

ELEKTROPHYSIOLOGISCHE BEURTEILUNG DER INTEGRATION NEURONALER STAMMZELLEN IN ISCHÄMISCHE HIRNAREALE IN DER RATTE

CHRISTOPH YVES MALIK



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**ELEKTROPHYSIOLOGISCHE BEURTEILUNG DER
INTEGRATION NEURONALER STAMMZELLEN IN
ISCHÄMISCHE HIRNAREALE IN DER RATTE**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Christoph Yves Malik

aus Hanau

Gießen 2006

Aus der Medizinischen Betriebseinheit

Physiologisches Institut

Leiter: Prof. Dr. Dr. H.M. Piper

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: PD Dr. A.Scholz

Gutachter: Prof. Dr. M. Kaps

Tag der Disputation: 21.05.2007

Für meinen Vater

1	Einleitung	6
1.1	Die klinische Bedeutung des cerebrovaskulären Insultes	6
1.2	Plastizität des ZNS	7
1.2.1	Während der Neuroembryogenese	7
1.2.2	Im adulten Organismus	7
1.3	Ionenkanäle von Neuronen des ZNS.....	8
1.3.1	Natriumkanäle	9
1.4	Stammzellen	11
1.4.1	Stammzellpotenz	11
1.4.2	Stammzelltypen.....	12
1.4.3	Tumorgenese durch Stammzellen	12
1.4.4	Entwicklung medizinischer Ansätze der Stammzelltherapie des ZNS	13
1.4.5	Besonderheiten der Therapie mit embryonalen Stammzellen.....	15
1.4.6	Rechtslage und Ethik.....	16
1.5	Übersicht bisheriger Studien	17
1.5.1	In-vitro.....	17
1.5.2	In-vivo	18
1.6	Ziel dieser Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Generierung von neuronalen precursor-Zellen aus ES der Maus	20
2.2	Cerebrale Ischämie und precursor-Zell Transplantation	21
2.3	Präparation des Gehirns	22
2.4	mikroskopisches Präparat.....	24
2.5	Pipetten- und Kontrolllösungen	25
2.6	Toxine.....	26
2.6.1	Tetrodotoxin	26
2.6.2	Tetraethylammonium	26
2.7	Die patch-clamp Technik	26
2.8	Versuchsstand.....	29
2.8.1	Experimentierkammer	29
2.8.2	Aufbau des Meßstandes	30
2.8.3	Aufzeichnungs-, Auswertungs- und Darstellungsverfahren	32
2.9	Immunhistochemie	33

3	Resultate	34
3.1	Elektrophysiologische Eigenschaften von NLCs	34
3.2	Charakterisierung der Ionenkanäle mit Toxinen	36
3.2.1	TTX	36
3.2.2	TEA	38
3.3	Immunhistologische Typisierung des Natriumkanals	38
3.4	Entwicklung der Aktionspotentiale 3 – 6 Wochen nach Transplantation	40
3.5	Ca ²⁺ -abhängige Auswärtsströme	43
3.6	Exzitatorische Postsynaptische Potentiale und Ströme	44
3.7	Elektrophysiologische Eigenschaften von Glia-ähnlichen Zellen	46
3.8	Immunhistochemischer Vergleich neuronaler und glialer Zellen	48
3.9	Weitere immunhistochemische Untersuchungen	49
4	Diskussion	50
4.1	Allgemeine Überlegungen zum vorliegenden Modell	50
4.2	Ionenströme	52
4.3	Aktionspotentiale	54
4.4	Gliale Zellen	56
4.5	Exzitatorische Postsynaptische Potentiale und Ströme	56
5	Zusammenfassung	60
6	Summary	61
7	Abbildungsverzeichnis	62
8	Literaturverzeichnis	63
9	Lebenslauf	72
10	Danksagung	74

1 Einleitung

1.1 Die klinische Bedeutung des cerebrovaskulären Insultes

Der Schlaganfall ist „ein Krankheitsbild, bei dem sich die klinischen Zeichen einer fokalen oder globalen Störung zerebraler Funktionen aufgrund akuter Durchblutungsstörungen rasch bemerkbar machen, mindestens 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen und offensichtlich nicht auf andere als vaskuläre Ursachen zurückgeführt werden können“ (Definition der WHO von 1978). In 80 % der Fälle wird der Schlaganfall von einem Thrombus hervorgerufen.

Gegenwärtig spielen cerebrovaskuläre Erkrankungen, insbesondere der Cerebrovaskuläre Insult (CVI), in den westlichen Ländern sowohl im medizinischen, als auch im wirtschaftlichen Bereich eine große Rolle. Zwar kam es im Zeitraum von 1970 bis 1994 in Österreich, einem gesundheitsökonomisch vergleichbaren Land zur BRD, zu einer Senkung der Mortalität um 50% auf ca. 100 pro 100 000 Einwohner (Brainin *et al.*, 2003), jedoch hat in den letzten Jahren die Inzidenz in den Industrieländern Mitteleuropas leicht (auf 200-300 pro 100 000 Einwohner) und in Entwicklungsländern dramatisch zugenommen. Sie stellen mit etwa 12% nach kardiovaskulären Erkrankungen (ca. 36%) und Neoplasien (ca. 24%) die dritthäufigste Todesursache dar. Sowohl die Tatsache, dass die Mortalität in Entwicklungsländern teilweise um den Faktor 10 höher liegt als auch das Ergebnis der „Global Burden of Disease-Studie“, die die cerebro- und kardiovaskulären Erkrankungen im Jahr 2020 als die führenden Todesursachen einstuft, sind alarmierend.

In Österreich, als einem zu Deutschland in Bezug auf das Gesundheitswesen vergleichbarem europäischen Land, geht man von einer Prävalenz von 6-8 pro 1000 Einwohner aus (ca. 60 000 insgesamt), von denen etwa ein Drittel mäßig bis schwer behindert sind und damit auf soziale Hilfsdienste und Therapieeinrichtungen angewiesen sind. Pro Patient werden über 15 Jahre gemittelt etwa 60 000 € direkte Kosten hervorgerufen, zuzüglich der Ausfälle der eigenen Produktivität, wie auch der der pflegenden Angehörigen. Somit stellt der cerebrovaskuläre Insult mit seinen Folgen einen bedeutenden gesundheitsökonomischen Faktor dar.

1.2 Plastizität des ZNS

1.2.1 Während der Neuroembryogenese

Die Differenzierung des Zentralnervensystemes von Säugetieren findet in einem frühen Stadium der Embryogenese statt, das sich der Differenzierung der drei Keimblätter anschließt. Das ZNS entwickelt sich aus dem Neuroektoderm, der „Neuralplatte“, die entlang des dorsalen Medians des Embryos zu finden ist. Durch Proliferation kommt es zur Ausbildung des Neuralrohres, aus dessen Hohlraum sich das Ventrikelsystem des ZNS entwickelt. Aus einer einzelnen Zelllage von Vorläuferzellen entwickeln sich sowohl Neurone als auch Gliazellen des ZNS. Zunächst findet eine symmetrische Zellteilung zur Zunahme der Zellmasse, später eine asymmetrische Zellteilung zur weiteren Differenzierung der Zelltypen statt. Im weiteren Verlauf kommt es zur Wanderung von differenzierten Neuronen, teilweise entlang glialer Zellfortsätze. Stammzellen verbleiben ruhend entlang der Basalmembran. Durch ein komplexes Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren und extrinsischen Signalen kommt es initial zur vermehrten Neurogenese und zu einer Supprimierung der Entstehung glialer Zellen. Später, wenn genügend Neurone gebildet wurden, kommt es zur Enthemmung der Gliogenese und zur Heranreifung des Hirngewebes.

1.2.2 Im adulten Organismus

Die Plastizität des adulten Gehirnes in Säugetieren erscheint sehr eingeschränkt. Versuche zeigen, dass sich Neubildungen aus adulten Stammzellen vor allem auf zwei Hirnregionen konzentrieren. Innerhalb des Hippocampus im Bereich des Gyrus dentatus findet eine ständige Regeneration der Körnerzellen statt (Altmann & Das, 1965; Kuhn *et al.*, 1996). Dieser Prozess der adulten Neurogenese konnte ebenfalls beim Menschen beobachtet werden (Eriksson *et al.*, 1998). Zusätzlich ist bekannt, dass zumindest bei Nagetieren in der Subventrikulärezone (SVZ) des anterolateralen Seitenventrikels eine Neurogenese stattfindet (Altmann, 1969). Jedoch scheint die Differenzierung zu regionsspezifischen Projektionsneuronen sehr eingeschränkt. Viel eher kommt es zu einer Umwandlung in Interneurone, die keine regionsspezifischen Funktionen übernehmen können. Somit scheint die Regenerationsfähigkeit des adulten Gehirnes aus adulten Stammzellen sehr eingeschränkt gegenüber embryonaler Stammzellen.

Trotz Aktivierung regenerativer Mechanismen nach einem CVI wie Neurogenese und Migration von Neuroblasten in ischämische Areale (Arvidsson *et al.*, 2002) kommt es aufgrund rascher Degeneration des geschädigten Gewebes nur zu einer geringen funktionellen Erholung. Aufgrund dieser unzureichenden Mechanismen und den bisher eher enttäuschenden Ergebnissen unzureichender klinischer Einsetzbarkeit oder fehlender umfassender klinischer Erfahrung mit neuroprotektiven Pharmaka (Dirnagl *et al.*, 1999; Carter *et al.*, 2000; Weiser, 2005), die eine primäre und sekundäre Schädigung des ischämischen Hirngewebes verhindern sollen, werden neue therapeutische Ansätze gesucht, um die neurologischen Defizite nach CVIs besser behandeln zu können. Einer dieser Ansätze verfolgt die funktionelle Wiederherstellung des ZNS durch die Transplantation von embryonalen oder neuronalen Stammzellen.

1.3 Ionenkanäle von Neuronen des ZNS

Die elektrophysiologischen Eigenschaften von Neuronen werden zum größten Teil durch ihren Besitz mit verschiedenen Ionenkanaltypen bestimmt. Die Ionenkanäle des ZNS können in sechs Kategorien unterteilt werden. Man unterscheidet: Spannungsabhängige und – unabhängige Kanäle, Liganden-gesteuerte Kanäle, Ionen-gesteuerte Kanäle, TRP-Kanäle und gap-junction Kanäle. Im folgenden Abschnitt möchte ich mich jedoch auf die spannungsabhängigen Kanäle beschränken. Sie stellen eine Gen-Superfamilie von Transmembranproteinen dar, die bei Na⁺- bzw. Ca²⁺-Kanälen aus vier kontinuierlichen Domänen (I-IV) oder einem Tetramer aus vier Untereinheiten bei K⁺-Kanälen bestehen. Jede dieser Domänen der Na⁺-Kanäle besteht aus sechs transmembranären Abschnitten, die durch α -Helices gebildet werden (S1-6), bei denen das jeweils 4. Segment (S4) besonders viele positiv geladene Aminosäuren enthält (Lysin und Arginin) und dadurch als Spannungssensor fungieren kann, der hierdurch die Kanalöffnung steuert. Diese Hauptproteinkette wird auch als α -Untereinheit bezeichnet. Sie ist für die eigentlichen biophysikalischen Eigenschaften der Ionenkanäle verantwortlich, da sie die Kanalpore bildet. Die α -Untereinheit kann mit verschiedenen Hilfs-Untereinheiten, auch β -Untereinheiten genannt, kombiniert sein. Im adulten ZNS existieren die Untereinheiten β_1 , β_2 und β_3 . Dieser Untereinheiten sind für die Modulation der Kanaleigenschaften verantwortlich (Johnson *et al.*, 2004), was die Diversität der funktionellen Ionenkanäle erhöht. Möglicherweise treten die β -Untereinheiten mit

weiteren Membranmolekülen in Kontakt und formen so einen Komplex, der über Signalmoleküle zusätzlich die Kanaleigenschaften verändern kann.

1.3.1 Natriumkanäle

Spannungsabhängige Natriumkanäle stellen für das Aktionspotential und damit für nahezu alle erregbaren Zellen ein sehr wichtiges funktionelles Element dar, da sie für die initiale Membrandepolarisation durch den schnellen Einstrom von Natriumionen in die Zelle verantwortlich sind.

Lange Zeit bestand keine international einheitliche Nomenklatur der spannungsabhängigen Kanäle. Durch Chandy & Gutman (1993) wurde eine Nomenklatur für spannungsabhängige Kaliumkanäle eingeführt, die später für Calcium- (Ertel *et al.*, 2000) und Natriumkanäle (Goldin *et al.*, 2000) adaptiert wurde. Sie basiert auf der Benennung des Kanals nach dem Ion, das hauptsächlich durch den Kanal geleitet wird (bsp. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} ...), gefolgt von der Abkürzung für den aktivierenden Liganden, der bei spannungsabhängigen Kanälen immer „v“ für „voltage“ ist. Aufgrund von Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten werden die Kanäle weiter in Familien eingeteilt. Bei K^+ -Kanälen gibt es vier (K_v1-4), bei Ca^{2+} drei (Ca_v1-3) und bei Na^+ eine Familie (Na_v1). Es gibt noch eine weitere Familie von Na_v -Kanalproteinen (Na_x). Lange Zeit war kein physiologisches Vorkommen dieses Kanals bekannt. Mittlerweile konnte er jedoch im zentralen und peripheren Nervensystem sowie im Herzen und der Lunge nachgewiesen werden. Im ZNS fungiert er als konzentrationsabhängiger Natriumkanal und -sensor und scheint an der Regulation des Natriumgehaltes der Körperflüssigkeiten beteiligt zu sein (Watanabe *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2006).

Für die weitere Benennung der Kanäle innerhalb der Superfamilie der Natriumkanäle wird die Erweiterung des kodierenden Gens verwendet, bsp. für SCN1A (SCN=sodiumchannel; A= α -subunit) entspricht $Na_v 1.1$. Dieses Vorgehen wird weitgehend für die gesamte Familie verwendet, in der 9 verschiedene Kanalisoforamen existieren ($Na_v 1.1 - 1.9$).

An der α -Untereinheit eines Natriumkanals lassen sich 3 funktionelle Einheiten unterscheiden:

- der bereits im letzten Abschnitt erwähnte Spannungssensor,
- die Pore des Ionenkanals, die die Innenwand des Kanals bildet, zusammen mit dem Selektivitätsfilter für die geleiteten Ionen (DEKA-Motiv),
- das intrazellulär gelegene Inaktivierungsgate, das die Inaktivierung des Ionenkanals initiiert und damit den Ionenfluß unterbindet.

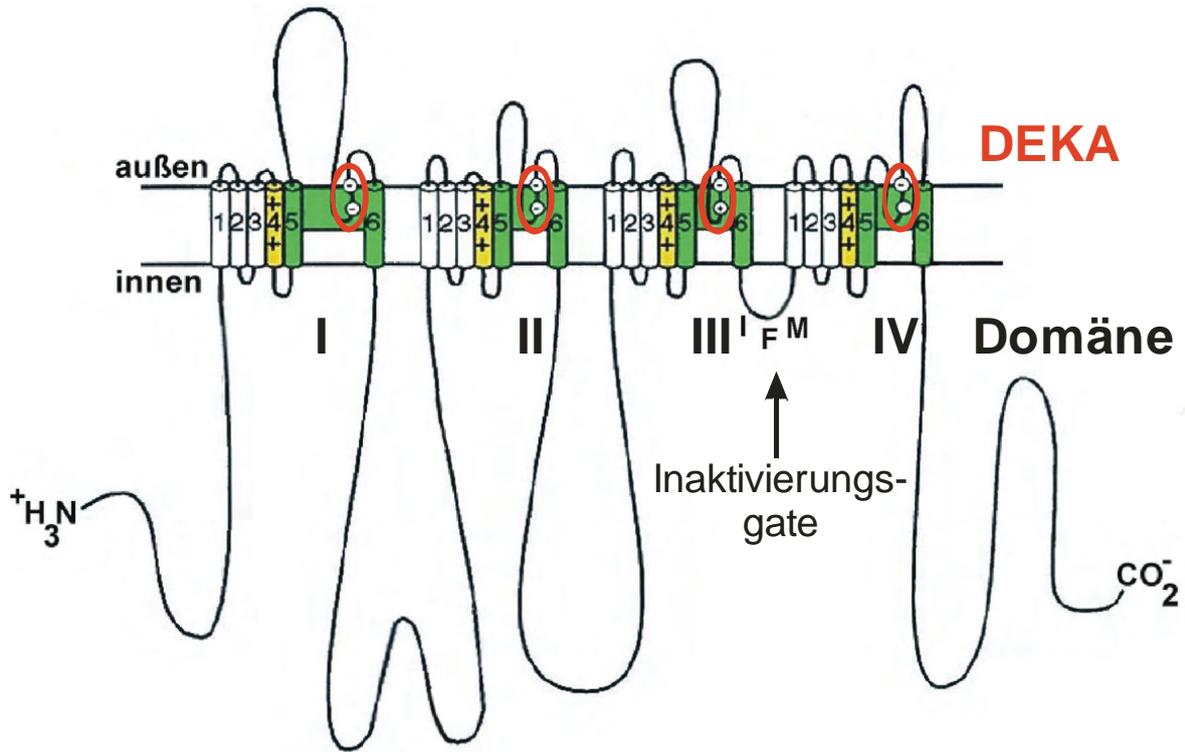


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Na_v-Kanals. Modifiziert nach Catterall *et al.* (2003).

Deutlich wird die Unterteilung in 4 Domänen mit den intra- und extrazellulären sowie transmembranären Anteilen des Kanalproteins. Gelb dargestellt sind die Spannungssensoren, rot umkreist sind die Anteile des DEKA-Motivs, die von den porenbildenden Helices flankiert werden. Das IFM-Partikel bildet das Inaktivierungsgate.

Die verschiedenen Na_v-Typen zeigen sowohl auf zellulärer wie auch auf subzellulärer Ebene unterschiedliche Verteilungsmuster. Im ZNS sind lediglich die Kanaltypen Na_v 1.1, 1.2, 1.3 und 1.6 zu finden. Alle sind hochsensibel gegenüber dem Kugelfischgift Tetrodotoxin (TTX). Na_v 1.1 findet sich vor allem im Striatum, dem Hippocampus und dem Thalamus (Brysch *et al.*, 1991; Black *et al.*, 1994), wo er vor allem an den Somata und Dendriten zu finden ist (Westenbroek *et al.*, 1989). Er scheint vor allem für die Erregungsfortpflanzung von synaptischen Signalen an den Dendriten zum Soma verantwortlich zu sein sowie integrative Funktion elektrischer Signale am Soma vor Generierung eines Aktionspotentials zu übernehmen.

Na_v 1.2 zeigt eine ähnliches Verteilungsmuster wie Na_v 1.1 (Black *et al.*, 1994), ist hier jedoch vor allem an Axonen und präsynaptischen Endigungen zu finden (Westenbroek *et al.*, 1989). Er scheint zu großen Teilen für die Leitung des Aktionspotentials des Axons zuständig zu sein.

1.4 Stammzellen

Nav 1.3 ist im Gehirn von Nagetieren vor allem in der embryonalen Phase zu finden (Yu & Catterall, 2003).

Nav 1.6 ist bisher vor allem in der Körnerzellschicht des Cerebellums und den Pyramiden- und Körnerzellen des Hippokampus zu finden (Schaller & Caldwell, 2000).

1.4 Stammzellen

1.4.1 Stammzellpotenz

Stammzellen (SC) unterscheiden sich definitionsgemäß von den übrigen Zellen des Körpers durch 2 Eigenschaften:

- Regeneration durch Zellteilung
- Differenzierung in reife Tochterzellen

Da diese Eigenschaften in verschiedenen Stammzellen unterschiedlich ausgeprägt sind, unterscheidet man SC in ihrer Potenzialität

Totipotenz: totipotente SC besitzen uneingeschränkte Differenzierungsfähigkeit und können einen gesamten Organismus bilden. In der menschlichen Ontogenese scheinen nur Zellen bis zum 8-Zell-Stadium totipotent zu sein.

Pluripotenz: pluripotente SC können in jeden Zelltyp des Organismus differenzieren, können aber nicht einen gesamten Organismus aufbauen, da sie keine Plazenta bilden können. Sie finden sich in der inneren Zellschicht der Blastozyste.

Multipotenz: multipotente SC sind bereits gewebespezifisch differenziert und können sich nur noch in Zelltypen dieses Gewebstyps entwickeln. Neuronale Stammzellen des ZNS differenzieren in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten.

Diese klassische Unterteilung scheint allerdings zunehmend aufzuweichen, seitdem bekannt ist, dass sich multipotente Zellen durch Entdifferenzierung in Pluripotente Zellen umwandeln können. (Bjornson *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2000). Diese Erkenntnis wird in der Literatur bisher jedoch noch immer sehr kontrovers diskutiert.

1.4.2 Stammzelltypen

Ihrem Ursprung nach werden Stammzellen in 2 Gruppen unterteilt:

Embryonale Stammzellen (ES): Embryonale Stammzellen werden aus der innersten Zellschicht von Blastozysten gewonnen und sind meist totipotent oder pluripotent. Sie wurden erstmals von der Maus gewonnen (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Sie lassen sich in Zellkultur nahezu uneingeschränkt vermehren. Durch ihre Pluri-, bzw. Totipotenz können sie in alle Gewebe- und Zelltypen des Organismus differenzieren. Wegen ihrer starken Proliferationsaktivität lassen sich auch komplexe genetische Veränderungen durchführen und sich theoretisch indikationsspezifische Spenderzellen herstellen. Da durch die Entnahme der Zellen der werdende Organismus getötet wird, ist die Forschung an diesen Zellen, insbesondere beim Menschen umstritten, scheint aber vielfältigere Therapiemöglichkeiten zu eröffnen. Von Vorteil ist, dass die Zellen relativ leicht gewonnen werden können.

Adulte Stammzellen (AS): Im adulten Organismus wurden ebenfalls SC (somatische SC, Gewebestammzellen) in vielen verschiedenen Organen beschrieben, z.B. Leber (Lagasse *et al.*, 2000), Pankreas, (Peck *et al.*, 2001), Gehirn (Kukekov *et al.*, 1999). Das Differenzierungspotenzial dieser Zellen ist zwar keimblattüberschreitend, jedoch dem der ES unterlegen. Ebenso ist die Überlebensdauer von AS limitiert. Vorteile gegenüber den ES ist die Möglichkeit zur autologen und damit immunsuppressionsfreien Transplantation (*tissue engineering*), die ethische Unbedenklichkeit der Stammzelltherapie und die vermutlich geringere Entartungstendenz.

1.4.3 Tumorgenese durch Stammzellen

Immer wieder wird die Tumorgenese durch Stammzellen thematisiert. Da Stammzellen theoretisch unbegrenzt regenerations- und proliferationsfähig sind, besteht durch die Therapie mit SC die Möglichkeit, dass sie sich unbegrenzt teilen und vermehren und dadurch Tumore ausbilden. Besonders besteht die Gefahr bei Zellen, die durch die Aktivierung von Onkogenen zum Zwecke der kulturellen Amplifikation immortalisiert wurden. Viele Faktoren scheinen hierbei jedoch eine Rolle zu spielen. Von Erdo *et al.* (2003) konnte durch den Vergleich von xenogener gegenüber homologer Stammzelltransplantation in Schlaganfall-Modellen an Nagetieren gezeigt werden, dass sich im Falle einer homologen Stammzelltransplantation in der Maus vermehrt Teratocarcinome ausbilden. Die Tumorgenese war unabhängig vom

Differenzierungsgrad der implantierten Zellen. Diese Tumorgenese durch homologe Transplantation kann möglicherweise durch eine spezielle Differenzierungsmethode (Dihne *et al.*, 2006) verhindert werden, was die klinische Anwendung der Stammzelltherapie im Falle einer Anwendung beim Menschen erheblich sicherer machen würde und viele Bedenken gegenüber der Methode in der klinischen Anwendung ausräumen könnte.

1.4.4 Entwicklung medizinischer Ansätze der Stammzelltherapie des ZNS

Heutzutage scheint die Transplantation neuronaler Stammzellen eine der vielversprechendsten Lösungswege verschiedener neuronaler Defekte und Erkrankungen des ZNS darzustellen. Allerdings stellt die Therapie des ZNS durch die gegebene Komplexität des Organs besondere Ansprüche an die Therapie, weshalb die Transplantation differenzierter Gewebeverbände kein Lösungsansatz darstellen kann. Einzige Therapiemöglichkeit scheint die Differenzierung und Integration undifferenzierter Vorläuferzellen, um eine physiologische neuronale Architektur zu rekreieren. Modelle zu Chorea Huntington und M. Parkinson konnten bereits klinisch erprobt werden. Bei ihnen wurden fetale Spenderzellen in Patienten implantiert. Trotz der bisher gering ausgeprägten Wirksamkeit gegenüber teilweise recht stark ausgeprägten Nebenwirkungen stellen sie einen wichtigen Hinweis auf das mögliche Potenzial dieser Therapieform mit der Möglichkeit einer dauerhaften Heilung dar. Sie zeigen auch, dass die Wirksamkeit und die Ausprägung der Nebenwirkung sehr stark mit der Methode der Stammzellgewinnung einhergehen (Freed *et al.*, 2001; Hagell *et al.*, 2002).

Lange Zeit blieb ungeklärt, ob für die drei Zelltypen des ZNS eine universale Stammzelle existiert oder ob alle drei Zelllinien aus unterschiedlichen Stammzellen hervorgehen. Golden & Cepko (1996), sowie Szele & Cepko (1996) konnten eine Stammzelle nachweisen, die sich sowohl in Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten differenzieren konnte. Aber auch Zellen mit eingeschränkter Differenzierungsfähigkeit konnten nachgewiesen werden (Grove *et al.*, 1993) Neurone und Oligodendrozyten, (Galileo *et al.*, 1990) Neurone und Astrozyten. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Entwicklung der Stammzelltechnik war die Immortalisierung der Vorläuferzellen, beispielsweise durch Einschleusung aktivierter Onkogene (Snyder *et al.*, 1997), da man sonst wegen ihrer begrenzten Vermehrungsfähigkeit in Kultur immer auf den Nachschub der Stammzellen aus neuronalem Gewebe angewiesen wäre. Anhand dieser Zellen konnte gezeigt werden, dass sich Stammzellen regionspezifisch in unterschiedliche neuronale Phänotypen differenzieren können (Flax *et al.*, 1998). Der

1.4 Stammzellen

klinsche Einsatz dieser Zellen erscheint allerdings wegen ihrer theoretisch erhöhten onkogenen Potenz fragwürdig.

Grundlegend für den Erfolg einer Stammzelltherapie in Hinblick auf die regionspezifische Zelldifferenzierung ist sowohl die Potenz der SC aber auch das Vorliegen extrinsischer Signale, die die Zelldiversifizierung induziert.

Da bisher wenig über das komplexe Zusammenspiel zwischen Neuronen untereinander und Neuronen mit anderen Zellarten wenig verstanden ist, beschränken sich Therapieansätze der Neurotransplantation bisher auf Erkrankungen, bei denen hauptsächlich ein Zelltyp in einer Hirnregion betroffen ist, wie z.B. Chorea Huntington und M. Parkinson. Erkrankungen, bei denen es generalisiert zu einem Zelluntergang kommt oder bei denen durch eine Gewebnekrose ganze Hirnareale funktionell ersetzt werden müssen, wurden bisher wenig beforscht.

Weitere Therapiealternativen stellen der zellvermittelte Gentransfer, bei dem die Therapie durch genetisch veränderte Zellen, die Wirksubstanzen (Wachstumsfaktoren) (Martinez-Serrano *et al.*, 1995) im Zielgewebe freisetzen können und die Therapie durch Xenotransplantation von Stammzellen (Fink *et al.*, 2000). Ebenfalls zu nennen ist die Möglichkeit der Stimulation endogener adulter Stammzellen durch Wachstumsfaktoren (Fallon *et al.*, 2000), bei denen sowohl die Differenzierung als auch die Fähigkeit zur Migration verändert wurden, und die Transdifferenzierung somatischer Stammzellen, die relativ differenzierte Gewebestammzellen über eine Transdifferenzierung in andere Gewebestammzellen umwandelt (Brazelton *et al.*, 2000).

Von neuronalen Stammzellen verspricht man sich neue Behandlungsmöglichkeiten des M. Alzheimers, M. Parkinson, Chorea Huntington, Epilepsie, lysosomalen Speicherkrankheiten, demyelinisierenden Erkrankungen, Schädigungen des Rückenmarkes und des CVIs.

Bisherige Studien, die neuronale Stammzellen in Ischämie-Modellen an Nagetieren untersuchten, konnten eine Verbesserung der Situation anhand von motorischen Verhaltens- (Willing *et al.*, 2003b) und Lernmodellen (Willing *et al.*, 2003a) beobachten. Die Reduktion des Infarktolumens sowie die gezielte Einwanderung von neuronalen Stammzellen in das geschädigte Gebiet konnten nach intracisternaler Applikation beobachtet werden. Von

Willing *et al.* (2003a, b) konnte gezeigt werden, dass auch die Transplantation der SC über eine intravenöse Injektion zum Einwandern der Zellen in das ZNS führen kann.

Eine Phase I (Kondziolka *et al.*, 2000) und eine Phase II Studie (Kondziolka *et al.*, 2005) haben die klinische Machbarkeit an 12 bzw. 18 Schlaganfall-Patienten getestet. Insbesondere wurde hierbei die Sicherheit der subcortikalen Stammzelltransplantation untersucht. In beiden Studien wurde die klinische Machbarkeit bestätigt. Eine Entartungstendenz wurde bei diesen Patienten bisher nicht beobachtet.

1.4.5 Besonderheiten der Therapie mit embryonalen Stammzellen

Für den sicheren klinischen Einsatz müssen hierbei jedoch mehrere Hürden bewältigt werden:

- Bedingt durch die uneingeschränkte Vermehrbarkeit ist die Gefahr einer malignen Entartung gegeben, die im klinischen Einsatz nicht auftreten darf.
- Protokolle zur Differenzierung in den benötigten Zelltyp müssen zuverlässig reproduzierbar sein.

Um gezielt Zellen eines gewünschten Typs zu erhalten, stehen zwei Methoden zu Auswahl.

- Die Lineage-Selektion, bei der Zellen ungerichtet differenziert und vermehrt werden, um in einem letzten Schritt die relevanten Zellen zu selektionieren.
- Gezielte Differenzierung, bei der durch die komplexe Auswahl und Abfolge verschiedener Wachstumsfaktoren zielgerichtet überwiegend die relevanten Zellsorten differenziert werden.

Zu beachten ist, dass die Methode der ES-Transplantation nicht per se die Problematik der Immunsuppression nach Transplantation umgeht. Allerdings können in ES durch homologe Rekombination der Zellen die für die Abstoßung relevanten Proteine inaktiviert werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit eines allogenen Zellersatzes aus klonierten ES-Zellen (therapeutisches Klonen; (Munsie *et al.*, 2000)), bei dem ein Zellkerntransfer aus patienteneigenem Gewebe in entkernte Eizellen stattfindet, diese bis zum Blastozystenstadium kultiviert werden und aus denen Stammzellen gewonnen werden können, die weiter differenziert werden können. Gegenwärtig werden diese Methoden

allerdings wegen vieler ungelöster wissenschaftlicher und ethischer Probleme und dem großen Zeitbedarf nur in der Forschung und nicht klinisch eingesetzt.

1.4.6 Rechtslage und Ethik

In Deutschland wird die rechtliche Lage der Stammzellforschung weitgehend vom Embryonenschutzgesetz in der aktuellen Fassung von Oktober 2001 bestimmt. Im Embryonenschutzgesetz wird der Beginn des individuellen Lebens mit der Vereinigung der Samenzelle mit der Eizelle definiert, auch im Rahmen einer künstlichen Befruchtung. Da sich alle embryonalen Zellen bis zum 8-Zell-Stadium potentiell in einen vollständigen humanen Embryo entwickeln können, sind alle diese totipotenten Zellen dem Embryonenschutzgesetz unterstellt. Dieses verbietet jegliche Verwendung von Embryonen, bzw. den aus ihnen gewonnenen totipotenten Zellen, die nicht dem Zweck dienen, den Embryo zu erhalten. Dadurch verbietet sich die Entnahme von Zellen aus einem Embryo zur Generierung von embryonalen Stammzellen. Besonders zu nennen ist die Technik des „therapeutischen Klonens“, da durch diese Technik totipotente Zellen erzeugt werden, die zumindest theoretisch zu einem kompletten Embryo heranwachsen könnten. Ebenfalls untersagt durch das Embryonenschutzgesetz ist die gegenwärtig nur hypothetische Entdifferenzierung und Reprogrammierung einer pluripotenten Stammzelle in eine totipotente Zelle.

In Deutschland kann zurzeit nur an humanen Stammzellen geforscht werden, wenn diese aus dem Ausland importiert werden, da diese Zellen nur pluripotent sind und damit nicht unter das Embryonenschutzgesetz fallen.

Auch im übrigen Europa wird der Umgang mit embryonalen Stammzellen eher restriktiv gehandhabt. In Großbritannien soll aber die Erlaubnis zur Erforschung von humanen ES für die medizinische Forschung erteilt werden. In den USA ist die Verwendung zumindest in der privaten Forschung erlaubt, staatlich wird sie zurzeit nicht gefördert.

Unabhängig der Rechtslage gegenüber embryonaler Stammzellen, bestehen vielerorts massive ethische Bedenken vor allem gegen die Nutzung humaner totipotenter Stammzellen und Embryonen, da durch diese Technik Embryonen, die im ethischen Sinne ein vollwertiges Lebewesen darstellen, zerstört und als „Ersatzteillager“ missbraucht würden. Diese Kommerzialisierung des Lebens wird nach wie vor weltweit kontrovers diskutiert und wird wahrscheinlich nie mit einem Konsens abgeschlossen werden können. Betrachtet man jedoch die Geschehnisse der Vergangenheit, dann ist zu erwarten, dass entgegen jeglicher Bedenken die Technik der embryonalen Stammzelltherapie vorangetrieben wird und im Falle der Machbarkeit weltweit zumindest eine regionäre Verbreitung finden wird.

Ethisch eher unbedenklich stellt sich die Therapie und Forschung an adulten Stammzellen dar, solange die Zellen lediglich mit einer pluri- bzw. multipotenten Differenzierungspotenz ausgestattet sind.

1.5 Übersicht bisheriger Studien

Da das Gehirn im Falle einer ischämischen Schädigung, bedingt durch seine komplexe Differenzierung und seiner sehr begrenzten Regenerationsfähigkeit aus gewebsansässigen Vorläuferzellen mit konventionellen Methoden, bisher in seiner Funktion nur geringfügig verbessert, bzw. geheilt werden kann, scheint die Therapie mit neuronalen bzw. embryonalen Stammzellen bisher ungeahnte Möglichkeiten zu eröffnen. Studien, die diesen Therapieansatz grundlegend untersuchen, bedienen sich im Wesentlichen dreier Methoden oder einer Kombination aus diesen:

- Untersuchung einer Verhaltensänderung im lebenden Tier.
- Immunhistochemische Nachweise von wichtigen neuronalen Proteinen, die vermuten lassen, dass die entwickelten Zellen auch neuronale Funktionen übernehmen können.
- Elektrophysiologische Untersuchung der aus Stammzellen stammenden Zellen

Die letzten beiden können sowohl *in vivo* oder *in vitro* durchgeführt werden und sind methodisch bedingt nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar.

1.5.1 In-vitro

Benninger *et al.* (2003) zeigt aus ES-Zellen abstammende Neurone in einer Hirnschnittkultur, bei denen er elektrophysiologisch Na⁺- und K⁺-Ströme sowie postsynaptische Ströme zeigen kann, die einen Hinweis auf funktionelle Interaktion mit dem host-Gewebe darstellen. Eine Integration in mit pathologisch ischämisch verändertem Gewebe fand er hierbei nicht.

In Zellkulturen kann Lee *et al.* (2000) aus ES-Zellen entstandene Zellen nachweisen, die elektrophysiologisch neuronale Eigenschaften besitzen. Als Studie an Zellkulturen sind die Ergebnisse allerdings schwer auf ein Tiermodell und erst recht nicht auf den Menschen übertragbar.

Westerlund *et al.* (2003) konnte in Zellkulturen mit adulten humanen Stammzellen eine Entwicklung hin zu Zellen mit elektrophysiologischen Eigenschaften von Neuronen zeigen.

Von Jiang *et al.* (2003) konnte an Zellkulturen mit adulten Stammzellen des Knochenmarks elektrophysiologisch eine neuronale Differenzierung nachgewiesen werden. Moe *et al.* (2005)

1.6 Ziel dieser Arbeit

konnten mit immunhistochemischen und elektrophysiologischen Methoden nachweisen, dass sich humane adulte neuronale Stammzellen in Zellkultur in funktionelle Neurone differenzieren und untereinander funktionelle Netzwerke ausbilden können. Hierbei handelt es sich um eine *in vitro*-Studie, die keinen Rückschluss auf eine Integration in neuronales host-Gewebes zulässt.

1.5.2 In-vivo

Wei *et al.* (2005) untersuchte an einem Rattenmodell nach fokaler Ischämie die strukturelle Reparatur und die Besserung von Verhaltensmustern und fand heraus, dass 1-8 Wochen nach Stammzellapplikation in der ischämische Lakune des Gehirns Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und endotheliale Zellen proliferierten, die aus embryonalen Stammzellen entstanden waren. Ebenso hat er eine Verhaltensbesserung gegenüber einer Kontrollgruppe gefunden. Einen Nachweis über eine funktionelle Integration der transplantierten Zellen in das host-Gewebe macht er jedoch nicht. Außerdem kann in dieser Arbeit der „*bystander Effekt*“ ausgeschlossen werden, d.h. ein Effekt, der nicht auf Stammzelldifferenzierung basiert, sondern auf zusätzlichen nicht untersuchten Mechanismen wie neuroregenerativen Mechanismen des host-Gewebes.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Aus vorangegangenen immunhistologischen Untersuchungen (Dihne *et al.*, 2003) war bekannt, dass sich die Gesamtheit der transplantierten eGFP positiven precursor-Zellen in unterschiedliche neuroektodermale Zelltypen wie Neurone und diverse Typen von glialen Zellen differenzieren. Ziel dieser Arbeit war es, die im immunhistologischen Nachweis als neuronal vordifferenzierte Stammzellen zu untersuchen und elektrophysiologische Eigenschaften von Neuronen zu identifizieren, um damit eine Aussage über ihre Funktionalität als Neuron treffen zu können. Anders als in bestehenden Studien (s.o.) sollte ebenfalls eine mögliche funktionelle Integration der transplantierten Zellen in das host-Gewebe an einem *in vivo*-Modell untersucht werden.

Teile dieser Arbeit wurden als Posterbeitrag auf dem Kongress der Society for Neuroscience in Washington 2005 vorgestellt.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Daten dieser Arbeit wurden zusammen mit immunhistochemischen Ergebnissen einer kooperierenden Arbeitsgruppe von Professor Reymann in Magdeburg zur Publikation bei der Zeitschrift „*Brain*“ eingereicht, akzeptiert und befinden sich zur Zeit im Druck (Buhmann *et al.*, 2006).

2 Material und Methoden

Die vorliegende Studie mit dem hier dargelegten Versuchsprotokoll wurde von der Genehmigungsbehörde, dem Landesverwaltungsamt Halle, Postfach 200256 unter dem Aktenzeichen 2-555.Ifz begutachtet und genehmigt.

2.1 Generierung von neuronalen precursor-Zellen aus ES der Maus

Die Generierung und Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen (ES) wurde von Marcel Dinhé (Zentrum für molekulare Neurobiologie, Universität Hamburg) vorgenommen.

Eine embryonale Stammzelllinie, die zusätzlich „*enhanced green fluorescent protein*“ (eGFP) exprimiert, wurde aus transgenen C57BL/6J Mäusen, die unter dem Einfluß des β -actin Promotors des Huhns (Okabe *et al.*, 1997) ubiquitär eGFP exprimiert, wie durch Abbondanzo (1993) und Dihne (2006) beschrieben. Unreife embryonale Stammzellen (ESC) wurden nach dem fünfphasigen Protokoll mit geringen Modifikationen generiert (Okabe *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000; Dihne *et al.*, 2006). Undifferenzierte ESCs (Phase 1) wurden auf Mitomycin behandelten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) zusammen mit 1000 U/ml Leukämie Inhibitions Faktor (LIF, Chemicon, Temecula, CA, USA) in ESC Medium angezchtet. Nach der Entstehung von *embryoid bodies* in ESC Medium ohne LIF für vier Tage wurden Nestin-positive Zellen durch Austausch des ESC Mediums gegen ITSFn Medium für 8 Tage (Phase 3; (Kim *et al.*, 2002) selektiert. Anschließend wurden die dissoziierten Zellen in Gewebekulturschalen, die mit 15 μ g/ml Poly-L-Ornithin (PLO, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 1 μ g/ml Laminin (Sigma) vorbehandelt wurden, in DMEM/F12 Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 2 % B27 Zusatz (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin, Antibiotikum (Invitrogen) und 20 ng/l FGF-2 (PreproTech, Rocky Hill, NY, USA; frühe Phase 4) ausgesät. Mehr als 95% der neuronalen Vorläuferzellen der Phase 4 exprimierten Nestin und das *neuronale Cell Adhäsions-Molekül* (NCAM) und proliferierten in der Gegenwart von FGF-2. Der Entzug von FGF-2 führte zur Differenzierung dieser Zellen in die drei Hauptzelllinien des Zentralen Nervensystems.

2.2 Cerebrale Ischämie und precursor-Zell Transplantation

Für die Implantation der Stammzellen wurden männliche Fischer-Ratten (Charles River, Deutschland) in einem Alter von 5 Wochen verwendet, die zu Beginn der Experimente 250 – 270 g wogen. Der Zugang zu Futter und Wasser erfolgte *ad libitum* während der Versuchphase. Die in diesem Abschnitt beschriebene Transplantation wurde von Claudia Bühnemann (IFN, Magdeburg, Deutschland) vorgenommen.

Alle chirurgischen Eingriffe wurden unter Halothan-Anästhesie durchgeführt. Der Vasokonstriktor Endothelin-1 (375 pmol; Sigma) wurde in 0,9 % NaCl gelöst und mit einer 5 µl-Hamilton-Spritze nahe der rechten A. cerebri media (MCA) appliziert. Dazu wurde die Kanüle stereotaktisch +0,09 mm anterior, +0,48 mm lateral und –0,75 mm unterhalb des Bregmas positioniert (Paxinos & Watson, 1998). Nach der Injektion wurde die Kanüle für 5 Minuten *in situ* belassen um eine vollständige Diffusion des Endothelins in das Gewebe zu erreichen. Anschliessend wurde die Nadel entfernt, die Wunde gereinigt und vernäht.

Am Tag der Transplantation wurden neuronale precursor-Zellen, die bis zum 3. Tag der Phase 5 differenziert waren, durch 0,05 % Trypsin / 0,04 % EDTA dissoziiert und in *Hanks balanced salt solution* (HBSS) bei einer Dichte von 50.000 Zellen/µl resuspendiert.

Sieben Tage nach der eMCAO wurden etwa 100.000 Zellen / 2 µl in einer Zeit von 3 Minuten mit einer 5 µl-Hamilton-Spritze an 2 Stellen des Rattengehirns injiziert. Die Injektion erfolgte nahe der Ischämiezone in A-P +0,09 mm; M-L +0,48 mm; D-V –0,55 mm, ipsilateraler kortikal: A-P +0,09 mm; M-L +0,2 mm; D-V –0,21 mm, ipsilateral striatal: A-P +0,09 mm; M-L +0,2 mm; D-V –0,38 mm. Nach der Injektion wurde die Kanüle für 3 Minuten *in situ* belassen, um einen Reflux der Zellen entlang des Stichkanales zu minimieren. Nach dem Entfernen der Nadel wurde die Wunde verschlossen und vernäht.

Um eine Abstoßung der transplantierten Zellen zu verhindern, erhielten die Ratten täglich eine intraperitoneale Injektion mit Cyclosporin A (CsA, Sandimmun Optoral, Novartis, 10mg/kg) bis zu dem Tag vor der Verwendung in einem Experiment. Alle Tiere überlebten den Zeitraum zwischen Implantation der Stammzellen und der Tötung zur Organentnahme zu Versuchszwecken.

2.3 *Präparation des Gehirns*

Drei bis sieben Wochen nach der Stammzell-Implantation wurden die Tiere getötet und für die Versuche verwendet.

Hierzu wurde die Ratte mit Halothan narkotisiert, die Narkosetiefe wurde durch einen Schmerzreiz am Schwanz und den Hinterpfoten kontrolliert. Anschließend wurde die Ratte mit einer Guillotine (Feinmechanische Werkstatt, Physiologisches Institut, Gießen) dekapitiert. Mit einem Skalpell wurde der Schädel skalpiert. Die Schädelkalotte wurde vom Foramen magnum ausgehend vorsichtig nach rostral mit einer Knochensplitterzange nach Böhler (Aesculap AG & Co. KG, Deutschland) entfernt (Abbildung 2).

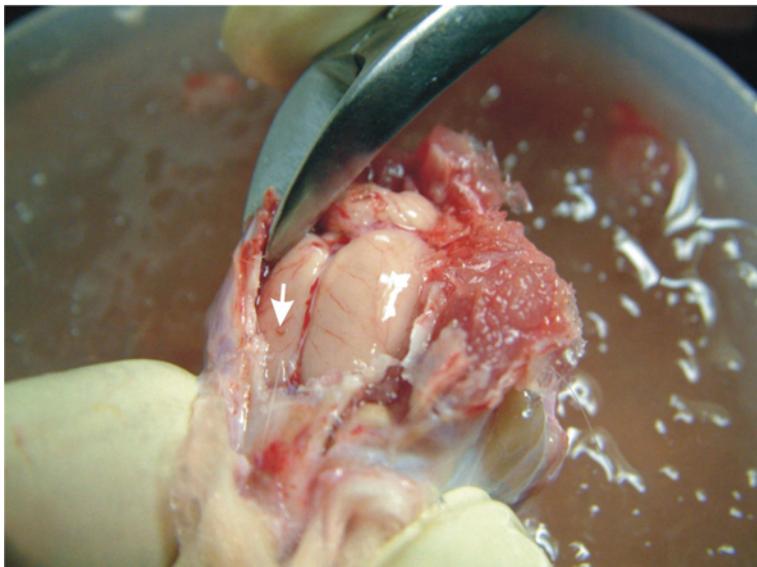


Abbildung 2:

Eröffnung der Schädelkalotte mit einer Knochensplitterzange nach Böhler. Der Pfeil deutet auf die mediale Implantationsstelle im rechten Ventrikel.

Die Hirnnerven wurden mit einem schmalen Spatel an der Hirnbasis durchtrennt und das Gehirn enukleiert. Visuell wurde die Implantationsstelle in der rechten Hemisphäre, die durch eine punktuelle mediale und laterale Verfärbung der Hirnoberfläche sichtbar war, (Abbildung 3A), identifiziert und mit je einem coronaren Schnitt mit einer entfetteten Rasierklinge ca. 3 mm vor und hinter den Einstichstellen aus der rechten Hemisphäre exzidiert. Die dem Gehirnblock aufliegende Pia mater wurde der A. cerebri media folgend stumpf mit Mikropinzetten (Dumont #5, Fine Science Tools, North Vancouver, Canada) abpräpariert und der im eröffneten Seitenventrikel liegende Plexus choroideus entfernt. Zur Präparation wurde nach Dekapitation der Schädel bzw. das Gehirn in eiskalter Carbogenbegaster (95 % O₂, 5 % CO₂; Linde AG, Deutschland) physiologischer Salzlösung

2.3 Präparation des Gehirns

(PSL, -1 - +4 °C) gelagert, um den Zellmetabolismus zu verlangsamen und Zellschäden zu minimieren.

Zur Herstellung der Dünnschnitte wurde ähnlich verfahren wie durch Scholz *et al.* (1998a) mit dorsalen Hinterwurzelganglien der Ratte (DRG). Der vorliegende Gehirnblock wurde in einem Becherglas mit Agar, 2 Gew.%, bei 40 °C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) aus PSL eingebettet und dieses Becherglas in einem tiefgekühlten 1 M NaCl-Bad (ca. -24 °C) schnell abgekühlt. Das Präparat wurde würfelförmig ausgeschnitten (Abbildung 4A) und mit Cyanoacrylat (UHU GmbH & Co. KG, Deutschland) auf die Präparateplatte eines Vibroslicers Leica VT 1000S (Leica Mikrosysteme GmbH, Deutschland) aufgeklebt, mit der Platte in die Präparatschale eingespannt und mit 2-6 °C kalter carbogenbegaster PSL bedeckt. Von diesem Präparat wurden mit dem Slicer bei einem Klingenvorschub (Classic Klingen, Wilkinson Sword GmbH, Deutschland) von 3 mm/min Schnitte von 150 – 200 µm Schichtstärke hergestellt (Abbildung 4B). Diese Schnitte wurden vom Agar befreit und in einem Vorratsbad mit PSL bei Raumtemperatur (21-23 °C) unter ständiger Carbogenbegasung aufbewahrt. Sie wurden bis zu 14 h für Versuche verwendet.

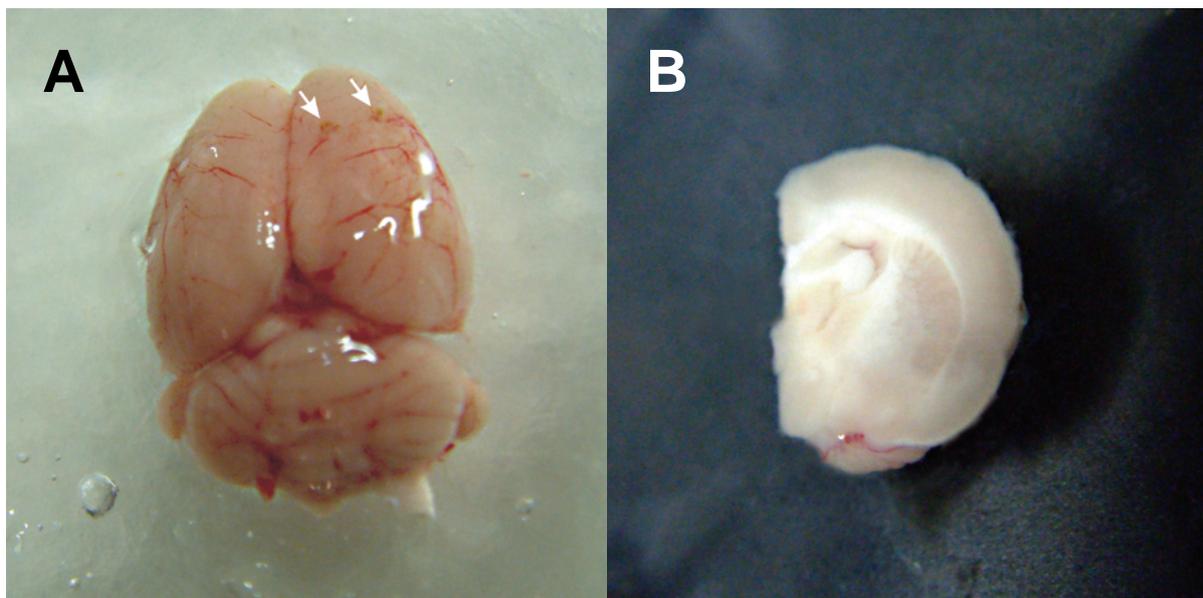


Abbildung 3 A: Das Rattenhirn nach der Eukleation aus dem Schädel.

A: Die Pfeile deuten auf die mediale und die laterale Implantationsstelle. **B:** Aufsicht auf die dorsale Schnittfläche der rechten Hemisphäre. Deutlich unterscheidbar Neocortex, Corpus callosum, rechter Seitenventrikel, Capsula interna, Basalganglien (Globus pallidus, Putamen, Striatum) und A. cerebri media. Das graft-Gewebe ist in diesem Präparat nicht angeschnitten.

2.4 mikroskopisches Präparat

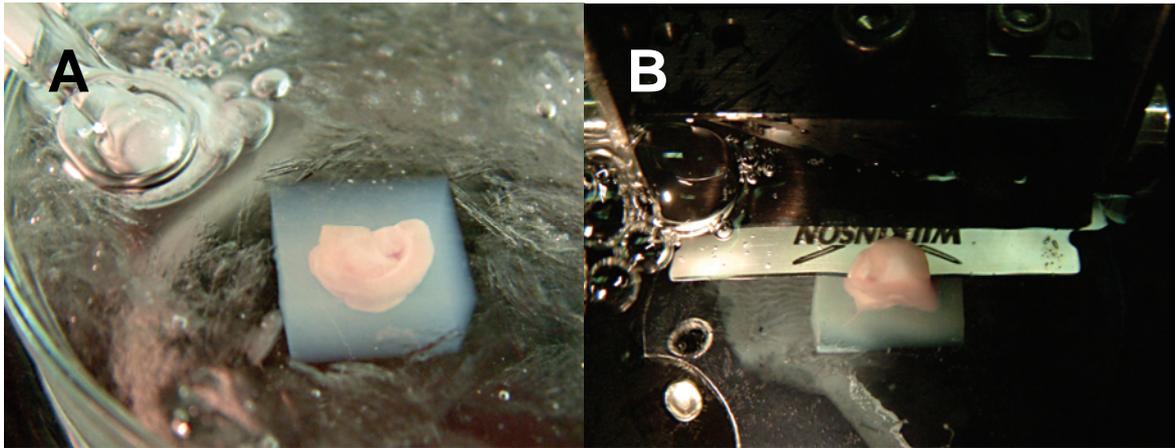


Abbildung 4: Herstellung der Hirnschnitte

A: In einem Agarblock eingebetteter Teil der rechten Hirnhemisphäre, der beide grafts enthält. Blick auf die dorsale Schnittfläche. **B:** Im Vibroslicer werden Gewebeschichten von 150 – 200 µm Stärke abgetragen

2.4 mikroskopisches Präparat

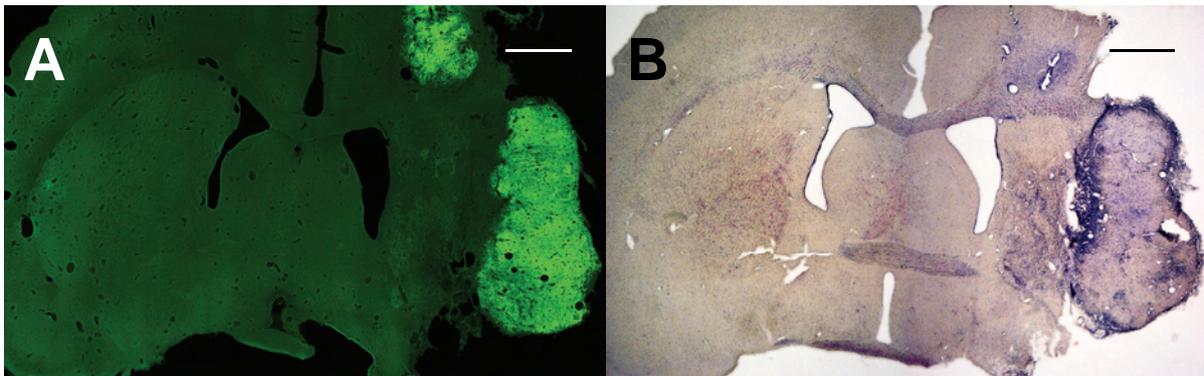


Abbildung 5: Vergleichende Darstellung eines Hirnschnittes 4 Wochen nach Transplantation

A: Abbildung im Fluoreszenzmikroskop. Durch eGFP hell leuchtend, heben sich der mediale und laterale Graft vom Leuchten des restlichen Hirngewebes deutlich ab. Die Abbildung wurde aus 54 einzelnen hochauflösenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen durch elektronische Bildverarbeitung zusammengesetzt.

B: Abbildung eines vergleichbaren Schnittes im Lichtmikroskop. Der laterale Graft ist sehr deutlich, der mediale nur schwach vom übrigen Gehirngewebe abgrenzbar. Maßbalken jeweils 500 µm.

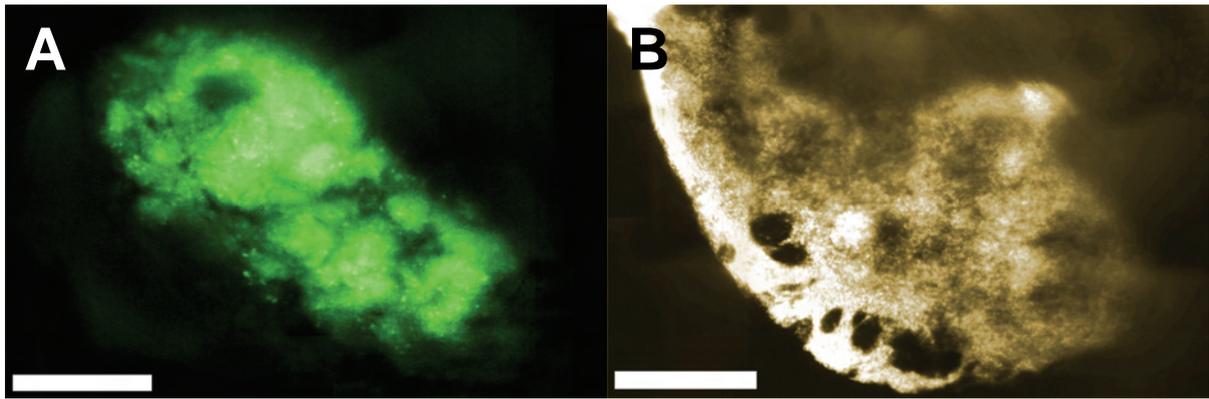


Abbildung 6: Fluoreszenz- und Lichtmikroskop Darstellung des grafts im elektrophysiologischen Setup.

A: Übersicht eines lateralen eGFP markierten grafts in der Fluoreszenz-Optik des Versuchsmikroskopes.

B: Dieselbe Übersicht im Lichtmikroskop. Maßbalken: 50 µm.

2.5 Pipetten- und Kontrolllösungen

Zur Herstellung der Pipettenlösung wurden folgende Substanzen verwendet. Alle Werte sind in mM angegeben. High-K-Pipettenlösung: KCl 18, K-Aspartat 100, CaCl₂ 1, MgCl₂ 3, Na₂-Adenosin 5'-triphosphat 2, Na₃-Guanosin 5'-triphosphat 0,1, Ethylenglycol-bis(β-Aminoethyl Ether) N, N, N', N'-Tetraessigsäure (EGTA) 10, N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'(2-Ethanosulfonsäure) (HEPES) 10. Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH 10 und KOH 27 auf einen pH von 7,3 titriert (pH-Meter, Ingold Elektrode, Merck, BRD). Die finalen Konzentrationen für Kalium und Natrium betragen: K⁺ 145, Na⁺ 14,3.

Die Innenlösung wurde nach der Herstellung tiefgefroren und jeweils an einem Versuchstag aufgetaut, um sicherzustellen, dass die beinhalteten Konzentrationen an ATP 2 mmol/l und GTP 0,1 mmol/l möglichst voll verfügbar waren, da energiereiche Metabolite wie ATP und GTP bei Zimmertemperatur schneller durch spontane Hydrolyse oder Verunreinigungen mit Mikroorganismen verbraucht werden können als bei -24 °C.

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, BRD) bezogen.

Zur Herstellung der Physiologischen Salzlösung (PSL) wurden folgende Substanzen verwendet (alle Angaben in mM): NaCl 115, KCl 5,6, MgCl₂ 1, Glucose 11, NaH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2,2. Der pH-Wert wurde durch Begasung mit Carbogengas (95% O₂/5% CO₂) auf 7,25-7,3 eingestellt. Die finale Konzentration an Na⁺ betrug 141.

In einzelnen Versuchen wurde eine physiologische Salzlösung verwendet, die einen geringen Calciumgehalt besaß. In dieser Lösung wurde anstatt 2,2 mmol/l nur 0,1 mmol/l CaCl_2 verwendet. Die übrige Zusammensetzung der Lösung blieb unverändert.

Als Begasung der carbonatgepufferten Lösungen wurde eine Gasgemisch von 95% O_2 und 5% CO_2 (Carbogengas) gewählt, welches über Begasungssteine mit einer Porengröße von 0 in die Lösungen eingeleitet wurde. Der hohe Anteil des Sauerstoffs, der theoretisch einem pO_2 von 720 mmHg entspricht, führt zur maximalen Sauerstoffsättigung der Gewebe und wirkt einem möglichen hypoxischen Schaden des Präparates entgegen.

2.6 Toxine

2.6.1 Tetrodotoxin

Tetrodotoxin (TTX) ist ein Toxin, das in der Leber und den Ovarien vieler Kugelfischarten (Tetraodontidae) vorkommt. Es ist ein sehr langsam reversibler selektiver Blocker von einer Gruppe von Na^+ -Kanälen (Narahashi *et al.*, 1964; Hille, 1968) und unterbindet damit die Erregungsbildung und –ausbreitung an erregbaren Membranen. Es wurde in der PSL in einer Konzentration von 100 nmol/l eingesetzt.

2.6.2 Tetraethylammonium

Tetraethylammonium (TEA) ist ein Toxin, welches spannungsabhängige Kaliumkanäle reversibel blockieren (Hille, 1967; Koppenhofer & Vogel, 1969) und damit die Repolarisierung nach einem Aktionspotential verhindern kann. Es wurde in PSL in einer Konzentration von 10 mmol/l eingesetzt. Die Stammlösung wurde in einer Konzentration von 1 M aufbewahrt.

2.7 Die patch-clamp Technik

Sämtliche Experimente dieser hier vorliegenden Arbeit beruhen auf der patch-clamp Technik (Hamill *et al.*, 1981), die von Neher und Sakmann (1976) erstmals beschrieben wurde. Sie beruht auf dem schon seit langer Zeit üblichen Verfahren der Spannungsklemme (Hodgkin & Huxley, 1952), bei der die Zellmembran als ein vereinfachtes RC-Element eines elektrischen

2.7 Die patch-clamp Technik

Schaltkreises schematisiert werden kann. Die Zellmembran stellt dabei den Kondensator, die Ionenkanäle den elektrischen Widerstand und das Membranpotential die Spannungsquelle dar (Abbildung 7). Eine mit Elektrolytlösung gefüllte Pipette wird durch die Zellmembran in das Zytosol einer Zelle eingebracht. Durch Konstanthalten des Membranruhepotentials bei fortwährender Spannungsapplikation mittels eines Feedbackverstärkers kann mit einem weiteren Verstärker der Kompensationsstrom gemessen werden, der aufgebracht werden muss, um den über die Messpipette fließenden Strom auszugleichen. Vom Betrag her entspricht der Kompensationsstrom dem Gesamtstrom der Membran der untersuchten Zelle. Eine Einschränkung dieser Methode besteht nur bei sehr schnellen Strom- bzw. Spannungskinetiken, da der Feedbackverstärker eine, wenn auch geringe, Latenz besitzt, bis er den kompensierenden Strom komplett aufbringen kann. Der Gesamtmembranstrom setzt sich als Summenstrom aus Ionenkanal- und Porenströmen und dem unspezifischen Leckstrom, der durch das Verletzen der Zellmembran zustande kommt, zusammen. Das Potential, das in der Zelle gehalten wird, ist frei wählbar. Von diesem Haltepotential aus können hyper- oder depolarisierende Spannungssprünge oder -verläufe in die Zelle injiziert werden, wobei sich die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran durch Aktivierung bzw. In- oder Deaktivierung von Ionenkanälen ändern. Während des Versuchs können Membranströme, die bei den veränderten Membranpotentialen über Ionenkanäle der Zelle als Ausgleichsströme fließen, gemessen werden.

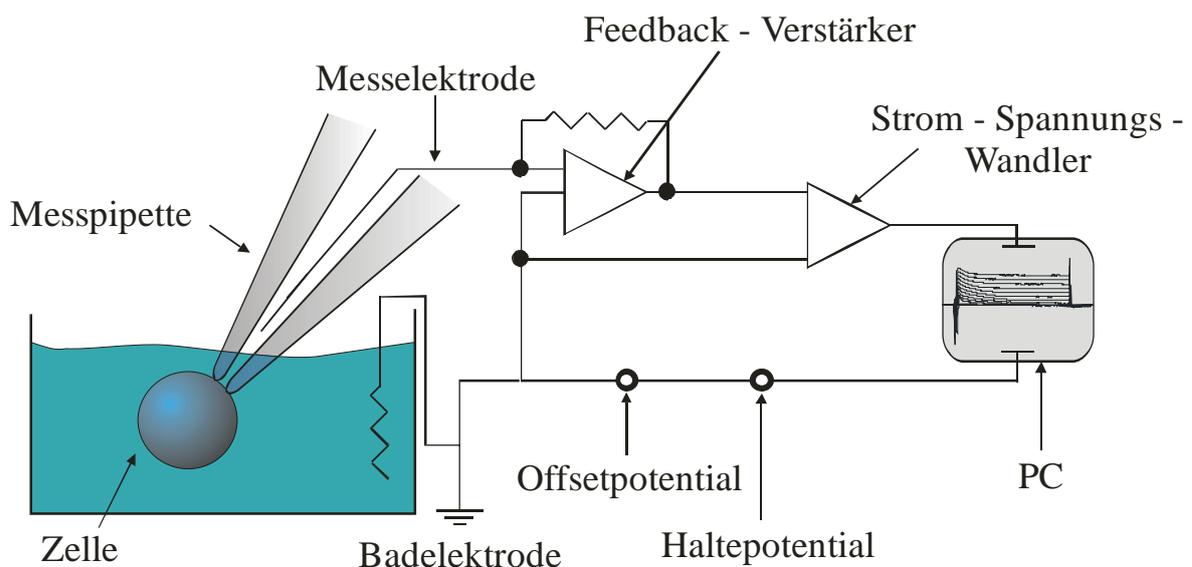


Abbildung 7: Schaltkreis eines *Voltage-Clamp*-Verstärkers

2.7 Die patch-clamp Technik

Wird der Schaltkreis der Spannungsklemme modifiziert und anstatt des Membranpotentials die Membranströme mit Hilfe des Feedbackverstärkers konstant gehalten, kann man das Ruhemembranpotential der Zelle bestimmen.

Die Neuerung der patch-clamp Technik gegenüber der Spannungsklemme ist das Erreichen eines sehr hohen Abdichtwiderstands zur Membran, der vor allem durch die Feuerpolierung der Pipette und Anlegen eines Unterdrucks beim Aufsetzen des polierten Randes auf die Zelloberfläche erreicht wird. Dadurch kann sich zwischen Zellmembran und Pipettenspitze ein sogenanntes „Gigaseal“ ausbilden, d.h., der elektrische Widerstand zwischen dem Pipetteninneren und der Außenlösung ist mehrere $G\Omega$ groß. Dadurch minimiert sich der unspezifische Leckstrom. Auch sehr kleine Ströme einzelner Ionenkanäle und Poren der Zellmembran mit Amplituden im pA-Bereich können somit erfasst werden, die früher einer Messung nicht zugänglich waren.

In der patch-clamp Methode existieren verschiedene Konfigurationen. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde nur die *whole-cell* Konfiguration verwendet. Sie wird folgendermaßen erreicht:

Die Patch-Pipette wird vorsichtig auf die Zellmembran aufgesetzt, wobei sich durch Anlegen eines Unterdrucks in der Pipette ein kleiner Membranfleck in die Pipettenöffnung einzieht und sich damit ein „Gigaseal“ ausbildet. Diese Konfiguration heißt „*cell-attached*“. Mit ihr kann ein kleiner Teil der physiologisch erhaltenen Zellmembran auf einzeln enthaltene Ionenkanäle untersucht werden.

Durch Zerstörung des unter der Pipette liegenden Membranflecks mit Unterdruck oder Stromimpulsen kann ein Übergang der *cell-attached* in die *whole-cell* Konfiguration erreicht werden. Die Pipetteninnenlösung und das Zytoplasma stehen miteinander in Verbindung und können sich nun austauschen. Durch die Wahl der Innenlösung kann intrazellulär ein klar definiertes Milieu geschaffen werden, da das Volumen des Zytoplasmas gegenüber dem Pipettenvolumen gering ist und somit nach einer gewissen Austauschphase das Zellinnere der Pipetteninnenlösung entspricht. Diese Konfiguration ist dazu geeignet, das Ruhepotential einer Zelle zu bestimmen (in der Konfiguration Stromklemme) oder den Membrangesamtstrom (in der Konfiguration Spannungsklemme) abzuleiten. Sie entspricht der Spannungsklemme nach Hodgkin und Huxley, allerdings mit deutlich geringeren Leckströmen.

2.8 Versuchsstand

2.8.1 Experimentierkammer

Die Experimentierkammer besteht aus einer Delrinscheibe (Krüger, Hamburg, BRD) mit einem Durchmesser von 30 mm, die eine zentrale Bohrung von 14 mm besitzt, gegen die von der Unterseite der Scheibe ein rundes Deckglas mit Silikonkleber geklebt ist. Dadurch entsteht eine Kammer mit einem Volumen von ca. $0,5 \text{ mm}^3$ bei durchschnittlichem Flüssigkeitspegel (Abbildung 8).

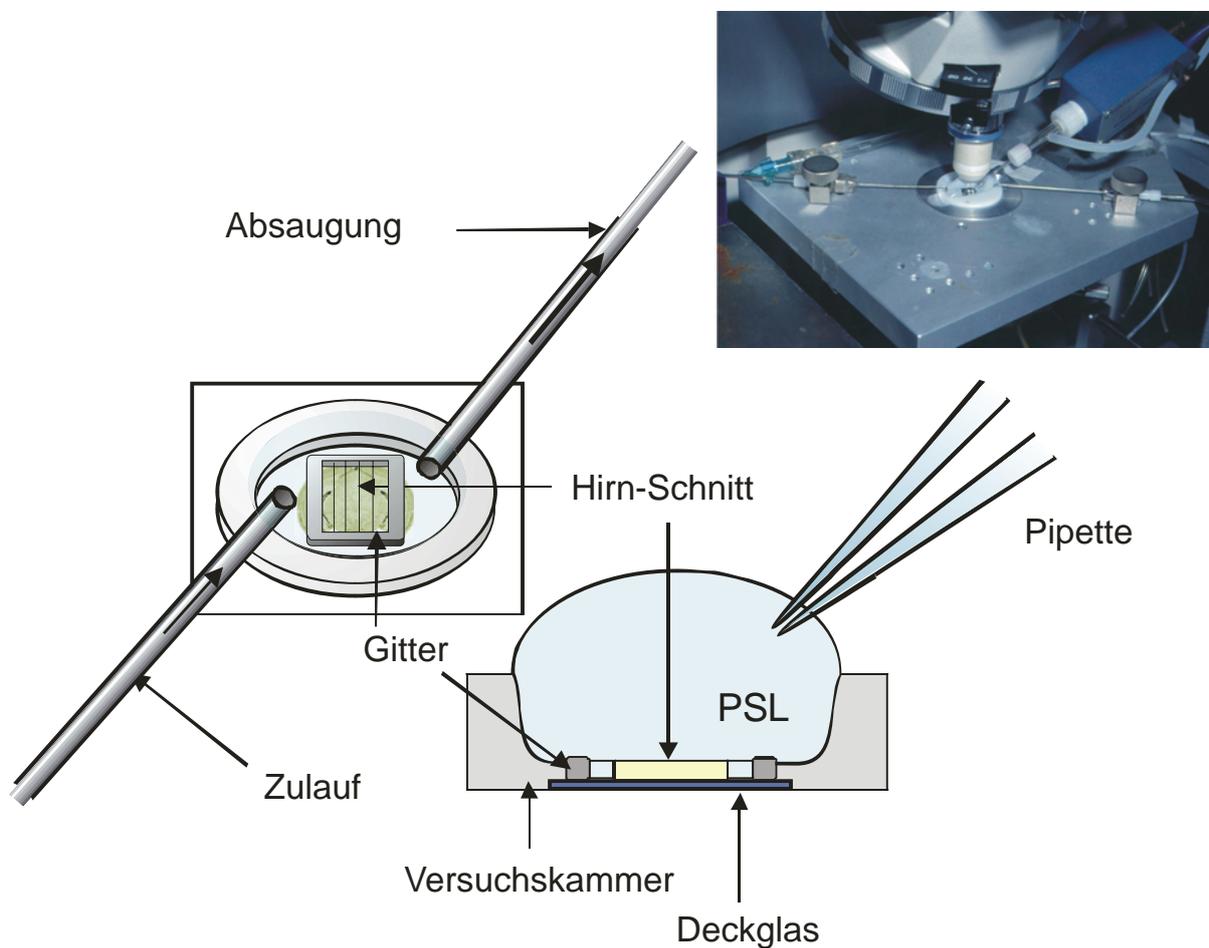


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Versuchsstandes

Die Perfusion der Experimentierkammer wird mit einem schwerkraftgetriebenen Perfusionssystem erreicht. Es besteht aus Reservoirbehältern für die Perfusionslösungen und bis zu 5 Behältern für Versuchslösungen mit 50 ml Volumen. Die Reservoirs sind über Teflonschläuche mit einem Drehschalter verbunden, der nur jeweils die eingestellte Lösung durchfließen lässt. Der Ausgang ist über einen Teflonschlauch mit einer gebogenen Kanüle

(feinmechanische Werkstatt, physiologisches Institut, Gießen, BRD) als Zulauf verbunden, die die Lösungen in die Versuchskammer leitet. Das Schlauchsystem hat vom Schalter bis zur Kammer ein Volumen von 0,15 ml und ist im Schnitt mit 1,6 ml/min durchflossen. Entleert wird die Kammer durch eine Pumpe (Wisa, Wuppertal, BRD), die über eine Kanüle den Kammerinhalt in einen Auffangbehälter absaugt.

Die Ablaufgeschwindigkeit ist etwas schneller eingestellt als die Zulaufgeschwindigkeit, damit im Entleerungsschlauch keine kontinuierliche Lösungssäule fließt, die wegen ihres Elektrolytgehaltes als Antenne fungieren und damit die Messungen stören kann.

Die Präparate wurden in der perfundierten Versuchskammer mit einem Gitter (feinmechanische Werkstatt, physiologisches Institut, Gießen, BRD) fixiert. Das Gitter besteht aus einem aus Platin gefertigten Rahmen (Außenmaß 7x5 mm), der mit 3 Fasern aus Zahnseide bespannt ist.

2.8.2 Aufbau des Meßstandes

Zur Herstellung der Pipetten wurden dickwandige Kapillaren aus Borosilikatglas (1,5 mm mit Filament, Clark Medical Instruments, Pangbourne, England) gewählt, welches wegen seiner geringen Leitfähigkeit und seinen günstigen kapazitiven Eigenschaften das Hintergrundrauschen der Messungen minimiert. Die Kapillaren sind 7,5 cm lang, haben einen äußeren Durchmesser von 1,5 mm und einen inneren von 0,86 mm. Das Filament der Kapillare lässt den Flüssigkeitsspiegel der Innenlösung leicht bis in die Spitze der fertigen Pipette fließen.

Die Kapillaren wurden mit beiden Enden in die Halterungen der Ziehschlitten eines Horizontal-Ziehgerätes (P-97, Sutter Instrument Company, USA) eingespannt und zu Pipetten gezogen.

Um den Rand der Pipettenöffnung von kleinsten Unebenheiten und Staubkörnchen zu befreien, wurde die Pipette anschließend feuerpoliert. Bei diesem Verfahren wird die Pipette einem stromdurchflossenen, glühenden Platindraht soweit angenähert, bis die Pipettenspitze leicht angeschmolzen wird. Um Auflagerungen auf der Pipettenspitze durch Platin, das vom Polierdraht verdampft wurde, zu verhindern, befindet sich an der Stelle des Drahtes, mit der die Pipette poliert wird, eine Perle aus Borosilikatglas. Um optimale Seals zu erhalten, wurden die Pipetten jeweils direkt vor einem Versuch so poliert, dass sie einen Widerstand zwischen Pipetteninnenlösung und Badlösung von 3-5 M Ω aufwiesen.

2.8 Versuchsstand

Die Pipetten wurden über die hintere Öffnung mit der Pipetteninnenlösung befüllt. Als Elektrode diente ein Silberdraht (0,5 mm Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, BRD), der regelmäßig in 1 M KCl mit einer Batterie chloriert wurde. Als Badelektrode diente ebenfalls ein chlorierter Silberdraht (Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, BRD)

Der Pipettenhalter besteht aus Kunststoffen mit hohen Dielektrizitätskonstanten, um das Hintergrundrauschen möglichst gering zu halten. Das hydrophobe Material (Delrin, Krüger, Hamburg, BRD) soll die einzelnen Anteile vor einem Wasserfilm schützen. Dieser Halter wurde in einem Winkel von 30° gegen die Horizontale auf einem 3-achsigen Mikromanipulator (ZSS 32-200-1.2, Märzhäuser, Wetzlar, BRD) befestigt. Gesteuert wurde der Manipulator über einen 3-Achsen-Joystick.

Das aufrechte Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, BRD) ist auf einem schwingungsgedämpften Tisch gelagert. Das 40fach Wasserimmersions-Objektiv ist vom Mikroskop elektrisch isoliert, um Störungen bei der Signalleitung vom Präparat zu vermeiden. Über eine Videokamera (WV-BP500, Panasonic, BRD) konnte das Bild des Mikroskops auf einen Bildschirm (WV-5410N, Panasonic, Japan) übertragen werden, so dass die Zelle während des Experiments problemlos weiter beobachtet werden konnte.

Für die Betrachtung von eGFP positiven Zellen wurde eine Fluoreszenzoptik eingesetzt. Sie bestand aus einer Quecksilberdampflampe in einem separaten Strahlengang des Mikroskops, der selektiv zugeschaltet werden konnte, in den ein optischer Filter mit einer Wellenlänge von 450-490 nm für die Anregung und einem Sperrfilter (515-565 nm) für die Betrachtung des Präparates eingebaut ist.

Zwecks Erfassung und Kategorisierung der untersuchten Zellen wurden diese digital vom Monitor abfotografiert (EOS 300D, Canon, Krefeld, Deutschland) 1/3s, f/13, 105 mm. Die Bilder wurden nachträglich digital geschärft und im Kontrast erhöht (Photoshop CS, Adobe Systems Inc., San Jose, USA).

Als *patch-clamp* Verstärker diente ein Axopatch 200A (Axon Instruments, USA) mit einem Verstärkungsbereich von 0,5-500 mV/pA. Somit können Ströme bis zu 20 nA aufgenommen werden. Die applizierten Testimpulse wurden computergesteuert vorgenommen, wobei die Steuersignale vom Rechner (Intel Pentium III, 700MHz) über den AD/DA-Wandler (Digidat 1200A, Axon Instruments) via Axopatch zur Headstage (CV201 AU) in die Pipette übermittelt wurden.

Die Signale wurden mit dem eingebauten Tiefpassfilter des Axopatch 200A (-3 dB, 4-Pol Bessel) gefiltert, um das Rauschen zu vermindern. Um Artefakte zu verhindern, wurde die Filterfrequenz gemäß des Nyquist-Kriteriums auf die Hälfte der Samplefrequenz festgesetzt.

2.8.3 Aufzeichnungs-, Auswertungs- und Darstellungsverfahren

Die analogen Rohdaten des patch-clamp Verstärkers wurden über den o.g. AD/DA-Wandler digitalisiert und mit der Aufzeichnungs- und Steuerungssoftware (Clampex 8, Axon Instruments, Foster City, USA) auf Festplatte aufgezeichnet. Die Aufnahmefrequenz wurde in Abhängigkeit des Versuchsprotokolls gewählt, um die zu verarbeitenden Datenmengen möglichst klein zu halten.

Ausgewertet wurden die Daten mit den Auswertungsprogrammen pClamp 6 und 9 (Clampfit 6 bzw. 9; Axon Instruments, Foster City, USA). Clampfit 6 diente zum automatisierten Vermessen von Stromamplituden mit Hilfe eines Makros, Clampfit 9 wurde zum manuellen Vermessen von Ruhepotentialen und Aktionspotentialen verwendet.

In *voltage-clamp* Experimenten wurde zur Bestimmung des unspezifischen Leckstroms ein hyperpolarisierender Spannungssprung appliziert und dabei die Ströme gemessen. Der so bestimmte unspezifische Leckstrom wurde vom Bruttostrom der *voltage-clamp* Experimente subtrahiert.

Die Kurvenanpassungen der Aktivierungs- und Inaktivierungskurven, Histogramme wurde mit Origin 7.0 (Microcal Software Inc., Northhampton, USA) vorgenommen. Die Kurvenanpassung und Bestimmung der Zeitkonstante (τ) der EPSPs wurde mit Clampfit 9 durchgeführt. Schemazeichnungen wurden mit Corel Draw (Corel Draw 10, Corel, Ottawa, Kanada) erstellt.

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) oder \pm SD (Standardabweichung) angegeben. Die Fehlerbalken der Zeichnungen stellen den Standardfehler dar. Ist der Betrag kleiner als das Symbol, wurden sie weggelassen. Die statistische Auswertung erfolgte in Origin mit einem gepaarten Student's t-Test. Falls das Signifikanzniveau (p) von 0,05 abweicht, ist der entsprechende Wert angegeben.

2.9 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden von Claudia Bühnemann (IFN, Magdeburg, Deutschland) durchgeführt.

Nach einer Chloralhydrat Anästhesie wurden 4 Wochen und 3 Monate alte Ratten mit 200 ml PBS (pH 7,4) und anschließend mit 200 ml 4 % Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,4) transcardial perfundiert. Das danach entnommene Gehirn wurde über Nacht in 4 % Paraformaldehyd gelagert, zur Cryoprotektion in 30 % Saccharose transferiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Methylbutan eingefroren. Von diesem Gewebsblock wurden in einem Cryotom (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland) $20\text{ }\mu\text{m}$ dünne coronare Schnitte angefertigt.

An diesen Schnitten wurden bei Raumtemperatur im frei flotierenden Zustand die Inkubationen durchgeführt, um eine bestmögliche Durchdringung durch die Antikörper (AK) zu gewährleisten. Die Inkubation mit den primären Antikörpern wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht durchgeführt: neuronales nukleares Antigen (NeuN; monoklonal Maus; 1:200; Chemicon, Temecula, USA), gliales fibrilläres saures Protein (GFAP; monoklonal Maus; 1:200; Chemicon), Anti-NaV 1.1, Anti-NaV 1.2, Anti-NaV 1.3 (alle polyklonal vom Kaninchen; 1:500 verdünnt; Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Die Schnitte wurden geblockt in PBS/Triton 0,5%, das 10% normales Esel-Serum enthielt.

Die Fluoreszenzfärbung erfolgte mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper von der Ziege (1:500, Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Einwirkzeit von 2 h bei Raumtemperatur.

Alle AK wurden mit PBS/Triton X100 0,5% mit 3% normalem Esel-Serum verdünnt. Für die Kontrolle auf unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers wurden Färbungen mit dem sekundären AK ohne den primären AK durchgeführt.

3 Resultate

3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von NLCs

In dieser Arbeit wurde die Technik der Dünnschnittpräparation (Scholz *et al.*, 1998a) modifiziert und dazu verwendet, Schnitte einer gesamten Hemisphäre eines Rattenhirns nach eMACO und precursor-Zell-Transplantation herzustellen. Drei bis sieben Wochen nach Stammzelltransplantation wurden Hirnschnitte angefertigt und mit Hilfe der patch-clamp Technik untersucht, ob sich die transplantierten Stammzellen in funktionelle Neurone differenzieren konnten. Dazu wurden 139 durch eGFP in der UV-Optik leuchtende Zellen mit einem mittleren Durchmesser zwischen 10 und 20 μm in der *whole-cell* Konfiguration untersucht, die sich direkt innerhalb oder in einer Umgebung von bis zu 400 μm um den leuchtenden graft befanden. Mehrheitlich wurden oberflächlich liegende Zellen untersucht, da die Erfolgsquote ein Gigaseal mit der Zelle zu erlangen bei tief gelegenen Zellen, die ein vorheriges Freispülen mit einer Spülpipette erforderten, sehr gering war und die Zellen während des Spülvorgangs immer Schaden nahmen oder platzten.

In 38 der 137 (27,7 %) untersuchten Zellen konnten einwärtsgerichtete spannungsabhängige Ströme mit großer Amplitude und einer schnellen Inaktivierungskinetik gezeigt werden (Abbildung 9 A), weshalb wir diese Zellen als „*neuronen-ähnliche Zellen*“ (neuronal-like cells; NLC) bezeichneten. In 16 Zellen war die Experimentqualität so gut (gute Spannungsklemme mit geringen Haltepotentialen), um aus den gemessenen Strömen eine Strom-Spannungs- (I-U), sowie Aktivierungs- bzw. Inaktivierungskurven (Abbildung 9 C) zu erstellen.

In der *whole-cell* Konfiguration wurde die Zelle bei einem Membranpotential von $E = -80 \text{ mV}$ gehalten. Der Seal-Widerstand lag bei $6,9 \pm 0,9 \text{ G}\Omega$. Das Meßprotokoll aus dem die I-U-Kurve erstellt wurde, bestand aus 15 vom Haltepotential ausgehende, um je 10 mV zunehmende Spannungssprüngen zwischen -70 und +70 mV von 100 ms Dauer mit einem Intervall von 3 Sekunden. Gemessen wurde jeweils der negative Spitzenstrom jeder Episode. Nach Subtraktion der unspezifischen Leckströme zeigte die Strom-Spannungskurve (Abbildung 9 B) einen bei -50 mV aktivierenden einwärtsgerichteten Strom, der sein Maximum bei -20 mV erreichte und ein interpoliertes Umkehrpotential von +60,6 mV hatte. Dieses befand sich nahe an dem errechneten Na^+ -Umkehrpotential nach Nernst von +58,7 mV

3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von NLCs

(23 °C). Der absolute maximale Einwärtsstrom betrug $-2,2 \pm 0,4$ nA. Aus diesen Daten ließ sich über die Boltzmann-Gleichung eine Aktivierungskurve (Abbildung 9 C, orange Kreise) mit einer halbmaximalen Aktivierung (E_{50}) $= -33,0 \pm 0,6$ mV und einer Anstiegsteilheit von $5,1 \pm 0,6$ mV/e errechnen. Hierfür wurden die gemessenen Stromamplituden durch die Differenz des Testpotentials zum Nernst-Umkehrpotential dividiert, woraus sich die Gesamtleitfähigkeit der Zelle jeweils bei dem getesteten Potential ergab. Anschließend wurden diese Werte auf die Leitfähigkeit bei einem Testpotential von 10 mV normiert, um die gemessenen Werte der verschiedenen Experimente besser miteinander vergleichbar zu machen.

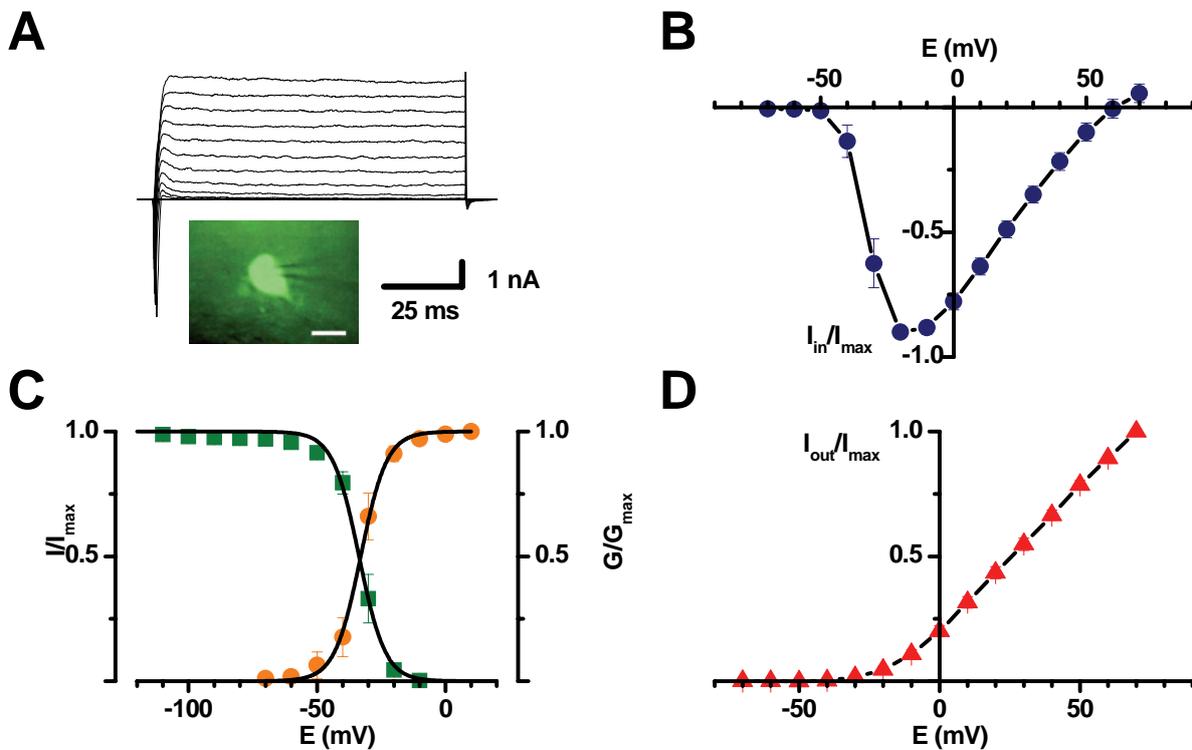


Abbildung 9: *Voltage-clamp* Registrierungen von Neuronen ähnlichen Zellen

A: *Whole-cell* Registrierungen im *voltage-clamp* des in der Fluoreszenzoptik durch eGFP leuchtenden Neurons. Messbalken: 10 μ m. B: Strom-Spannungskurve von 16 NLC der normalisierten maximalen Einwärtsströme (Interpoliertes Umkehrpotential der Einwärtsströme: $+60,6$ mV, Errechnetes Na^+ -Umkehrpotential: $+58,7$ mV). C: Aktivierungs- und Inaktivierungskurven der Einwärtsströme. Die angepasste Boltzmann-Verteilung ergab eine E_{50} von $-33,2 \pm 0,6$ mV für die Aktivierung (orange Kreise, $n=16$ Zellen) und $-33,6 \pm 0,5$ mV für die Inaktivierung (grüne Quadrate, $n=7$ Zellen). D: Strom-Spannungskurve der korrigierten und auf dem Maximalstrom normierten späten Auswärtsströme (bei 150 ms). Die Aktivierungsschwelle lag bei ca. -40 mV ($n=38$ Zellen).

3.2 Charakterisierung der Ionenkanäle mit Toxinen

Die Inaktivierungskurve (Abbildung 9 C, grüne Quadrate) wurde mit einem Protokoll erstellt, das, ausgehend vom Haltepotential -80 mV , um jeweils 10 mV zunehmende 50 ms lange Vorimpulse bei -110 mV beginnend, applizierte, welche von einem Testpotential von $+20\text{ mV}$ mit 50 ms Dauer gefolgt wurde. Gemessen wurde jeweils die maximale Amplitude der Einwärtsströme jeder Episode während des Testpotentials. Die Ströme jeder Zelle wurden auf den jeweiligen Maximalstrom normiert. Es ergab sich eine Inaktivierungskurve mit einer halbmaximalen Inaktivierung $E_{50} = -33,6 \pm 0,5$ ($n=7$) mit einer Steigung von $-5,1 \pm 0,5\text{ mV/e}$.

Zusätzlich zeigten die NLCs spannungsabhängige, langsam inaktivierende Auswärtsströme (Abbildung 9 A). Diese wurden ebenfalls mit oben genannten Spannungssprüngen generiert und als Mittelwert des $70\text{-}90\text{ ms}$ Intervalls des Testpulses gemessen und auf den jeweiligen Maximalstrom normiert. Die hieraus erstellte Strom Spannungskurve (Abbildung 9 D) zeigte einen ab -40 mV aktivierenden Auswärtsstrom. Der absolute Auswärtsstrom betrug bei einem Membranpotential von $+70\text{ mV}$ $2,6 \pm 0,5\text{ nA}$ ($n=16$).

3.2 Charakterisierung der Ionenkanäle mit Toxinen

3.2.1 TTX

Ionenkanäle lassen sich außer durch die biophysikalischen Eigenschaften auch über ihre Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Toxinen identifizieren. Deshalb wurde die Empfindlichkeit der Einwärtsströme gegenüber 100 nM TTX getestet. Die angewandte Konzentration des Kugelfischgiftes blockierte den Einwärtsstrom auf $11,7\%$ seiner Ausgangsgröße von $1,2 \pm 0,2\text{ nA}$ auf $0,1 \pm 0,1\text{ nA}$ ($n=8$, $E = -10\text{ mV}$, Abbildung 10C). Wie in der Originalregistrierung (Abbildung 10A) blieb oft Strom übrig, der von seiner Inaktivierungskinetik langsamer war als der in Kontrolle gemessene Einwärtsstrom. Zusätzlich fiel auf, dass dieser Strom erst bei höheren Reizpotentialen aktivierte. In der Folge der Einwärtsstromblockade waren die untersuchten Zellen nicht mehr in der Lage, Aktionspotentiale zu generieren.

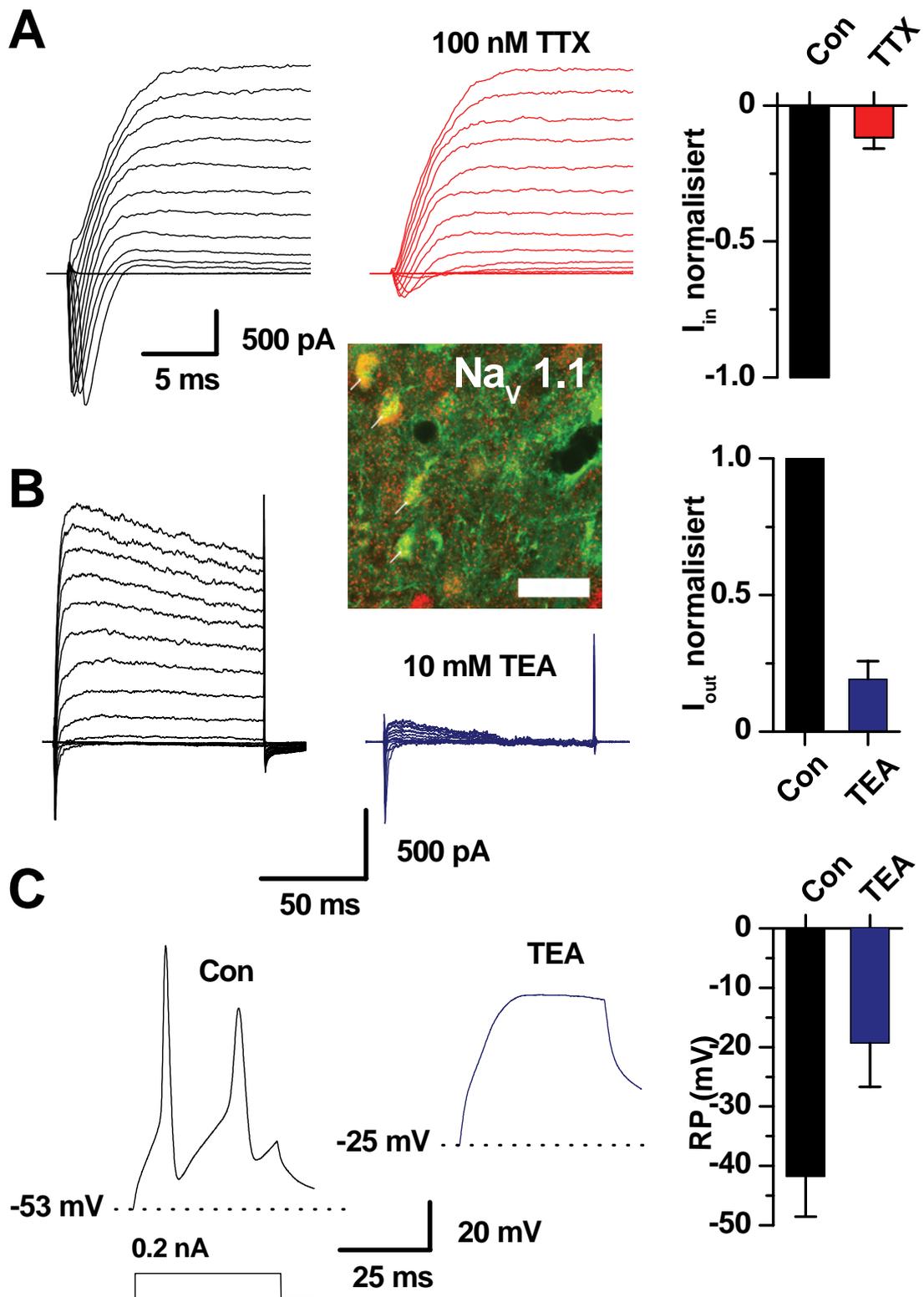


Abbildung 10: Effekte von TTX und TEA auf NLCs

3.3 Immunhistologische Typisierung des Natriumkanals

A: Ausschnittsvergrößerung einer korrigierten *whole-cell* Registrierung einer NLC 4 Wochen nach Transplantation in PSL und 100 nM TTX (Messbalken 10 μ m). Das Balkendiagramm zeigt die korrigierten und normierten maximalen Einwärtsströme bei einem Testpotential von -10 mV (n=8 Zellen), die durch 100 nM TTX auf 11,7 % geblockt wurden. **B:** *whole-cell* Registrierung einer NLC in Kontrolle und 10 mM TEA 5 Wochen nach Transplantation. Zusammenfassendes Balkendiagramm der korrigierten und normierten späten Auswärtsströme (n=5 Zellen) mit Blockade des Stromes auf 20 %. **C:** Auswirkungen von 10 mM TEA auf das Ruhepotential einer NLC, bei dem depolarisierten RP kann kein Aktionspotential generiert werden. Das Balkendiagramm zeigt die Zusammenfassung der RP von 6 Zellen: Kontrolle $-41,8 \pm 6,8$ mV, TEA $-19,3 \pm 7,4$ mV ($p < 0,02$)

3.2.2 TEA

Die Auswärtsströme wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber TEA mit einer Konzentration von 10 mM getestet. Der auf viele spannungsabhängige Kalium-Kanäle wirkende Blocker konnte den Strom bei einem Testpotential von +30 mV von $2,3 \pm 0,8$ nA auf $0,4 \pm 0,2$ nA (20 %) blockieren (n=5, Abbildung 10B).

Wie man im Balkendiagramm der Abbildung 10 C erkennen kann, hatte die Blockade der K^+ -Kanäle bedeutenden Einfluss auf das Ruhepotential (ER) der Zellen. Es depolarisierte von $-41,8 \pm 6,8$ mV auf $-19,3 \pm 7,4$ mV (n=6, Temp 23 °C). Folge dieser Depolarisation war, dass die Zellen keine Aktionspotentiale bei ihrem natürlichen E_R generieren konnten (Abbildung 10C).

3.3 *Immunhistologische Typisierung des Natriumkanals*

Durch das interpolierte Umkehrpotential und die Blockierbarkeit der Einwärtsströme durch TTX konnten die schnellen Einwärtsströme als Natriumkanäle identifiziert werden. Da die Typisierung über die Aktivierungs- und Inaktivierungskurve auf den Na_v -Kanal $Na_v1.1$ hindeutete, strebten wir eine Typisierung des Kanalbesetzes über einen immunhistologischen Nachweis mit Antikörpern an. Die erfassten elektrophysiologischen Eigenschaften deuteten am ehesten auf einen Kanal der Klassen $Na_v1.1-1.3$ hin, weshalb wir immunhistologische Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen das zu untersuchende Kanalprotein vornahmen. Damit sichergestellt wurde, dass nur Zellen, die aus Stammzellen entstanden sind, untersucht wurden, wurde nur die Kolo-kalisation der Antikörperfärbungen in eGFP positiven Zellen berücksichtigt.

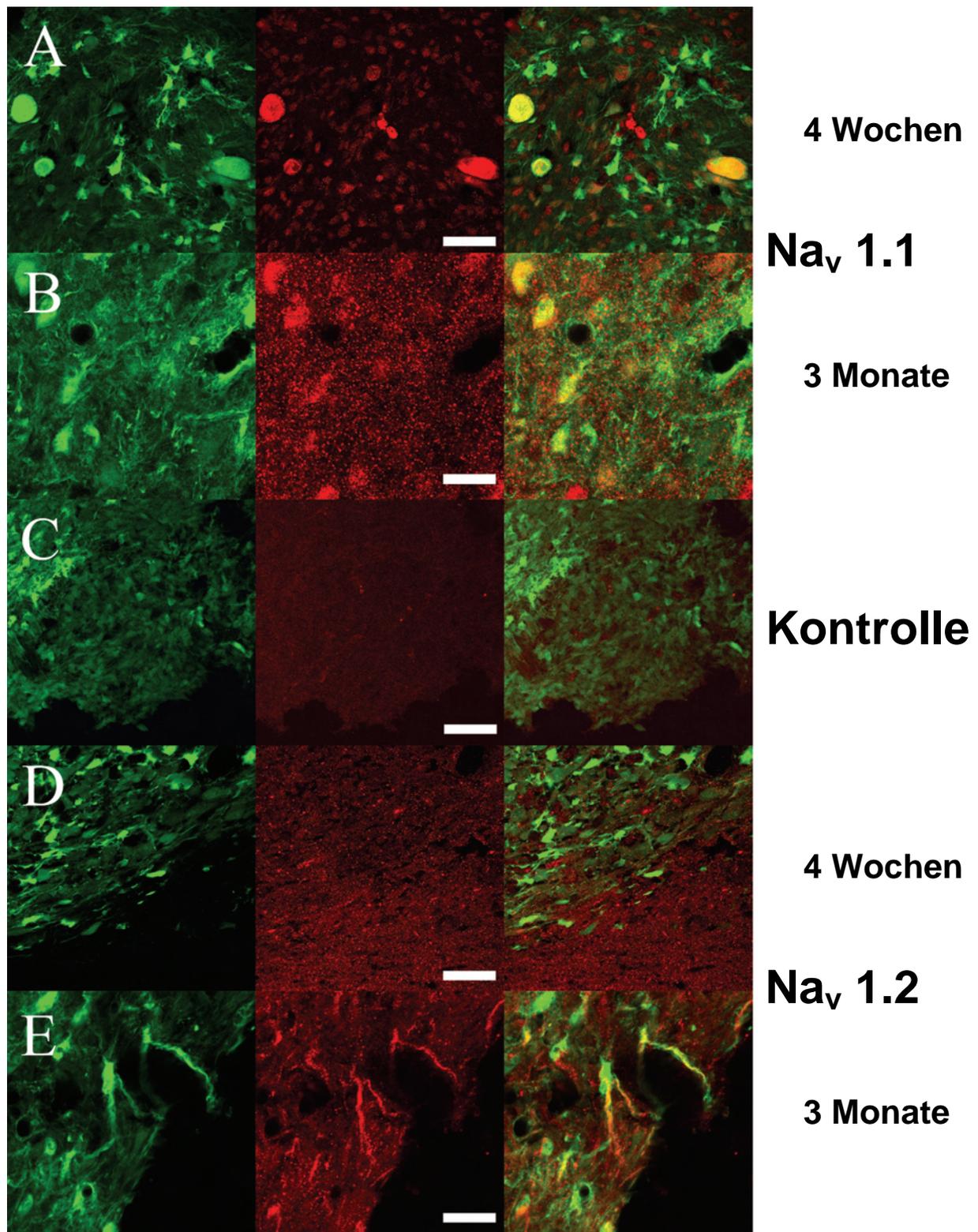


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbungen von Na_v-Kanalproteinen

A links: eGFP positive Zellen fluoreszieren grün 4 Wochen nach Transplantation. Mitte: Na_v 1.1 rot fluoreszierend dargestellt (Messbalken=25 µm). rechts: Überlagerung beider Bilder, eGFP positive Zellen mit Na_v 1.1 Kanälen im Bereich der Somata stellen sich gelb dar. B links: eGFP positive Zellen grün fluoreszierend, 3 Monate nach Transplantation. Mitte: Na_v 1.1 positive Strukturen rot fluoreszierend (Messbalken=25 µm). rechts: Überlagerung beider Bilder. eGFP positive mit Na_v 1.1 Kanälen im Bereich

3.4 Entwicklung der Aktionspotentiale 3 – 6 Wochen nach Transplantation

der Somata sind gelb dargestellt. C: Negativkontrolle. links: eGFP positive Zellen grün fluoreszierend, 4 Wochen nach Transplantation. Mitte: Färbung mit sekundärem AK ohne primären AK. Es sind keine neuronalen Strukturen angefärbt (Messbalken=100 μm). rechts: Überlagerung beider Bilder. D links: eGFP positive Zellen grün fluoreszierend nach 4 Wochen. mitte: diffus verteilte Anfärbungen durch Na_v 1.2-AK (Messbalken=50 μm). rechts: Überlagerung beider Bilder. Es kann keine eindeutige Kolokalisation von eGFP und Na_v 1.2 beobachtet werden. E links: eGFP positive Zellen grün fluoreszierend 3 Monate nach Implantation. mitte: Darstellung Na_v 1.2-positiver Strukturen (Messbalken=20 μm). rechts: Überlagerung beider Bilder. Gelb leuchtend dargestellt sind Nervenzellfortsätze von eGFP positiven Zellen mit Na_v 1.2.

Zur Sicherstellung, dass die Färbung nicht durch eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers gegen neuronale Strukturen zustande gekommen ist, wurde eine Negativkontrolle durch Applikation von sekundärem Antikörper ohne vorherige Anwendung des primären Antikörpers durchgeführt. In dieser Färbung (Abbildung 11 C) konnten keine unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers nachgewiesen werden.

Um eine Aussage über eine eventuelle zeitliche Entwicklung des Ionenkanalbesatzes machen zu können, wurden Färbungen nach 4 Wochen und nach 3 Monaten vorgenommen. Der Kanal Na_v 1.1 konnte sowohl nach 3 Wochen als auch nach 4 Monaten auf eGFP⁺-Zellen im Bereich der Somata nachgewiesen werden (Abbildung 11 A, B).

Nach 4 Wochen konnte für den Kanal Na_v 1.2 keine signifikante Kolokalisation in eGFP⁺-Zellen nachgewiesen werden, wobei der Antikörper ein diffuses Färbungsmuster gegen das Hirngewebe zeigte (Abbildung 11 D). Nach 3 Monaten konnte eine Färbung durch Antikörper in Stammzell generierten Zellen an deren Zellfortsätzen gezeigt werden (Abbildung 11 E).

In Färbungen mit Antikörpern gegen Na_v 1.3-Kanalproteine konnte in keinem der untersuchten Zeiträumen eine Kolokalisation mit eGFP nachgewiesen werden (Abbildung nicht gezeigt).

3.4 Entwicklung der Aktionspotentiale 3 – 6 Wochen nach Transplantation

Die Funktionalität von Neuronen ist eng mit der Fähigkeit, Aktionspotential zu generieren, verbunden. Wichtig hierbei sind deren Eigenschaften wie Amplitude, Dauer sowie die Fähigkeit, Serien von Aktionspotentialen generieren zu können.

Durch Injektion von Stromimpulsen (40 ms) zunehmender Stromstärke, beginnend mit einer Stärke von 0,1 nA in NLCs konnten im *current-clamp* Modus Aktionspotentiale ausgelöst werden (Abbildung 12A). In Zellen, die 4 Wochen nach Transplantation untersucht wurden, betrug die Aktionspotentialdauer (APD) $6,5 \pm 0,8$ ms (n=7, Abbildung 12C) bei halbmaximaler

3.4 Entwicklung der Aktionspotentiale 3 – 6 Wochen nach Transplantation

Amplitude bei ihrem natürlichen Ruhepotential bei einer Amplitude von $68,2 \pm 9,6$ mV ($n=7$). Nach einer längeren Implantationszeit von 7 Wochen verkürzte sich die Aktionspotential Dauer auf $2,2 \pm 0,2$ ms ($n=6$) bei zunehmender Amplitude von $95,9 \pm 13,7$ mV. Durch ein künstliches Haltepotential von $E=-80$ mV wurde die Aktionspotential Dauer verkürzt, außer bei Zellen, die älter als 6 Wochen waren (Abbildung 12C Mitte), während die Aktionspotential-Amplitude bei künstlichem Ruhepotential in allen Altersstufen bei diesem künstlichen Haltepotential zwischen 118,5 und 125,7 mV lag und damit keinen signifikanten Unterschied zeigte. Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass das Ruhepotential der NLCs von $-25,8 \pm 9,0$ mV nach 3 Wochen ($n=3$) auf $-54,5 \pm 4,3$ mV ($n=7$, 7 Wochen, Abbildung 12C) negativiert wurde.

Nach 4 Wochen konnten durch einen eine Sekunde langen Reiz in 2 von 13 Zellen Serien von Aktionspotentialen ausgelöst werden. Diese Fähigkeit entwickelte sich während der Implantationszeit, so dass nach 7 Wochen bei 6 von 8 untersuchten Zellen Serien von Aktionspotentialen beobachtet werden konnten.

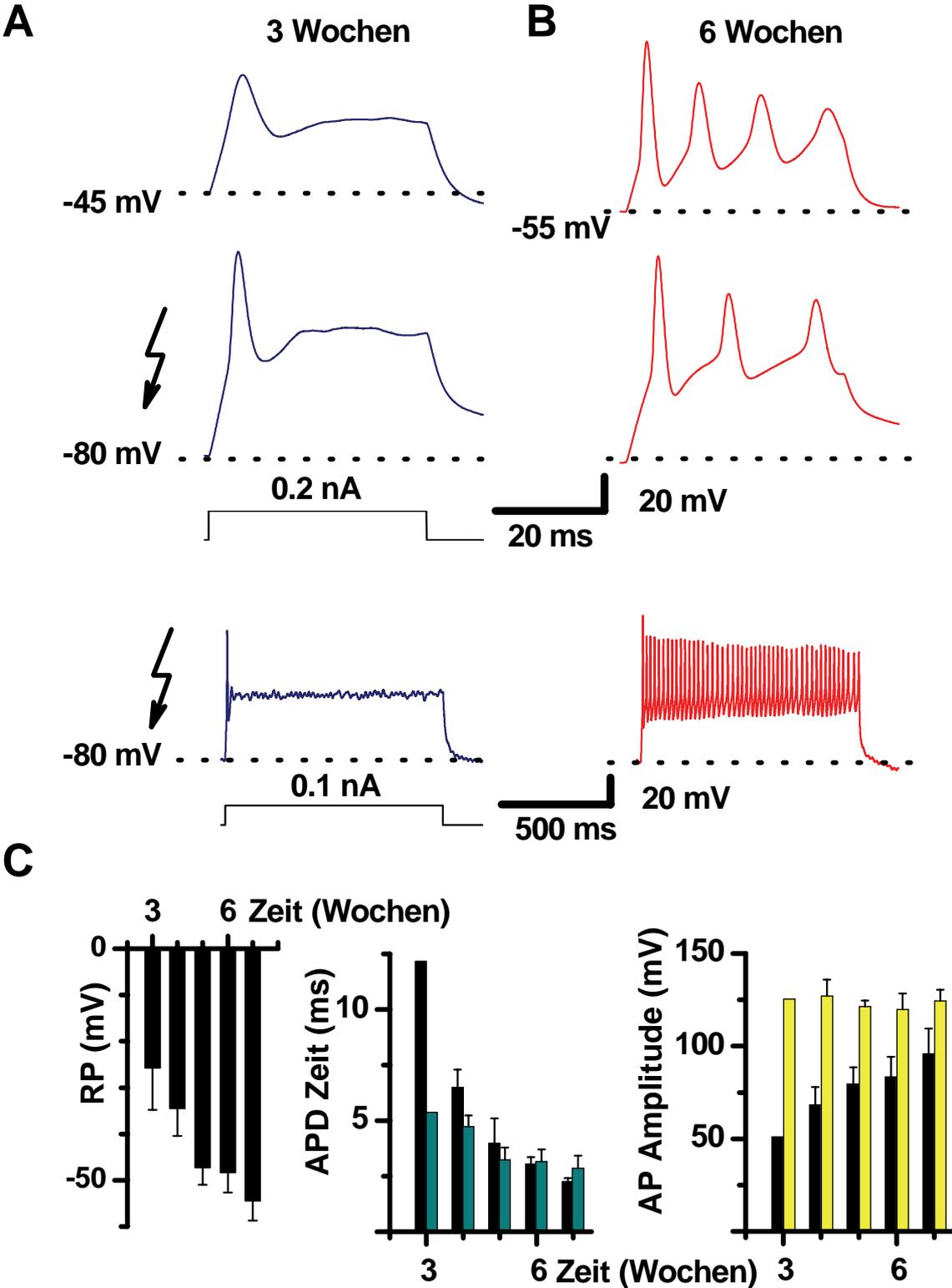


Abbildung 12: Aktionspotentiale in ihrer zeitlichen Entwicklung

A: Aktionspotentiale von NLCs nach 3- bzw. 6-wöchiger Implantationszeit, die durch einen injizierten Strom von 40 ms Dauer 0,2 nA Stärke hervorgerufen werden. Die obere Reihe wurde bei dem gegebenen Ruhemembranpotential, die untere Reihe bei einem künstlichen Ruhepotential von -80 mV ausgelöst. **B:** NLC nach 6-wöchiger Implantationszeit können auf einen 1 s Reiz von 0,1 nA Stärke mit einer Serie von Aktionspotentialen antworten. **C:** Das RP der transplantierten Zellen wird mit zunehmender Implantationsdauer negativer (n=3-10 Zellen), die Dauer der Aktionspotentiale nimmt ab (schwarze Balken Messung bei E_R; grüne Balken bei E_m=-80 mV; n=1-9 Zellen) und die Amplitude der Aktionspotentiale nimmt zu (schwarze Balken Messung bei E_R; gelbe Balken bei E_m=-80 mV; n=1-9 Zellen).

3.5 Ca²⁺-abhängige Auswärtsströme

Neben den bereits beschriebenen Na⁺- und K⁺-Kanälen interessierten wir uns dafür, ob auch Ca²⁺-Kanäle, die ebenfalls häufig auf ZNS-Neuronen beschrieben wurden, auf den vorliegenden NLCs zu finden seien. Um die heterogene Gruppe der Ca²⁺-Kanäle indirekt zu erfassen und einen durch sie bedingten Strom erkennen zu können, entschieden wir uns, keine unspezifischen Blocker einzusetzen, sondern die elektromotorische Kraft für Ca²⁺ und die Außenladungen zu verringern, indem wir die Ca²⁺-Konzentration der Badlösung [Ca²⁺] auf 0,1 mM herabsetzten.

Bei Ein- und Auswasch der Ca²⁺-armen Lösung kam es zu einer reversiblen Reduktion der Amplitude des Auswärtsstromes ab Testpotentialen größer als 0 mV, wie aus der I-U-Kurve in Abbildung 13A zu erkennen ist (n=5). Abbildung 13B zeigt den Verlauf der Stromamplitude während des Einwaschs der Ca²⁺-armen Lösung, hervorgerufen durch einen Spannungssprung zu E=30 mV. Der Verlauf der Stromamplitude sowie dessen Reversibilität deuten auf einen Effekt hin, der durch den Entzug der externen Ca²⁺-Ionen zustande kommt und ist damit deutlich von einem „*Rundown*“ der Auswärtsströme zu unterscheiden.

Die Reduktion von Ca²⁺-Ionen führte dazu, dass sich die Aktionspotential Dauer, gemessen bei Ruhepotential von 2,4±0,1 ms auf 3,9±1,0 ms (n=6), reversibel verlängerte. Eine Beeinflussung des Ruhepotentials zeigte sich durch die verringerte Ca²⁺-Konzentration nicht.

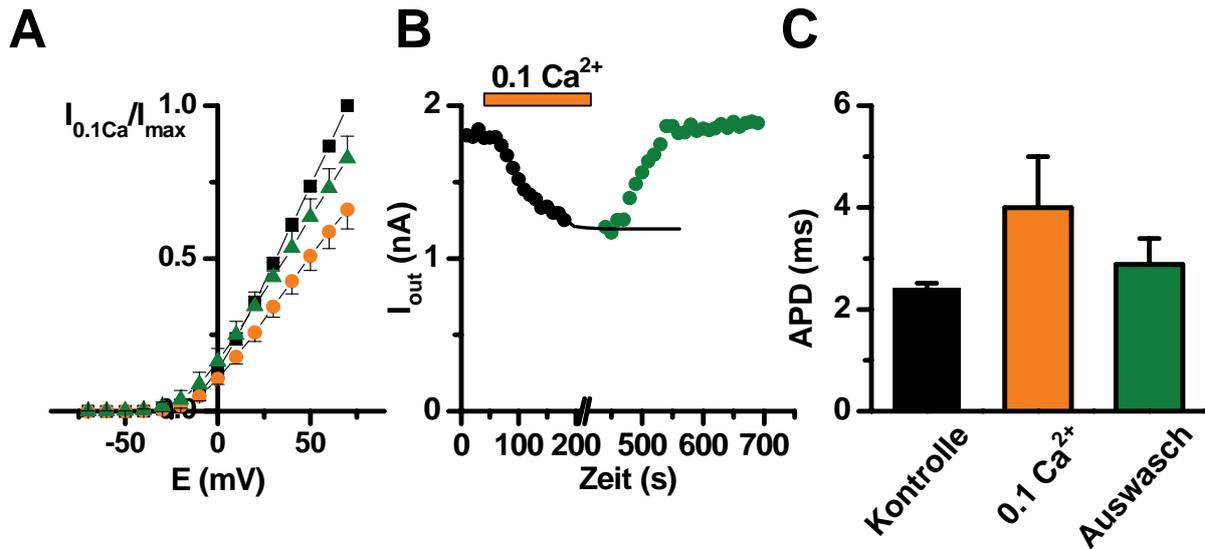


Abbildung 13: Ca²⁺-abhängige Ströme in NLC

A: Strom-Spannungs-Kurven der normierten spät-aktiven Auswärtsströme (n=6 – 3 Zellen; PSL: Quadrate, Ca²⁺-arme Lösung: Kreise, Auswasch: Dreiecke). **B:** Reduktion des spät-aktiven Auswärtsstromes bei +30 mV, Haltepotential $E_m = -80$ mV bei Einwasch einer PSL mit 0,1 mM Ca²⁺, nach Auswasch dieser Lösung erholt sich die Stromamplitude wieder. Die Linie verdeutlicht interpoliert den Kurvenverlauf der Messungen. Impulsintervall 10 s. **C:** in 0,1 Ca²⁺-PSL nimmt die Aktionspotentialdauer reversibel zu (nicht signifikant).

3.6 Exzitatorische Postsynaptische Potentiale und Ströme

Bei der Untersuchung von Zellen 5 Wochen nach der Transplantation fiel sowohl in Experimenten mit *voltage-clamp* wie auch in *current-clamp* Modus zunächst vereinzelt, später häufiger eine zelleigene Spontanaktivität auf. Bei genauer Betrachtung erinnerten die beobachteten Ströme bzw. Potentiale an solche, wie sie für exzitatorische postsynaptische Ströme und Potentiale typisch sind, die eine sehr schnelle Aktivierung von wenigen pA, bzw. mV aufweisen und dann exponentiell zu ihrem Ausgangswert zurückstreben. Sie stellen das elektrophysiologische Korrelat einzelner synaptischer Übertragungen dar und bedeuten, wenn sie in eGFP⁺-Zellen gemessen werden können, dass diese entweder mit einer weiteren eGFP⁺-Zelle oder mit einem Neuron des graft-Gewebes verbunden ist. Exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) und Ströme (EPSC) können dadurch die funktionelle Integration einer transplantierten Zelle mit dem host-Gewebe anzeigen. In dieser Arbeit stand vor allem die semiquantitative Beschreibung dieses Phänomens im Vordergrund. Die gezielte Blockade

3.6 Exzitatorische Postsynaptische Potentiale und Ströme

dieser Potentiale und Ströme wurde aufgrund der vielen verschiedenen möglichen Transmitter zentraler Synapsen und der geringen Anzahl von Versuchstieren zunächst nicht unternommen. Für die Untersuchung auf EPSCs wurden kontinuierliche *voltage-clamp* Registrierungen an NLCs 5-7 Wochen nach Transplantation bei einem Haltepotential von $E=-60$ mV durchgeführt. In 13 Zellen konnten spontane, sehr schnell aktivierende Einwärtsströme mit exponentieller Desensitisierungskinetik ($\tau=2,4\pm 0,2$ ms, Abbildung 14B) unterschiedlicher Amplituden beobachtet werden (Abbildung 14A). Die Eigenschaften dieser Ströme waren gut mit den Charakteristika von EPSCs vereinbar. Aufgrund der großen Anzahl der Ereignisse konnten die Registrierungen mit einer Template-basierenden Ereignissuche in pClamp 9.2 ausgewertet werden. Die Amplituden aller registrierten EPSCs wurden dann in einem Amplituden-Histogramm (Abbildung 14C) erfasst und mit einer mehrfachen Gauß-Anpassung analysiert. Dieser Anpassung ergab, dass die Amplitude des minimalen Ereignisses $11,6\pm 0,6$ pA betrug (Amplitude 2. Ordnung: 21,1 pA; 3. Ordnung: 34,2 pA; 4. Ordnung: 44,6 pA).

Passend zu dieser Beobachtung konnten schnelle spontane Depolarisationen (Abbildung 14D) unterschiedlicher Stärke im *current-clamp* Modus gesehen werden, die durch EPSCs unterschiedlicher Größe hervorgerufen sein können. In 7 von 13 Zellen, die spontane EPSPs gezeigt hatten, konnten Serien von Aktionspotentialen mit einer Frequenz zwischen 1 und 18,5 Hz beobachtet werden, denen entsprechende EPSC's vorausgingen.

Um die Vermutung zu erhärten, dass es sich bei den beobachteten Depolarisationen um EPSPs handelt, haben wir versucht, die synaptische Übertragung durch Entzug von Ca^{2+} -Ionen, die an der postsynaptischen Transmitterausschüttung beteiligt sind, zu unterbinden, da die spezifische Blockade angesichts der großen Anzahl der möglichen Transmitter nicht möglich erschien. Die Häufigkeit der EPSPs wurde von $13,7\pm 6,1$ min^{-1} (51 Ereignisse insgesamt) in Kontrolle durch den Einwasch einer 0,1 mM Ca^{2+} -PSL auf $1,9\pm 1,2$ min^{-1} (in 3 Zellen) reduziert und stiegen in ihrer Häufigkeit nach Auswasch mit PSL wieder auf $8,9\pm 5,4$ min^{-1} an.

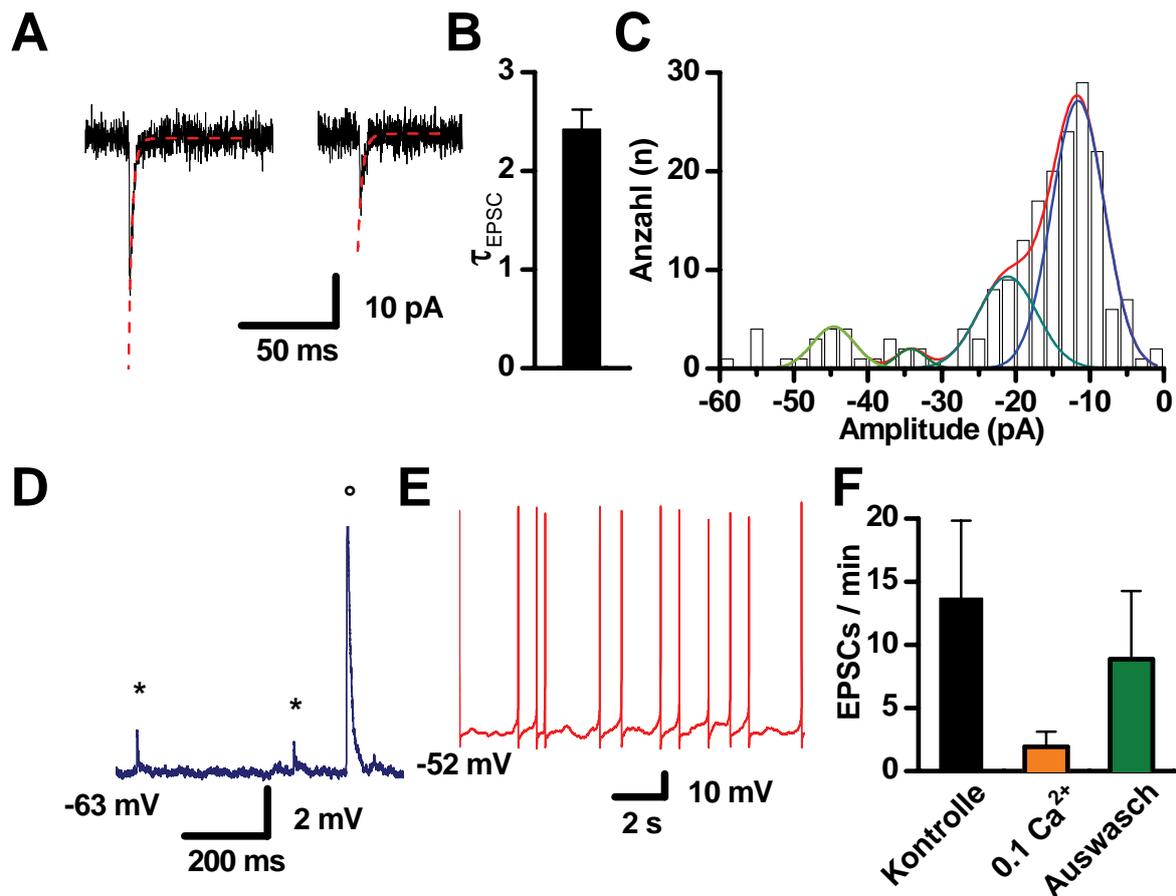


Abbildung 14: Spontane EPSC und EPSP in NLC

A: EPSCs unterschiedlicher Amplitude mit einer überlagerten monoexponentiellen Kurvenanpassung. **B:** Die monoexponentielle Kurvenanpassung der EPSCs ergab eine Zeitkonstante von $\tau=2,4\pm 0,2$ ms ($n=26$). **C:** Spitzenamplituden-Histogramm von 205 PSCs ($n=5$) Zellen. Die Anpassung mit einer multiplen Gauß-Verteilung erbringt als kleinstes gequanteltes Ereignis von 11,6 pA. Die Summe der Einzelanpassungen ist rot wiedergegeben. **D:** Spontane EPSPs im *current-clamp* Modus mit Depolarisationen unterschiedlicher Amplitude. Sternchen markieren jeweils elementare Ereignisse. Kreis zeigt eine Summation mehrerer EPSPs. **E:** Folge der EPSPs waren spontane Aktionspotentiale mit einer Frequenz von 1,5 – 2,5 Hz (andere Zelle als in D). **F:** Die Häufigkeit der EPSCs wurde reversibel durch 0,1 mM Ca^{2+} -PSL reduziert.

3.7 Elektrophysiologische Eigenschaften von Glia-ähnlichen Zellen

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen NLCs gab es ein Gruppe von Zellen ($n=99$), die zwar eGFP positiv waren, sich aber in ihrem mikroskopischen Erscheinungsbild wie auch in

3.7 Elektrophysiologische Eigenschaften von Glia-ähnlichen Zellen

den elektrophysiologischen Eigenschaften unterschieden. Sie ähnelten eher Gliazellen, weshalb sie *gliaähnliche Zellen* (*glia-like cells*; GLCs) genannt wurden. Da die Beschreibung dieser Zellen für diese Arbeit nicht das primäre Ziel darstellte, wurden trotz der großen vorgefundenen Anzahl dieser Zellen einige exemplarisch elektrophysiologisch untersucht. In der morphologischen Betrachtung (Abbildung 15 Bildeinsatz) boten diese Zellen bei gleicher Somagröße feiner gegliederte Verästelungen von Zellfortsätzen als die oben beschriebenen NLCs.

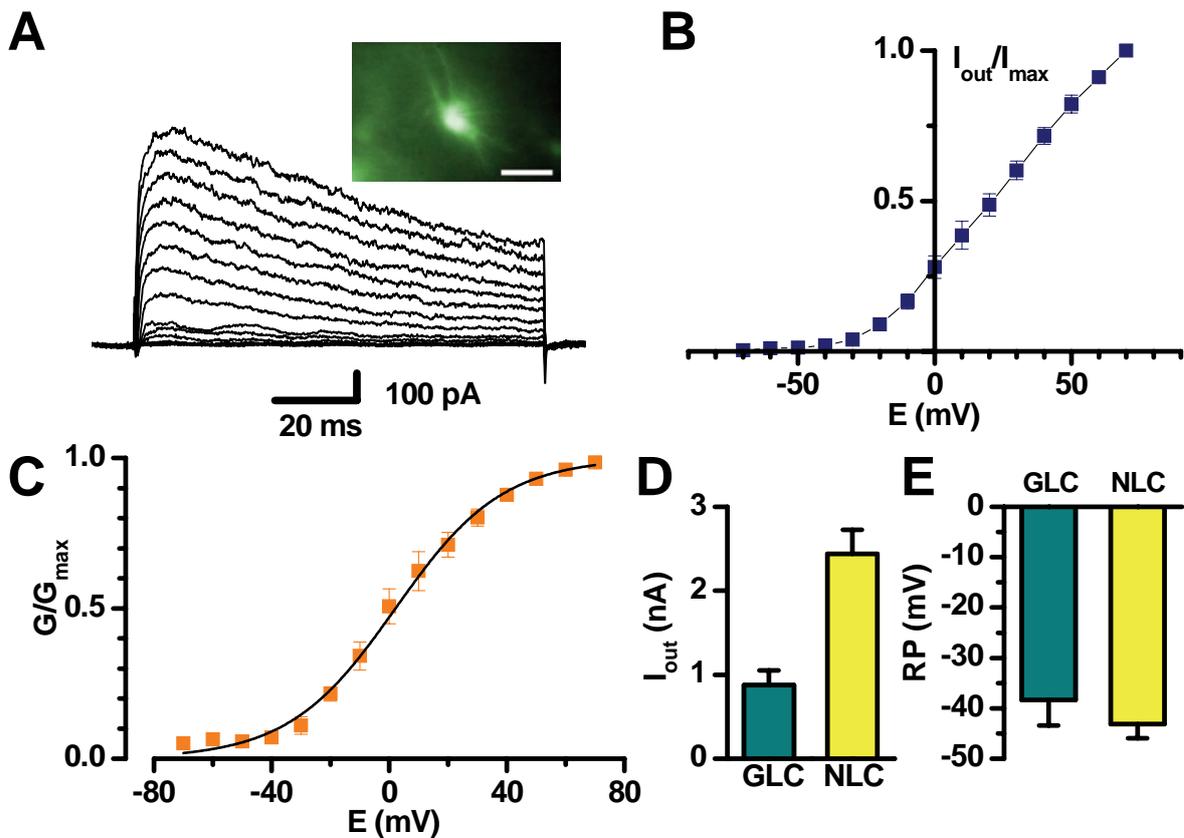


Abbildung 15: *Voltage-clamp* Registrierungen von GLCs nach Transplantation

A: Registrierungen der in der Fluoreszenzoptik durch eGFP⁺ leuchtende Gliazelle. Messbalken 10 μ m. **B:** Strom-Spannungskurve der korrigierten und auf dem Maximalstrom normierten peak-Auswärtsströme (n=5 Zellen). **C:** Aktivierungskurve der Auswärtsströme. Die angepasste Boltzmann-Verteilung ergab eine E_{50} von $+2,1 \pm 0,7$ mV für die Aktivierung (n=5 Zellen). **D:** Vergleich der maximalen Auswärtsströme bei +70 mV (GLC n=5, NLC n=37 Zellen). **E:** Vergleich der Ruhepotentiale von GLCs und NLCs (GLC n=5, NLC n=33)

3.8 Immunhistochemischer Vergleich neuronaler und glialer Zellen

In der *whole-cell* Konfiguration konnte in keiner dieser Zellen ein Einwärtsstrom nachgewiesen werden, weshalb von diesen Zellen weder bei ihrem Ruhemembran- noch bei einem künstlichen Haltepotential von -80 mV Aktionspotentiale abgeleitet werden konnten. Die Amplitude des spannungsabhängigen Auswärtsstromes war mit $0,9 \pm 0,2$ nA (n=5, Abbildung 15A) deutlich kleiner als der von NLCs mit $2,4 \pm 0,3$ nA (n=37, Abbildung 15D). Das Ruhepotential beider Zelltypen war mit $-38,3 \pm 5,1$ (GLCs, n=5) gegenüber $-43,1 \pm 2,8$ (NLCs, n=33) nur geringfügig unterschiedlich (Abbildung 15E).

Die Aktivierungsschwelle des Auswärtsstromes befand sich bei -30 mV, die halbmaximale Aktivierung lag bei $E_{50} = 2,1 \pm 0,7$ mV mit einer Steigung von $18,1 \pm 0,7$ mV/e.

3.8 Immunhistochemischer Vergleich neuronaler und glialer Zellen

Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen mit neuronalen und glialen Eigenschaften sollten die differenzierten Stammzellen auch immunhistologisch differenziert werden. Hierfür wurden die Marker *NeuN* für reife neuronale Zellen (*neuronal nuclear antigen*; neuronal nuclear antigen) und *GFAP* (*glial fibrillary acidic protein*; glial fibrillary acidic protein) für Astrozyten mit immunhistochemischen Methoden dargestellt. Die Kolokalisation dieser Markerproteine mit eGFP zeigten, welche Zellen, die aus Stammzellen entstanden waren, sich in Neurone bzw. Gliazellen differenziert hatten. Die Ergebnisse dieser Doppelfärbungen sind in Abbildung 16 zu sehen. Hierbei wurde deutlich, dass Zellen, die NeuN⁺ waren, nur gering ausgeprägte Zellfortsätze besaßen. Von ihrem Aussehen glichen sie den Zellen, die in den elektrophysiologischen Untersuchungen neuronale Charakteristika aufwiesen (vergleiche Bildeinsatz der Abbildung 9A). NeuN konnte in etwa 30% aller eGFP⁺-Zellen 4 bis 12 Wochen nach Transplantation nachgewiesen werden. Zellen, die GFAP⁺ waren, besaßen hingegen eher dendritisch ausgebildete Zellfortsätze und glichen damit den Zellen, die in den elektrophysiologischen Untersuchungen gliaähnlichen Charakter gezeigt hatten (vergleiche Bildeinsatz der Abbildung 15A). GFAP konnte in etwa 8 % der eGFP⁺-Zellen nachgewiesen werden.

Zusätzlich fiel auf, dass das intrazelluläre Verteilungsmuster der Marker ein anderes war. NeuN war vor allem im Bereich der Somata, GFAP mehrheitlich im Bereich der Zellfortsätze zu finden.

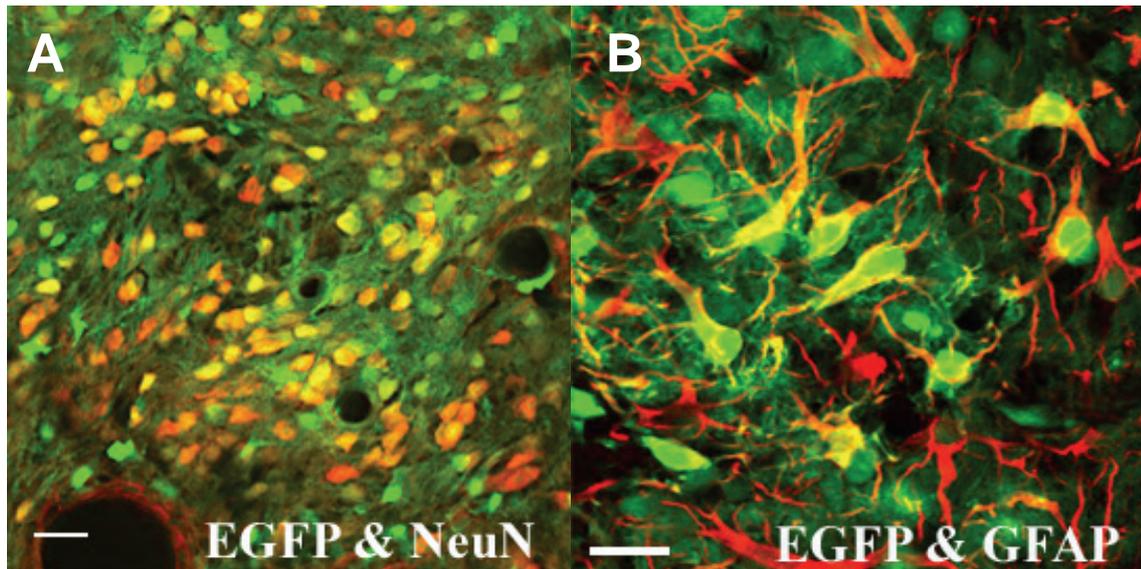


Abbildung 16 Immunhistochemischer Vergleich neuronaler und glialer Marker

A: Überlagernde Darstellung von eGFP⁺ Zellen (grün) und NeuN⁺ Zellen (rot, Marker für reife Neuronen). Zellen, die beide Marker exprimieren, sind gelblich dargestellt. **B:** Überlagerung von eGFP⁺ Zellen (grün) und GFAP⁺ Zellen (rot, Marker für Astroglia). Zellen, die beide Marker exprimieren, erscheinen gelblich. Messbalken=20 μ m

3.9 Weitere immunhistochemische Untersuchungen

Im Rahmen der Studien (Buhmann *et al.*, 2006) an dem vorliegenden Präparat wurden zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen der Natriumkanäle und glialen Marker weitere Proteine immunhistochemisch untersucht, die hier der Vollständigkeit wegen erwähnt, aber nicht gezeigt werden sollen, da sie Gegenstand weiterer Arbeiten darstellen.

Als Zeichen der Synapsenbildung konnte in eGFP⁺-NLCs SV2, ein Marker der präsynaptischen Vesikel, nachgewiesen werden. Ebenfalls konnten unter den eGFP⁺-Zellen acetylcholinerge, GABAerge, serotoninerge und Substanz P positive Neurone dargestellt werden.

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Überlegungen zum vorliegenden Modell

Eine zellbasierte Therapie eines ischämischen Hirndefektes am Tiermodell ist vom Ansatz her viel versprechend, muss allerdings Schwierigkeiten überwinden, die in pharmakologischen, neuroprotektiven oder Gewebekultur-Modellen (Benninger *et al.*, 2003; Scheffler *et al.*, 2003) nicht berücksichtigt werden müssen. Zunächst müssen die Zellen in einer Umgebung überleben, die für proliferierende Zellen unwirtlich ist. Das Sauerstoff- und Nährstoffangebot ist gering, der pH-Wert des Gewebes ist niedrig, es findet eine inflammatorische Reaktion des Implantatlagers statt. Trotzdem müssen die applizierten Zellen nicht nur überleben, sondern auch proliferieren und sich differenzieren. Eine weitere Schwierigkeit des vorliegenden Modells gegenüber Modellen, die sich mit neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson (Kim *et al.*, 2002; Bjorklund *et al.*, 2002) oder Chorea Huntington (Fricker-Gates *et al.*, 2004) befassen, ist, dass verschiedenste Zelltypen ersetzt werden müssen, die zur erfolgreichen Therapie miteinander in spezifischer Weise interagieren müssen, obwohl die Differenzierung der applizierten Zellen nach der Transplantation nur geringfügig gesteuert werden kann.

Zurzeit gibt es nur wenige Studien, die an Schlaganfallmodellen in-vivo einen Erfolg zeigen, gemessen durch eine Verbesserung des untersuchten motorischen Verhaltens (Chen *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002; Borlongan *et al.*, 1998). Die Überlebensrate der Zellen in diesen Modellen ist oft gering und ein direkter elektrophysiologischer Nachweis über die Funktionalität der transplantierten Zellen wurde nicht erbracht. Studien, die diesen direkten Nachweis nicht erbringen, erscheinen problematisch, da die beobachtete Verhaltensbesserung möglicherweise nicht auf die Differenzierung und den Zellersatz durch die transplantierten Zellen zurückgehen, sondern auf neuroregenerative Effekte des host-Gewebes, beispielsweise durch Induktion von Wachstumsfaktoren (Mahmood *et al.*, 2004). Dieser Effekt wird in neuerer Zeit ausgiebig in der Literatur diskutiert (Lindvall *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2005) und auch als „*bystander Effekt*“ bezeichnet. Dieser Effekt kann in der vorliegenden Studie vernachlässigt werden, da die transplantierten differenzierten xenogenen Stammzellen direkt untersucht wurden und nicht eine reine Verhaltensanalyse von

4.1 Allgemeine Überlegungen zum vorliegenden Modell

Versuchstieren durchgeführt wurde. Fehlend ist jedoch eine nachweisliche Verbesserung in Verhaltenstests. Bisher existiert nur eine Studie von Wei (2005), die eine funktionelle Besserung der motorischen Hirnleistung zusammen mit dem immunhistologischen Nachweis über Neurone erbringt, die aus transplantierten embryonalen Stammzellen entstanden sind.

Die funktionelle Entwicklung von Stammzellen in *in-vitro* Modellen wurde schon früh untersucht (Bain *et al.*, 1995; Strubing *et al.*, 1995; Finley *et al.*, 1996). In einigen Studien konnte in *in-vivo* Modellen an Parkinson erkrankten Tieren die funktionelle Entwicklung der transplantierten Zellen nachgewiesen werden, nachdem sie in embryonale Gehirne eingebracht wurden (Kim *et al.*, 2002; Wernig *et al.*, 2004). Kritisch anzumerken ist bei diesen Modellen, dass die Zellapplikation in einer sehr proliferations- und differenzierungsfreundliche Umgebung stattfand, da, bedingt durch die stattfindende physiologische Neuroembryogenese, viele Wachstumsfaktoren im Gewebe zu finden sind, die im adulten Tier nicht mehr vorhanden sind. Mit Transplantationen in adulte Tiere bzw. in ischämische Hirnareale sind die Ergebnisse dieser Studien somit nur sehr begrenzt vergleichbar. Die Implantation von Stammzellen nach einem lokal begrenzten ischämischen Infarkt wurde an adulten Tieren bisher nur mit Hilfe von Verhaltenstest untersucht (Wei *et al.*, 2005). Studien, die an einem, vergleichbaren Modell, wie dem hier vorliegenden, durchgeführt wurden, sind in der Literatur aktuell nicht zu finden.

Die Untersuchung des adulten Hirngewebes von Nagetieren (>P18) ist der Untersuchung gegenüber embryonalen Hirnschnitten mit der *patch-clamp* Technik nur sehr eingeschränkt möglich, da ab einem bestimmten Reifegrad ein Fasernetz auf der Hirnschnittoberfläche den Neuronen aufgelagert ist (Morales *et al.*, 2004), das die Ausbildung eines Seals mit der Zelloberfläche stark behindert. Üblicherweise wird im Bereich des ZNS mit einer Spülpipette oberflächliches Hirngewebe weggespült, um tiefer gelegene Zellschichten der Untersuchung zugänglich zu machen. In den vorliegenden Schnitten führte diese Methode nicht zum Erfolg, da die Oberfläche des Hirnschnittes faserig elastisch war, so dass hohe Spüldrücke aufgewandt werden mussten, die dann das Gewebe nur unzureichend abdrängen konnten. Zusätzlich schollen die freigespülten Neurone bald an und platzten, so dass die Untersuchung auf oberflächlich gelegene Neurone beschränkt war. Die Erfolgsrate war dabei deutlich geringer als in Tieren jüngerer Alters beschrieben. Die Kontrolle, dass es sich bei den untersuchten Zellen wirklich um eGFP⁺ Zellen handelte, war dadurch gegeben, dass sich

nach dem Erreichen der *whole-cell* Konfiguration das fluoreszierende Zytoplasma deutlich in das Lumen der Pipette einzog, was unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte.

In etwa einem Drittel der untersuchten eGFP⁺ Zellen konnten neuronale Eigenschaften wie Aktionspotentiale (APs) und spannungsabhängige Na⁺- und K⁺-Ströme nachgewiesen werden. Dies lässt die Annahme zu, dass sich ein Teil der neuronalen Vorläuferzellen auch wirklich in Neurone differenziert hat. Theoretisch bestünde allerdings auch die Möglichkeit, dass eine solche Differenzierung durch eine Fusion einer unreifen neuronalen Vorläuferzelle und einem reifen Neuron vorgetäuscht würde, wie durch Terada (2002) anhand von Southern-Blots beschrieben wurde. Zellen, die auf diese Weise entstehen, hätten sowohl neuronale Eigenschaften (Na⁺-Ströme, Fähigkeit Aktionspotentiale zu generieren) als auch Eigenschaften von Stammzellen (eGFP⁺). Zellen, die auf diese Weise entstehen, würden jedoch nicht, wie weiter unten diskutiert, einem Reifeprozess unterworfen sein, wie er in dem vorliegenden Modell zu beobachten ist.

Unter den elektrophysiologisch untersuchten Zellen besaßen etwa 30% neuronale und der Rest gliale Eigenschaften. Dieses Mengenverhältnis deckt sich sehr gut mit den immunhistochemischen Untersuchungen, die im Rahmen paralleler Studien am selben Modell durchgeführt wurden (Buhemann *et al.*, 2006), sowie Studien von Dihne *et al.* (2003).

4.2 Ionenströme

Die Einwärtsströme NLCs wurden zu überwiegenden Teilen durch 100 nM TTX blockiert und konnten dadurch als TTX-sensitive Na⁺-Ströme (Scholz & Vogel, 2000) klassifiziert werden. Der verbleibende Reststrom zeigte eine verlangsamte und veränderte Kinetik, die typisch für Ca²⁺-Ströme ist (Abbildung 10A). Die Aktivierung erfolgte bei positiveren Reizpotentialen, die untypisch für Na⁺-Kanäle sind. In anderen Modellen wurden TTX-Konzentrationen verwendet, die bis zu 10 mal höher waren (Lee *et al.*, 2000; Scheffler *et al.*, 2005). Dies könnte zu der Annahme führen, dass die verwendete Konzentration zu niedrig gewesen sein könnte, um den Strom vollständig zu blockieren, deckt sich jedoch nicht mit Scholz & Vogel (2000). Die allgemein angenommene IC₅₀ für TTX an sensitiven Na⁺-Kanälen beträgt 2-5 nM. Die verwendeten 100 nM liegen also deutlich über der nötigen Konzentration an TTX, um sensitive Kanäle zu blockieren. Theoretisch bestünde die Möglichkeit, dass es sich bei dem vorhandenen Reststrom um TTX-insensitive Kanäle

handelt. Diese sind jedoch normalerweise in Neuronen des peripheren Nervensystems zu finden (Roy & Narahashi, 1992; Scholz *et al.*, 1998b).

Die Auswärtsströme zeichneten sich durch ihre Kinetik und ihre Blockierbarkeit mit 10 mM TEA als *delayed-rectifier* K^+ -Ströme aus, die sowohl zur Repolarisationsphase als auch zum Ruhepotential (RP) beitragen. Zusätzlich konnte eine weitere Komponente der Kaliumströme dargestellt werden, indem die Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung verringert wurde. Dieser Calciumionenentzug führte zu einer Reduktion der Auswärtsströme und durch Zunahme bei Wiederherstellung der hohen Calciumionenkonzentration (Abbildung 13B). Die Calciumabhängigkeit von Kaliumströmen wurde in Neuronen schon häufig beschrieben (Kostyuk *et al.*, 1981; Scholz *et al.*, 1998a). Mehrere Ionenkanaltypen können für dieses Phänomen ursächlich sein: kleine (SK_{Ca}), mittlere (IK_{Ca}) und große (BK_{Ca}) calciumabhängige Kaliumkanäle. Welche dieser Kanaltypen in den Messungen vorgelegen haben, könnte letztendlich nur durch eine weitere Untersuchung mit den kanalspezifischen Blockern wie zum Beispiel Iberiotoxin (BK_{Ca}), Clotrimazol (IK_{Ca}) und Apamin (SK_{Ca}) herausgefunden werden. Es scheint jedoch, dass BK_{Ca} zumindest anteilig in den untersuchten Zellen vorgelegen haben kann, da dieser Kanal sehr sensitiv gegenüber TEA ist (Scholz *et al.*, 1998a). Wenn man die Blockade der Kaliumströme durch TEA (Abbildung 10B) und Ca^{2+} -Ionenentzug (Abbildung 13A) vergleicht, kommt man zu dem Schluss, dass mindestens 14% der Auswärtsströme sowohl durch TEA als auch durch den Ca^{2+} -Entzug blockiert wurde, da TEA ca. 80% und der Ionenentzug ca. 34% der Auswärtsströme blockieren kann. Dieser Anteil kann nur durch den großen calciumabhängigen Kaliumkanal bedingt sein, da von den calciumabhängigen Kaliumkanälen nur der BK_{Ca} TEA empfindlich ist.

Der beobachtete Auswärtsstrom setzt sich somit zusammen aus *delayed-rectifier* und calciumabhängigen Kaliumkanälen.

Auffällig ist, dass das Ruhepotential zu überwiegenden Teilen durch die mit TEA blockierten *delayed-rectifier* K^+ -Ströme generiert wurde (Abbildung 10C). Die Tendenz, dass mit zunehmender Differenzierungsdauer auch ein immer negativer werdendes Ruhepotential von den Nervenzellen generiert werden kann, findet sich in mehreren Studien wieder (Jiang *et al.*, 2003; Benninger *et al.*, 2003).

Die kinetischen Parameter der beobachteten Na^+ -Ströme in NLCs stimmten am besten mit den beschriebenen Eigenschaften von Na_v 1.1, der im ZNS mit am weitesten verbreitet ist, überein (Goldin *et al.*, 2000). Allerdings war das halbmaximale Potential E_{50} der Aktivierung 10 mV negativer als in der Literatur beschrieben. Dies könnte z.B. durch eine Kombination

4.3 Aktionspotentiale

mit unterschiedlichen β -Untereinheiten zustande kommen, die die Kanaleigenschaften verändern können. Auch eine Verfälschung der gemessenen Kanaleigenschaften durch fehlende Blockade weiterer Einwärtsströme wie Ca^{2+} -Ströme und vorliegenden space clamp-Situationen bei insgesamt als schwierig zu bewertenden Versuchsbedingungen könnten hierfür die Ursache sein. Zusätzlich könnten unterschiedlichste intra- und interzelluläre Modulationsmechanismen über Transmitter- oder Modulatorenssysteme eine große Rolle spielen. Das Vorkommen des Na_v 1.1 wird jedoch in den immunhistochemischen Färbungen der neuronalen Zellen bestätigt. Zwölf Wochen nach der Transplantation konnten zusätzlich Na_v 1.2 Kanäle in den Färbungen in der typischen Lokalisation der Zellfortsätze gefunden werden. Es ist bekannt, dass Na_v 1.2 in der Ontogenese nach Na_v 1.1 exprimiert wird (Spampanato *et al.*, 2001), was darauf hindeutet, dass im vorliegenden Präparat eine ähnliche Reifung des Nervengewebes stattfindet wie in der natürlich ablaufenden Embryogenese. Zwar wurde elektrophysiologisch ebenfalls dieser Reifeprozess beobachtet, dennoch wurde der spätere Zeitraum nach der siebten Woche und damit die Koexpression mit Na_v 1.2 in der vorliegenden Studie nicht mehr untersucht, da die Untersuchung von Dendriten mit der *patch-clamp* Methode außerordentlich schwierig ist und bei einem Präparat, das nicht in großer Anzahl regelmäßig verfügbar ist, zusätzlich erschwert wird.

NLCs haben ihre elektrophysiologischen Eigenschaften über dem beobachteten Zeitraum immer mehr den natürlich vorkommenden reifen Neuronen des ZNS angenähert, auch wenn sie sich in ihren Eigenschaften auch am Ende der untersuchten Periode von nativen Neuronen etwas unterschieden. Beispielsweise war die Aktionspotentialdauer bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes länger als bei natürlich vorkommenden ZNS-Neuronen.

4.3 Aktionspotentiale

Im Laufe des Untersuchungszeitraumes ist es zu einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer und einer Zunahme der Aktionspotential Amplitude gekommen. Diese Entwicklung findet sich in mehreren Studien wieder (Westerlund *et al.*, 2003; Benninger *et al.*, 2003).

Bemerkenswert ist, dass sowohl die Qualität des einzelnen Aktionspotentials als auch die Frequenz der Aktionspotential-Serien stark durch das Membranpotential der Zelle beeinflusst erscheinen. Indirekt sind die Aktionspotentiale somit nicht nur vom absoluten Besatz mit Na^+ -Ionenkanälen und deren Anzahl, sondern auch von dem Besatz mit K_{dr} -, K_{Ca} -, unspezifischen K^+ -Kanälen, Ca_v -, Ionenkanälen oder dem Fehlen von Two-pore-Domain-Kanälen abhängig.

4.3 Aktionspotentiale

Der unterschiedliche Ionenkanalbesatz beeinflusst sehr das zugrundeliegende Ruhepotential der Zelle. Ist das Ruhemembranpotential Kanälen insgesamt zu positiv, befinden sich die meisten Na^+ -Kanäle im inaktivierten Zustand. Aktionspotentiale sind dann nicht mehr auslösbar. Oft sind bei alleinigem Vorhandensein von *delayed-rectifier* Kanälen mit einem stark negativen Ruhepotential keine Aktionspotentialserien auslösbar wie sie beispielsweise bei Besatz mit dem großen calciumabhängigen Kaliumkanal ermöglicht werden, da dieser zu einer schnelleren Repolarisation des Membranpotentials führt, jedoch bei negativeren Potentialen zunehmend seine Leitfähigkeit verliert und damit ein erneutes Aktionspotential durch spannungsabhängige Na^+ -Kanäle ermöglicht und nicht das Membranpotential stabilisiert wie ein *delayed-rectifier* Kanal. Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass die Fähigkeit, Aktionspotentialserien generieren zu können, nicht allein an das Vorkommen von BK_{Ca} gekoppelt ist. Unter bestimmten Konstellationen können auch Serien von Neuronen ohne das Vorkommen von BK_{Ca} generiert werden und Zellen mit BK_{Ca} können keine Serien generieren.

Die Beobachtung, dass auch nach einer siebenwöchigen Differenzierungszeit die Aktionspotentiale der NLCs gegenüber nativen Neuronen in ihrer Qualität zurückbleiben (Abbildung 12A), könnte unter anderem in diesem Wechselspiel des relativen und absoluten Kanalbesatzes von Na^+ -Kanälen, die für das Aktionspotential verantwortlich sind und weiteren Ionen-Kanälen, die für das Ruhepotential der Zelle und deren Repolarisierung zuständig sind, begründet sein. Abbildung 12C deutet auf APs hin, die eine noch recht geringe Amplitude und eine langsame Kinetik der Aktionspotentiale nach drei Wochen zeigen. Eine künstliche Negativierung des Ruhepotentials führt bereits in den erst drei Wochen alten Zellen zu einer höheren Amplitude des Aktionspotentials, ähnlich wie sie bei reifen Neuronen zu finden ist. Dies konnte dadurch zustande kommen, dass durch das relativ positive Ruhepotential viele Na^+ -Kanäle inaktiviert sind, die durch das künstliche negative Haltepotential in den aktivierbaren Zustand überführt werden.

Die zunehmende Fähigkeit, ähnlich wie natürliche ZNS-Neurone, Serien von Aktionspotentialen generieren zu können, spiegelt ebenfalls einen klaren Hinweis auf die Reifung der NLCs wieder.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Differenzierung zur vollständig adulten Nervenzelle auch nach der siebenwöchigen Beobachtungszeit nicht abgeschlossen ist, sondern weiter voranschreitet. Dies würde bedeuten, dass die Differenzierung gegenüber ähnlichen Modellen (Benninger *et al.*, 2003) verzögert ist, bei denen die Differenzierung im Beobachtungszeitraum abgeschlossen war. Zu beachten hierbei ist jedoch, dass das Wachstum

im hier vorliegenden Modell weder unter Zellkulturbedingungen noch unter optimalen trophischen Bedingungen stattfand, sondern in einem ischämischen Hirnareal.

4.4 Gliale Zellen

GLCs zeigen sowohl elektrophysiologisch wie auch immunhistochemisch substantiell unterschiedliche Eigenschaften gegenüber NLCs. GLCs besitzen keinerlei Na^+ -Ströme und können dadurch keinerlei Aktionspotentiale generieren (Abbildung 15A). Zusätzlich zeigte der Auswärtsstrom der GLCs unterschiedliche Eigenschaften. Die Amplitude betrug insgesamt nur ein Drittel, und er inaktivierte schneller als der Auswärtsstrom von NLCs (Abbildung 15D). Er war damit eher den A-Typ K^+ -Strömen zuzurechnen. Der langsam inaktivierende Auswärtsstrom der NLCs entspricht eher Einwärtsgerichteter K^+ -Strömen (*delayed-rectifier*).

Die grundsätzlichen Unterschiede glialer und neuronaler Zellen, die mit elektrophysiologischen Methoden bereits aufgezeigt wurden, konnten mit immunhistochemischen Methoden bestätigt werden. Vier bis zwölf Wochen nach Transplantation konnten in etwa 30 % der eGFP^+ -Zellen der Marker für reife Neurone *NeuN* nachgewiesen werden. Diese Zahl ist deckungsgleich mit der Verteilung neuronaler zu glialer Zellen, wie sie mit Hilfe der Elektrophysiologie gefunden wurde. Anders als durch die *patch-clamp* Methode wurde durch die immunhistochemische Darstellung nur etwa 8% mit GFAP als Astrozyten identifiziert. Allerdings ist bekannt, dass die verwendeten Antikörper zur Quantifizierung der Astrozyten nur Subpopulationen dieses Zelltyps darstellen können (Eng *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte die Differenzierung zu Astrozyten durch Doppelfärbungen mit eGFP und $\text{S100}\beta$ bestätigt werden (Buhemann *et al.*, 2006). Die gesamte Population von Astrozyten konnte dadurch nicht dargestellt werden und mit den Ergebnissen der Elektrophysiologie in Deckung gebracht werden.

4.5 Exzitatorische Postsynaptische Potentiale und Ströme

Im Präparat konnten 4 bis 7 Wochen nach der Transplantation exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) und Ströme (EPSC) in NLCs beobachtet werden, was auf einen synaptischen Eingang der untersuchten Zellen schließen lässt. Für die postsynaptischen Potentiale wurden keine spezifischen Blocker eingesetzt, sondern die Reduktion der

4.5 Exzitatorische Postsynaptische Potentiale und Ströme

postsynaptischen Potentiale wurde durch Entzug von Ca^{2+} -Ionen, die an der synaptischen Übertragung beteiligt sind, herbeigeführt. Diese unspezifische Methode der Blockade der synaptischen Übertragung wurde gegenüber einem spezifischen Block bevorzugt, da in parallelen Studien an dem vorliegenden Modell (Buhmann *et al.*, 2006) mehrere Neurotransmitter in NLCs nachgewiesen werden konnten und in den elektrophysiologischen Versuchsreihen aufgrund der geringen Präparatezahl nicht alle Neurotransmitter auf ihre Wirksamkeit untersucht werden konnten.

Der Entzug der Ca^{2+} -Ionen führte nur zur Reduktion der Häufigkeit der EPSPs, nicht zur völligen Blockade. Dies könnte zum einen daran liegen, dass in den Neuronen selbst noch genügend Ca^{2+} -Ionen in intrazellulären Speichern vorhanden waren, um eine komplette Übertragung an der Synapse zu verhindern. Zum anderen ist es in Schnittpräparaten ein oft beobachtetes Phänomen, dass der Entzug von Substanzen und Blockern nicht zu einer vollständigen Erholung von der Blockade von Strömen oder Aktionspotentialen führt, wie sie bei Untersuchungen in Zellkulturen zu beobachten ist, da der Auswasch aus den Gewebsschnitten oft inkomplett ist (Ettorre, 2006). Dieses Phänomen gilt eher für hochmolekulare Proteintoxine. Für Ca^{2+} -Ionen sollte dieser Effekt weniger zum Tragen kommen, ist aber nicht völlig außer Acht zu lassen. Hinzu kommt auch, dass 0,1 mmol/l Ca^{2+} -Ionen in der Badlösung belassen wurde, da sonst ein Selektivitätsverlust von Ionenkanälen für ihren spezifischen Ionentyp auftreten könnte. Beispielsweise können Ca^{2+} -Kanäle für Na^{+} -Ionen bei fehlendem intrazellulärem Kalzium leitend werden (Almers *et al.*, 1984).

Die beobachteten EPSPs führten in den Untersuchten NLCs zu einem anhaltenden Feuern von Aktionspotentialserien, die typischerweise in neuronalen Netzwerken beobachtet werden können (Antkowiak, 2002). Eine ähnliche Konnektivität nach Stammzelltransplantation konnte von Benninger *et al.* (2003) und Wernig *et al.* (2004) beobachtet werden, diese Beobachtung wurde allerdings nur in eine Gewebekultur, bzw. in einem neonatalen Organismus gemacht und ist somit mit adulten Modellen nur schlecht vergleichbar. Die postsynaptischen Potentiale und Ströme wurden in diesen Studien sehr ausführlich untersucht und beschrieben. Durch Benninger wurden die untersuchten Potentiale nicht nur morphologisch beschrieben, sondern auch durch ihre pharmakologische Blockierbarkeit und ihre Stimulierbarkeit in AMPA-generierte EPSPs (durch CNQX blockierbar) und GABA-generierte IPSPs (durch Bicucullin blockierbar) identifiziert. Diese Differenzierung fand jedoch nur an der *slice-Kultur* statt. Eine derartige pharmakologische Differenzierung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht getroffen. Die Tatsache, dass Zellen, die vermehrt postsynaptische Aktivität zeigten, auch vermehrt spontane Aktionspotentialentladungen

aufwiesen, lässt jedoch den Schluß zu, dass es sich hierbei überwiegend um EPSPs gehandelt hat. Diese Vermutung wird gestützt durch den Vergleich der Eigenschaften der von Benninger beobachteten EPSPs und IPSPs. EPSPs zeigen eine sehr schnelle Aktivierung und eine etwas langsamere Desensibilisierung, während IPSPs eine langsamere Aktivierung als EPSPs zeigen und eine sehr langsame Desensibilisierung besaßen. IPSPs hätten zudem keine Aktionspotentialserien, wie sie in unseren Versuchen gemessen wurden, ausgelöst. Eine genaue pharmakologische Differenzierung müsste jedoch in einer weiteren Versuchsreihe durchgeführt werden.

Kritisch ist ebenso die Aussage von Wernig *et al.* (2004) über die funktionelle Integration von stammzellgenerierten Neuronen in seinem neonatalen Modell zu betrachten, da sich Diskrepanzen zwischen den angewandten immunhistochemischen und elektrophysiologischen Methoden ergeben. In seinem Präparat lassen sich zwar NMDA-Rezeptoren nachweisen, EPSCs, die durch diese Rezeptoren hervorgerufen werden, können jedoch nicht beobachtet werden.

Da der überwiegende Teil der NLCs, in denen EPSPs untersucht werden konnten im host-Parenchym, einige hundert Mikrometer entfernt vom eigentlichen grafts gelegen haben, ist es wahrscheinlich, dass der beobachtete synaptische Eingang durch Neurone des Empfängergewebes verursacht wurde. Ob der Eingang durch Interaktion mit dem host-Gewebe oder durch Verknüpfung von NLCs untereinander zustande kam, konnte im Rahmen der hier vorliegenden Studie jedoch nicht sicher geklärt werden. Hierfür wären Doppel-patch-clamp Versuche notwendig, die sehr aufwendig sind und deren Erfolg in Anbetracht des schwierigen Präparates mit seiner niedrigen Erfolgsrate und seltenen Verfügbarkeit eher als gering einzuschätzen ist.

Zusammenfassend lässt sich durch die vorliegende Untersuchung die Aussage treffen, dass neuronale Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen generiert werden können und diese in einer ischämischen zentralnervösen Läsion zu neuronalen und glialen Zellen differenzieren und überleben.

Ausblickend für weitere mögliche Untersuchungen an dem vorliegenden Modell ließen sich noch fehlende Fragen dieser Untersuchung ergänzen. Grundlage für diese weitergehenden Untersuchungen wäre eine größere Anzahl von Versuchstieren mit einer besseren Verfügbarkeit des Präparates. Die Beobachtung könnte über einen noch längeren Zeitraum fortgeführt werden, um Aussagen über den Langzeiterfolg treffen zu können. Um die

4.5 Exzitatorische Postsynaptische Potentiale und Ströme

Funktion der Neurone weiter abzuklären, könnten Stimulationen und Inhibitionen der untersuchten Neurone mit spezifischen Neurotransmittern und Blockern vorgenommen werden. Ergänzend könnte die Aussage über die Funktionalität der transplantierten Zellen durch Versuche mit Verhaltensbeobachtungen unterstützt werden.

Abschließend ließe sich die Integration transplanteder differenzierter Neurone durch Doppel-patch-clamp Untersuchungen klären, indem man in Neuronen des host-Gewebes reizt und in Neuronen des graft-Gewebes EPSPs und Aktionspotentiale misst oder umgekehrt.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmals in einem Tiermodell mit durch Endothelin induziertem cerebrovaskulären Insult die Differenzierung und funktionelle Integration von neuronalen xenotransplantierten eGFP markierten embryonalen Stammzellen mit Hilfe der patch-clamp Technik und immunhistochemischen Färbungen untersucht.

- In etwa 30% von eGFP positiven Zellen konnten Einwärts- und Auswärtsströme nachgewiesen werden.
- Die transplantierten Zellen überlebten im elektrophysiologischen Beobachtungszeitraum von 7 Wochen nach Transplantation.
- Die Einwärtsströme, die eine für spannungsabhängige Natriumkanäle typische Kinetik zeigten, konnten durch 100 nM TTX blockiert werden.
- Nur diese Zellen konnten Aktionspotentiale generieren und wurden deshalb neuron-ähnliche Zellen genannt (neuron-like cells: NLC)
- Die Auswärtsströme zeigten eine langsame Inaktivierungskinetik ($\tau > 500$ ms) und konnten durch 10 mM TEA auf 20 % blockiert werden.
- Die Auswärtsströme gliedern sich in zwei Komponenten K_{dr} (*delayed rectifier* K^+ -Kanäle) und K_{Ca} (calciumabhängige K^+ -Kanäle).
- K_{dr} hat großen Einfluss auf das Ruhepotential der untersuchten NLCs.
- K_{Ca} führt zu einer Modulation der Aktionspotential Dauer.
- Mit zunehmender Zeit nach Transplantation wurde das Ruhemembranpotential zunehmend negativer.
- Die Reifung der untersuchten Zellen führte zu einer Verkürzung der Aktionspotential Dauer und zu der Fähigkeit, Serien von Aktionspotentialen zu generieren.
- In NLCs konnten spontane Einwärtsströme von kurzer Dauer und mit ähnlicher Kinetik beobachtet werden, die als exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) identifiziert wurden.
- Die EPSPs sind ein Hinweis auf die funktionelle Integration der NLCs. Offen bleibt, ob die Verknüpfung untereinander oder mit host-Neuronen ausgebildet wird.
- Die calciumabhängigen EPSPs führten zum spontanen Feuern von Aktionspotentialen
- Die aus transplantierten Zellen differenzierten Gliazellen besaßen nur Auswärtsströme mit geringerer Amplitude und konnten keine Aktionspotentiale generieren.

6 Summary

For the first time, the differentiation and functional integration of xenotransplanted eGFP⁺ stem-cells derived from neuronal embryonic precursor-cells was examined in an animal, endothelin-induced stroke model.

- Inward and outward currents were found in about 30 % of eGFP positive cells.
- Transplanted cells survived during the electrophysiological observation period of 7 weeks after transplantation.
- The inward currents, which demonstrated the typical kinetics of voltage-gated sodium currents were blocked by 100 nM TTX.
- Only the eGFP⁺-cells were able to generate action potentials. Therefore they were called neuron-like cells (NLC).
- The outward current revealed slow inactivation kinetics ($\tau > 500$ ms) and 10 mM TEA could suppress it to 20%.
- The outward currents consisted of two components, K_{dr} (delayed rectifier K^+ -currents) and K_{Ca} (calcium dependent K^+ -currents).
- K_{dr} had a large influence on the resting membrane potential of NLC.
- K_{Ca} modulated the actionpotential duration.
- The resting membrane potential became more negative during the electrophysiological observation period.
- As the cells matured, the action potential duration was shortened and they were more able to generate trains of action potentials.
- Spontaneous inward currents of short duration and similar kinetics were observed in NLCs and identified as excitatory postsynaptic potentials (EPSPs).
- The EPSPs are evidence of the functional integration of NLC. It is unclear if NLC interconnect with each other or with the host-neurons.
- The calcium-dependent EPSPs evoked spontaneous firing of actionpotentials in NLCs.
- Differentiated glial cells derived from transplanted cells possessed only voltage-dependent outward currents with low amplitude and could not generate an action potential.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Na _v -Kanals.....	10
Abbildung 3 A: Das Rattenhirn nach der ENUktion aus dem Schädel.....	23
Abbildung 4: Herstellung der Hirnschnitte	24
Abbildung 5: Vergleichende Darstellung eines Hirnschnittes	24
Abbildung 6: Fluoreszenz- und Lichtmikroskop Darstellung des grafts.	25
Abbildung 7: Schaltkreis eines <i>Voltage-Clamp</i> -Verstärkers	27
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Versuchsstandes	29
Abbildung 9: <i>Voltage-clamp</i> Registrierungen von neuronellen Zellen.....	35
Abbildung 10: Effekte von TTX und TEA auf NLCs.....	37
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbungen von Na _v -Kanalproteinen	39
Abbildung 12: Aktionspotentiale in ihrer zeitlichen Entwicklung.....	42
Abbildung 13: Ca ²⁺ -abhängige Ströme in NLC	44
Abbildung 14: Spontane EPSC und EPSP in NLC	46
Abbildung 15: <i>Voltage-clamp</i> Registrierungen von GLCs nach Transplantation	47
Abbildung 16 Immunhistochemischer Vergleich neuronaler und glialer Marker	49

8 Literaturverzeichnis

Abbondanzo SJ, Gadi I, & Stewart CL (1993). Derivation of embryonic stem cell lines. *Methods Enzymol* **225**, 803-823.

Almers W, McCleskey EW, & Palade PT (1984). A non-selective cation conductance in frog muscle membrane blocked by micromolar external calcium ions. *J Physiol* **353:565-83.**, 565-583.

Altmann J (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* **137**, 433-458.

Altmann J & Das G (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology* **124**, 319-335.

Antkowiak B (2002). In vitro networks: cortical mechanisms of anaesthetic action. *Br J Anaesth* **89**, 102-111.

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, & Lindvall O (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* **8**, 963-970.

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, & Gottlieb DI (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* **168**, 342-357.

Benninger F, Beck H, Wernig M, Tucker KL, Brustle O, & Scheffler B (2003). Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in hippocampal slice cultures. *J Neurosci* **23**, 7075-7083.

Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, & Isacson O (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2344-2349.

Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, & Vescovi AL (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283**, 534-537.

Black JA, Yokoyama S, Higashida H, Ransom BR, & Waxman SG (1994). Sodium channel mRNAs I, II and III in the CNS: cell-specific expression. *Brain Res Mol Brain Res* **22**, 275-289.

Borlongan CV, Tajima Y, Trojanowski JQ, Lee VM, & Sanberg PR (1998). Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp Neurol* **149**, 310-321.

Brainin M, Dachenhausen A, & Steiner M (2003). [Epidemiology of stroke]. *Wien Med Wochenschr* **153**, 3-5.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, & Blau HM (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-1779.

Brysch W, Creutzfeldt OD, Luno K, Schlingensiepen R, & Schlingensiepen KH (1991). Regional and temporal expression of sodium channel messenger RNAs in the rat brain during development. *Exp Brain Res* **86**, 562-567.

Buhemann C, Scholz A, Bernreuther C, Malik CY, Braun H, Schachner M, Reymann KG, & Dihne M (2006). Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* ..

Carter AJ, Grauert M, Pschorn U, Bechtel WD, Bartmann-Lindholm C, Qu Y, Scheuer T, Catterall WA, & Weiser T (2000). Potent blockade of sodium channels and protection of brain tissue from ischemia by BIII 890 CL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4944-4949.

Catterall WA, Goldin AL, & Waxman SG (2003). International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev* **55**, 575-578.

Chandy KG & Gutman GA (1993). Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci* **14**, 434.

Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, & Chopp M (2001). Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* **32**, 2682-2688.

Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, & Frisen J (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **288**, 1660-1663.

Dihne M, Bernreuther C, Hagel C, Wesche KO, & Schachner M (2006). Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain. *Stem Cells* **24**, 1458-1466.

Dihne M, Bernreuther C, Sibbe M, Paulus W, & Schachner M (2003). A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *J Neurosci* **23**, 6638-6650.

Dirnagl U, Iadecola C, & Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397.

Eng LF, Ghirnikar RS, & Lee YL (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* **25**, 1439-1451.

Erdo F, Buhle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Focking M, Kustermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, & Trapp T (2003). Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 780-785.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, & Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-1317.

Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, & Catterall WA (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**, 533-535.

Ettorre G. Spannungsabhängige Kalium-Kanäle in Endothelzellen in einer Dünnschnittpräparation des linken Ventrikels des Meerschweinchenherzens. 1[1], 1-69. 2006. Wettenberg.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Evans MJ & Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.

Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, & Loughlin S (2000). In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14686-14691.

Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fischman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, & Isacson O (2000). Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* **9**, 273-278.

Finley MF, Kulkarni N, & Huettner JE (1996). Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J Neurosci* **16**, 1056-1065.

Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billingham LL, Jendoubi M, Sidman RL, Wolfe JH, Kim SU, & Snyder EY (1998). Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol* **16**, 1033-1039.

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, & Fahn S (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* **344**, 710-719.

Fricker-Gates RA, Muir JA, & Dunnett SB (2004). Transplanted hNT cells ("LBS neurons") in a rat model of huntington's disease: good survival, incomplete differentiation, and limited functional recovery. *Cell Transplant* **13**, 123-136.

Galileo DS, Gray GE, Owens GC, Majors J, & Sanes JR (1990). Neurons and glia arise from a common progenitor in chicken optic tectum: demonstration with two retroviruses and cell type-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 458-462.

Golden JA & Cepko CL (1996). Clones in the chick diencephalon contain multiple cell types and siblings are widely dispersed. *Development* **122**, 65-78.

Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, & Catterall WA (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **28**, 365-368.

Grove EA, Williams BP, Li DQ, Hajihosseini M, Friedrich A, & Price J (1993). Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex. *Development* **117**, 553-561.

Haas S, Weidner N, & Winkler J (2005). Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol* **18**, 59-64.

Hagell P, Piccini P, Bjorklund A, Brundin P, Rehnström S, Widner H, Crabb L, Pavese N, Oertel WH, Quinn N, Brooks DJ, & Lindvall O (2002). Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **5**, 627-628.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, & Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**, 85-100.

Hille B (1967). The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J Gen Physiol* **50**, 1287-1302.

Hille B (1968). Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve. *J Gen Physiol* **51**, 199-219.

Hodgkin AL & Huxley AF (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**, 449-472.

- Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, & Verfaillie CM (2003). Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11854-11860.
- Johnson D, Montpetit ML, Stocker PJ, & Bennett ES (2004). The sialic acid component of the beta1 subunit modulates voltage-gated sodium channel function. *J Biol Chem* **279**, 44303-44310.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, & McKay R (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50-56.
- Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L, Meltzer CC, Elder E, Gebel J, Decesare S, Jovin T, Zafonte R, Lebowitz J, Flickinger JC, Tong D, Marks MP, Jamieson C, Luu D, Bell-Stephens T, & Teraoka J (2005). Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* **103**, 38-45.
- Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitman MA, & Bynum L (2000). Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* **55**, 565-569.
- Koppenhofer E & Vogel W (1969). [Effect of tetrodotoxin and tertaethylammonium chloride on the inside of the membrane of Ranvier's node in *Xenopus laevis*]. *Pflugers Arch* **313**, 361-380.
- Kostyuk PG, Veselovsky NS, Fedulova SA, & Tsyndrenko AY (1981). Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-III. Potassium currents. *Neuroscience* **6**, 2439-2444.
- Kuhn HG, ckinson-Anson H, & Gage FH (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* **16**, 2027-2033.
- Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, & Steindler DA (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* **156**, 333-344.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, & Grompe M (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* **6**, 1229-1234.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, & McKay RD (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18**, 675-679.

Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, & Chopp M (2001). Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* **56**, 1666-1672.

Lindvall O, Kokaia Z, & Martinez-Serrano A (2004). Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* **10**, S42-S50.

Mahmood A, Lu D, & Chopp M (2004). Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **21**, 33-39.

Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7634-7638.

Martinez-Serrano A, Lundberg C, Horellou P, Fischer W, Bentlage C, Campbell K, McKay RD, Mallet J, & Bjorklund A (1995). CNS-derived neural progenitor cells for gene transfer of nerve growth factor to the adult rat brain: complete rescue of axotomized cholinergic neurons after transplantation into the septum. *J Neurosci* **15**, 5668-5680.

Moe MC, Westerlund U, Varghese M, Berg-Johnsen J, Svensson M, & Langmoen IA (2005). Development of neuronal networks from single stem cells harvested from the adult human brain. *Neurosurgery* **56**, 1182-1188.

Morales E, Fernandez FR, Sinclair S, Molineux ML, Mehaffey WH, & Turner RW (2004). Releasing the peri-neuronal net to patch-clamp neurons in adult CNS. *Pflugers Arch* **448**, 248-258.

Munsie MJ, Michalska AE, O'Brien CM, Trounson AO, Pera MF, & Mountford PS (2000). Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol* **10**, 989-992.

Narahashi T, Moore JW, & Scott WR (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J Gen Physiol* **47**, 965-974.

Neher E & Sakmann B (1976). Single channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibers. *Nature* **260**, 799-802.

Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, & Nishimune Y (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**, 313-319.

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, & McKay RD (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* **59**, 89-102.

Paxinos G & Watson C (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed. Academic Press, New York.

Peck AB, Chaudhari M, Cornelius JG, & Ramiya VK (2001). Pancreatic stem cells: building blocks for a better surrogate islet to treat type 1 diabetes. *Ann Med* **33**, 186-192.

Roy ML & Narahashi T (1992). Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* **12**, 2104-2111.

Schaller KL & Caldwell JH (2000). Developmental and regional expression of sodium channel isoform NaCh6 in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **420**, 84-97.

Scheffler B, Schmandt T, Schroder W, Steinfarz B, Hussein L, Wellmer J, Seifert G, Karam K, Beck H, Blumcke I, Wiestler OD, Steinhauser C, & Brustle O (2003). Functional network integration of embryonic stem cell-derived astrocytes in hippocampal slice cultures. *Development* **130**, 5533-5541.

Scheffler B, Walton NM, Lin DD, Goetz AK, Enikolopov G, Roper SN, & Steindler DA (2005). Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9353-9358.

Scholz A, Gruss M, & Vogel W (1998a). Properties and functions of calcium-activated K⁺ channels in small neurons of rat dorsal root ganglion studied in a thin slice preparation. *J Physiol* **513**, 55-69.

Scholz A, Kuboyama N, Hempelmann G, & Vogel W (1998b). Complex blockade of TTX-resistant Na⁺ currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons. *J Neurophysiol* **79**, 1746-1754.

Scholz A & Vogel W (2000). Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics. *Pain* **89**, 47-52.

Snyder EY, Yoon C, Flax JD, & Macklis JD (1997). Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11663-11668.

Spampanato J, Escayg A, Meisler MH, & Goldin AL (2001). Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2. *J Neurosci* **21**, 7481-7490.

Strubing C, Hnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, & Wobus AM (1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* **53**, 275-287.

Szele FG & Cepko CL (1996). A subset of clones in the chick telencephalon arranged in rostrocaudal arrays. *Curr Biol* **6**, 1685-1690.

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, & Scott EW (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-545.

Watanabe E, Hiyama TY, Kodama R, & Noda M (2002). NaX sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells in mice. *Neurosci Lett* **330**, 109-113.

Watanabe E, Hiyama TY, Shimizu H, Kodama R, Hayashi N, Miyata S, Yanagawa Y, Obata K, & Noda M (2006). Sodium-level-sensitive sodium channel Na(x) is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R568-R576.

Wei L, Cui L, Snider BJ, Rivkin M, Yu SS, Lee CS, Adams LD, Gottlieb DI, Johnson EM, Jr., Yu SP, & Choi DW (2005). Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* **19**, 183-193.

Weiser T (2005). AMPA receptor antagonists for the treatment of stroke. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**, 153-159.

Wernig M, Benninger F, Schmandt T, Rade M, Tucker KL, Bussow H, Beck H, & Brustle O (2004). Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo. *J Neurosci* **24**, 5258-5268.

Westenbroek RE, Merrick DK, & Catterall WA (1989). Differential subcellular localization of the RI and RII Na⁺ channel subtypes in central neurons. *Neuron* **3**, 695-704.

Westerlund U, Moe MC, Varghese M, Berg-Johnsen J, Ohlsson M, Langmoen IA, & Svensson M (2003). Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture. *Exp Cell Res* **289**, 378-383.

Willing AE, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, Hart C, Sanchez-Ramos J, & Sanberg PR (2003a). Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* **73**, 296-307.

Willing AE, Vendrame M, Mallery J, Cassady CJ, Davis CD, Sanchez-Ramos J, & Sanberg PR (2003b). Mobilized peripheral blood cells administered intravenously produce functional recovery in stroke. *Cell Transplant* **12**, 449-454.

Yu FH & Catterall WA (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* **4**, 207.

Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, & Low WC (2002). Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* **174**, 11-20.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name, Vornamen: Malik, Christoph Yves
Geburtsdatum: 31.01.1977
Geburtsort: Hanau
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

1987 - 1996 Grimmelshausen Gymnasium Gelnhausen
Abschluss Allgemeine Hochschulreife

ZIVILDIENTST

1996 - 1997 Ausbildung zum **Rettungssanitäter**
Rettungsdienst, Deutsches Rotes Kreuz, Gelnhausen

STUDIUM UND AUSBILDUNG

10/1997 – 11/2004 **Studiengang Humanmedizin**
Justus-Liebig-Universität Gießen

09/1999 **Physikum** (Ärztliche Vorprüfung)

05/2000 Beginn der experimentellen Doktorarbeit am Physiologischen
Institut, Gießen, Fach Humanmedizin

2000 - 2003 Famulaturen in Innere Medizin, Pädiatrie (Gelnhausen),
Kardiologie (Frankfurt am Main), Radiologie (Hamburg)

09/2000 **1. Staatsexamen Humanmedizin**

04/2003 **2. Staatsexamen Humanmedizin**

2003 - 2004 Praktisches Jahr in Chirurgie, Herzchirurgie (Gießen), Innere
Medizin (Langenthal/Schweiz), Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
(Bern/Schweiz)

11/2004 **3. Staatsexamen Humanmedizin**

Seit 04/2004 **Studiengang Zahnmedizin**
Justus-Liebig-Universität Gießen

05/2005 Beginn der experimentellen Doktorarbeit am Physiologischen
Institut, Gießen, Fach Zahnmedizin

Seit 03/2006 **Teilzeitstelle als Assistenzarzt in der Abteilung für Mund-Kiefer-
Gesichtschirurgie**
ev. Jung-Stilling-Krankenhaus Siegen

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

2000 - 2005	Tätigkeit als Assistent in Notaufnahmen der Inneren Medizin und Chirurgie, Main-Kinzig-Kliniken Gelnhausen
2004 - 2006	Wissenschaftliche Hilfskraft Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität, Abteilung Neurophysiologie

WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN

Scholz, A.; Gruß, M.; Krause, U.; Malik, C.; Ettore, G.; Vogel, W.: HEPES influences the resting potentials in primary sensory neurones. Pflügers Arch 441: R 225 (2001)

Scholz, A.; Ettore, G.; Malik, C.Y.; Krause, U.; Gruß, M.: Resting potential in primary sensory neurones is influenced by hepes. Soc. for Neurosci., 31st Annual Meeting: 382.27 (2001) Soc. for Neurosci., San Diego, 10.-15.11.2001

Malik, C.Y.; Ettore, G.; Scholz, A.: Resting potential of endothel cells in thin slice of guinea pig heart is little affected by hypoxia. Pflügers Arch 443: S 327 (2002) Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Tübingen, 15.03. - 19.03.2002

Malik, C.Y.; Scholz, A.: Delayed rectifier K⁺ currents in endothel cells are blocked by heptanol in thin slice of guinea pig. Pflügers Arch 443: S 279 (2002) Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Tübingen, 15.03. - 19.03.2002

Ettore, G.; Malik, C.; Scholz, A.: The buffer HEPES depolarizes neurones in a thin slice preparation of rat spinal ganglia by a blockade of K⁺ currents. 3rd FENS S. 101 (2002)
3rd FENS 2002, Paris, 13.-17.07.02

Ettore, G.; Malik, C.; Fabian, S.; Frese, J.; Heugel, P.; Czorlich, P.; Lots, K.; Kellert, L.; Scholz, A.: Actions of Endothelin-1 on neurones in a thin slice preparation of dorsal root ganglia of young rat. Pflügers Arch 445: S33 (2003)

Bühnemann, C.B.; Bernreuther, C.; Braun, H.; Malik, C.; Scholz, A.; Schachner, M.; Reymann, K.G.; Dihné, M.: ES cell-derived neural precursors survive after transplantation into the ischemic cortex and differentiate into functional neurons. Program No. 259.2. Society for Neuroscience, Washington, DC, 12.-16.11.2005

Bühnemann C, Scholz A, Bernreuther C, Malik CY, Braun H, Schachner M, Reymann KG, & Dihné M (2006). Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. Brain, DOI: 10.1093/brain/aw1261, 11 pages

10 Danksagung

Hiermit möchte ich von ganzem Herzen meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Andreas Scholz, der mir während der gesamten Zeit, die zur Erarbeitung dieser Arbeit notwendig war, ein guter Mentor, Lehrer und Freund war. Ohne seinen Enthusiasmus für solides wissenschaftliches Arbeiten wären die Durststrecken, die es während jeder experimentellen Phase einer Dissertationsarbeit gibt, sicherlich trockener ausgefallen. Sein umfassendes Wissen war mit immer Ansporn und Quelle für neue Ideen und Erkenntnisse.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Freund und Kollegen Giovanni Ettore, der mich auf meinem Weg in die Wissenschaft begleitet hat und mir die Methodik der Elektrophysiologie beigebracht hat. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Weiterhin möchte ich allen übrigen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe danken, die diese Arbeit ermöglicht haben. Vor allem bei Brigitte Agari unserer MTA und Otto Becker unserem weltbesten Feinmechaniker möchte ich mich besonders bedanken.

Den Arbeitsgruppen von Professor Dr. Klaus G. Reymann (Leibniz Institut für Neurobiologie IfN, Neuropharmakologie, Magdeburg), hier besonders zu nennen Claudia Bühnemann, die die Stammzelltransplantationen und die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt hat, von Frau Professor Dr. Melitta Schachner (Zentrum für molekulare Neurobiologie, Universität Hamburg) und von PD Dr. Marcel Dihné (Heinrich-Heine-Universität, Neurologische Klinik, Düsseldorf) gilt großer Dank für die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung des verwendeten Modelles und der Versuchstiere.

Mein allergrößter Dank gilt jedoch meiner Familie, ganz besonders meiner Mutter Helga und meinem Vater Horst, der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr erleben durfte. Durch ihre Aufopferung haben sie meine Ausbildung, mein Studium und diese Arbeit unterstützt und ermöglicht.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Julia Martin für ihre Nachsicht bedanken, die durch ihren Verzicht auf gemeinsame Stunden diese Arbeit erst ermöglicht hat.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5183-1



9 7 8 3 8 3 5 1 9 5 1 8 3 9