., Zhang, X., Zhang, X., Jiang, W., Zhang, Y., Chen, J., Liu, Y., He, T.-C. und Li, T. (2010). Pre-activation of retinoid signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Dev Growth Differ* 52: 419-431. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01182.x.
- Bittman, K., Owens, D.F., Kriegstein, A.R. und LoTurco, J.J. (1997). Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. *J Neurosci* 17: 7037-7044.
- Biver, G., Wang, N., Gartland, A., Orriss, I., Arnett, T.R., Boeynaems, J.-M. und Robaye, B. (2013). Role of the P2Y13 receptor in the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts and adipocytes. *Stem Cells* 31: 2747-2758. DOI: 10.1002/stem.1411.
- Bleasdale, J.E., Thakur, N.R., Gremban, R.S., Bundy, G.L., Fitzpatrick, F.A., Smith, R.J. und Bunting, S. (1990). Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 756-768.
- Bodi, E., Hurtado, S.P., Carvalho, M.A., Borojevic, R. und Carvalho, Antônio C Campos de (2004). Gap junctions in hematopoietic stroma control proliferation and differentiation of blood cell precursors. *An Acad Bras Cienc* 76: 743-756.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J. und Peppiatt, C.M. (2002). 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J* 16: 1145-1150. DOI: 10.1096/fj.02-0037rev.
- Brandao-Burch, A., Key, M.L., Patel, J.J., Arnett, T.R. und Orriss, I.R. (2012). The P2X7 Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 41. DOI: 10.3389/fendo.2012.00041.
- Broad Institute. GPP Web Portal. <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/clone/details?cloneId=TRCN0000231420>. 04.06.2019.
- Bruder, S.P., Ricalton, N.S., Boynton, R.E., Connolly, T.J., Jaiswal, N., Zaia, J. und Barry, F.P. (1998). Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 13: 655-663. DOI: 10.1359/jbmr.1998.13.4.655.
- Brun, J., Lutz, K.A., Neumayer, K.M.H., Klein, G., Seeger, T., Uynuk-Ool, T., Wörgötter, K., Schmid, S., Kraushaar, U. und Guenther, E., et al. (2015). Smooth Muscle-Like Cells Generated from Human Mesenchymal Stromal Cells Display Marker Gene Expression and Electrophysiological Competence

- Comparable to Bladder Smooth Muscle Cells. *PLoS One* 10: e0145153. DOI: 10.1371/journal.pone.0145153.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L. und De Flora A (2001). Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J* 15: 10-12. DOI: 10.1096/fj.00-0566fje.
- Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-1483. DOI: 10.1007/s00018-007-6497-0.
- Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7: 575-590. DOI: 10.1038/nrd2605.
- Burnstock, G. (2016). Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371. DOI: 10.1098/rstb.2015.0422.
- Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. und Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40: 668-688. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1970.tb10646.x.
- Burnstock, G. und Knight, G.E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240: 31-304. DOI: 10.1016/S0074-7696(04)40002-3.
- Burnstock, G. und Verkhratsky, A. (2009). Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf)* 195: 415-447. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x.
- Burnstock, G. und Verkhratsky, A. (2010). Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* 1: e9. DOI: 10.1038/cddis.2009.11.
- Burra, S. und Jiang, J.X. (2009). Connexin 43 hemichannel opening associated with Prostaglandin E(2) release is adaptively regulated by mechanical stimulation. *Commun Integr Biol* 2: 239-240.
- Burra, S. und Jiang, J.X. (2011). Regulation of cellular function by connexin hemichannels. *Int J Biochem Mol Biol* 2: 119-128.
- Burton, D.G.A. und Faragher, R.G.A. (2015). Cellular senescence: from growth arrest to immunogenic conversion. *Age (Dordr)* 37: 27. DOI: 10.1007/s11357-015-9764-2.
- Caiazzo, M., Dell'Anno, M.T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T.D., Menegon, A., Roncaglia, P. und Colciago, G., et al. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476: 224-227. DOI: 10.1038/nature10284.
- Calvert, J.A., Atterbury-Thomas, A.E., Leon, C., Forsythe, I.D., Gachet, C. und Evans, R.J. (2004). Evidence for P2Y1, P2Y2, P2Y6 and atypical UTP-sensitive receptors coupled to rises in intracellular calcium in mouse cultured superior cervical ganglion neurons and glia. *Br J Pharmacol* 143: 525-532. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705959.
- Camilleri, E.T., Gustafson, M.P., Dudakovic, A., Riestler, S.M., Garces, C.G., Paradise, C.R., Takai, H., Karperien, M., Cool, S. und Im Sampen, H.-J., et al. (2016). Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release

- criteria for good manufacturing practice-compliant production. *Stem Cell Res Ther* 7: 107. DOI: 10.1186/s13287-016-0370-8.
- Cao, N., Huang, Y., Zheng, J., Spencer, C.I., Zhang, Y., Fu, J.-D., Nie, B., Xie, M., Zhang, M. und Wang, H., et al. (2016). Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* 352: 1216-1220. DOI: 10.1126/science.aaf1502.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-650. DOI: 10.1002/jor.1100090504.
- Caplan, A.I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med* 6: 1445-1451. DOI: 10.1002/sctm.17-0051.
- Cavaliere, F., Donno, C. und D'Ambrosi, N. (2015). Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Front Cell Neurosci* 9: 211. DOI: 10.3389/fncel.2015.00211.
- Chen-Engerer, H.-J., Hartmann, J., Karl, R.M., Yang, J., Feske, S. und Konnerth, A. (2019). Two types of functionally distinct Ca²⁺ stores in hippocampal neurons. *Nat Commun* 10: 3223. DOI: 10.1038/s41467-019-11207-8.
- Cheng, A., Tang, H., Cai, J., Zhu, M., Zhang, X., Rao, M. und Mattson, M.P. (2004). Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. *Dev Biol* 272: 203-216. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.04.031.
- Cheng, L., Hu, W., Qiu, B., Zhao, J., Yu, Y., Guan, W., Wang, M., Yang, W. und Pei, G. (2014). Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* 24: 665-679. DOI: 10.1038/cr.2014.32.
- Cherian, P.P., Siller-Jackson, A.J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L.F., Sprague, E. und Jiang, J.X. (2005). Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 16: 3100-3106. DOI: 10.1091/mbc.E04-10-0912.
- Cheung, G., Chever, O. und Rouach, N. (2014). Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. *Front Cell Neurosci* 8: 348. DOI: 10.3389/fncel.2014.00348.
- Ciciarello, M., Zini, R., Rossi, L., Salvestrini, V., Ferrari, D., Manfredini, R. und Lemoli, R.M. (2013). Extracellular purines promote the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages. *Stem Cells Dev* 22: 1097-1111. DOI: 10.1089/scd.2012.0432.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M. und Verderio, C. (2003). Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278: 1354-1362. DOI: 10.1074/jbc.M209454200.
- Condorelli, D.F., Belluardo, N., Trovato-Salinaro, A. und Mudò, G. (2000). Expression of Cx36 in mammalian neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 72-85.
- Connor, B., Firmin, E., McCaughey-Chapman, A., Monk, R., Lee, K., Liot, S., Geiger, J., Rudolph, C. und Jones, K. (2018). Conversion of adult human fibroblasts into neural precursor cells using chemically modified mRNA. *Helvion* 4: e00918. DOI: 10.1016/j.helivon.2018.e00918.

- Connors, B.W. und Long, M.A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 27: 393-418. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131128.
- Coppi, E., Pugliese, A.M., Urbani, S., Melani, A., Cerbai, E., Mazzanti, B., Bosi, A., Saccardi, R. und Pedata, F. (2007). ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25: 1840-1849. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0669.
- Covas, D.T., Siufi, J.L.C., Silva, A.R.L. und Orellana, M.D. (2003). Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 36: 1179-1183. DOI: 10.1590/s0100-879x2003000900006.
- Curti, S., Hoge, G., Nagy, J.I. und Pereda, A.E. (2012). Synergy between electrical coupling and membrane properties promotes strong synchronization of neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus. *J Neurosci* 32: 4341-4359. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6216-11.2012.
- Czarnecka, J., Porowińska, D., Bajek, A., Hołysz, M. und Roszek, K. (2017). Neurogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Induces Alterations in Extracellular Nucleotides Metabolism. *J Cell Biochem* 118: 478-486. DOI: 10.1002/jcb.25664.
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T.D. und Malenka, R.C. (2004). Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42: 535-552. DOI: 10.1016/s0896-6273(04)00266-1.
- Delarasse, C., Gonnord, P., Galante, M., Auger, R., Daniel, H., Motta, I. und Kanellopoulos, J.M. (2009). Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem* 109: 846-857. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06008.x.
- Dermietzel, R. und Spray, D.C. (1993). Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci* 16: 186-192. DOI: 10.1016/0166-2236(93)90151-b.
- Díaz-Hernandez, M., Del Puerto, A., Díaz-Hernandez, J.I., Diez-Zaera, M., Lucas, J.J., Garrido, J.J. und Miras-Portugal, M.T. (2008). Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 121: 3717-3728. DOI: 10.1242/jcs.034082.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M. und Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80783-7.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. und Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- Dorshkind, K., Green, L., Godwin, A. und Fletcher, W.H. (1993). Connexin-43-type gap junctions mediate communication between bone marrow stromal cells. *Blood* 82: 38-45.
- Drouin-Ouellet, J., Lau, S., Brattås, P.L., Rylander Ottosson, D., Piracs, K., Grassi, D.A., Collins, L.M., Vuono, R., Andersson Sjöland, A. und Westergren-Thorsson, G., et al. (2017). REST suppression

- mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO Mol Med* 9: 1117-1131. DOI: 10.15252/emmm.201607471.
- Dürig, J., Rosenthal, C., Halfmeyer, K., Wiemann, M., Novotny, J., Bingmann, D., Dührsen, U. und Schirrmacher, K. (2000). Intercellular communication between bone marrow stromal cells and CD34+ haematopoietic progenitor cells is mediated by connexin 43-type gap junctions. *Br J Haematol* 111: 416-425. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2000.02385.x.
- Duval, N., Gomès, D., Calaora, V., Calabrese, A., Meda, P. und Bruzzone, R. (2002). Cell coupling and Cx43 expression in embryonic mouse neural progenitor cells. *J Cell Sci* 115: 3241-3251.
- Eisinger, B.E. und Zhao, X. (2017). Identifying molecular mediators of environmentally enhanced neurogenesis. *Cell Tissue Res*: 1-15. DOI: 10.1007/s00441-017-2718-5.
- Eltzschig, H.K., Eckle, T., Mager, A., Küper, N., Karcher, C., Weissmüller, T., Boengler, K., Schulz, R., Robson, S.C. und Colgan, S.P. (2006). ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99: 1100-1108. DOI: 10.1161/01.RES.0000250174.31269.70.
- Esseltine, J.L., Shao, Q., Huang, T., Kelly, J.J., Sampson, J. und Laird, D.W. (2015). Manipulating Cx43 expression triggers gene reprogramming events in dermal fibroblasts from oculodentodigital dysplasia patients. *Biochem J* 472: 55-69. DOI: 10.1042/BJ20150652.
- Eugenin, E.A., Basilio, D., Saez, J.C., Orellana, J.A., Raine, C.S., Bukauskas, F., Bennett, M.V.L. und Berman, J.W. (2012). The role of gap junction channels during physiologic and pathologic conditions of the human central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 7: 499-518. DOI: 10.1007/s11481-012-9352-5.
- Falk, M.M., Kumar, N.M. und Gilula, N.B. (1994). Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J Cell Biol* 127: 343-355.
- Fan, W., Li, J., Wang, Y., Pan, J., Li, S., Zhu, L., Guo, C. und Yan, Z. (2016). CD105 promotes chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells through Smad2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 474: 338-344. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.101.
- Feng, N., Han, Q., Li, J., Wang, S., Li, H., Yao, X. und Zhao, R.C. (2014). Generation of highly purified neural stem cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells by Sox1 activation. *Stem Cells Dev* 23: 515-529. DOI: 10.1089/scd.2013.0263.
- Ferrari, D., Gulinelli, S., Salvestrini, V., Lucchetti, G., Zini, R., Manfredini, R., Caione, L., Piacibello, W., Ciciarello, M. und Rossi, L., et al. (2011). Purinergic stimulation of human mesenchymal stem cells potentiates their chemotactic response to CXCL12 and increases the homing capacity and production of proinflammatory cytokines. *Exp Hematol* 39: 360-74, 374.e1-5. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.12.001.
- Fields, R.D. und Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7: 423-436. DOI: 10.1038/nrn1928.

- Fiori, M.C., Figueroa, V., Zoghbi, M.E., Saéz, J.C., Reuss, L. und Altenberg, G.A. (2012). Permeation of calcium through purified connexin 26 hemichannels. *J Biol Chem* 287: 40826-40834. DOI: 10.1074/jbc.M112.383281.
- Fiori, M.C., Krishnan, S., Kjellgren, A., Cuello, L.G. und Altenberg, G.A. (2017). Inhibition by Commercial Aminoglycosides of Human Connexin Hemichannels Expressed in Bacteria. *Molecules* 22. DOI: 10.3390/molecules22122063.
- Fortier, L.A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 34: 415-423. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x.
- Francis, D., Stergiopoulos, K., Ek-Vitorin, J.F., Cao, F.L., Taffet, S.M. und Delmar, M. (1999). Connexin diversity and gap junction regulation by pH. *Dev Genet* 24: 123-136. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6408(1999)24:1/2<123::AID-DVG12>3.0.CO;2-H.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. und Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3: 393-403. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.
- Fruscione, F., Scarfi, S., Ferraris, C., Bruzzone, S., Benvenuto, F., Guida, L., Uccelli, A., Salis, A., Usai, C. und Jacchetti, E., et al. (2011). Regulation of human mesenchymal stem cell functions by an autocrine loop involving NAD⁺ release and P2Y₁₁-mediated signaling. *Stem Cells Dev* 20: 1183-1198. DOI: 10.1089/scd.2010.0295.
- Fu, Y., Huang, C., Xu, X., Gu, H., Ye, Y., Jiang, C., Qiu, Z. und Xie, X. (2015). Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res* 25: 1013-1024. DOI: 10.1038/cr.2015.99.
- Galarreta, M. und Hestrin, S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402: 72-75. DOI: 10.1038/47029.
- Galarreta, M. und Hestrin, S. (2001a). Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci* 2: 425-433. DOI: 10.1038/35077566.
- Galarreta, M. und Hestrin, S. (2001b). Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science* 292: 2295-2299. DOI: 10.1126/science.1061395.
- Genet, N., Bhatt, N., Bourdieu, A. und Hirschi, K.K. (2018). Multifaceted Roles of Connexin 43 in Stem Cell Niches. *Curr Stem Cell Rep* 4: 1-12. DOI: 10.1007/s40778-018-0110-3.
- Gharibi, B., Abraham, A.A., Ham, J. und Evans, B.A.J. (2011). Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Res* 26: 2112-2124. DOI: 10.1002/jbmr.424.
- Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C.C. und Sáez, J.C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol* 4: 88. DOI: 10.3389/fphar.2013.00088.
- Gilula, N.B., Reeves, O.R. und Steinbach, A. (1972). Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. *Nature* 235: 262-265. DOI: 10.1038/235262a0.

- Glaser, T., Cappellari, A.R., Pillat, M.M., Iser, I.C., Wink, M.R., Battastini, A.M.O. und Ulrich, H. (2012). Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration. *Purinergic Signal* 8: 523-537. DOI: 10.1007/s11302-011-9282-3.
- Gnecchi, M. und Melo, L.G. (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol* 482: 281-294. DOI: 10.1007/978-1-59745-060-7_18.
- Goodenough, D.A., Goliger, J.A. und Paul, D.L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65: 475-502. DOI: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002355.
- Goodenough, D.A. und Paul, D.L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 285-294. DOI: 10.1038/nrm1072.
- Gulisano, M., Parenti, R., Spinella, F. und Cicirata, F. (2000). Cx36 is dynamically expressed during early development of mouse brain and nervous system. *Neuroreport* 11: 3823-3828.
- Gutnick, M.J. und Prince, D.A. (1981). Dye coupling and possible electrotonic coupling in the guinea pig neocortical slice. *Science* 211: 67-70.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 391: 85-100.
- Hammond, C. (2014). Cellular and Molecular Neurophysiology (Academic Press).
- Han, S.-M., Coh, Y.-R., Ahn, J.-O., Jang, G., Yum, S.Y., Kang, S.-K., Lee, H.-W. und Youn, H.-Y. (2015a). Enhanced hepatogenic transdifferentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells by gene engineering with Oct4 and Sox2. *PLoS One* 10: e0108874. DOI: 10.1371/journal.pone.0108874.
- Han, Y.-C., Lim, Y., Duffield, M.D., Li, H., Liu, J., Abdul Manaph, N.P., Yang, M., Keating, D.J. und Zhou, X.-F. (2015b). Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts to Neural Stem Cells by Small Molecules. *Stem Cells Int* 2016: 1-11. DOI: 10.1155/2016/4304916.
- Harris, A. und Locke, D. (2008). Connexins (Springer).
- Hartfield, E.M., Rinaldi, F., Glover, C.P., Wong, L.-F., Caldwell, M.A. und Uney, J.B. (2011). Connexin 36 expression regulates neuronal differentiation from neural progenitor cells. *PLoS One* 6: e14746. DOI: 10.1371/journal.pone.0014746.
- Hemptinne, I. de, Vermeiren, C., Maloteaux, J.-M. und Hermans, E. (2004). Induction of glial glutamate transporters in adult mesenchymal stem cells. *J Neurochem* 91: 155-166. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02709.x.
- Herbertson, A. und Aubin, J.E. (1997). Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures. *Bone* 21: 491-500.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M.O., Fiedler, J., Boehm, B.O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J. und Brenner, R., et al. (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 117: 4411-4422. DOI: 10.1242/jcs.01307.

- Herrup, K. und Yang, Y. (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* 8: 368-378. DOI: 10.1038/nrn2124.
- Ho, A.D., Wagner, W. und Franke, W. (2008). Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 10: 320-330. DOI: 10.1080/14653240802217011.
- Hoare, M., Greiser, U., Schu, S., Mashayekhi, K., Aydogan, E., Murphy, M., Barry, F., Ritter, T. und O'Brien, T. (2010). Enhanced lipoplex-mediated gene expression in mesenchymal stem cells using reiterated nuclear localization sequence peptides. *J Gene Med* 12: 207-218. DOI: 10.1002/jgm.1426.
- Hodgkin, A.L. und Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117: 500-544. DOI: 10.1111/(ISSN)1469-7793.
- Hoffmann, A., Floerkemeier, T., Melzer, C. und Hass, R. (2017). Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. *J Tissue Eng Regen Med* 11: 2565-2581. DOI: 10.1002/term.2153.
- Hoogduijn, M.J. und Lombardo, E. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stromal Cells Anno 2019: Dawn of the Therapeutic Era? *Stem Cells Transl Med*. DOI: 10.1002/sctm.19-0073.
- Hormuzdi, S.G., Filippov, M.A., Mitropoulou, G., Monyer, H. und Bruzzone, R. (2004). Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim Biophys Acta* 1662: 113-137. DOI: 10.1016/j.bbamem.2003.10.023.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S. und Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395. DOI: 10.1080/14653240500319234.
- Hu, W., Qiu, B., Guan, W., Wang, Q., Wang, M., Li, W., Gao, L., Shen, L., Huang, Y. und Xie, G., et al. (2015). Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell* 17: 204-212. DOI: 10.1016/j.stem.2015.07.006.
- Hur, E.-M. und Zhou, F.-Q. (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 11: 539-551. DOI: 10.1038/nrn2870.
- Hwang, D.W., Kwon, H.W., Jang, J., Jung, H.J., Kim, K.R. und Lee, D.-S. (2017). Neuron-Specific Fluorescence Reporter-Based Live Cell Tracing for Transdifferentiation of Mesenchymal Stem Cells into Neurons by Chemical Compound. *Stem Cells Int* 2017: 8452830. DOI: 10.1155/2017/8452830.
- Iacobas, D.A., Suadicani, S.O., Iacobas, S., Chrisman, C., Cohen, M.A., Spray, D.C. und Scemes, E. (2007). Gap junction and purinergic P2 receptor proteins as a functional unit: insights from transcriptomics. *J Membr Biol* 217: 83-91. DOI: 10.1007/s00232-007-9039-7.
- Izgi, K., Sonmez, M.F., Canatan, H. und Iskender, B. (2017). Long Term Exposure to Myrtucommulone-A Changes CD105 Expression and Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Regen Med* 14: 113-121. DOI: 10.1007/s13770-016-0020-3.

- Ji, W., Álvarez, Z., Edelbrock, A.N., Sato, K. und Stupp, S.I. (2018). Bioactive Nanofibers Induce Neural Transdifferentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 10: 41046-41055. DOI: 10.1021/acsami.8b13653.
- Jiang, J.X. und Cherian, P.P. (2003). Hemichannels formed by connexin 43 play an important role in the release of prostaglandin E(2) by osteocytes in response to mechanical strain. *Cell Commun Adhes* 10: 259-264.
- Jiang, L.-H., Hao, Y., Mousawi, F., Peng, H. und Yang, X. (2017a). Expression of P2 Purinergic Receptors in Mesenchymal Stem Cells and Their Roles in Extracellular Nucleotide Regulation of Cell Functions. *J Cell Physiol* 232: 287-297. DOI: 10.1002/jcp.25484.
- Jiang, L.-H., Mousawi, F., Yang, X. und Roger, S. (2017b). ATP-induced Ca²⁺-signalling mechanisms in the regulation of mesenchymal stem cell migration. *Cell Mol Life Sci* 74: 3697-3710. DOI: 10.1007/s00018-017-2545-6.
- Jiang, S., Yuan, H., Duan, L., Cao, R., Gao, B., Xiong, Y.-F. und Rao, Z.-R. (2011). Glutamate release through connexin 43 by cultured astrocytes in a stimulated hypertonicity model. *Brain Res* 1392: 8-15. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.03.056.
- Jiang, X., Shen, S., Cadwell, C.R., Berens, P., Sinz, F., Ecker, A.S., Patel, S. und Tolias, A.S. (2015). Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science* 350: aac9462. DOI: 10.1126/science.aac9462.
- Johnstone, S.A., Liley, M., Dalby, M.J. und Barnett, S.C. (2015). Comparison of human olfactory and skeletal MSCs using osteogenic nanotopography to demonstrate bone-specific bioactivity of the surfaces. *Acta Biomater* 13: 266-276. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.11.027.
- Jopling, C., Boue, S. und Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 79-89. DOI: 10.1038/nrm3043.
- Jungwirth, N., Salinas Tejedor, L., Jin, W., Gudi, V., Skripuletz, T., Stein, V.M., Tipold, A., Hoffmann, A., Stangel, M. und Baumgärtner, W., et al. (2018). Mesenchymal Stem Cells Form 3D Clusters Following Intraventricular Transplantation. *J Mol Neurosci* 65: 60-73. DOI: 10.1007/s12031-018-1070-x.
- Kaiser, R.E. und Gottschalk, G. (1972). Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten. Soforthilfe f. statist. Tests mit wenigen Messdaten (Mannheim, Wien, Zürich: Bibliographisches Institut).
- Kar, R., Batra, N., Riquelme, M.A. und Jiang, J.X. (2012). Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch Biochem Biophys* 524: 2-15. DOI: 10.1016/j.abb.2012.03.008.
- Karagas, N.E. und Venkatachalam, K. (2019). Roles for the Endoplasmic Reticulum in Regulation of Neuronal Calcium Homeostasis. *Cells* 8. DOI: 10.3390/cells8101232.
- Katebi, M., Soleimani, M. und Cronstein, B.N. (2009). Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *J Leukoc Biol* 85: 438-444. DOI: 10.1189/jlb.0908520.

- Kawano, S., Otsu, K., Kuruma, A., Shoji, S., Yanagida, E., Muto, Y., Yoshikawa, F., Hirayama, Y., Mikoshiba, K. und Furuichi, T. (2006). ATP autocrine/paracrine signaling induces calcium oscillations and NFAT activation in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 39: 313-324. DOI: 10.1016/j.ceca.2005.11.008.
- Kawano, S., Shoji, S., Ichinose, S., Yamagata, K., Tagami, M. und Hiraoka, M. (2002). Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 32: 165-174. DOI: 10.1016/s0143416002001240.
- Kempermann, G., Song, H. und Gage, F.H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a018812. DOI: 10.1101/cshperspect.a018812.
- Khakh, B.S. (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* 2: 165-174. DOI: 10.1038/35058521.
- Kim, D.Y., Kam, Y., Koo, S.K. und Joe, C.O. (1999). Gating connexin 43 channels reconstituted in lipid vesicles by mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 274: 5581-5587.
- Kim, J., Efe, J.A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., Lipton, S.A., Zhang, K. und Ding, S. (2011). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *PNAS* 108: 7838-7843. DOI: 10.1073/pnas.1103113108.
- Kim, N.R., Kang, S.K., Ahn, H.H., Kwon, S.W., Park, W.S., Kim, K.S., Kim, S.S., Jung, H.J., Choi, S.U. und Ahn, J.H., et al. (2009). Discovery of a new and efficient small molecule for neuronal differentiation from mesenchymal stem cell. *J Med Chem* 52: 7931-7933. DOI: 10.1021/jm9015558.
- Köles, L., Gerevich, Z., Oliveira, J.F., Zadori, Z.S., Wirkner, K. und Illes, P. (2008). Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377: 1-33. DOI: 10.1007/s00210-007-0222-2.
- Koyanagi, M., Takahashi, J., Arakawa, Y., Doi, D., Fukuda, H., Hayashi, H., Narumiya, S. und Hashimoto, N. (2008). Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *J Neurosci Res* 86: 270-280. DOI: 10.1002/jnr.21502.
- Krabbe, C., Zimmer, J. und Meyer, M. (2005). Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells-a critical review. *APMIS* 113: 831-844. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm_3061.x.
- Kumar, N.M. und Gilula, N.B. (1992). Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Semin Cell Biol* 3: 3-16.
- Kuznetsov, S.A., Krebsbach, P.H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D. und Robey, P.G. (1997). Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 12: 1335-1347. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.9.1335.
- Kwon, H.J. (2012). Extracellular ATP signaling via P2X(4) receptor and cAMP/PKA signaling mediate ATP oscillations essential for prechondrogenic condensation. *J Endocrinol* 214: 337-348. DOI: 10.1530/JOE-12-0131.

- Ladewig, J., Koch, P. und Brüstle, O. (2013). Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 225-236. DOI: 10.1038/nrm3543.
- Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., Herms, S., Wernet, P., Kögler, G. und Müller, F.-J., et al. (2012). Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat Methods* 9: 575-578. DOI: 10.1038/nmeth.1972.
- Lai, P.-L., Lin, H., Chen, S.-F., Yang, S.-C., Hung, K.-H., Chang, C.-F., Chang, H.-Y., Lu, F.L., Lee, Y.-H. und Liu, Y.-C., et al. (2017). Efficient Generation of Chemically Induced Mesenchymal Stem Cells from Human Dermal Fibroblasts. *Sci Rep* 7: 44534. DOI: 10.1038/srep44534.
- Lakatta, E.G., Maltsev, V.A. und Vinogradova, T.M. (2010). A coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ Res* 106: 659-673. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206078.
- Le Blanc, K. und Pittenger, M. (2005). Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 7: 36-45. DOI: 10.1080/14653240510018118.
- Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.-M., Lee, K.-D., Hsieh, S.-L. und Chen, T.-H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103: 1669-1675. DOI: 10.1182/blood-2003-05-1670.
- Lemcke, H. und Kuznetsov, S.A. (2013). Involvement of connexin43 in the EGF/EGFR signalling during self-renewal and differentiation of neural progenitor cells. *Cell Signal* 25: 2676-2684. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.08.030.
- Lemcke, H., Nittel, M.-L., Weiss, D.G. und Kuznetsov, S.A. (2013). Neuronal differentiation requires a biphasic modulation of gap junctional intercellular communication caused by dynamic changes of connexin43 expression. *Eur J Neurosci* 38: 2218-2228. DOI: 10.1111/ejn.12219.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B. und McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585-595.
- Levi, B., Wan, D.C., Glotzbach, J.P., Hyun, J., Januszyk, M., Montoro, D., Sorkin, M., James, A.W., Nelson, E.R. und Li, S., et al. (2011). CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling. *J Biol Chem* 286: 39497-39509. DOI: 10.1074/jbc.M111.256529.
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F. und Zhuang, Q., et al. (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7: 51-63. DOI: 10.1016/j.stem.2010.04.014.
- Li, X. und Jin, P. (2010). Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nat Rev Neurosci* 11: 329-338. DOI: 10.1038/nrn2739.
- Li, X., Zuo, X., Jing, J., Ma, Y., Wang, J., Liu, D., Zhu, J., Du, X., Xiong, L. und Du, Y., et al. (2015). Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell* 17: 195-203. DOI: 10.1016/j.stem.2015.06.003.

- Liu, H. und Song, N. (2016). Molecular Mechanism of Adult Neurogenesis and its Association with Human Brain Diseases. *J Cent Nerv Syst Dis* 8: 5-11. DOI: 10.4137/JCNSD.S32204.
- Liu, J., Song, L., Jiang, C., Liu, Y., George, J., Ye, H. und Cui, Z. (2012). Electrophysiological properties and synaptic function of mesenchymal stem cells during neurogenic differentiation - a mini-review. *Int J Artif Organs* 35: 323-337. DOI: 10.5301/ijao.5000085.
- Liu, M.-L., Zang, T., Zou, Y., Chang, J.C., Gibson, J.R., Huber, K.M. und Zhang, C.-L. (2013). Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat Commun* 4: 2183. DOI: 10.1038/ncomms3183.
- Lo Turco, J.J. und Kriegstein, A.R. (1991). Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. *Science* 252: 563-566.
- Lu, P., Blesch, A. und Tuszynski, M.H. (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* 77: 174-191. DOI: 10.1002/jnr.20148.
- Lv, F.-J., Tuan, R.S., Cheung, K.M.C. und Leung, V.Y.L. (2014). Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 32: 1408-1419. DOI: 10.1002/stem.1681.
- Ma, K., Fox, L., Shi, G., Shen, J., Liu, Q., Pappas, J.D., Cheng, J. und Qu, T. (2011). Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Neurol Res* 33: 1083-1093. DOI: 10.1179/1743132811Y.0000000053.
- Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y. und Tsukihara, T. (2009). Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* 458: 597-602. DOI: 10.1038/nature07869.
- Maeda, S. und Tsukihara, T. (2011). Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell Mol Life Sci* 68: 1115-1129. DOI: 10.1007/s00018-010-0551-z.
- Maier, T., Güell, M. und Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 583: 3966-3973. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.10.036.
- Maleki, M., Ghanbarvand, F., Reza Behvarz, M., Ejtemaei, M. und Ghadirkhomi, E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells* 7: 118-126. DOI: 10.15283/ijsc.2014.7.2.118.
- Manchanda, R., Appukuttan, S. und Padmakumar, M. (2019). Electrophysiology of Syncytial Smooth Muscle. *J Exp Neurosci* 13: 1179069518821917. DOI: 10.1177/1179069518821917.
- Marger, L., Mesirca, P., Alig, J., Torrente, A., Dubel, S., Engeland, B., Kanani, S., Fontanaud, P., Striessnig, J. und Shin, H.-S., et al. (2011). Pacemaker activity and ionic currents in mouse atrioventricular node cells. *Channels (Austin)* 5: 241-250. DOI: 10.4161/chan.5.3.15264.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N. und Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466: 829-834. DOI: 10.1038/nature09262.

- Miladpour, B., Rasti, M., Owji, A.A., Mostafavipour, Z., Khoshdel, Z., Noorafshan, A. und Zal, F. (2017). Quercetin potentiates transdifferentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into the beta cells in vitro. *J Endocrinol Invest* 40: 513-521. DOI: 10.1007/s40618-016-0592-8.
- Moore, A.R., Zhou, W.-L., Sirois, C.L., Belinsky, G.S., Zecevic, N. und Antic, S.D. (2014). Connexin hemichannels contribute to spontaneous electrical activity in the human fetal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: E3919-28. DOI: 10.1073/pnas.1405253111.
- Moraes, D.A., Sibov, T.T., Pavon, L.F., Alvim, P.Q., Bonadio, R.S., Da Silva, J.R., Pic-Taylor, A., Toledo, O.A., Marti, L.C. und Azevedo, R.B., et al. (2016). A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 7: 97. DOI: 10.1186/s13287-016-0359-3.
- Murugan Girija, D., Kalachaveedu, M., Ranga Rao, S. und Subbarayan, R. (2018). Transdifferentiation of human gingival mesenchymal stem cells into functional keratinocytes by *Acalypha indica* in three-dimensional microenvironment. *J Cell Physiol* 233: 8450-8457. DOI: 10.1002/jcp.26807.
- Neary, J.T., Rathbone, M.P., Cattabeni, F., Abbracchio, M.P. und Burnstock, G. (1996). Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci* 19: 13-18.
- Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J.W., Reits, E., Janssen, L. und Neefjes, J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434: 83-88. DOI: 10.1038/nature03290.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S. und Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720. DOI: 10.1038/35055553.
- Noronha-Matos, J.B., Coimbra, J., Sá-e-Sousa, A., Rocha, R., Marinhas, J., Freitas, R., Guerra-Gomes, S., Ferreira, F., Costa, M.A. und Correia-de-Sá, P. (2014). P2X7-induced zeiosis promotes osteogenic differentiation and mineralization of postmenopausal bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FASEB J* 28: 5208-5222. DOI: 10.1096/fj.14-257923.
- North, R.A. (1996). Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr Opin Cell Biol* 8: 474-483. DOI: 10.1016/s0955-0674(96)80023-8.
- North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013-1067. DOI: 10.1152/physrev.00015.2002.
- Ode, A., Schoon, J., Kurtz, A., Gaetjen, M., Ode, J.E., Geissler, S. und Duda, G.N. (2013). CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater* 25: 37-47.
- Ohshima, Y., Tsukimoto, M., Takenouchi, T., Harada, H., Suzuki, A., Sato, M., Kitani, H. und Kojima, S. (2010). gamma-Irradiation induces P2X(7) receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1800: 40-46. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.10.008.

- Oliveira, S.L.B., Trujillo, C.A., Negraes, P.D. und Ulrich, H. (2015). Effects of ATP and NGF on Proliferation and Migration of Neural Precursor Cells. *Neurochem Res* 40: 1849-1857. DOI: 10.1007/s11064-015-1674-2.
- Oliver, D., Baukrowitz, T. und Fakler, B. (2000). Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem* 267: 5824-5829. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01669.x.
- Orellana, J.A., Martinez, A.D. und Retamal, M.A. (2013). Gap junction channels and hemichannels in the CNS: regulation by signaling molecules. *Neuropharmacology* 75: 567-582. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.02.020.
- Orriss, I.R., Burnstock, G. und Arnett, T.R. (2010). Purinergic signalling and bone remodelling. *Curr Opin Pharmacol* 10: 322-330. DOI: 10.1016/j.coph.2010.01.003.
- Pacini, S. und Petrini, I. (2014). Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. *Front Cell Dev Biol* 2: 20. DOI: 10.3389/fcell.2014.00020.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R. und Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425: 479-494. DOI: 10.1002/1096-9861(20001002)425:4<479::aid-cne2>3.0.co;2-3.
- Pang, Z.P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D.R., Yang, T.Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S. und Südhof, T.C., et al. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476: 220-223. DOI: 10.1038/nature10202.
- Pardal, R. und López Barneo, J. (2016). Mature neurons modulate neurogenesis through chemical signals acting on neural stem cells. *Dev Growth Differ* 58: 456-462. DOI: 10.1111/dgd.12283.
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., Zhang, L., Di, C.-G., Liu, X.-M., Shao, Y., Ma, B.-F., Lee, J.-H. und Ha, K.-S., et al. (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 28: 2162-2171. DOI: 10.1002/stem.541.
- Park, G., Yoon, B.S., Kim, Y.S., Choi, S.-C., Moon, J.-H., Kwon, S., Hwang, J., Yun, W., Kim, J.-H. und Park, C.-Y., et al. (2015). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocyte-like cells using small molecule treatments. *Biomaterials* 54: 201-212. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.029.
- Paul, D.L., Ebihara, L., Takemoto, L.J., Swenson, K.I. und Goodenough, D.A. (1991). Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* 115: 1077-1089.
- Pearson, R.A., Dale, N., Llaudet, E. und Mobbs, P. (2005). ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46: 731-744. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.024.
- Pellegatti, P., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R. und Di Virgilio, F. (2005). A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell* 16: 3659-3665. DOI: 10.1091/mbc.E05-03-0222.
- Peng, H., Hao, Y., Mousawi, F., Roger, S., Li, J., Sim, J.A., Ponnambalam, S., Yang, X. und Jiang, L.-H. (2016). Purinergic and Store-Operated Ca²⁺ Signaling Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells

- and Their Roles in ATP-Induced Stimulation of Cell Migration. *Stem Cells* 34: 2102-2114. DOI: 10.1002/stem.2370.
- Pennarossa, G., Maffei, S., Campagnol, M., Rahman, M.M., Brevini, T.A.L. und Gandolfi, F. (2014). Reprogramming of pig dermal fibroblast into insulin secreting cells by a brief exposure to 5-azacytidine. *Stem Cell Rev Rep* 10: 31-43. DOI: 10.1007/s12015-013-9477-9.
- Peppiatt, C.M., Collins, T.J., Mackenzie, L., Conway, S.J., Holmes, A.B., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Seo, J.T. und Roderick, H.L. (2003). 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium* 34: 97-108. DOI: 10.1016/s0143-4160(03)00026-5.
- Pereda, A.E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci* 15: 250-263. DOI: 10.1038/nrn3708.
- Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Björklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J. und Parmar, M. (2011). Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 10343-10348. DOI: 10.1073/pnas.1105135108.
- Phinney, D.G. (2012). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem* 113: 2806-2812. DOI: 10.1002/jcb.24166.
- 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. und Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.
- Poltavtseva, R.A., Nikonova, Y.A., Selezneva, I.I., Yaroslavtseva, A.K., Stepanenko, V.N., Esipov, R.S., Pavlovich, S.V., Klimantsev, I.V., Tyutyunnik, N.V. und Grebennik, T.K., et al. (2014). Mesenchymal stem cells from human dental pulp: isolation, characteristics, and potencies of targeted differentiation. *Bull Exp Biol Med* 158: 164-169. DOI: 10.1007/s10517-014-2714-7.
- Potapova, I., Plotnikov, A., Lu, Z., Danilo, P., Valiunas, V., Qu, J., Doronin, S., Zuckerman, J., Shlapakova, I.N. und Gao, J., et al. (2004). Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res* 94: 952-959. DOI: 10.1161/01.RES.0000123827.60210.72.
- Qin, H., Zhao, A. und Fu, X. (2017). Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cell Mol Life Sci* 74: 3553-3575. DOI: 10.1007/s00018-017-2586-x.
- Qin, Y., Zhou, C., Wang, N., Yang, H. und Gao, W.-Q. (2015). Conversion of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells to Neural Stem Cell-Like Cells by a Single Transcription Factor, Sox2. *Cell Reprogram* 17: 221-226. DOI: 10.1089/cell.2015.0001.
- Quist, A.P., Rhee, S.K., Lin, H. und Lal, R. (2000). Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *J Cell Biol* 148: 1063-1074.
- Qyang, Y., Martin-Puig, S., Chiravuri, M., Chen, S., Xu, H., Bu, L., Jiang, X., Lin, L., Granger, A. und Moretti, A., et al. (2007). The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are

- controlled by a Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Stem Cell* 1: 165-179. DOI: 10.1016/j.stem.2007.05.018.
- Ralevic, V. und Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492.
- Rana, S. und Dringen, R. (2007). Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 415: 45-48. DOI: 10.1016/j.neulet.2006.12.043.
- Ren, J. und Bertrand, P.P. (2008). Purinergic receptors and synaptic transmission in enteric neurons. *Purinergic Signal* 4: 255-266. DOI: 10.1007/s11302-007-9088-5.
- Retamal, M.A. (2014). Connexin and Pannexin hemichannels are regulated by redox potential. *Front Physiol* 5: 80. DOI: 10.3389/fphys.2014.00080.
- Revel, J.P. und Karnovsky, M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 33: C7-C12.
- Riddle, R.C., Hippe, K.R. und Donahue, H.J. (2008). Chemotransport contributes to the effect of oscillatory fluid flow on human bone marrow stromal cell proliferation. *J Orthop Res* 26: 918-924. DOI: 10.1002/jor.20637.
- Riddle, R.C., Taylor, A.F., Rogers, J.R. und Donahue, H.J. (2007). ATP release mediates fluid flow-induced proliferation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 22: 589-600. DOI: 10.1359/jbmr.070113.
- Rinaldi, F., Hartfield, E.M., Crompton, L.A., Badger, J.L., Glover, C.P., Kelly, C.M., Rosser, A.E., Uney, J.B. und Caldwell, M.A. (2014). Cross-regulation of Connexin43 and \beta-catenin influences differentiation of human neural progenitor cells. *Cell Death Dis* 5: e1017. DOI: 10.1038/cddis.2013.546.
- Ripps, H., Qian, H. und Zakevicius, J. (2004). Properties of connexin26 hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *Cell Mol Neurobiol* 24: 647-665.
- Rosendaal, M., Mayen, A., Koning, A. de, Dunina-Barkovskaya, T., Krenács, T. und Ploemacher, R. (1997). Does transmembrane communication through gap junctions enable stem cells to overcome stromal inhibition? *Leukemia* 11: 1281-1289. DOI: 10.1038/sj.leu.2400744.
- Rossi, L., Manfredini, R., Bertolini, F., Ferrari, D., Fogli, M., Zini, R., Salati, S., Salvestrini, V., Gulinelli, S. und Adinolfi, E., et al. (2007). The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood* 109: 533-542. DOI: 10.1182/blood-2006-01-035634.
- Roszek, K. und Wujak, M. (2018). How to influence the mesenchymal stem cells fate? Emerging role of ectoenzymes metabolizing nucleotides. *J Cell Physiol* 234: 320-334. DOI: 10.1002/jcp.26904.
- Rozental, R., Srinivas, M., Gökhan, S., Urban, M., Dermietzel, R., Kessler, J.A., Spray, D.C. und Mehler, M.F. (2000). Temporal expression of neuronal connexins during hippocampal ontogeny. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 57-71.

- Ryu, J.K., Choi, H.B., Hatori, K., Heisel, R.L., Pelech, S.L., McLarnon, J.G. und Kim, S.U. (2003). Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: Role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. *J Neurosci Res* 72: 352-362. DOI: 10.1002/jnr.10507.
- Saalbach, A. und Anderegg, U. (2019). Thy-1: more than a marker for mesenchymal stromal cells. *FASEB J* 33: 6689-6696. DOI: 10.1096/fj.201802224R.
- Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D. und Beyer, E.C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83: 1359-1400. DOI: 10.1152/physrev.00007.2003.
- Saez, J.C. und Leybaert, L. (2014). Hunting for connexin hemichannels. *FEBS Lett.* DOI: 10.1016/j.febslet.2014.03.004.
- Saez, J.C., Retamal, M.A., Basilio, D., Bukauskas, F.F. und Bennett, M.V.L. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1711: 215-224. DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.01.014.
- Saul, A., Hausmann, R., Kless, A. und Nicke, A. (2013). Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front Cell Neurosci* 7: 250. DOI: 10.3389/fncel.2013.00250.
- Sayed, N., Wong, W.T., Ospino, F., Meng, S., Lee, J., Jha, A., Dexheimer, P., Aronow, B.J. und Cooke, J.P. (2015). Transdifferentiation of human fibroblasts to endothelial cells: role of innate immunity. *Circulation* 131: 300-309. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007394.
- Scarfi, S. (2014). Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World J Stem Cells* 6: 153-162. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i2.153.
- Scemes, E., Spray, D.C. und Meda, P. (2009). Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemichannels". *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 457: 1207-1226. DOI: 10.1007/s00424-008-0591-5.
- Schadzek, P., Hermes, D., Stahl, Y., Dilger, N. und Ngezahayo, A. (2018). Concatenation of Human Connexin26 (hCx26) and Human Connexin46 (hCx46) for the Analysis of Heteromeric Gap Junction Hemichannels and Heterotypic Gap Junction Channels. *Int J Mol Sci* 19: 2742. DOI: 10.3390/ijms19092742.
- Schajnovitz, A., Itkin, T., D'Uva, G., Kalinkovich, A., Golan, K., Ludin, A., Cohen, D., Shulman, Z., Avigdor, A. und Nagler, A., et al. (2011). CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions. *Nat Immunol* 12: 391-398. DOI: 10.1038/ni.2017.
- Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Orellana, J.A. und Saez, J.C. (2008a). Currently used methods for identification and characterization of hemichannels. *Cell Commun Adhes* 15: 207-218. DOI: 10.1080/15419060802014198.
- Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Retamal, M.A., Shoji, K.F., Martinez, A.D. und Saez, J.C. (2008b). Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free [Ca²⁺]_i responses. *Mol Biol Cell* 19: 3501-3513. DOI: 10.1091/mbc.E07-12-1240.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S. und Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Schock, S.C., Leblanc, D., Hakim, A.M. und Thompson, C.S. (2008). ATP release by way of connexin 36 hemichannels mediates ischemic tolerance in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 138-144. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.01.054.
- Schrobbach, K., Klein, T.J. und Woodfield, T.B.F. (2015). The importance of connexin hemichannels during chondroprogenitor cell differentiation in hydrogel versus microtissue culture models. *Tissue Eng Part A* 21: 1785-1794. DOI: 10.1089/ten.TEA.2014.0691.
- Shao, Q., Esseltine, J.L., Huang, T., Novielli-Kuntz, N., Ching, J.E., Sampson, J. und Laird, D.W. (2019). Connexin43 is Dispensable for Early Stage Human Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation But is Protective against Cell Senescence. *Biomolecules* 9. DOI: 10.3390/biom9090474.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.-M., Goderie, S.K., Roysam, B. und Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3: 289-300. DOI: 10.1016/j.stem.2008.07.026.
- Shi, Q., Gu, S., Yu, X.S., White, T.W., Banks, E.A. und Jiang, J.X. (2015). Connexin Controls Cell-Cycle Exit and Cell Differentiation by Directly Promoting Cytosolic Localization and Degradation of E3 Ligase Skp2. *Dev Cell* 35: 483-496. DOI: 10.1016/j.devcel.2015.10.014.
- Shin, J., Berg, D.A., Zhu, Y., Shin, J.Y., Song, J., Bonaguidi, M.A., Enikolopov, G., Nauen, D.W., Christian, K.M. und Ming, G.-l., et al. (2015). Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell* 17: 360-372. DOI: 10.1016/j.stem.2015.07.013.
- Silva, W.A., Covas, D.T., Panepucci, R.A., Proto Siqueira, R., Siufi, J.L.C., Zanette, D.L., Santos, A.R.D. und Zago, M.A. (2003). The Profile of Gene Expression of Human Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 21: 661-669. DOI: 10.1634/stemcells.21-6-661.
- Söhl, G., Maxeiner, S. und Willecke, K. (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6: 191-200. DOI: 10.1038/nrn1627.
- Söhl, G. und Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228-232. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.11.013.
- Soldner, F. und Jaenisch, R. (2018). Stem Cells, Genome Editing, and the Path to Translational Medicine. *Cell* 175: 615-632. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.010.
- Song, H., Stevens, C.F. und Gage, F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417: 39-44. DOI: 10.1038/417039a.
- Sonntag, S., Söhl, G., Dobrowolski, R., Zhang, J., Theis, M., Winterhager, E., Bukauskas, F.F. und Willecke, K. (2009). Mouse lens connexin23 (Gj1) does not form functional gap junction channels

- but causes enhanced ATP release from HeLa cells. *Eur J Cell Biol* 88: 65-77. DOI: 10.1016/j.ejcb.2008.08.004.
- Sosinsky, G.E. und Nicholson, B.J. (2005). Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 1711: 99-125. DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.04.001.
- Stridh, M.H., Correa, F., Nodin, C., Weber, S.G., Blomstrand, F., Nilsson, M. und Sandberg, M. (2010). Enhanced glutathione efflux from astrocytes in culture by low extracellular Ca²⁺ and curcumin. *Neurochem Res* 35: 1231-1238. DOI: 10.1007/s11064-010-0179-2.
- Stridh, M.H., Tranberg, M., Weber, S.G., Blomstrand, F. und Sandberg, M. (2008). Stimulated efflux of amino acids and glutathione from cultured hippocampal slices by omission of extracellular calcium: likely involvement of connexin hemichannels. *J Biol Chem* 283: 10347-10356. DOI: 10.1074/jbc.M704153200.
- Su, X., Chen, J.-J., Liu, L.-Y., Huang, Q., Zhang, L.-Z., Li, X.-Y., He, X.-N., Lu, W., Sun, S. und Li, H., et al. (2017). Neonatal CX26 removal impairs neocortical development and leads to elevated anxiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: 3228-3233. DOI: 10.1073/pnas.1613237114.
- Suadicani, S.O., Brosnan, C.F. und Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci* 26: 1378-1385. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3902-05.2006.
- Sun, D., Junger, W.G., Yuan, C., Zhang, W., Bao, Y., Qin, D., Wang, C., Tan, L., Qi, B. und Zhu, D., et al. (2013). Shockwaves induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through ATP release and activation of P2X7 receptors. *Stem Cells* 31: 1170-1180. DOI: 10.1002/stem.1356.
- Swayne, L.A. und Bennett, S.A.L. (2016). Connexins and pannexins in neuronal development and adult neurogenesis. *BMC Cell Biol* 17 Suppl 1: 10. DOI: 10.1186/s12860-016-0089-5.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T. und Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem* 281: 21362-21368. DOI: 10.1074/jbc.M600504200.
- Talaverón, R., Fernández, P., Escamilla, R., Pastor, A.M., Matarredona, E.R. und Sáez, J.C. (2015). Neural progenitor cells isolated from the subventricular zone present hemichannel activity and form functional gap junctions with glial cells. *Front Cell Neurosci* 9: 411. DOI: 10.3389/fncel.2015.00411.
- Talele, N.P., Fradette, J., Davies, J.E., Kapus, A. und Hinz, B. (2015). Expression of α -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* 4: 1016-1030. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.05.004.
- Tang, Y. und Illes, P. (2017). Regulation of adult neural progenitor cell functions by purinergic signaling. *Glia* 65: 213-230. DOI: 10.1002/glia.23056.

- Taran, R., Mamidi, M.K., Singh, G., Dutta, S., Parhar, I.S., John, J.P., Bhonde, R., Pal, R. und Das, A.K. (2014). In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci* 39: 157-169.
- Taruno, A. (2018). ATP Release Channels. *Int J Mol Sci* 19. DOI: 10.3390/ijms19030808.
- Thier, M., Wörsdörfer, P., Lakes, Y.B., Gorris, R., Herms, S., Opitz, T., Seiferling, D., Quandt, T., Hoffmann, P. und Nöthen, M.M., et al. (2012). Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* 10: 473-479. DOI: 10.1016/j.stem.2012.03.003.
- Thimm, J., Mechler, A., Lin, H., Rhee, S. und Lal, R. (2005). Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels. *J Biol Chem* 280: 10646-10654. DOI: 10.1074/jbc.M412749200.
- Thompson, R.J. und MacVicar, B.A. (2008). Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2: 81-86. DOI: 10.4161/chan.2.2.6003.
- Tian, E., Sun, G., Sun, G., Chao, J., Ye, P., Warden, C., Riggs, A.D. und Shi, Y. (2016). Small-Molecule-Based Lineage Reprogramming Creates Functional Astrocytes. *Cell Rep* 16: 781-792. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.06.042.
- Todorova, M.G., Soria, B. und Quesada, I. (2008). Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state. *J Cell Physiol* 214: 354-362. DOI: 10.1002/jcp.21203.
- Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Massy, M., Mortier, C., Delforge, A. und Bron, D. (2004). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72: 319-326. DOI: 10.1111/j.1432-0436.2004.07207003.x.
- Trexler, E.B., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V., Bargiello, T.A. und Verselis, V.K. (1999). Rapid and direct effects of pH on connexins revealed by the connexin46 hemichannel preparation. *J Gen Physiol* 113: 721-742.
- Tsao, H.-K., Chiu, P.-H. und Sun, S.H. (2013). PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Cell Death Dis* 4: e751. DOI: 10.1038/cddis.2013.274.
- Tse, M.K., Hung, T.S., Chan, C.M., Wong, T., Dorothea, M., Leclerc, C., Moreau, M., Miller, A.L. und Webb, S.E. (2018). Identification of Ca²⁺ signaling components in neural stem/progenitor cells during differentiation into neurons and glia in intact and dissociated zebrafish neurospheres. *Sci China Life Sci* 61: 1352-1368. DOI: 10.1007/s11427-018-9315-6.
- Tu, J., Yang, F., Wan, J., Liu, Y., Zhang, J., Wu, B., Liu, Y., Zeng, S. und Wang, L. (2014). Light-controlled astrocytes promote human mesenchymal stem cells toward neuronal differentiation and improve the neurological deficit in stroke rats. *Glia* 62: 106-121. DOI: 10.1002/glia.22590.
- Unwin, P.N. und Zampighi, G. (1980). Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 283: 545-549.

- Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Surprenant, A. und Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-519. DOI: 10.1038/371516a0.
- Valiunas, V. (2013). Cyclic nucleotide permeability through unopposed connexin hemichannels. *Front Pharmacol* 4: 75. DOI: 10.3389/fphar.2013.00075.
- Valiunas, V., Doronin, S., Valiuniene, L., Potapova, I., Zuckerman, J., Walcott, B., Robinson, R.B., Rosen, M.R., Brink, P.R. und Cohen, I.S. (2004). Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *J Physiol* 555: 617-626. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.058719.
- Valiunas, V. und Weingart, R. (2000). Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 440: 366-379.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C. und Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-1041. DOI: 10.1038/nature08797.
- Vierbuchen, T. und Wernig, M. (2012). Molecular roadblocks for cellular reprogramming. *Mol Cell* 47: 827-838. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.09.008.
- Vogel, W., Grünebach, F., Messam, C.A., Kanz, L., Brugger, W. und Bühring, H.-J. (2003). Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88: 126-133.
- Voitychuk, O.I., Asmolkova, V.S., Gula, N.M., Sotkis, G.V., Galadari, S., Howarth, F.C., Oz, M. und Shuba, Y.M. (2012). Modulation of excitability, membrane currents and survival of cardiac myocytes by N-acylethanolamines. *Biochim Biophys Acta* 1821: 1167-1176. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2012.05.003.
- Vuyst, E. de, Decrock, E., Cabooter, L., Dubyak, G.R., Naus, C.C., Evans, W.H. und Leybaert, L. (2006). Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO J* 25: 34-44. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600908.
- Vuyst, E. de, Wang, N., Decrock, E., Bock, M. de, Vinken, M., van Moorhem, M., Lai, C., Culot, M., Rogiers, V. und Cecchelli, R., et al. (2009). Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium* 46: 176-187. DOI: 10.1016/j.ceca.2009.07.002.
- Wagner, A.-S., Glenske, K., Henß, A., Kruppke, B., Rößler, S., Hanke, T., Moritz, A., Rohnke, M., Kressin, M. und Arnhold, S., et al. (2017a). Cell behavior of human mesenchymal stromal cells in response to silica/collagen based xerogels and calcium deficient culture conditions. *Biomed Mater* 12: 45003. DOI: 10.1088/1748-605X/aa6e29.
- Wagner, A.-S., Glenske, K., Wolf, V., Fietz, D., Mazurek, S., Hanke, T., Moritz, A., Arnhold, S. und Wenisch, S. (2017b). Osteogenic differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells in response to extracellular calcium with special regard to connexin 43. *Ann Anat* 209: 18-24. DOI: 10.1016/j.aanat.2016.09.005.

- Wang, D., Shen, W., Zhang, F., Chen, M., Chen, H. und Cao, K. (2010). Connexin43 promotes survival of mesenchymal stem cells in ischaemic heart. *Cell Biol Int* 34: 415-423. DOI: 10.1042/CBI20090118.
- Wang, D.-G., Zhang, F.-X., Chen, M.-L., Zhu, H.-J., Yang, B. und Cao, K.-J. (2014). Cx43 in mesenchymal stem cells promotes angiogenesis of the infarcted heart independent of gap junctions. *Mol Med Rep* 9: 1095-1102. DOI: 10.3892/mmr.2014.1923.
- Wang, N., Bock, M. de, Decrock, E., Bol, M., Gadicherla, A., Vinken, M., Rogiers, V., Bukauskas, F.F., Bultynck, G. und Leybaert, L. (2013). Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochim Biophys Acta* 1828: 35-50. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.07.002.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K.V., Tarasova, Y., Wersto, R.P., Boheler, K.R. und Wobus, A.M. (2004). Nestin expression-a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61: 2510-2522. DOI: 10.1007/s00018-004-4144-6.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U. und Söhl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383: 725-737. DOI: 10.1515/BC.2002.076.
- Wislet-Gendebien, S., Leprince, P., Moonen, G. und Rogister, B. (2003). Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 116: 3295-3302. DOI: 10.1242/jcs.00639.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. und Black, I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61: 364-370. DOI: 10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C.
- Wu, P.-Y., Lin, Y.-C., Chang, C.-L., Lu, H.-T., Chin, C.-H., Hsu, T.-T., Chu, D. und Sun, S.H. (2009). Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Cell Signal* 21: 881-891.
- Xing, S., Grol, M.W., Grutter, P.H., Dixon, S.J. und Komarova, S.V. (2016). Modeling Interactions among Individual P2 Receptors to Explain Complex Response Patterns over a Wide Range of ATP Concentrations. *Front Physiol* 7: 294. DOI: 10.3389/fphys.2016.00294.
- Xue, Y., Ouyang, K., Huang, J., Zhou, Y., Ouyang, H., Li, H., Wang, G., Wu, Q., Wei, C. und Bi, Y., et al. (2013). Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell* 152: 82-96. DOI: 10.1016/j.cell.2012.11.045.
- Yamashita, M. (2013). From neuroepithelial cells to neurons: changes in the physiological properties of neuroepithelial stem cells. *Arch Biochem Biophys* 534: 64-70. DOI: 10.1016/j.abb.2012.07.016.
- Yang, N., Ng, Y.H., Pang, Z.P., Südhof, T.C. und Wernig, M. (2011). Induced neuronal cells: how to make and define a neuron. *Cell Stem Cell* 9: 517-525. DOI: 10.1016/j.stem.2011.11.015.
- Yang, R., Yu, T., Kou, X., Gao, X., Chen, C., Liu, D., Zhou, Y. und Shi, S. (2018). Tet1 and Tet2 maintain mesenchymal stem cell homeostasis via demethylation of the P2rX7 promoter. *Nat Commun* 9: 2143. DOI: 10.1038/s41467-018-04464-6.

- Ye, Z.-C., Wyeth, M.S., Baltan-Tekkok, S. und Ransom, B.R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* 23: 3588-3596.
- Yeager, M. und Nicholson, B.J. (1996). Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 6: 183-192.
- Yi, C., Mei, X., Ezan, P., Mato, S., Matias, I., Giaume, C. und Koulakoff, A. (2016). Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 23: 1691-1701. DOI: 10.1038/cdd.2016.63.
- Yim, E.K.F., Pang, S.W. und Leong, K.W. (2007). Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. *Exp Cell Res* 313: 1820-1829. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.02.031.
- Yoo, A.S., Sun, A.X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R.E., Tsien, R.W. und Crabtree, G.R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476: 228-231. DOI: 10.1038/nature10323.
- Yoon, C.W., Jung, H., Goo, K., Moon, S., Koo, K.M., Lee, N.S., Weitz, A.C. und Shung, K.K. (2018). Low-Intensity Ultrasound Modulates Ca²⁺ Dynamics in Human Mesenchymal Stem Cells via Connexin 43 Hemichannel. *Ann Biomed Eng* 46: 48-59. DOI: 10.1007/s10439-017-1949-7.
- Yuste, R., Nelson, D.A., Rubin, W.W. und Katz, L.C. (1995). Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. *Neuron* 14: 7-17.
- Zhang, J. und Jiao, J. (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int* 2015: 727542. DOI: 10.1155/2015/727542.
- Zhang, L., Yin, J.-C., Yeh, H., Ma, N.-X., Lee, G., Chen, X.A., Wang, Y., Lin, L., Chen, L. und Jin, P., et al. (2015). Small Molecules Efficiently Reprogram Human Astroglial Cells into Functional Neurons. *Cell Stem Cell* 17: 735-747. DOI: 10.1016/j.stem.2015.09.012.
- Zhao, H.-B., Yu, N. und Fleming, C.R. (2005). Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear. *PNAS* 102: 18724-18729. DOI: 10.1073/pnas.0506481102.
- Zheng, J., Choi, K.-A., Kang, P.J., Hyeon, S., Kwon, S., Moon, J.-H., Hwang, I., Kim, Y.I., Kim, Y.S. und Yoon, B.S., et al. (2016). A combination of small molecules directly reprograms mouse fibroblasts into neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 476: 42-48. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05.080.
- Zimmer, D.B., Green, C.R., Evans, W.H. und Gilula, N.B. (1987). Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. *J Biol Chem* 262: 7751-7763.
- Zippel, N., Limbach, C.A., Ratajski, N., Urban, C., Luparello, C., Pansky, A., Kassack, M.U. und Tobiasch, E. (2012). Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 21: 884-900. DOI: 10.1089/scd.2010.0576.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. und Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228. DOI: 10.1089/107632701300062859.

6 Anhang

6.1 Zusätzliche Informationen

Tabelle 8: Gen- und Proteinnamenäquivalente

Genname	Proteinname	Vollname
<i>RPS29</i>	Rps29	40S ribosomales Protein S29
<i>GAPDH</i>	GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
<i>NT5E</i>	CD73	Ekto-5'-Nukleotidase
<i>THY1</i>	CD90	Thy-1 Zellmembran-Glykoprotein
<i>ENG</i>	CD105	Endoglin
<i>ALCAM</i>	CD166	Aktiviertes Leukozyten-Zelladhäsionsmolekül
<i>NES</i>	Nestin	Neuro-epitheliales Stammzell-Intermediärfilament
<i>TUBB3</i>	Tuj1	Neuronen-spezifisches Klasse III beta-Tubulin
<i>RBFOX3</i>	NeuN	Neuronales Nuclei-Antigen
<i>MAP2</i>	MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
<i>POU3F2</i>	Brn-2	Gehirnspezifisches Homöobox/POU-Domänenprotein 2
<i>SOX2</i>	SOX-2	Transkriptionsfaktor SOX-2
<i>MYT1L</i>	MyT1-L	Myelin-Transkriptionsfaktor 1-ähnliches Protein
<i>ACTA2</i>	α -Aktin-2	Alpha-Aktin-2
<i>TAGLN</i>	Transgelin	Transgelin
<i>MYL2</i>	Myl2	leichte Myosinkette 2
<i>SMYD1</i>	SmyD1	Histon-Lysin N-Methyltransferase SMYD1
<i>GJB2</i>	Cx26	Connexin26
<i>GJD2</i>	Cx36	Connexin36
<i>GJA4</i>	Cx37	Connexin37
<i>GJA5</i>	Cx40	Connexin40
<i>GJA1</i>	Cx43	Connexin43
<i>GJC1</i>	Cx45	Connexin45

6.2 Zusätzliche Daten

6.2.1 ATP-induzierte Ca^{2+} -Signale unter Anwesenheit von U-73122

Um die ATP-Reaktionsfähigkeit der MSCs und NIM-2-differenzierten Zellen unter den verschiedenen Messbedingungen zu quantifizieren, wurde der prozentuale Anteil der auf die ATP-Stimuli (S1-S3) reagierenden Zellen bestimmt (Abbildung 35). Es wurden nur Zellen betrachtet, die auf die RS mit einem intrazellulären Ca^{2+} -Signal reagiert hatten, was als 100 % angenommen wurde.

Wurden S1-S3 im Kontrollmedium mit 2 mM Ca^{2+} induziert, reagierten von den MSCs bei S1-S3 fast 100 % der Zellen. Bei den differenzierten Zellen war nur ein leichter Rückgang der Anzahl reagierender Zellen festzustellen, wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den MSCs und den induzierten Zellen messbar waren (Abbildung 35).

Wurde das extrazelluläre Ca^{2+} im Badmedium entzogen, war bei den MSCs von S1 zu S2 eine leichte Reduktion und von S1 zu S3 ein signifikanter Rückgang der reagierenden Zellen zu beobachten. Allerdings lag die Anzahl reagierender Zellen bei S3 immer noch bei ca. 85 %. Signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den MSCs reagierten die NIM-2-induzierten Zellen. Während bei S1 noch kein Unterschied zu den MSCs oder zum Kontrollmedium messbar war, war die Anzahl reagierender Zellen unter Ca^{2+} -Entzug bei S2 (40 %) und S3 (25 %) sehr stark reduziert und wich signifikant von den gemessenen Kontrollwerten (S2: 95 % und S3: 90 %) ab. Der Einfluss des Ca^{2+} -Entzugs auf die differenzierten Zellen war somit deutlich stärker als auf die MSCs (Abbildung 35).

Die Verwendung des PLC-Inhibitors U-73122 führte in den MSCs zu deutlich weniger auf ATP reagierenden Zellen. Bereits bei der ersten Stimulierung nach Inhibitorzugabe (S1) reagierten mit 65 % signifikant weniger Zellen auf den ATP-Stimulus als unter Kontrollbedingungen. Bei S2 und S3 sank die Anzahl der reagierenden Zellen noch weiter auf 8 % bzw. 2 %. Damit reagierten bei Anwesenheit von U-73122 bei allen ATP-Stimuli signifikant weniger MSCs als differenzierte Zellen. So war bei den induzierten Zellen mit einem Reaktionsanteil von 90 % bei S1 keine signifikante Abweichung zu den Kontrollbedingungen messbar und erst bei S2 (45 %) und S3 (25 %) eine signifikante Abnahme der reagierenden Zellen zu verzeichnen (Abbildung 35).

Wenn zeitgleich der PLC-Inhibitor U-73122 zu dem Badmedium gegeben und das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen wurde, so zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch bei diesem Experiment reagierten signifikant weniger MSCs mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen als differenzierte Zellen. Schon bei S1 reagierten lediglich 6 % der MSCs auf den ATP-Stimulus, während es bei den NIM-2-induzierten Zellen noch 55 % waren. Bei S2 und S3 waren sämtliche Ca^{2+} -Signale in den MSCs vollständig unterdrückt. Auch die differenzierten Zellen zeigten kaum noch Reaktionen auf S2 und S3. Hier lag die Reaktionsrate bei 6 % und 1 % (Abbildung 35). Dieser Versuchsaufbau führte somit in beiden Zelltypen zu einem fast vollständigen Verlust der Ca^{2+} -Signale, bei den differenzierten Zellen jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung.

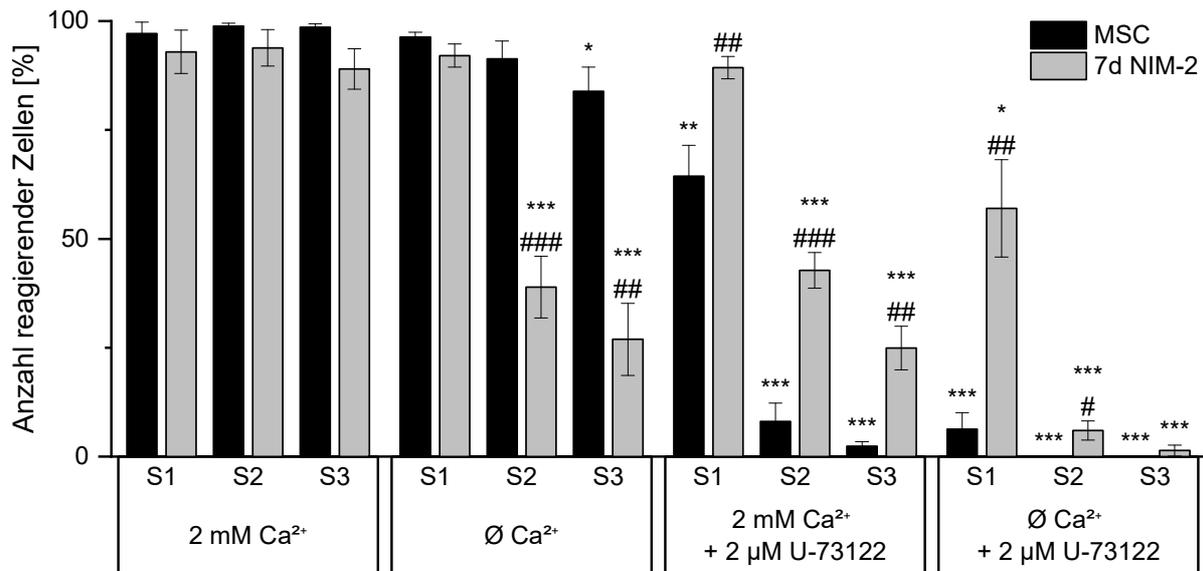


Abbildung 35: Anzahl der auf ATP-Stimulierung reagierenden Zellen unter Anwesenheit des PLC-Inhibitors U-73122. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der im zweiten Versuchsabschnitt auf die ATP-Stimulierungen (S1, S2, S3) reagierenden Zellen. Betrachtet wurden dabei nur die Zellen, die im ersten Versuchsabschnitt mit einem Ca²⁺-Signal auf die ATP-Referenzstimulierung reagierten. Unter Kontrollbedingungen (2 mM Ca²⁺) waren sowohl in den MSCs als auch in den 7 d NIM-2-differenzierten Zellen Ca²⁺-Signale als Antwort auf alle drei ATP-Stimulierungen stabil messbar. Der Entzug von Ca²⁺ im Badmedium (Ø Ca²⁺) führte bei den MSCs bei S3 zu einer leichten Minderung der reagierenden Zellen. Bei den differenzierten Zellen reagierten bereits ab S2 signifikant weniger Zellen. Die Zugabe des PLC-Inhibitors U-73122 (2 mM Ca²⁺ + 2 μM U-73122) führte in den MSCs bei S1 zu einer signifikanten Reduktion der reagierenden Zellen, die bei S2 und S3 noch stärker war. Bei den differenzierten Zellen trat eine signifikante Minderung der reagierenden Zellen erst ab S2 ein. In unbehandelten MSCs konnten die Ca²⁺-Signale durch gleichzeitigen extrazellulären Ca²⁺-Entzug und den Zusatz von U-73122 (Ø Ca²⁺ + 2 μM U-73122) als Antwort auf alle ATP-Stimulierungen fast vollständig unterdrückt werden. Diese Behandlung führte bei den NIM-2-induzierten Zellen erst ab S2 zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Ca²⁺-Signale. Bei S1 war die Anzahl der reagierenden Zellen jedoch bereits signifikant reduziert. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM (n ≥ 50) angegeben. Statistische Signifikanzen wurden mit einem Studentschen *t*-Test abgeschätzt und sind als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ (Vergleich eines Ca²⁺-Signals eines Zelltyps unter Ca²⁺-Entzug oder Inhibitorzugabe mit dem entsprechenden Signal des gleichen Zelltyps unter Kontrollbedingungen in Ca²⁺-haltigem Badmedium) und als # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ und ### $p \leq 0,001$ (Vergleich von NIM-2-differenzierten Zellen mit unbehandelten MSCs zum gleichen Zeitpunkt und bei gleicher Medienzusammensetzung) dargestellt.

6.2.2 ATP-induzierte Ca²⁺-Signale unter Anwesenheit von 2-APB

Es wurde die Fähigkeit der MSCs und NIM-2-differenzierten Zellen, bei den verschiedenen Messbedingungen auf die ATP-Stimuli zu reagieren, quantifiziert. Dafür wurde, wie zuvor beschrieben, der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt, die auf die ATP-Stimuli (S1-S3) reagierten (Abbildung 36). Dafür wurden nur Zellen betrachtet, die bereits auf die RS mit einem intrazellulären Ca²⁺-Signal geantwortet hatten, sodass auf die RS per Definition 100 % der betrachteten Zellen reagierten.

Wurden S1-S3 im Kontrollmedium mit 2 mM Ca²⁺ induziert, reagierten von den MSCs bei S1-S3 fast 100 % der Zellen (S1: 99 %, S2: 96 %, S3: 96 %). Bei den NIM-2-induzierten Zellen war von S1 zu S2

(80 %) und schließlich zu S3 (70 %) ein Rückgang in der Anzahl reagierender Zellen messbar, wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den MSCs und den induzierten Zellen zustande kamen (Abbildung 36).

Um die Aktivität der P2X-Rezeptoren zu testen, wurde den Zellen das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen. Dabei zeigte sich bei den MSCs ein leichter signifikanter Rückgang der Anzahl reagierender Zellen bei S2 (70 %) und S3 (70 %). S1 blieb mit einer Reaktionsfähigkeit von 90 % relativ unverändert. Sehr viel stärker fiel der Rückgang in der Anzahl reagierender Zellen bei den NIM-2-induzierten Zellen aus. Die erste Stimulierung S1 lag mit 96 % noch auf dem Kontrollniveau. Die Reaktionsfähigkeit bei S2 sank bereits auf 35 %, während die Anzahl reagierender Zellen bei S3 schließlich nur noch 10 % lag. Somit reagierten unter Ca^{2+} -Entzug signifikant weniger differenzierte Zellen auf die ATP-Stimuli S2 und S3 als MSCs (Abbildung 36).

Die Zugabe von 2-APB zu dem Badmedium diente dem Inhibieren einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und führte damit zu einer Unterbrechung von P2Y-Signalkaskaden. Wurden unter Anwesenheit dieses Inhibitors die ATP-Stimuli induziert, reagierten kaum noch Zellen mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen. Während bei S1 noch 10 % der betrachteten MSCs reagierten, waren es bei S2 und S3 lediglich 1 %. Noch stärker fiel die Reaktion in den induzierten Zellen aus. Hier zeigte sich in der Reaktion auf S1, dass mit 0 % an reagierenden Zellen im Vergleich zu den MSCs signifikant weniger Zellen mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen auf den ATP-Stimulus antworteten. Auch bei S2 und S3 waren in den NIM-2-differenzierten Zellen keine Ca^{2+} -Signale messbar (Abbildung 36).

Wurde dem Badmedium sowohl das extrazelluläre Ca^{2+} entzogen als auch der IP_3 -Rezeptor-Inhibitor 2-APB zugesetzt, gab es in beiden Zelltypen kaum noch messbare Ca^{2+} -Signale und keine signifikanten Unterschiede zwischen den MSCs und den induzierten Zellen. Bei S1 reagierten in beiden Zelltypen noch 3,5 % mit einem intrazellulären Ca^{2+} -Signal auf den ATP-Stimulus. Bei S2 und S3 waren sowohl in den MSCs als auch in den differenzierten Zellen keine Ca^{2+} -Signale mehr detektierbar (Abbildung 36).

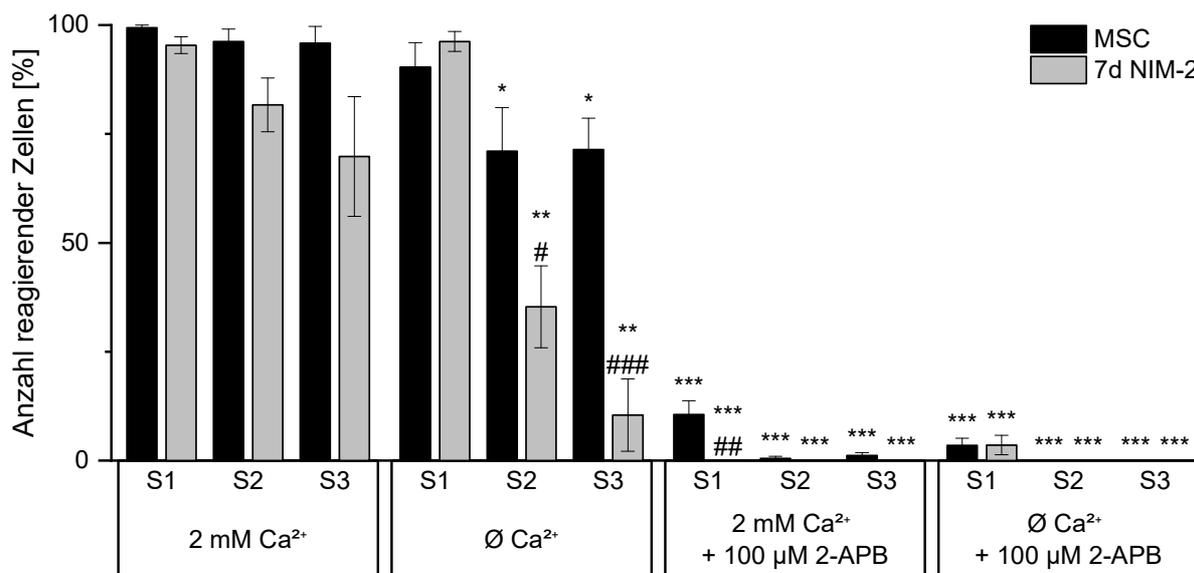


Abbildung 36: Anzahl der auf ATP-Stimulierung reagierenden Zellen unter Anwesenheit des IP₃-Rezeptor-Inhibitors 2-APB. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der auf die ATP-Stimulierungen im zweiten Versuchsabschnitt (S1, S2, S3) reagierenden Zellen. Betrachtet wurden dabei nur die Zellen, die im ersten Versuchsabschnitt mit einem Ca²⁺-Signal auf die ATP-Referenzstimulierung reagierten. Unter Kontrollbedingungen (2 mM Ca²⁺) waren sowohl in den MSCs als auch in den 7 d NIM-2-differenzierten Zellen Ca²⁺-Signale als Antwort auf alle drei ATP-Stimulierungen stabil messbar. Der Entzug von Ca²⁺ im Badmedium (Ø Ca²⁺) führte bei den MSCs bei S2 und S3 zu einer leichten Minderung der reagierenden Zellen. Bei den differenzierten Zellen reagierten ab S2 signifikant weniger Zellen. Durch die Zugabe des IP₃-Rezeptor-Inhibitors 2-APB (2 mM Ca²⁺ + 100 µM 2-APB) und die Zugabe von 2-APB unter zusätzlichem Entzug des extrazellulären Ca²⁺ (Ø Ca²⁺ + 100 µM 2-APB) waren sowohl in den MSCs als auch in den 7 d NIM-2-differenzierten Zellen kaum noch Ca²⁺-Signale messbar. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM (n ≥ 50) angegeben. Statistische Signifikanzen wurden mit einem Studentischen *t*-Test abgeschätzt und sind als * *p* ≤ 0,05, ** *p* ≤ 0,01 und *** *p* ≤ 0,001 (Vergleich eines Ca²⁺-Signals eines Zelltyps unter Ca²⁺-Entzug oder Inhibitorzugabe mit dem entsprechenden Signal des gleichen Zelltyps unter Kontrollbedingungen in Ca²⁺-haltigem Badmedium) und als # *p* ≤ 0,05, ## *p* ≤ 0,01 und ### *p* ≤ 0,001 (Vergleich von NIM-2-differenzierten Zellen mit unbehandelten MSCs zum gleichen Zeitpunkt und bei gleicher Medienzusammensetzung) dargestellt.

6.3 Material

Wenn nicht näher spezifiziert oder angegeben, wurden die verwendeten Materialien von Sigma-Aldrich bezogen. Die Oligonukleotide wurden bei Microsynth/Seqlab bestellt.

Tabelle 9: qRT-PCR-Primer

Zielgen		Primersequenz 5'-3'	Amplifikatgröße (bp)	Effizienz (%)
<i>RPS29</i>	Vorwärts	CGAAAATTTCGCCAGGGTTC	109	94
	Rückwärts	TCGCGTACTGACGGAAACAC		
<i>NT5E</i>	Vorwärts	GGAACCACGTATCCATGTGC	76	93
	Rückwärts	TGGATTCCATTGTTGCGTTCA		
<i>THY1</i>	Vorwärts	GCGTCTGGAGGAGGCTG	117	93

Zielgen		Primersequenz 5'-3'	Amplifikat- größe (bp)	Effizienz (%)
	Rückwärts	GGGAGACCTGCAAGACTGTTA		
<i>ENG</i>	Vorwärts	CCTGACCTGTCTGGTTGCAC	126	96
	Rückwärts	ACGCGTGTGCGAGTAGATG		
<i>ALCAM</i>	Vorwärts	ACGATGAGGCAGACGAGATAAG	150	93
	Rückwärts	ATGCAGTCTTTGACTTCTTCATGT		
<i>NES</i>	Vorwärts	TCAGCTTTCAGGACCCCAAG	130	91
	Rückwärts	GGTGTCTCAAGGGTAGCAGG		
<i>TUBB3</i>	Vorwärts	AGCAAGAACAGCAGCTACTTCGT	102	96
	Rückwärts	GATGAAGGTGGAGGACATCTTGA		
<i>RBFOX3</i>	Vorwärts	CTCCGCCTGAAGCGATGG	115	95
	Rückwärts	GAGTAGTCTGCGTGGGGT		
<i>MAP2</i>	Vorwärts	AGTTCCAGCAGCGTGATG	95	98
	Rückwärts	CATTCTCTCTTCAGCCTTCTC		
<i>POU3F2</i>	Vorwärts	CTGGTGCAGGGCGACTAC	73	92
	Rückwärts	CGGTGATCCACTGGTGAG		
<i>SOX2</i>	Vorwärts	CAAGATGCACAACCTCGGAGA	147	98
	Rückwärts	CGGGGCCGGTATTTATAATC		
<i>MYT1L</i>	Vorwärts	ATCAAGCCATGGAACTTGG	126	94
	Rückwärts	TCCACCTCTGATAAGATCCT		
<i>ACTA2</i>	Vorwärts	AAAAGACAGCTACGTGGGTGA	76	93
	Rückwärts	GCCATGTTCTATCGGGTACTTC		
<i>TAGLN</i>	Vorwärts	CTATGGCATGAGCCGGAAG	97	95
	Rückwärts	GCCACACTGCACTATGATCCA		
<i>MYL2</i>	Vorwärts	TCTTTGCAGAGTGGTCCCTG	140	104
	Rückwärts	GCCACGAAGTACCCATAGCC		
<i>SMYD1</i>	Vorwärts	CAGAACCACGTGGAGCACTT	130	107
	Rückwärts	CTCCGAAGATGTGCGAGATGT		
<i>CX26</i>	Vorwärts	CTCCCAGCGCAGAGCAAA	114	90
	Rückwärts	ACGGTGAGCCAGATCTTTCC		
<i>CX36</i>	Vorwärts	AAGGCATCTCCCGCTTCTACA	71	98
	Rückwärts	GCCAACCAGGAACCCAATTT		
<i>CX37</i>	Vorwärts	CAGGCAGGCGACGGAG	127	109
	Rückwärts	TGCGGAAGATGAAGAGCACC		
<i>CX40</i>	Vorwärts	GCAGCCAGAGTGTGAAGAAG	150	110
	Rückwärts	CGGTGAGTGTGTTGTGACT		
<i>CX43</i>	Vorwärts	TTTAAGCAAAAGAGTGGTGCCC	98	103
	Rückwärts	CTTCCCTCCAGCAGTTGAGT		
<i>CX45</i>	Vorwärts	CTGGACAACAGGGCATACCA	144	93
	Rückwärts	ACAGCTGTAAGGACGATCCG		

Zielgen		Primersequenz 5'-3'	Amplifikat- größe (bp)	Effizienz (%)
<i>P2RX1</i>	Vorwärts	CGCCTTCCTCTTCGAGTATGA	68	102
	Rückwärts	AGATAACGCCACCTTCTTATTACG		
<i>P2RX2</i>	Vorwärts	TACGAGACGCCCAAGGTGAT	88	104
	Rückwärts	CGAAGTAGAGCAGGATGAGCAG		
<i>P2RX3</i>	Vorwärts	TAAAGGGACAGGCTCCCAT	80	101
	Rückwärts	CCTACAGGACAGGGAGACGA		
<i>P2RX4</i>	Vorwärts	CAGGTGCGTAGCTTTCAACG	78	97
	Rückwärts	ACGTGTGTGTCATCCTCCAC		
<i>P2RX5</i>	Vorwärts	GAAGAGGTAGCGGCAAGGTC	86	101
	Rückwärts	ATTGACGCGGTTGAGAAAGC		
<i>P2RX6</i>	Vorwärts	GCTGGGGCTTCTGGATTAT	99	95
	Rückwärts	AGACCACGATCCCAAAGTGC		
<i>P2RX7</i>	Vorwärts	TCTGTGCACACCAAGGTGAA	108	94
	Rückwärts	GAAGGTGTAGTCTGCGGTGT		
<i>P2RY1</i>	Vorwärts	GGGTTGTAGGCAGAAGGCTC	91	92
	Rückwärts	CCTCTTCCGCCAGCTATCTC		
<i>P2RY2</i>	Vorwärts	CAGCACTACCTGCCAGAAA	84	94
	Rückwärts	GAAGTCTGCGGGAAACAGGA		
<i>P2RY4</i>	Vorwärts	GCAGTTTGGTTGGTTCGTAGC	72	97
	Rückwärts	GGTCCCTTTGTTGCTGGTTG		
<i>P2RY6</i>	Vorwärts	GGGCATTTGAGCTGGGTTTT	94	93
	Rückwärts	GCACAAGGTGTCAGTAAAGGC		
<i>P2RY11</i>	Vorwärts	AGCTCCTATGTGCCCTACCA	92	97
	Rückwärts	GCTATGTCTGCAAAGCTCGG		
<i>P2RY12</i>	Vorwärts	TGTGTGTCAAGTTACCTCCGT	99	95
	Rückwärts	CTGGTGGTCTTCTGGTAGCG		
<i>P2RY13</i>	Vorwärts	TGGGGCTGAAATGGCATCAA	88	91
	Rückwärts	ACCACATAAAACACAAGCATTAGGA		
<i>P2RY14</i>	Vorwärts	TGACTTTGTGATGAGCCTGACT	86	96
	Rückwärts	TGCACACAAACACGTTTCAGC		

Tabelle 10: Antikörper

Name	Firma	Produktnr.	Klon	Wirt	IF	WB
anti-Cx26	Merck Millipore	MABT198	3B12.1	Maus	1:1.000	1:1.000
anti-Cx43	Sigma-Aldrich	C6219	polyklonal	Hase	1:4.000	1:7.500
anti-Cx45	Thermo Fisher	41-5800	5C7G1	Maus	1:50	1:500
anti-GAPDH	Abcam	ab181602	EPR16891	Hase	-	1:100.000

anti-mouse IgG - iFluor™ 488	AAT Bioquest	16448	polyklonal	Ziege	1:500	-
anti-mouse IgG - Peroxidase	Sigma-Aldrich	A9044	polyklonal	Hase	-	1:40.000
anti-MAP2	Cell Signaling	4542	polyklonal	Hase	1:50	-
anti-Nestin	Abcam	ab105389	SP103	Hase	1:200	-
anti-NeuN	Merck Millipore	MAB377	A60	Maus	1:100	1:200
anti-rabbit IgG - iFluor™ 488	AAT Bioquest	16608	polyklonal	Ziege	1:500	-
anti-rabbit IgG - Peroxidase	Sigma-Aldrich	A9169	polyklonal	Ziege	-	1:40.000
anti- β -Tubulin	Sigma-Aldrich	T4026	TUB 2.1	Maus	-	1:2.000
anti-Tuj1	Abcam	ab78078	2G10	Maus	1:1.000	1:2.000

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelsystem	Eigenbau
Analysewaage	Sartorius
Axiovert 10	Zeiss
Brutschrank Hera Cells	Heraeus
EPC 10 USB double Patch-Clamp-Amplifier	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH
Faraday-Käfig	Eigenbau
Indo-1 Filterblock für Optosplit II	Cairn Research
ISMATEC REGIO ICC peristaltische Pumpe	Cole-Parmer GmbH
Kapillarziehgerät	Narishige PP-830
MicroStar Micromanipulator	Scientifica
NanoDrop™	Peqlab 2000c
Nikon DIGITAL Sight	Nikon GmbH
Nikon Eclipse TE2000-E C1 Laser-Scanning-Mikroskop	Nikon GmbH
Nikon Eclipse TS100	Nikon GmbH
Nikon Ti-E, inverses Fluoreszenzmikroskop	Nikon GmbH
Optosplit II	Cairn Research
ORCA-Flash4.0 Digital CMOS camera	Hamamatsu
PCR-Cycler	Peqlab
peqSTAR 96Q real time PCR-Cycler	Peqlab
Peristaltikpumpe Reglo ICC 4CH 8 Roller	IDEX Health & Science/Cole-Parmer
Polychrom V	FEI Company
Schwingungsgedämpfter Tisch	Newport
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 12: Medien, Puffer und Lösungen

Medium, Puffer, Lösung	Zusammensetzung
MSC-Zellkulturmedium	DMEM mit 1,0 g/L D-Glucose 100 U/mL Penicillin 0,1 mg/mL Streptomycin 10 % FCS 25 mM HEPES 2 ng/mL FGF-2 (human, PeproTech, 100-18B)
PBS, pH 7.4, 295 mosmol/L	137 mM NaCl 1 mM KCl 1 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
NIM-1	DMEM/Ham's F12 (1:1) 100 U/mL Penicillin 0,1 mg/mL Streptomycin 1,6 mM Valproinsäure 1,6 % DMSO 160 µM Butylhydroxyanisol 8 µM Forskolin 0,8 µM Hydrocortison 20 mM KCl 4 µg/mL Insulin
NIM-2	50 % DMEM/Ham's F12 (1:1) 50 % Neurobasal™ Medium 100 U/mL Penicillin 0,1 mg/mL Streptomycin 1x N-2-Zusatz 1x B-27™-Zusatz 1x GlutaMAX™ 5 µg/mL Heparin 1x nicht-essenzielle Aminosäuren 20 ng/mL FGF-2 (human, PeproTech, 100-18B) 100 µM dbcAMP 1 µM I-BET 20 µM CHIR99021 1 µM Repsox 50 µM Forskolin 5 µM Y-27632
NIM-3	50 % DMEM/Ham's F12 (1:1) 50 % Neurobasal™ Medium 100 U/mL Penicillin 0,1 mg/mL Streptomycin 0,5x N-2-Zusatz 1x B-27™-Zusatz 500 µM Valproinsäure 100 µM cAMP

	20 ng/mL FGF-2 (human, PeproTech, 100-18B)
	3 μ M CHIR99021
	1 μ M Repsox
	10 μ M Forskolin
	10 μ M SP600125
	5 μ M Gö6983
	5 μ M Y-27632
MAT	50 % DMEM/Ham's F12 (1:1)
	50 % Neurobasal™ Medium
	100 U/mL Penicillin
	0,1 mg/mL Streptomycin
	0,5x N-2-Zusatz
	1x B-27™-Zusatz
	100 μ M cAMP
	20 ng/mL FGF-2 (human, PeproTech, 100-18B)
	20 ng/mL BDNF (PeproTech, 450-02)
	20 ng/mL GDNF (PeproTech, 450-10)
	20 ng/mL NT-3 (PeproTech, 450-03)
	3 μ M CHIR99021
	10 μ M Forskolin
	1 μ M Dorsomorphin
NeuroM	50 % DMEM/Ham's F12 (1:1)
	50 % Neurobasal™ Medium
	100 U/mL Penicillin
	0,1 mg/mL Streptomycin
	0,5x N-2-Zusatz
	1x B-27™-Zusatz
	20 ng/mL BDNF (PeproTech, 450-02)
	20 ng/mL GDNF (PeproTech, 450-10)
	20 ng/mL NT-3 (PeproTech, 450-03)
10x Oligo-Annealing-Puffer	100 mM TRIS-HCl, pH 8.0
	10 mM EDTA, pH 8.0
	1 M NaCl
10x Puffer B	100 mM TRIS-HCl, pH 7.5
	100 mM MgCl ₂
	1 mg/mL BSA
10x Puffer EcoRI	500 mM TRIS-HCl, pH 7.5
	100 mM MgCl ₂
	1 M NaCl
	0,2 % Triton X-100
	1 mg/mL BSA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.0
	1 mM EDTA
	pH 8.0

SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 20 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
TAE-Puffer	40 mM TRIS 10 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7.8 (Eisessig)
RIPA-Puffer	25 mM TRIS HCl, pH 7.6 150 mM NaCl 1 % (w/v) Nonidet P-40 1 % Natriumdesoxycholat (w/v) 0,1 % (w/v) SDS 0,5 % (v/v) Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche) 10 mM NaF 1 mM PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄
5x Lämmli-Puffer	65 mM TRIS HCl, pH 6.8 50 mM DTT 10 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS HCl, pH 8.3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Transfer-Puffer	25 mM TRIS HCl, pH 8.3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
PBS-T	137 mM NaCl 1 mM KCl 1 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 0,1 % Tween 20
Ponceau S-Färbelösung	0,1 % (w/v) Ponceau S 5 % Essigsäure
Entwicklerlösung	100 mM TRIS HCl, pH 8.5 225 µM Cumarsäure 1,25 mM Luminol 0,009 % H ₂ O ₂

Badmedium (Patch-Clamp)	140 mM NaCl 5 mM KCl 10 mM HEPES 1 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O 10 mM Glucose 2 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O pH 7.4 (NaOH) 295 mosmol/L
Pipettenmedium	145 mM K-Gluconat 5 mM KCl 10 mM HEPES 2,5 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O 5 mM Glucose 0,5 mM Na ₂ ATP 1 mM EGTA 0,5 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O pH 7.4 (KOH) 295 mosmol/L
Badmedium mit Ca ²⁺ (Ca ²⁺ -Imaging)	121 mM NaCl 5,4 mM KCl 25 mM HEPES 0,8 mM MgCl ₂ 5,5 mM Glucose 6 mM NaHCO ₃ 1,8 mM CaCl ₂ pH 7.4 295 mosmol/L
Badmedium Ø Ca ²⁺ (Ca ²⁺ -Imaging)	121 mM NaCl 5,4 mM KCl 25 mM HEPES 0,8 mM MgCl ₂ 5,5 mM Glucose 6 mM NaHCO ₃ 1 mM EGTA pH 7.4 295 mosmol/L
EtdBr-Badmedium	121 mM NaCl 5,4 mM KCl 25 mM HEPES 0,8 mM MgCl ₂ 5,5 mM Glucose 6 mM NaHCO ₃ 1,8 mM CaCl ₂ 5 µM Ethidiumbromid (EtdBr) pH 7.4 295 mosmol/L

EtdBr-Badmedium Ø Ca ²⁺ Ø Mg ²⁺	121 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	25 mM HEPES
	5,5 mM Glucose
	6 mM NaHCO ₃
	5 µM Ethidiumbromid (EtdBr)
	pH 7.4
	295 mosmol/L

Tabelle 13: Chemikalien, Enzyme und Kits

Chemikalie, Enzym, Kit	Hersteller
2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB)	Sigma-Aldrich
Agarose	AppliChem
B-27™-Zusatz	Thermo Fisher Scientific
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich
Butylhydroxyanisol	Biomol
Carbenoxolon (CBX)	Sigma-Aldrich
CHIR99021	Biomol
DAPI	Sigma-Aldrich
DMEM/Ham's F-12 (1:1), stable glutamine, low endotoxin	Biochrom
DMEM mit 1,0 g/L D-Glucose	Biochrom
Dorsomorphin	Biomol
FCS	Biochrom
Forskolin	Biomol
GelRed®	Biotium
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific
Gö6983	Biomol
HEPES	Merck
Hydrocortison	Biomol
Indo-1 AM	Invitrogen
KAPA SYBR® FAST Universal Mastermix (2x)	KAPA Biosystems
LB-Medium	Roth
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Maxima First Strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR with dsDNase	Thermo Fisher Scientific
N-2-Zusatz	Thermo Fisher Scientific
Neurobasal™ Medium	Gibco™
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAAs)	Biochrom
OneTaq® 2x Mastermix	New England Biolabs
Opti-MEM™ I	Gibco™
Penicillin / Streptomycin	Biochrom

Chemikalie, Enzym, Kit	Hersteller
PeqGOLD Total RNA kit	Peqlab
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
Rattenkollagen Typ I	Trevigen
Repsox	Biomol
Rotiphorese® Gel 30	Roth
SP600125	Biomol
T4-DNA-Ligase und zugehöriger Ligase-Puffer	Thermo Fisher Scientific
Trypsin aus Schweinepankreas	Sigma-Aldrich
U-73122	Biomol
Valproinsäure (VPA)	Biomol
Y-27632	Biomol

Tabelle 14: Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller
Deckgläschen, Durchmesser 10 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Kapillaren	Kimble Chase, Brand
Zellkulturschalen, Durchmesser 100 mm	Sarstedt

Tabelle 15: Verwendete Software

Software	Hersteller
OriginPro 2017	OriginLab Corporation
EZ-C1-Software	Nikon GmbH
Fiji for ImageJ	National Institutes of Health
ISMATEC® Pump Control	Cole-Parmer GmbH
Microsoft Excel 2016	Microsoft
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft
NIS-Elements AR 4.4	Nikon GmbH
PatchMaster 2.9	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH

Lebenslauf

Name Nadine Saskia Dilger

Geburtstag 06.02.1989

Geburtsort Uelzen

Bildungsgang

Seit Mai 2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zellbiologie und Biophysik, Abteilung Zellbiologie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

2014 – 2019 Promotionsstudentin am Institut für Zellbiologie und Biophysik, Abteilung Zellphysiologie und Biophysik an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

2011 – 2014 Masterstudium Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Abschluss: Master of Science (M. Sc.)

Hauptfächer: Molekularbiologie und Biologie & Chemie von Naturstoffen

Thema der Masterarbeit: *Gap Junction*-Halbkanäle in Granulosazellen: Physiologische und Molekularbiologische Analyse

2008 – 2011 Bachelorstudium Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc.)

Thema der Bachelorarbeit: Nachweis der Interaktion des Tat-Substrats HiPIP mit den Chaperonen SlyD und DnaK mittels eines bakteriellen *Two-Hybrid*-Systems

2001 – 2008 Bernhard-Riemann-Gymnasium Scharnebeck

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Publikationsliste

- Dilger N.**, Neehus A.-L., Grieger K., Hoffmann A., Ngezahayo A. (2020) Gap junction dependent cell communication is modulated during neuronal transdifferentiation of mesenchymal stem/stromal cells into neuron-like cells. Eingereichtes Manuskript.
- Schadzek P., Hermes D., Stahl Y., **Dilger N.**, Ngezahayo A. (2018) Concatenation of human connexin26 (hCx26) and human connexin46 (hCx46) for the analysis of heteromeric gap junction hemichannels and heterotypic gap junction channels. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2742, DOI 10.3390/ijms19092742.
- Dilger N.**, Neehus A.-L., Grieger K., Ngezahayo A. (2017) Analysis of the gap junction-dependent communication during neuronal transdifferentiation of human mesenchymal stem cells. Poster, International Gap Junction Conference, Glasgow, Scotland, UK.
- Neehus A.-L., **Dilger N.**, Ngezahayo A. (2016) Gap Junction dependent cell-to-cell communication during transdifferentiation of human mesenchymal stem cells. Poster, 4th Annual Conference of the German Stem Cell Network (GSCN), Hannover, Germany.
- Dilger N.**, Bintig W., Ngezahayo A. (2015) Regulation of gap junction hemichannels in GFSHR-17 granulosa cells by purinergic receptors. Poster, International Gap Junction Conference, Valparaíso, Chile.
- Brehm R., Schumacher V. A., Schorle H., Nettersheim D., Ngezahayo A., Begandt D., **Dilger N.**, Schnepel N., Gaehle M., Hambruch N., Wilhelm J., Kliesch S., Weidner W., Bergmann M., Fink C. (2015) Comparative analysis of tight, adherens and gap junctions in the human Sertoli cell line FS1 and the human seminoma like cell line TCam-2 prior to co-culture experiments. Conference Paper, 48th Annual Conference on Physiology and Pathology of Reproduction / Volume: 50.
- Dilger N.**, Bintig W., Ngezahayo A. (2014) Involvement of gap junction hemichannels in GFSHR-17 granulosa cells during folliculogenesis. Poster, Jahrestagung der deutschen physiologischen Gesellschaft, Mainz, Germany.
- Dilger N.**, Bintig W., Ngezahayo A. (2014) Gap junction hemichannels are responsible for the anion permeability of the granulosa cells and are regulated by P2Y₂ and 4 receptors. Poster, Jahrestagung der deutschen physiologischen Gesellschaft, Mainz, Germany.