

**Elektrophysiologische Charakterisierung nativer und
stammzell-abgeleiteter enterischer Neurone zur
Entwicklung einer stammzellbasierten Therapie bei
der Hirschsprung-Erkrankung**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Nadine Wronna

aus Tettwang

Tübingen

2015

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 17.02.2016

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Nieder

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Elke Günther

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste
getan hat.*

Johann Wolfgang von Goethe

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Ich erkläre hiermit, dass mir das *Anatomische Institut der Universität Tübingen* die Bilder in den Grafiken;

Abbildung 21 Ba

Abbildung 24

Abbildung 25

Abbildung 26

freundlicherweise zur Erstellung der vorliegenden Arbeit überlassen hat.

Bad Homburg, den 08.11.2015

Nadine Wronna

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Elke Günther richten. Vielen Dank für die Betreuung dieser Arbeit, die vielfältigen Anregungen und aufmunternden Worte und vor allem für ihre Geduld!

Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Dr. Andreas Nieder für die Betreuung dieser Arbeit. Herrn Dr. Udo Kraushaar möchte ich einen ganz besonderen Dank für seine Unterstützung, Hilfestellungen, Zuspruch und Geduld aussprechen. Durch ihn wurde diese Dissertation erst ermöglicht und finalisiert. Vielen Dank, lieber Udo, ich weiß, es war nicht immer einfach!

Desweiteren danke ich dem *Anatomischen Institut der Universität Tübingen*, der Kinderklinik in Tübingen sowie der *Naturin Viscofan GmbH & Co. KG* für die gute Zusammenarbeit und den sehr produktiven Informationsaustausch.

Mein ganz besonderer Dank geht auch an all meine ehemaligen Kollegen und Freunde am *NMI*, durch die ich neben fachlicher Unterstützung auch sehr viel Spaß während der Promotion erfahren habe.

Allen voran danke ich hier meinen Freunden, die auch während schwieriger Zeiten stets an meiner Seite waren, immer an mich geglaubt und unterstützt haben: Dr. Alice Hettler, Dr. Massimo Kubon, Dr. Sabine Trinks, Dr. Max Eickenscheidt, Melanie Eberhardt, Denise Ziegler, Dr. Anja Zehnder, Dr. Susanne Denzau, Dr. Kristin Graumann, Dr. Selina Kern und Björn Schembera.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Motivation.....	3
2.2 Das enterische Nervensystem	4
2.2.1 Die Entstehung	4
2.2.2 Aufbau und Aufgaben	4
2.3 Die Hirschsprung-Erkrankung	17
2.3.1 Entstehung der Hirschsprung-Erkrankung.....	19
2.3.2 Genetische Faktoren	20
2.3.3 Therapiemöglichkeiten.....	22
2.4 Der stammzellbasierte Therapieansatz	23
3 Zielsetzung	25
3.1 Funktionale enterische progenitor-abgeleitete Zellen auf einem Kollagenträger	25
4 Material und Methoden	26
4.1 Material	26
4.2 Methoden	26
4.2.1 Isolierung und Kultivierung enterischer Neurone und Progenitorzellen	26
4.2.2 Histologie	30
4.2.3 Elektrophysiologische Methoden	33

4.2.4	Auswertung der Patch-clamp Experimente	36
5	Ergebnisse	38
5.1	Meerschweinchen.....	38
5.1.1	Kultivierung und Immunhistochemie von Meerschweinchen Ganglien..	38
5.1.2	Elektrophysiologische Messungen vollständig isolierter und kultivierter Meerschweinchen Ganglien	40
5.1.3	Natriumgetragene Aktionspotenziale	42
5.2	Adulte C56/BL6N Mäuse	43
5.2.1	Kultivierung und Immunhistochemie adulter C56/BL6N Mäuse	44
5.2.2	Elektrophysiologische Charakterisierung der Natriumkanäle	47
5.2.3	Natriumgetragene Aktionspotenziale	54
5.3	Progenitor-abgeleitete Zellen (PDCs) aus neonatalen C56/BL6N Mäusen .	62
5.3.1	Typ I progenitor-abgeleitete Zellen.....	63
5.3.2	Typ II progenitor-abgeleitete Zellen.....	67
6	Diskussion	98
6.1	Potenzial postnataler enterischer Progenitorzellen für einen zellbasierten Therapieansatz	99
6.2	Isolierung, Proliferation und Differenzierung enterischer Zellen <i>in vitro</i>	101
6.2.1	Meerschweinchen	101
6.2.2	Adulte und progenitor-abgeleitete murine Zellen (PDCs).....	101
6.3	Immunhistochemische Antikörpermarkierung als positiver Nachweis enterischer Neurone.....	103
6.4	Elektrophysiologischer Vergleich adulter enterischer Neurone und postnataler enterischer progenitor-abgeleiteter Zellen <i>in vitro</i>	104
6.4.1	Reifung und Expression von Ionenkanälen.....	105
6.4.2	Natriumkanäle	106
6.4.3	Kaliumkanäle.....	108

6.4.4	Aktionspotenziale und die Möglichkeit von Netzwerkaktivität	109
6.5	Ausblick.....	113
7	Referenzen.....	115
8	Anhang A	126
8.1	Verwendete Materialien.....	126
8.1.1	Verbrauchsmaterial und Laborinstrumente	126
8.1.2	Chemikalien, Zellkulturmedien und –lösungen	127
8.1.3	Immunhistochemie.....	128
8.1.4	Tiere	129
8.1.5	Geräte.....	129
8.1.6	Software	129
9	Anhang B	130
9.1	Präparations,- und Kultivierungsmedien, Intra- und Extrazellulärlösungen	130
9.1.1	Präparations-, und Kultivierungsmedien	130
9.1.2	Intra,-und Extrazellulärlösungen	131
10	Anhang C.....	134
10.1	Zusammenfassung relevanter elektrophysiologischer Daten.....	134
10.1.1	Elektrophysiologische Daten adulter muriner Zellen	134
10.1.2	Elektrophysiologische Daten progenitor-abgeleiteter Zellen (PDC Typ II)	135
11	Anhang D.....	138
11.1	Strom- und Spannungsprotokolle.....	138
11.1.1	Natrimaktivierung	138
11.1.2	Natriuminaktivierung.....	139
11.1.3	Refraktärzeit der Natriumkanäle	140
11.1.4	Stromprotokoll (Current-clamp Protokoll)	141

12	Anhang E	142
12.1	Time lapse Aufnahme einer Meerschweinchen Primärkultur.....	142
13	Publikationen	144
13.1	Posterbeiträge	144
14	Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis	145
14.1	Abbildungsverzeichnis.....	145
14.2	Tabellenverzeichnis.....	149
Lebenslauf Fehler! Textmarke nicht definiert.	

Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridine
A ₂ P	L-Ascorbic acid 2-phosphate
AH	Afterhyperpolarisation
AK	Antikörper
Ara-C	Cytosin β -D-arabinofuranosid
BK-Kanal	Big Kalium Kanal
BSA	Bovine serum albumin
Ca ²⁺	Kalzium
Cd	Cadmium
CsCl	Cäsiumchlorid
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>DIV</i>	Days in vitro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ENS	Enterisches Nervensystem
EPSP	Exzitatorisches Postsynaptisches Potenzial
ET-3	Endothelin 3
ET-A	Endothelinrezeptor A
ET-B	Endothelinrezeptor B
EZL	Extrazellulärflüssigkeit
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fötale Kälberserum
G	Leitfähigkeit
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFR α 1	glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α -1
G Ω	Giga Ohm
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure)	Hepes
HCN-Kanal	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation Kanal
HRP	Horseradish peroxidase
HVA-Kanal	High voltage activated-Kanal
I _A	A-Strom, Kaliumstrom
I _{C50}	mittlere inhibitorische Konzentration
I _{Cav}	Kalziumstrom, spannungsaktiviert
IgG	Immunglobulin
I _h	unspezifischer Kationen-Strom
I _{Nav}	Natriumstrom, spannungsaktiviert
IPAN	intrinsische primäre afferente Neurone
IZL	Intrazellulärflüssigkeit
KCl	Kaliumchlorid

kHz	Kilohertz
Mash-1	Mammalian Achaete-Scute Homolog 1
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mNGF7S	murinen Nervenwachstumsfaktor 7S
ms	Millisekunde
MΩ	Mega Ohm
nA	Nanoampere
Na ₂ ATP	Di-Natrium-ATP
NaH ₂ PO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NMI	Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
P/S	Penicilin/Streptomycin
pA	Pico Ampere
Pax3	Gen, Paired box 3
PB	Phosphat Buffer
PBS	Phosphate buffered saline
pF	Picofarad
PFA	Paraformaldehyd
Phox2a	Protein, Paired mesoderm homeobox protein 2A
PNS	Peripheres Nervensystem
RET	Rezeptortyrosinkinase
RT	Raumtemperatur
S-Neuron	Synaptic-Neuron
sec	Sekunde
Sox10	Transkriptionsfaktor (SRY-related HMG-box)
TEA	Tetraethylammonium
TTX	Tetrodotoxin
TTX-R	Tetrodotoxin-Resistent
TuJ	Neuron-specific class III beta-tubulin
U	Unit
V	Volt
WS4	Shah-Waardenburg Syndroms
ZNS	Zentrales Nervensystem
μg	Mikrogramm

1 Zusammenfassung

Eine der häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen bei Neugeborenen, mit einer Inzidenz von 1 : 5000, ist die Hirschsprung-Erkrankung. Bei dieser Erkrankung finden sich im Darm eine oder mehrere aganglionäre Abschnitte, die aufgrund der fehlenden neuronalen Innervierung tonisch kontrahiert sind. Aktuelle, meist operative Behandlungsmöglichkeiten sind unbefriedigend und einhergehend mit einer erheblichen Minderung der Lebensqualität (Granstrom *et al.*, 2015; Rintala und Pakarinen, 2010 und 2012; Tsuji *et al.*, 1999).

Für eine zellbasierte Therapie ist es aus ethischen Gründen wünschenswert, postnatale, zellbasierte Therapien auf Basis von progenitor-abgeleiteten Zellen zu entwickeln. In der Vergangenheit wurde gastrointestinalen Progenitorzellen (adulte multipotente Stammzellen) die Fähigkeit zugesprochen, gastrointestinale Dysfunktionen heilen bzw. eindämmen zu können (Gershon, 2007; Estrada-Mondaca *et al.*, 2007; Wilkinson *et al.*, 2012). Im Jahr 2009 zeigten Metzger *et al.*, dass adulte progenitor-abgeleitete Zellen aus dem humanen Darm *in vitro* neben neuronähnlicher Morphologie, spannungsabhängige Natriumkanäle aufweisen (Metzger *et al.*, 2009a und 2009b).

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, als Teil eines Verbundprojektes, war es deshalb, das Potenzial progenitor-abgeleiteter Zellen aus dem murinen Darm hinsichtlich ihres Entwicklungspotenzials hin zu funktionalen enterischen Neuronen *in vitro* zu untersuchen. Diese Evaluation durch elektrophysiologische Charakterisierung sollte Aufschluss darüber geben, ob Progenitorzellen, welche postnatal aus dem murinen Darm isoliert und anschließend *in vitro* proliferiert und differenziert wurden, in der Lage sind, sich nicht nur morphologisch, sondern auch funktional in Neurone entwickeln zu können. Elektrophysiologische Patch-clamp Messungen *in vitro* ergaben erstmals, dass progenitor-abgeleitete Zellen tatsächlich dazu fähig sind, sich in verschiedene neuronale Subtypen mit modulierenden Eigenschaften entwickeln zu können. Als positiver Hinweis einer erfolgreichen Differenzierung hin zu neuronalen Zellen, diente der Nachweis von Natriumströmen und natrium-getragenen Aktionspotenzialen. Sowohl die gemessenen Natrium-Spitzenstromamplituden als auch das dynamische Schaltverhalten der Natriuminaktivierung stimmte mit der in der Literatur beschriebenen Kinetik von primären, murinen enterischen Neuronen, sowohl *in vitro* (Rugiero *et al.*, 2003) als auch *in situ* (Osorio *et al.*, 2001) überein. Darüber hinaus

konnte elektrophysiologisch zwischen zwei verschiedenen Neuronenarten des enterischen Nervensystems unterschieden werden, den S- und AH-Neuronen. Bei der näheren elektrophysiologischen Evaluation dieser Aktionspotenziale der beiden Neuronentypen konnten ebenfalls mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse bezüglich der mittleren Maximalamplituden bestimmt werden (Nurgali *et al.*, 2004, Rugiero *et al.*, 2002; 2003). Außerdem lässt das Vorhandensein verschiedener phasischer und tonischer Aktionspotenzialmuster und (neuronenspezifischer) Ionenströme zusätzlich den Rückschluss zu, dass sich *in vitro* verschiedene neuronale Subtypen differenziert haben.

Zusätzlich untermauert wurden diese Ergebnisse durch immunhistochemische Untersuchungen der elektrophysiologisch evaluierten Zellen durch den Projektpartner *Anatomisches Institut der Universität Tübingen*. Durch Markierung der sich proliferierenden Zellen mit BrdU, welches während der Zellteilung in die DNA interkaliert, konnte bestätigt werden, dass sich die elektrophysiologisch gemessenen Zellen aus Progenitorzellen differenziert hatten.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass adulte enterische Progenitorzellen aufgrund ihrer bereits determinierten Funktionalität und dem Vorteil, *in vitro* expandiert werden zu können, ein hohes Potenzial haben, als Quelle für (autologe) progenitor-zellbasierte (gastrointestinale) Therapien eingesetzt werden zu können. Ein großer Vorteil hierbei ist die geringe Menge an benötigtem patienteneigenem Material.

2 Einleitung

2.1 Motivation

Während ein funktionierendes enterisches Nervensystem im Verlauf der Embryogenese nicht essenziell ist, so ist es in allen postnatalen Stadien eines Lebewesens umso wichtiger (Schuchardt *et al.*, 1994). Störungen im enterischen Nervensystem beeinträchtigen nicht nur die Lebensqualität eines Menschen erheblich, sondern können auch zu dessen Tod führen.

Die Motivation der vorliegenden Arbeit war es daher, eine Methode im Tiermodell zu entwickeln, die als Grundlage für spätere Therapieansätze bei der Hirschsprung-Erkrankung dienen soll. Hierbei sollte eine Basis geschaffen werden, um Kindern, die an einem Defekt des enterischen Nervensystems im Darm, der sogenannten Hirschsprung-Erkrankung leiden, ein normales Leben zu ermöglichen, ohne erhebliche Beeinträchtigungen der Lebensqualität durch signifikante Begleiterkrankungen. Besonders im Hinblick auf ethische Bedenken ist es wünschenswert einen Therapieansatz zu entwickeln welcher nicht auf pluripotenten Stammzellen, sondern auf bereits adulten Stammzellen, den sogenannten Progenitorzellen, basiert.

Durch ein vom *Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)* gefördertes Kooperationsprojekt, zusammen mit dem *Anatomischen Institut der Universität Tübingen*, der *Kinderklinik der Universität Tübingen*, *Naturin Viscofan GmbH & Co. KG* und dem *Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut der Universität Tübingen (NMI)* sollte dies realisiert werden. Die Idee des Vorhabens war es, aus patienteneigenen Progenitorzellen des Darmes ein funktionierendes re-transplantierbares Nervengeflecht innerhalb eines Kollagenträgers zu entwickeln, um so die defekten Darmregionen zu reaktivieren. Dadurch soll den Betroffenen eine Darmresektion sowie die damit verbundenen Begleiterkrankungen und sozialen Einschränkungen erspart werden. Teilaufgabe der vorliegenden Arbeit war es, isolierte und differenzierte Progenitorzellen aus dem Mausmodell auf ihre elektrophysiologische Funktionalität und Netzwerkaktivität als mögliches Transplantat zu überprüfen. Bis heute ist wenig über die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Ionenkanalexpression von progenitor-abgeleiteten postnatalen enterischen Neuronen *in vitro* bekannt.

2.2 Das enterische Nervensystem

Das enterische Nervensystem, kurz ENS, ist der größte Teil des peripheren Nervensystems (PNS) und arbeitet weitgehend autonom. Ein Teil wird vom Rautenhirn und den Ganglien des PNS innerviert (Trudrung *et al.*, 1994; Luckensmeyer und Keast, 1998; Powely, 2000). Durch komplexe Reflexbögen, bestehend aus intrinsischen sensorischen Neuronen, Inter-, - und Motorneuronen (Costa *et al.*, 1996; Porter *et al.*, 1997; Kunze und Furness, 1999; Schemann *et al.*, 2001), arbeitet das ENS aber größtenteils autonom (Furness *et al.*, 1995 und 1998). Das ENS findet sich im kompletten Gastrointestinaltrakt und gliedert sich in Neurone und die zugehörigen Gliazellen, in sogenannte enterische Ganglien. Die Neuronenzahl ist vergleichbar mit denen des Rückenmarks (Gershon *et al.*, 1993). Neben Sympathikus und Parasympathikus hat es im autonomen Nervensystem sowohl die größte Anzahl an funktionell unterschiedlichen Neuronen als auch die komplexeste neuronale Verschaltung (Costa *et al.*, 1996; Furness, 2000; Brookes, 2001). Die Hauptaufgabe des ENS besteht in der Vermittlung der Motilitätsreflexe und der Kontrolle des Wasser-, - und Elektrolythaushaltes (Furness, 2006). Außerdem wird ihm die Aufgabe der intestinalen Blutversorgung zugeschrieben (Vanner *et al.*, 1996).

2.2.1 Die Entstehung

Der Entstehungsort des ENS ist die Neuralleiste (LeDouarin and Kalcheim, 1999). Von dort aus migriert es in der frühen Embryogenese als Vorläuferzellen zuerst in das orale und anschließend in das anale Ende des Intestinaltraktes, um diesen schließlich komplett zu besiedeln. Sobald die Vorläuferzellen den Intestinaltrakt erreicht haben, sammeln sie sich in Gruppen. Je nach ihrer späteren Bestimmung entweder in dem sich parallel entwickelnden myenterischen oder im submukösen Plexus (Newgreen und Young, 2002). Hier differenzieren sich die Vorläuferzellen zunächst in eine Vielzahl verschiedener Neuronentypen und Gliazellen, formen die Ganglien und bilden dann die komplexen Reflexbögen, welche essenziell für die Funktion des ENS sind.

2.2.2 Aufbau und Aufgaben

Im Unterschied zum zentralen Nervensystem (ZNS) ist das ENS in Ganglien organisiert, welche als „Knotenpunkte“ eine Vielzahl verschiedener Neuronentypen enthalten und sowohl Nervenbündel als auch Fasern miteinander verbinden. Die Ganglien liegen in zwei verschiedenen Plexi, dem myenterischen Plexus (Auerbach

Plexus), zwischen der Ring,- und äußeren longitudinalen Muskulatur und im submukösen Plexus (Meissner Plexus) der Submukosa. Bis auf den Ösophagus und den Magen ist die komplette Wand des Gastrointestinaltraktes mit Ganglien ausgekleidet. Ihre Größe variiert je nach Darmregion und teilweise auch zwischen den verschiedenen Spezies, wobei Ganglien des myenterischen Plexus immer größer als die des submukösen Plexus sind. Die Axone der einzelnen Neurone innervieren wiederum andere Ganglien und Gewebe des Verdauungstraktes wie z.B. Muskelschichten und die Mukosa (Furness, 2006).

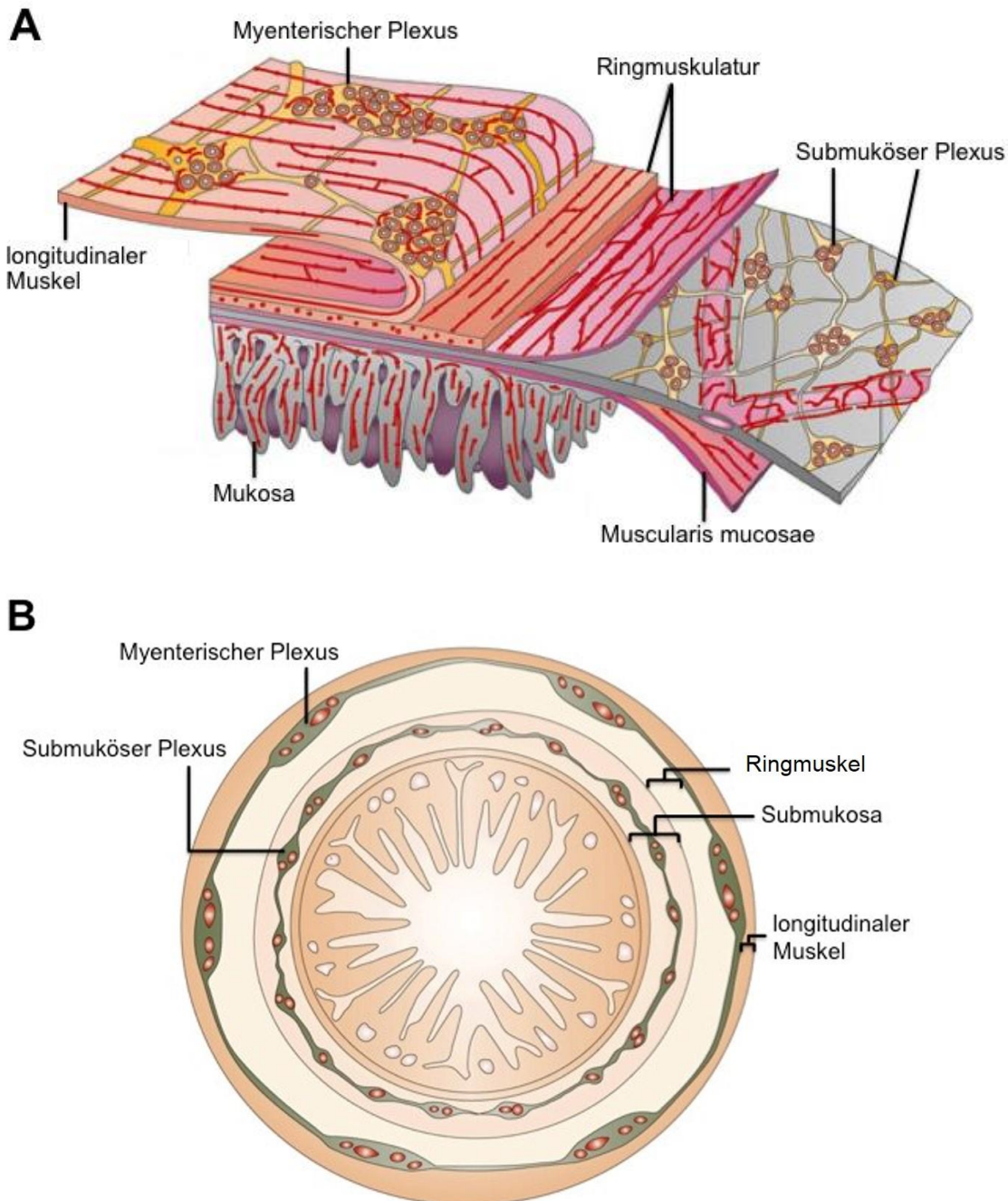


Abbildung 1: Querschnitt durch die Darmwand mit den wichtigsten Komponenten des enterischen Nervensystems.

A: Teil eines Querschnittes mit der charakteristischen Verteilung der Plexi innerhalb der Darmwand (modifiziert nach Furness, 2012) **B:** Querschnitt des Darmrohres. Die einzelnen Plexi kleiden den Darm komplett aus, sind aber in Knotenpunkten angelegt, welche durch Nervenfasern miteinander verbunden sind. Die Knotenpunkte sind in regelmäßigen Abständen über die komplette Länge des Darmes angelegt. Der zum Lumen hin gerichteten Mukosa mit ihren Darmzotten folgt der submuköse Plexus, welcher zwischen der Mukosa und der inneren Ringmuskulatur liegt. Zwischen der äußeren longitudinalen Muskelschicht und der inneren Ringmuskulatur liegt der myenterische Plexus (modifiziert nach Heanue und Pachnis, 2007).

2.2.2.1 Der myenterische Plexus (Auerbach Plexus)

Der myenterische Plexus liegt zwischen der äußeren longitudinalen und der inneren Ringmuskulatur des Darmes und kleidet den Darm in seiner kompletten Länge aus. Seine Ganglien variieren erheblich in ihrer Größe: Im Ileum des Meerschweinchens wurden zum Beispiel pro Ganglion zwischen fünf und 200 Neurone gezählt (Furness, 2006). Da die Ganglien großen Deformierungskräften durch die Darmmotilität ausgesetzt sind, sind sie stark verformbar (Gabella und Trigg, 1984). Der myenterische Plexus gliedert sich in drei Komponenten: den primären, den sekundären und den tertiären Plexus (Furness, 2006). Das primäre Netzwerk des Plexus bilden die Ganglien und die internodalen Stränge. Ein Großteil der Nervenfasern dringt allerdings nicht in das Ganglion ein, sondern wandert an ihm vorbei, um in einem anderen Internodalbündel zu münden. Die zweite Komponente des myenterischen Plexus wird von feineren Nervenfaserbündeln gebildet, entsprungen von den Ganglien oder den primären Internodalsträngen verläuft diese parallel zur Ringmuskulatur (Furness, 2006). Die dritte und feinste Komponente des Plexus schlängelt sich durch die Lücken des primären Netzwerkes (Richardson, 1958; Llewellyn-Smith *et al.*, 1993; Furness, 2000) und dient der Ringmuskelnervierung (Furness, 2006).

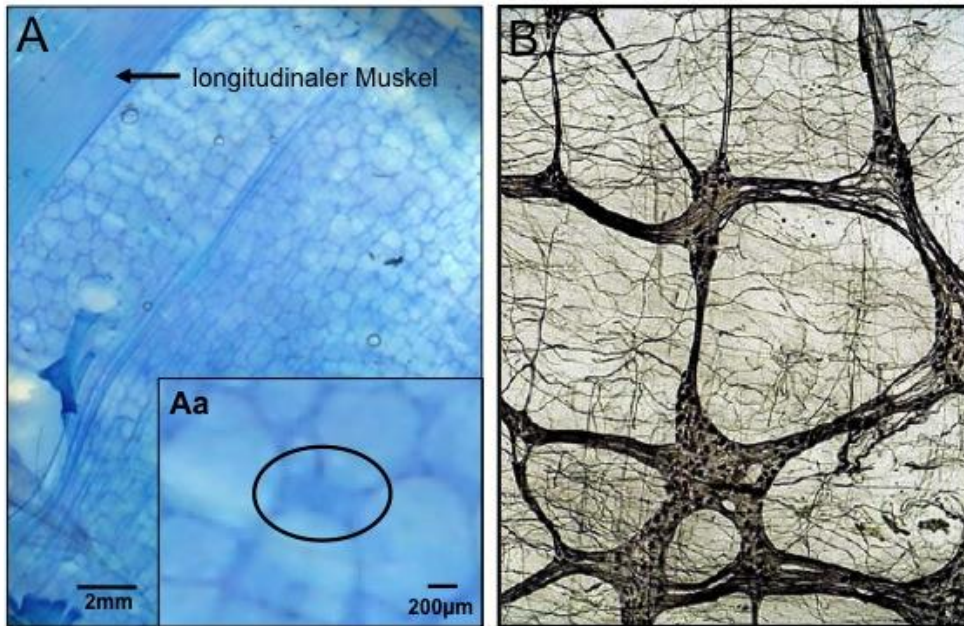


Abbildung 2: Der myenterische Plexus (Auerbach Plexus)

A: Eigene Daten zeigen eine Methylenblau-Färbung des myenterischen Plexus eines Meerschweinchens. In **Aa** ist ein Ganglion vergrößert dargestellt.

B: Modifiziert nach Wedel *et al.*, 2007 stellt den myenterischen Plexus eines humanen Kolons bei 5-fach Vergrößerung dar.

2.2.2.2 Der submuköse Plexus (Meissner Plexus)

Im Allgemeinen sind die Nervenfasern des submukösen Plexus feiner und die Ganglien kleiner als die des myenterischen Plexus (Furness, 2006; Timmermans *et al.*, 2001). Wie auch der myenterische Plexus kleidet er den Darm in seiner vollen Länge aus. Die Organisation der submukösen Ganglien und die Varietät an funktional unterschiedlichen Neuronen variiert zwischen verschiedenen Spezies (Scheuermann *et al.*, 1987a; b; Hoyle und Burnstock 1989; Timmermanns *et al.*, 1990). Auch die Tiefe, in der die Ganglien innerhalb des Plexus angesiedelt sind, beeinflusst ihre neuronale Zusammensetzung. So innervieren solche, die näher zum Lumen gerichtet liegen beispielsweise die Mukosa (Porter *et al.*, 1999; Timmermans *et al.*, 2001), solche, die näher zur Ringmuskulatur liegen, innervieren dagegen die Ring-, - und teilweise sogar die longitudinale Muskulatur (Furness *et al.*, 1990).

2.2.2.3 Neuronentypen im ENS

Enterische Neurone werden entweder aufgrund ihrer Morphologie oder ihrer Funktion eingeteilt. Funktional werden sie in drei Gruppen gegliedert: in intrinsische primäre afferente Neurone (IPANs), in Inter-, - und in Motoneurone. Die Axone enterischer Neurone sind fein, unmyelinisiert und haben eine relativ langsame Weiterleitungsgeschwindigkeit. In Nervenfaserbündeln konnten Geschwindigkeiten von 0,3 bis zu 0,7 m/s gemessen werden (Kosterlitz und Lydon, 1971; Yokoyama *et al.*, 1977). Antidromische Aktionspotenziale in Somata von Dogiel Typ II Neuronen erreichten hingegen eine Geschwindigkeit von 0,23 m/s (Hendriks *et al.*, 1990).

Bereits 1895 beschrieb Dogiel drei verschiedene Neuronenmorphologien, die bis heute Bestand haben und in Dogiel Typ I, II und III Neurone klassifiziert werden. Manche Autoren nehmen eine Erweiterung der Neuronenklassen in Typ IV, V, VI und VII vor, wobei die von Dogiel die Beständigste darstellt (Furness, 2006).

Neurone vom Dogiel Typ I

Diese Neurone sind charakterisiert durch ihre leicht lang gezogene, abgeflachte und stern-, - oder winkelförmige Morphologie. Ihre Somata sind zwischen 13 und 35 µm lang und 9 bis 22 µm breit. Sie besitzen ein Axon und 4 bis 20 Dendriten oder mehr. Die teilweise bifurkale Axone können in bis zu vier Ganglien münden bevor sie die Ringmuskulatur erreichen, manche enden auch schon früher. Ein entscheidendes Merkmal sind die lamellenartigen, kurzen Dendriten, die flach im myenterischen Plexus liegen. Funktional gehören die Dogiel Typ I Neurone keiner bestimmten Klasse an. Unter ihnen gibt es inhibitorische Motoneurone, die auf den Muskel projizieren, exzitatorische Motoneurone und Interneurone.

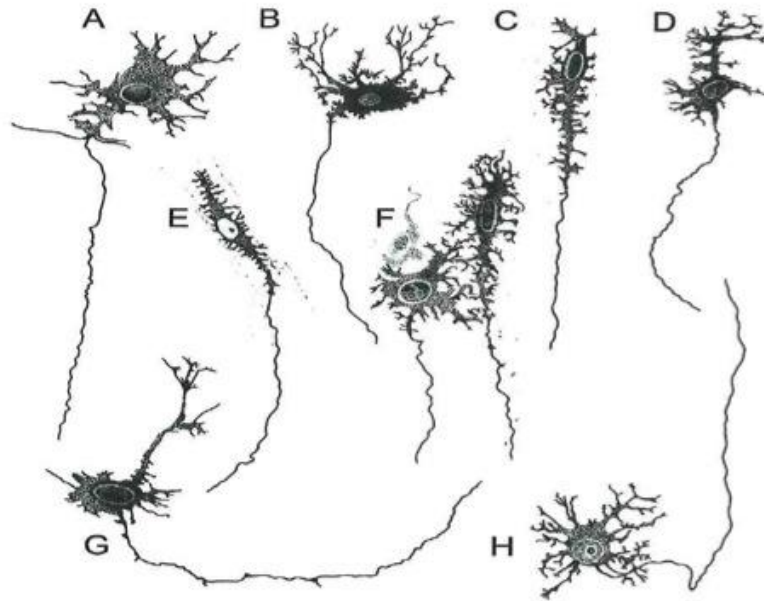


Abbildung 3: Dogiel Typ I Neurone. Bestimmt und gezeichnet 1899 von Dogiel.

Die Neurone **A**, **C**, **E**, **F** und **H** entstammen dem myenterischen Plexus eines Meerschweinchen-Dünndarmes, **D** und **G** des eines Menschen. Das Neuron in **B** zeigt ein Dogiel Typ I Neuron aus der Gallenblase eines Hundes (modifiziert nach Furness, 2006).

Neurone vom Dogiel Typ II

Typ II Neurone sind die häufigsten Neurone im myenterischen und submukösen Plexus des Dün- und Dickdarmes. Sie machen ungefähr 10 bis 25 % der Gesamtpopulation der Neurone in myenterischen Ganglien aus. Laut Dogiel sind ihre Somata rund oder oval, haben ein Axon und 3 bis 10 Dendriten. Manche von ihnen haben einen pseudounipolaren Verlauf. Mittlerweile ist bekannt, dass alle Hauptausläufer dieser Neurone Axone sind (Furness, 2006; Hendriks *et al.*, 1990). Dogiel Typ II Neurone sind mit 22 bis 47 μm Länge und 13 bis 22 μm Breite größer als die vom Typ I. Die sehr langen Ausläufer dieser Neurone projizieren primär direkt in die umgebenden Muskelschichten (Bornstein *et al.*, 1991), manche sogar bis in die Mukosa (Furness *et al.*, 1990b). Die feineren Äste münden in demselben oder benachbarten Ganglion. Ein Großteil der Ausläufer ist kreisförmig um den Zellkörper gelegt und erreicht im Meerschweinchen beispielsweise eine Länge von rund 2 mm. Ein Teil der Axone hat eine Länge von 2 bis 40 mm, teilweise sogar bis zu 100 mm, und projiziert in proximale, anale Richtung (Brookes *et al.*, 1995). Außerdem formen sie Synapsen in myenterischen Ganglien (Johnson *et al.*, 1996).

Im submukösen Plexus innervieren die Neurone benachbarte Ganglien (Lomax *et al.*, 2001; Reed und Vanner, 2001) und projizieren in die Mukosa, wobei die Ausläufer nur eine Länge von ca. 2 mm annehmen (Furness, 2006; Kirchgessner *et al.*, 1992; Song *et al.*, 1992).

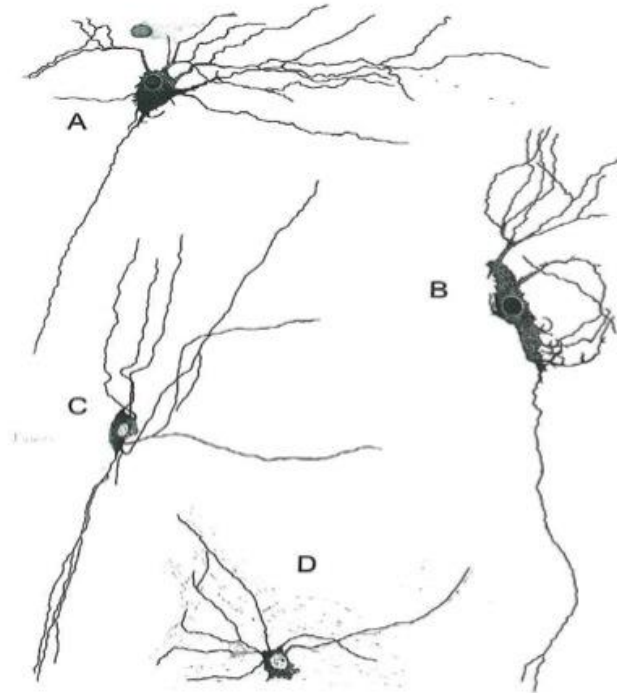


Abbildung 4: Neurone vom Dogiel Typ II. Bestimmt und gezeichnet 1899 von Dogiel.

Die Neurone in **A** und **B** sind aus dem myenterischen Plexus eines Meerschweinchen Dünndarmes, Neuron **C** aus dem eines Menschen. Neuron **D** stammt aus dem Dickdarm eines Meerschweinens (modifiziert nach Furness, 2006).

Neurone vom Dogiel Typ III

Morphologisch sind Neurone vom Dogiel Typ III durch ihre 2 bis 10 verzweigten und feiner werdenden Dendriten charakterisiert. Im Vergleich zu Dogiel Typ II Neuronen sind ihre Dendriten relativ kurz.

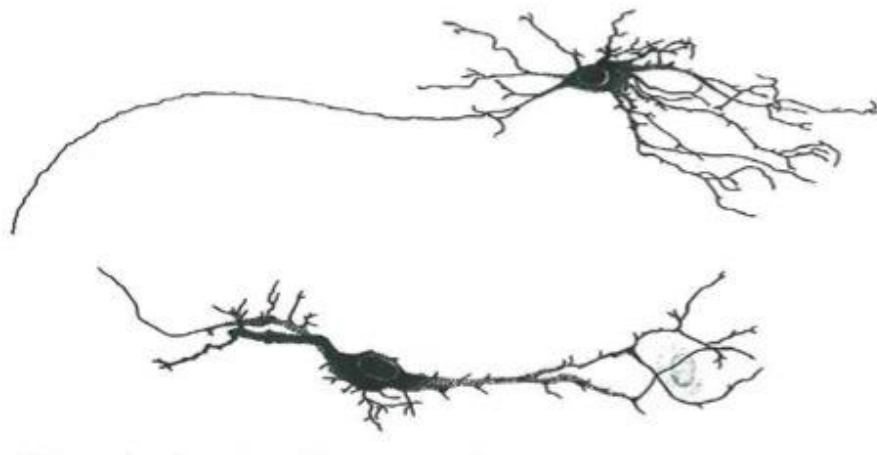


Abbildung 5: Dogiel Typ III Neurone. Bestimmt und gezeichnet 1899 von Dogiel.

Beide dargestellten myenterischen Neurone stammen aus dem Dünndarm des Meerschweinchens. Das oben dargestellte Neuron ist gleich mit den Neuronen, die in der Literatur als filamentöse Interneurone des Meerschweinchens beschrieben werden (modifiziert nach Furness, 2006).

2.2.2.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften enterischer Neurone des Dün- und Dickdarms

Die elektrophysiologische Charakterisierung von ENS-Neuronen ist nicht nur durch die Tatsache limitiert, dass es Unterschiede zwischen den Spezies gibt, sondern auch dass ihre Eigenschaften durch Neurotransmitter, Hormone und andere Mediatoren wie z.B. Histamin und Prostaglandin beeinflusst werden können. Die ersten intrazellulären Messungen und elektrophysiologischen Klassifikationen wurden in den 1970ern gemacht (Nishi und North, 1973; Hirst und McKirdy, 1974; Wood und Mayer, 1978). Nishi und North unterteilten die Neurone in drei Gruppen. Typ I Neurone, welche über die komplette Zeit eines depolarisierenden Strompulses Aktionspotenziale generieren (tonisch), Typ II, welcher mit nur einem Aktionspotenzial am Anfang einer Depolarisation reagiert (phasisch) und Typ III der nicht erregbar war. Von diesem nicht stimulierbaren Typ III wird angenommen, dass dieser bei der Messung zerstört wurde oder es sich fälschlicherweise um Gliazellen handelte. Diese Unterschiede im Feuerverhalten von Neuronen sind essenziell um ein neuronales Netzwerk optimal kontrollieren und die Netzwerkaktivität fein aufeinander abzustimmen zu können. Neurone mit kurzer Refraktärzeit, welche eine schnelle Abfolge von Aktionspotenzialen auf einen Puls zeigen, sind besonders wichtig für synaptische Übertragungen. Für die Modellierung der Informationsübertragungen von Inter- und

Motoneuronen beispielsweise ist es wichtig, dass die Neurone lange Refraktär- und Hyperpolarisationsphasen haben, um später eintreffende Signale am Soma des Neurons zu inhibieren.

1974 wurden die Neurone im Dünndarm des Meerschweinchens von Hirst *et al.*, dann in S- und AH-Neurone gegliedert. So steht „S“ für „synaptic“ und „AH“ für „after hyperpolarizing“ und leitet sich von der Form des Aktionspotenzials bzw. vom phasischen und tonischen Feuerverhalten der Neurone ab. Die Bezeichnung S- und AH- Neuron ist heutzutage nicht mehr eindeutig zutreffend, wird aber dennoch beibehalten.

S-Neurone

Die S-Neurone zeigen schnelle Aktionspotenziale gefolgt von meist kurzen „nachhyperpolarisierenden“ Potenzialen (AHPs), welche 20 bis 100 ms andauern. Da es sich um natriumgetragene Aktionspotenziale handelt, können diese durch Tetrodotoxin (TTX) inhibiert werden. Oft haben S-Neurone filamentöse Formen und sind vom Dogiel Typ I. In Meerschweinchen zum Beispiel haben alle S-Neurone ein einzelnes Axon und können deshalb nie von Dogiel Typ II sein (Furness, 2006).

Als Antwort auf intrazelluläre Depolarisierungen von 50 ms feuern diese Neurone tonisch Aktionspotenziale (Furness, 2006). Bei 500 ms andauernden depolarisierenden Pulsen reduziert sich die Feuerrate oder stellt sich nach 200-150 ms durch das Vorhandensein eines auswärtsrekifizierenden Stromes ganz ein (Kunze *et al.*, 1997).

2001 zeigten Brookes *et al.*, dass es drei verschiedene Neuronentypen mit unterschiedlichen Eigenschaften gibt, welche in die Kategorie der S-Neurone fallen. Noch ist die elektrophysiologische Subklassifizierung der S-Neurone nicht vollständig aufgeklärt, es konnte aber gezeigt werden, dass auf, - aber nicht absteigende Interneurone einen markanten A-Strom (I_A) besitzen. Hoch erregbare Neurone mit hohem Eingangswiderstand, welche sich oft am Rande myenterischer Ganglien befinden, konnten von Smith *et al.*, 1999 identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um longitudinale Muskel-Motoneurone.

Außerdem zeigen S-Neurone sowohl langsame als auch schnelle exzitatorische postsynaptische Potenziale (EPSPs), welche oft die Summe aus unterschiedlichen Transmissionen verschiedener Axone darstellen. Langsame EPSPs hingegen werden

meist durch Stimulation interganglionärer Verbindungen ausgelöst (Wood und Mayer 1978; Morita und North, 1985).

AH-Neurone

Das Aktionspotenzial eines AH-Neurons liegt einem Tetrodotoxin (TTX)-sensitiven Natriumkanal (I_{NaV}) und einem TTX-insensitiven Kalziumkanal (TTX-R I_{Cav}) zugrunde (North 1973; Hirst *et al.*, 1985a; Rugiero *et al.*, 2003). Bei Vorhandensein von TTX reicht der TTX-R I_{Cav} aus um ein Aktionspotenzial am Soma auszulösen. Dem ebenfalls einwärtsgerichteten TTX-resistenten Natriumkanal (TTX-R I_{NaV}) konnte bislang noch keine tragende Rolle in der Entstehung von Aktionspotenzialen in AH-Neuronen nachgewiesen werden (Rugiero *et al.*, 2003).

Der TTX-sensitive I_{NaV} in myenterischen AH-Neuronen aktiviert zwischen -50 und -40 mV und erreicht bei -10 mV seinen maximalen Öffnungszustand (untersucht an Meerschweinchen-Zellkulturen) (Zholos *et al.*, 2002). Er zeigt eine schnelle Inaktivierungskinetik und sein „steady state“ halb-inaktivierungs Potenzial liegt bei -56 mV. Die Zeitkonstante der Inaktivierung nimmt bei depolarisierenden Haltepotenzialen ab. Die Erholung aus der Inaktivierung ist ebenfalls schnell, mit Zeitkonstanten zwischen 7 und 44 ms, bei Haltepotenzialen von -100 und -60 mV (Furness, 2006).

Die Maximalamplituden eines Aktionspotenzials eines AH-Neurons liegt zwischen 75 - 100 mV (Meerschweinchen) und zeigt eine Flexion in der repolarisierenden Phase, welche durch das Aktivieren eines I_{Cav} verursacht wird. Hierbei handelt es sich um einen n-Typ Kalziumkanal, da unter Anwesenheit von L-Typ Kalziumkanal-Blockern diese Flexion noch immer vorhanden ist (North und Tokimasa 1987; Kunze *et al.*, 1994). Normalerweise folgen der fallenden Phase des Aktionspotenzials zwei einzelne Hyperpolarisationen, eine frühe und eine späte AHP („after hyperpolarisation“) (siehe Abb. 7). Die späten, langsamen AHPs können 2 bis 30 Sekunden andauern (Hirst *et al.*, 1974; 1985b). Die frühe AHP-Phase, welche sich direkt der fallenden Phase anschließt, dauert 20 bis 100 ms und ähnelt der transienten Hyperpolarisation von S-Neuronen sowie der Hyperpolarisation der meisten Aktionspotenziale des ZNS. Prominente Ströme, die diese transiente Hyperpolarisation beeinflussen, sind unter anderem ein TEA-sensitiver delayed rectifier Kationenkanal (Hirst *et al.*, 1985a, Zholos *et al.*, 1999), ein Kalzium- und ein spannungssensitiver Kaliumkanal (BK-Kanäle) mit großer Leitfähigkeit. Bei

Ruhehaltepotenzialen negativer als -60 mV konnte das Vorhandensein eines 4-Aminopyridin-sensitiven A-Stroms (I_A) detektiert werden (Hirst *et al.*, 1985a).

Die späten AHPs spielen eine große Rolle bei der Erregbarkeit der AH-Neurone. Je nach Aktivierungsgrad des späten AHP-Stromes kann die resultierende Hyperpolarisation ausreichen, um später eintreffende Aktionspotenziale am Soma zu reduzieren und so folgende Informationsübertragungen zu Inter- und Motoneuronen zu verhindern. Dieser Effekt, dass AH-Neurone mit ihrer späten AHP-Phase die Signale der IPANs tackten, ist für Regulation der Peristaltik notwendig. Essenziell für die Generation der späten AHP-Phase ist die Aktivierung der kalziumabhängigen Kaliumkanäle. Dies erfolgt durch eine kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern, die über einen Ryanodine-sensitiven Rezeptor geregelt wird (Hirst und Spence, 1973; Hirst *et al.*, 1974). Die Repolarisation aus der späten AHP-Phase hängt dann wiederum von der Kalziumaufnahme in die Mitochondrien ab. Wird die Aufnahme von Kalzium in die Mitochondrien beispielsweise durch mitochondriale respiratorische Enzyme gehemmt, so verlängert sich die AHP-Phase (Vanden Berghe *et al.*, 2002). Der AHP-Strom trägt außerdem zum Erreichen des Ruhehaltepotenzials bei.

Zusätzlich existiert in AH-Neuronen ein unspezifischer Kationen-Strom (I_h), welcher durch Hyperpolarisation aktiviert wird und beim Ruhehaltepotenzial aktiv ist (Galligan *et al.*, 1990, Rugiero *et al.*, 2002). Dieser Strom trägt zu Membranleitfähigkeiten negativer -40 mV bei, hat langsame Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken und kann anhaltende Depolarisationen verursachen (Galligan *et al.*, 1990; Rugiero *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2005). Die Regulation des Stroms in AH-Neuronen ist noch nicht ganz geklärt, in anderen Zelltypen wie z.B. Herzmuskelzellen wird er durch cyclisches AMP reguliert.

AH-Neurone wie auch die S-Neurone zeigen einen A-Typ Kaliumkanal (I_A) (Hirst *et al.*, 1985b; Galligan *et al.*, 1989; Nguyen *et al.*, 2005). Dieser Kanal ist bei den meisten Neuronen bei Ruhehaltepotenzialen inaktiviert, bei AH-Neuronen hat er jedoch ein geringes Aktivierungslevel (Starodub und Wood, 2000). Er ist aktivierbar bei Hyperpolarisationen negativer -60 mV (Hirst *et al.*, 1985a) und limitiert so z.B. die Feuerrate eines Neurons, in dem er das Erreichen des Ruhemembranpotenziales verzögert.

Weitere Kanäle, die aber keinen signifikanten Beitrag zum Erreichen des Ruhehaltepotenziales leisten, sind z.B. HVA- (high voltage activated) Kalziumkanäle und ATP-abhängige Kaliumkanäle (siehe Abb. 7).

Beim Meerschweinchen sind fast alle Dogiel Typ II Neurone, AH-Neurone. Den meisten von ihnen fehlt allerdings die späte AHP, obwohl sie die typische Flexion während der Repolarisation zeigen (Cornelissen *et al.*, 2000).

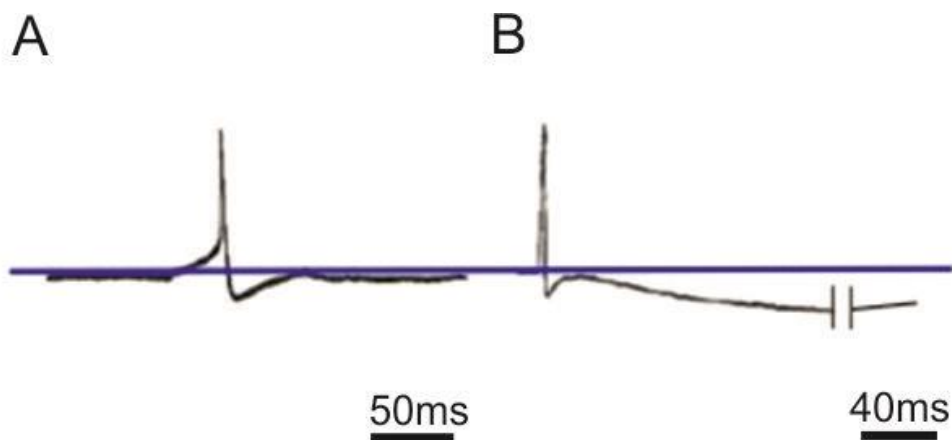


Abbildung 6: Vergleich des Aktionspotenzialverlaufs eines S-Neurons und eines AH-Neurons.

A: Das Aktionspotenzial eines S-Neurons. **B:** Das Aktionspotenzial eines AH-Neurons. Die blaue Linie markiert das Ruhehaltepotenzial der Zellen. Deutlich zu erkennen ist, dass dem AH-Neuron der ersten nachhyperpolarisierenden Phase eine zweite Phase folgt, welche sich über mehrere Sekunden erstrecken kann. Dahingegen erreicht das S-Neuron bereits nach kurzer Zeit sein Ruhehaltepotenzial und ist somit in der Lage innerhalb kurzer Zeit neue Aktionspotenziale auszulösen. Somit erzeugt es eine hohe Aktionspotenzial-Feuerrate (modifiziert nach Furness, 2006).

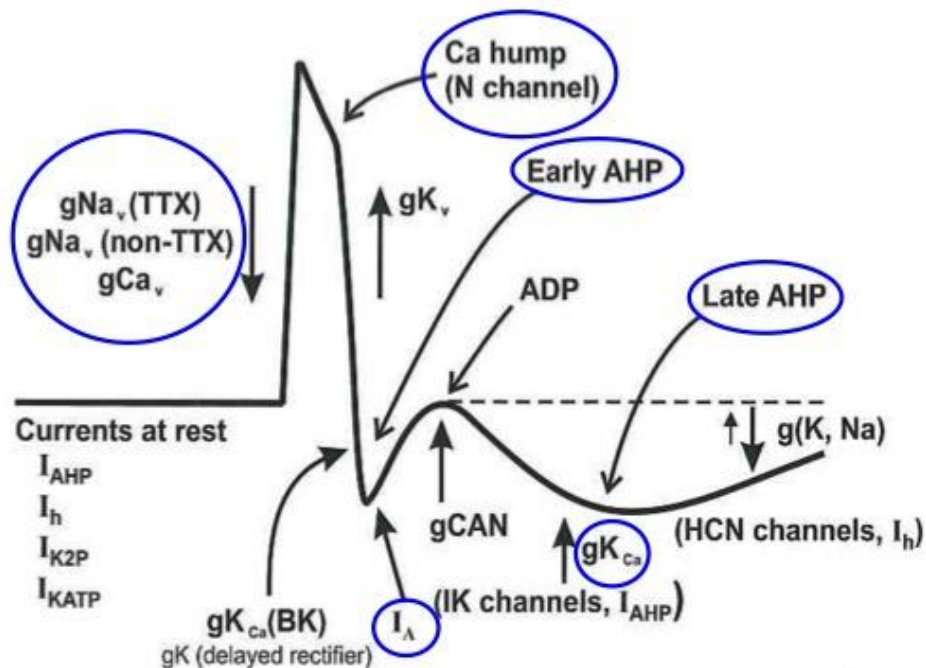


Abbildung 7: Schematische Darstellung aller Ionenkanäle eines AH-Neurons (Meerschweinchen) und deren Beteiligung am Ruhehaltepotenzial, Aktionspotenzial und nachhyperpolarisierendem Potenzial.

Aufwärtsgerichtete Pfeile symbolisieren auswärtsgerichtete Ströme, nach unten zeigende Pfeile die Einwärtsströme. Die angesprochenen Kanäle sind farblich markiert (modifiziert nach Furness, 2006).

2.3 Die Hirschsprung-Erkrankung

Erstmals beschrieben wurde die Hirschsprung-Erkrankung 1886 von dem dänischen Kinderarzt Harald Hirschsprung, welcher der Erkrankung seinen Namen gab. Bei der Hirschsprung-Erkrankung handelt es sich um einen der häufigsten gastrointestinalen Geburtsfehler bei Neugeborenen und Kindern mit einer Inzidenz von 1 : 5000 (Newgreen und Young, 2002) und einer Geschlechterverteilung von 4 : 1 (Mann : Frau) (Cass, 1986). Hierbei werden während der frühen Embryogenese verschiedene Darmabschnitte nicht mit innervierenden Neuronen besiedelt, sodass dieser tonisch kontrahiert ist. Hauptsächlich betroffen (bis zu 85 % der Fälle) ist das Rektum und Colon sigmoideum, eine sogenannte „short-segment“ Hirschsprung-Erkrankung (Seri *et al.*, 1997; Ryan, 1995). Seltener ist dieser Defekt in proximaler Richtung ausgeweitet und betrifft das proximale Ileum („long-segment“), in ungefähr 10 % der Fälle (Badner *et al.*, 1990; Seri *et al.*, 1997). Bei Kindern mit einer long-segment Erkrankung weißt das Kolon in 60 % der Fälle eine komplette Aganglionose auf (Ryan, 1995). Da der

Darm normalerweise tonisch kontrahiert ist und der Transport der Nahrung durch inhibitorische Neurone des ENS in Form von wellenartiger Peristaltik gewährleistet wird, kommt es zu funktionellen Charakteristika der Erkrankung. Unter anderem äußert sich ein fehlerhaftes ENS in intestinaler Obstruktion und massiver Konstipation, da sich der Darminhalt in proximaler Richtung akkumuliert und ein Megakolon bildet (siehe Abb. 8). In den meisten Fällen ist der Defekt des ENS nicht auf die distalen aganglionären Regionen beschränkt, sondern bildet in distalen Regionen des Darms hypoganglionäre Bereiche aus, welche sich in der „transition zone“ befinden und durch die Peristaltik ausgeglichen werden können. Bevor moderne Operationstechniken etabliert wurden, lag die Mortalitätsrate bei ca. 88 % (Takats und Biggs, 1938).

Laut vieler US Studien ist die Prävalenz der Hirschsprung-Erkrankung unter Asiaten am höchsten (2,8 / 10 000), gefolgt von Afroamerikaner (2,1 / 10 000) und Kaukasiern mit 1,5 / 10 000 (Holschneider und Puri, 2008). Die genaue Ätiologie ist bis heute noch nicht vollständig geklärt (Burkardt *et al.*, 2014).

Häufig geht die Hirschsprung-Erkrankung mit anderen Erkrankungen einher, wie z.B. einer Variante des Shah-Waardenburg Syndroms (WS4), Deletionssyndrom 22q11, Trisomie 21, dem kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndrom (Undine Syndrom) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Frykman und Short 2012; Levin *et al.*, 2012). All diese Erkrankungen, wie auch die Hirschsprung-Erkrankung stehen während ihrer Entwicklung in Zusammenhang mit der Neuralleiste, und werden deshalb als Neurocristopathien zusammengefasst (Bolande, 1997).

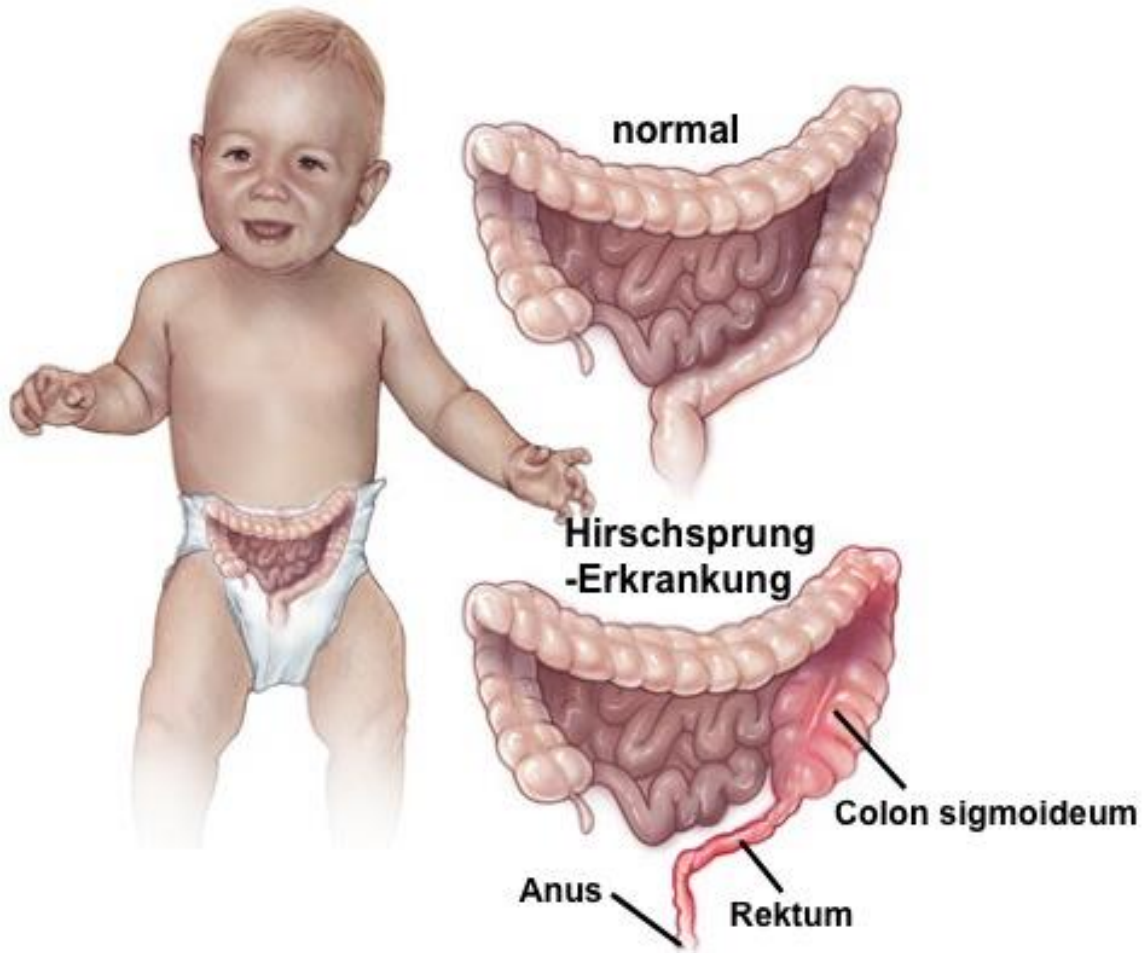


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines normalen Intestinaltraktes und eines Intestinaltraktes mit aganglionärem Rektum

Auf apikaler Seite des aganglionären Darmabschnittes akkumuliert der Darminhalt und führt zu einem Megakolon (modifiziert nach „Mayo Foundation for Medical Education and Research“).

2.3.1 Entstehung der Hirschsprung-Erkrankung

Genetische Hinweise (Seri *et al.*, 1997) zeigen, dass eine Aganglionose nicht notwendigerweise auf bestimmte Darmabschnitte beschränkt ist (Badner *et al.*, 1990). So gibt es z.B. keinen direkten Zusammenhang zwischen den betroffenen distalen Regionen, den Genmutationen und den entsprechenden Genprodukten. Es muss sich also um eine Fehlmigration der Vorläuferzellen aus der Neuralleiste durch den kompletten Gastrointestinaltrakt während der frühen Embryogenese handeln (Newgreen und Young, 2002b). Ein mögliches Problem könnte bei den Vorläuferzellen der Neuralleiste selbst liegen, an der lokalen Umgebung, einem Fehler der Migrationswege, bevor die Zellen den Darm überhaupt erreichen oder im Darm selbst

liegen. Mutationen könnten außerdem die Möglichkeit der Vorläuferzellen zu Migration, Teilung und Differenzierung beeinflussen. Prinzipiell sind Mutationen in Genen, die für 2-Zell-Zell Signal Systeme codieren wie z.B. GDNF-Ret/GFR α 1 (glial cell line-derived neurotrophic factor - Rezeptortyrosinkinase Ret / GDNF-Familie Rezeptor α 1) und ET-3/ET_B (Endothelin-3 / Endothelinrezeptor B) und Mutationen in Transkriptionsfaktoren von essenzieller Bedeutung bei der Entwicklung des ENS. Bei den Transkriptionsfaktoren sind vor allem Mash1 (mammalian achaete scute homolog-1), Sox10 (SRY-related HMG-box 10), Pax3 (paired box 3) und Phox2a und b (Paired mesoderm homeobox protein 2a und b) betroffen. Wie genau die Kolonisation des Darmes mit inhibitorischen enterischen Neuronen gestört wird, ist noch nicht ganz verstanden (Newgreen und Young, 2002b).

2.3.2 Genetische Faktoren

Geschwister haben mit 4 % im Vergleich zur restlichen Population mit ca. 0,02 % ein erhöhtes intrafamiliäres Risiko von der Hirschsprung-Erkrankung betroffen zu sein. Das Risiko erhöht sich mit der Länge des aganglionären Bereichs (Badner *et al.*, 1990). Die „short“- und „long-segment“ Erkrankungen haben ihren Ursprung in Mutationen der gleichen Gene (Seri *et al.*, 1997; Parisi und Kapur, 2000), sind aber für weniger als 50 % distaler Aganglionose verantwortlich. Bis jetzt konnten noch nicht alle betroffenen Gene identifiziert werden. Es ist nur klar, dass es keine stricte, genetische Erkrankung ist, Menschen mit Genmutationen aber auf jeden Fall prädisponiert sind an der Hirschsprung-Erkrankung zu erkranken (Kapur, 1993; Parisi und Kapur, 2000; Robertson *et al.*, 1997; Sancandi *et al.*, 2000).

2.3.2.1 RET und seine Liganden (GDNF-RET-GFR α 1)

Ungefähr 50 % der familiären und bis zu 35 % der sporadisch auftretenden Hirschsprung-Erkrankungen sind zurückzuführen auf Abweichungen in der Zellerkennung und innerhalb von Signalkomplexen, welche eine Rezeptor-Tyrosinkinase RET und seine Liganden, GDNF und GFR α 1, enthalten (Newgreen *et al.*, 2002a; Parisi und Kapur, 2000; Robertson *et al.*, 1997; Butler Tjaden und Trainor, 2013).

GDNF wird von mesenchymalen Zellen des sich entwickelnden Darms exprimiert, wohingegen seine Rezeptor-Tyrosinkinase auf den Vorläuferzellen der Neuralleiste selbst vorkommt (Young *et al.*, 2001; 2004).

Das RET-Gen codiert einen transmembranen Rezeptor mit zytoplasmatischer Tyrosinkinase-Domäne. Über GFR $\alpha 1$ (RET Co-Rezeptor) interagiert das GDNF mit RET (Rezeptor-Tyrosinkinase) (Jing *et al.*, 1996; Treanor *et al.*, 1996).

Dieser Signalkomplex fördert im ZNS und PNS neben dem Überleben von Neuronen, die Mitose von neuronalen Progenitorzellen, deren Differenzierung und das Neuritenwachstum (Lin *et al.*, 1993; Henderson *et al.*, 1994; Matheson *et al.*, 1997; Eng, 1999; Rosenthal, 1999).

Mutationen im *RET*-Gen führen zu einer Inaktivierung der Kinase was neben dem Undine-Syndrom und anderen Erkrankungen, aganglionäre Darmabschnitte in verschiedenen Schweregraden zur Folge hat (Romeo *et al.*, 1994; Edery *et al.*, 1994). Long-segment Erkrankte scheinen dabei eine höhere Mutationsrate im *RET*-Gen zu zeigen als Betroffene mit short-segment Erkrankung, insbesondere in der Tyrosinkinase-Domäne (Inoue *et al.*, 2000; 2001).

2.3.2.2 Endothelin-Endothelin Rezeptor

Ein weiteres regulatorisches System, das die Entwicklung des ENS kontrolliert, besteht aus verschiedenen Endothelinen (ETs). Sie binden an die Endothelin-Rezeptoren A (ET_A) und B (ET_B), auf der Zelloberfläche (Newgreen *et al.*, 2002a). Eine wichtige Rolle bei der Entstehung des ENS scheint das Endothelin ET₃ und sein Rezeptor ET_B zu sein. Es wird angenommen, dass das ET₃ von mesenchymalen Zellen produziert wird und der zugehörige ET_B Rezeptor auf enterischen Neuronen vorkommt (Kapur *et al.*, 2004). Mutationen in Genen des ET₃-ET_B Systems verursachen bis zu 10 % der Hirschsprung-Erkrankungen (Parisi, 1993). Vermutlich führen Mutationen in Endothelinen zu einer verfrühten Differenzierung der Vorläuferzellen zu enterischen Neuronen, so dass diese nicht weiter proliferieren und eine weitere Migration in entfernter liegende Darmregionen nicht mehr möglich ist (Hearn *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999). Oft gehen Mutationen im ET_B mit dem Waardenburg-Shah-Syndrom einher, welches je nach Mutation verschiedene Ausprägungen erfährt.

2.3.2.3 Transkriptionsfaktoren

Neben Genmutationen können auch Mutationen in Transkriptionsfaktoren auftreten, welche die Differenzierung von Vorläuferzellen zu enterischen Neuronen initiieren. Zu ihnen gehören z.B. Phox2b und Sox10. Sind diese Transkriptionsfaktoren beispielsweise ausgeschaltet, findet keine Kolonisation des Darmes mit Neuronen statt

(Newgreen *et al.*, 2002a). Neben Mutationen im Endothelin-Endothelin-Rezeptor kann beim Waardenburg-Shah-Syndrom auch der Transkriptionsfaktor Sox10 betroffen sein.

2.3.3 Therapiemöglichkeiten

Trotz stetiger Verbesserung der operativen Behandlungsmethoden der Hirschsprung-Erkrankung konnte bis heute keine zufriedenstellende Therapie entwickelt werden. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde eine Vielzahl an operativen Techniken angewendet. Hierzu zählen die Sympathektomien um die distalen Darmregionen zu relaxieren, die Resektion des dilatierten proximalen Kolons sowie die Spinalanästhesie (Judd und Adson 1928; Telford und Haxton 1948; Swenson *et al.*, 1949). Die Behandlung von erkrankten Kinder erfolgte auch medikamentös. Dies beinhaltete beispielsweise Einläufe, Behandlungen mit flüssigem Paraffin und Mineralöl, Darmmassagen und der Einsatz Sympathikus-stimulierender und Parasympathikus-inhibierender Substanzen (Fullerton 1927; Yeazell und Bell 1949). 1949 entwickelte der schwedische Kinderarzt Orvar Swenson einen bis dahin neuen Operationsansatz. Er entfernte den aganglionären Darmabschnitt und verband den funktionierenden Teil des Darmes mit dem Rektum, ohne dabei den Schließmuskel zu verletzen. Damit erreichte er die erste „Heilung“ von Hirschsprung erkrankten Kindern in 33 von 34 Fällen (Swenson *et al.*, 1949; Yancey *et al.*, 1952). Dieser Ansatz ist bis heute Bestandteil vieler operativer Eingriffe und wurde über die Jahre immer weiter verbessert. Seit den 1990ern wurden verschiedene minimalinvasive Techniken zur Behandlung der Hirschsprung-Erkrankung entwickelt. Heutzutage werden nicht nur Laparoskopien durchgeführt, sondern auch komplett transanale Ansätze verfolgt, wodurch der trans-abdominale Eingriff umgangen wird (Langer, 2012). Meta-Analysen zeigen, dass dieser transanale Ansatz nicht nur einen geringeren operativen Einsatz benötigt und somit die Zeit der Hospitalisation verkürzt ist, sondern auch dass die Folgen wie Inkontinenz und Obstipation deutlich verringert sind (Che *et al.*, 2013).

Trotz all dieser Entwicklungen und einer erheblichen Verbesserung der Lebensqualität und verringerten Mortalität innerhalb der letzten Jahrzehnte bleibt eine Vielzahl an Einschränkungen der Lebensqualität. Nur 50 % der behandelten Kinder entwickelt eine optimale Darmfunktion (Rintala und Pakarinen, 2012). Verschiedene Kohortenstudien zeigen, dass es eine signifikante Rate an refraktären Verstopfungen und fäkaler Inkontinenz gibt, was bei 10-30 % aller Betroffenen zu erheblichen sozialen

Einschränkungen führt (Ludmann *et al.*, 1994; Baille *et al.*, 1999). Beispielsweise kann nach einem operativen Eingriff der Analsphinkter nicht mehr richtig schließen, was in 40 % eine fäkale Inkontinenz zur Folge hat. Bei Kindern mit einer long-segment Hirschsprung-Erkrankung oder einhergehenden Erkrankungen wie Trisomie 21 ist der Ausgang noch schlechter (87 % Inkontinenz) (Jarvi *et al.*, 2010).

Die verzögerte Transitionszeit des Darminhaltes und die relative Motilitätsstörung des Darms sind teilweise für die sehr hohe Rate an Obstipation verantwortlich an welcher 30-100 % aller Behandelten leiden.

2.4 Der stammzellbasierte Therapieansatz

Durch das stetig wachsende Verständnis der Regulation und Entwicklung des enterischen Nervensystems und der Erkenntnis, dass im ZNS und PNS zeitlebens ein kleiner Teil an Progenitor- bzw. Stammzellen unter der Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren erhalten bleibt, wird vermehrt der stammzellbasierte Therapieansatz verfolgt, um so die post-operativen Beeinträchtigungen der Lebensqualität bei Hirschsprung-Erkrankten und anderen Neurocristopathien erheblich zu lindern bzw. zu lösen (Natarajan *et al.*, 1999).

Der zellbasierte Therapieansatz ist vielversprechend, wirft aber noch grundlegende Fragen auf. Ein großer Vorteil der multipotenten Progenitorzellen ist das verminderte Risiko der Tumorbildung und ihrer Möglichkeit aus patienteneigenem Material isoliert werden zu können. Dies ermöglicht eine autologe Transplantation, was für den Patienten den Vorteil hat eine Immunsuppression umgehen zu können. Aktuell gibt es jedoch noch keine spezifischen Zellmarker für Progenitorzellen, sodass keine zuverlässige Isolierung und Vermehrung mit hinreichend hohem Reinheitsgrad möglich ist. Ein grundlegendes Problem schwebt über allen stammzellbasierten Therapieansätzen: Es ist noch nicht geklärt, welche Komposition an Zellen essenziell ist, um ein funktionales Netzwerk zu erlangen und ob dieses überhaupt eine funktionale Einheit mit dem peripheren Nervensystem bilden kann. Außerdem scheinen postnatale Progenitorzellen in ihrem Potenzial verschiedene neuronale Sub-Typen bilden zu können eingeschränkt zu sein (Kruger *et al.*, 2002). 2013 zeigten Hotta *et al.*, dass transplantierte Progenitorzellen in der Lage sind Aktionspotenziale auszubilden und synaptische Inputs verarbeiten zu können. Fraglich ist bis heute, ob diese Neurosphären sich in komplett funktionale enterische Neurone entwickeln können. Des Weiteren kann die genaue Besiedelung mit transplantierten

Neurosphären nicht bestimmt werden, genauso wenig wie ihre Differenzierung innerhalb des Organs.

3 Zielsetzung

3.1 Funktionale enterische progenitor-abgeleitete Zellen auf einem Kollagenträger

Viele Arbeiten zeigten bisher eine erfolgreiche Transplantation von stammzell-abgeleiteten Zellen. In den meisten Fällen wurde deren „Funktionalität“ nur mittels morphologischer Marker, wie z.B. durch spezifische neuronale Marker oder Neurotransmitter verifiziert. Eine noch immer ungeklärte Frage ist jedoch, ob diese Zellen auch das Potenzial besitzen, ein elektrophysiologisch funktionales Netzwerk auszubilden. Grundlegend hierfür ist das Vorhandensein einer essenziellen Komposition von Ionenkanälen, welche eine elektrophysiologische Reizweiterleitung ermöglichen.

Um das Problem der nicht kontrollierbaren Migration von transplantierten Zellen zu umgehen, sollten die progenitor-abgeleiteten Zellen in einem Kollagenträger differenziert werden, welcher anschließend an die aganglionäre Stelle transplantiert werden soll.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, aus dem Tiermodell Progenitorzellen so zu isolieren, proliferieren und zu differenzieren, dass sie *in vitro* ein funktionales Netzwerk ausbilden. Diese Funktionalität wurde mittels Patch-clamp Messungen überprüft und evaluiert.

Diese Charakterisierung sollte als Grundlage für einen späteren Transfer zu humanen Progenitorzellen dienen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Alle Materialien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind Anhang A, verwendete Zellkulturmedien, Intra-, - und Extrazellulärlösungen Anhang B zu entnehmen.

4.2 Methoden

4.2.1 Isolierung und Kultivierung enterischer Neurone und Progenitorzellen

4.2.1.1 Meerschweinchen

Für die späteren elektrophysiologischen Untersuchungen der progenitor-abgeleiteten enterischen Zellen (PDCs = progenitor derived cells) wurde zunächst die Präparation und Kultivierung primärer intestinaler enterischer Neurone aus Meerschweinchen in der hier vorliegenden Arbeit etabliert. Aufgrund der hohen Verfügbarkeit an Publikationen fiel die Wahl zunächst auf diesen Modellorganismus.

Präpariert und kultiviert wurden Neurone aus dem Plexus myentericus, welcher sich zwischen äußerer Längs- und innerer Ringmuskulatur der Darmwand befindet. Nach enzymatischer Behandlung konnten die darin liegenden Ganglien isoliert und für folgende Patch-clamp-Versuche in Kultur genommen werden.

4.2.1.1.1 Isolierung und Kultivierung enterischer Ganglien

Nach der Dekapitation adulter, männlicher, 350-400 Gramm schwerer Dunkin-Hartley Meerschweinchen wurde der Bauchraum steril geöffnet, der gesamte Dick- und Dünndarm entnommen und unmittelbar in 4 °C sterile Krebslösung überführt sowie gespült. Danach wurde die äußere longitudinale Muskelschicht mit dem sich darunter befindenden myenterischen Plexus (LMMP) vorsichtig abgezogen und dreimal in neuer Krebslösung gewaschen. Nach mechanischem Zerkleinern der LMMP's wurde ein Enzym-Mix, bestehend aus BSA (4 mg/ml), Protease I (1 mg/ml) und Kollagenase II (1,25 mg/ml) hinzugefügt und bei 30-35 °C unter ständigem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 4 °C kalter Krebslösung konnte die enzymatische Reaktion beendet werden, sobald der Mix mit den darin befindlichen LMMPs trüb wurde und mit Schlieren durchzogen war.

Im Anschluss wurde die Lösung dreimal 5 min bei 4 °C und 500 g gewaschen und in eine 1:1 Mischung aus 4 °C kaltem Medium 199/GlutaMAX und Kulturmedium-GP auf Eis überführt. Bereits mit 0,1 mg/ml Poly-L Lysin Hydrobromid beschichtete Deckgläser aus Glas wurden mittig mithilfe eines Binokulars mit jeweils 10-15 Ganglien (Neurone und Gliazellen = funktionelle Einheit des ENS) beimpft. Durch das gezielte Sammeln einzelner Ganglien wird eine übermäßige Verunreinigung der Kultur mit anderen Zellen verhindert. Die beimpften Deckgläser wurden über Nacht im Brutschrank (37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) inkubiert. Am folgenden Tag (*DIV 1, day in-vitro*), wurde die Tropfenkultur mit Kulturmedium-GP und 20 µM Cytosin β-D-arabinofuranosid (Ara-C) aufgefüllt. Das Ara-C sollte hier in seiner Eigenschaft als Mitoseinhibitor das Wachstum von Fibroblasten und anderen Zellen, welche die späteren Patch-clamp-Experimente beeinträchtigen können, hemmen. Bis zur weiteren Verwendung wurde alle 2-3 Tage ein halber Medienwechsel durchgeführt.

4.2.1.2 C56/BL6N Mäuse

Aufgrund speziesspezifischer Unterschiede des enterischen Nervensystems (Furness, 2006) wurde die Isolierung und Kultivierung primärer intestinaler Neurone aus Meerschweinchen nach erfolgreicher Etablierung auf den Modellorganismus Maus übertragen. Die elektrophysiologisch zu charakterisierenden progenitor-abgeleiteten Zellen (PDCs) wurden ebenfalls aus C56/BL6N Mäusen gewonnen. Die elektrophysiologischen Daten der adulten Mäuse sollten als direktes Referenzsystem für die PDCs dienen.

4.2.1.2.1 Adulte C56/BL6N Mäuse

Im Unterschied zur Meerschweinchen-Präparation wurden bei den Mäusen keine kompletten Ganglien-Verbände isoliert und kultiviert, sondern eine Mischung aus Einzelzellen verschiedener Zelltypen des LMMPs verwendet.

Für Experimente mit adulten C56/BL6N Mäusen wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Den mit CO₂ getöteten Mäusen wurde der Bauchraum steril geöffnet, der Dünn-, - und Dickdarm steril entnommen und in Präparations-HBSS (nominell Ca²⁺, - und Mg²⁺ frei und 1 % P/S, 4 °C) überführt. Pro Ansatz wurden drei Tiere verwendet. Nachdem die Därme in 1-2 cm lange Stücke geschnitten und in frisches Präparations-HBSS transferiert wurden, konnten die Blutgefäße und

Mesenterialansätze unter dem Binocular, mithilfe einer feinen Schere, sauber abgetrennt werden. Danach wurden von den Darmstücken, mittels einer spitzen Pinzette, die LMMPs vorsichtig abgezogen und in ein Eppendorf Gefäß mit frischem Präparations-HBBS überführt. Bei diesem Vorgang war darauf zu achten den Darm nicht zu punktieren oder zu verletzen, um das Risiko späterer Kontaminationen durch den Darminhalt zu minimieren. Nach Absetzen der LMMPs in den Reaktionsgefäßen wurde das Präparations-HBBS vorsichtig abgezogen. Die verbleibenden LMMPs wurden enzymatisch mit 0,4 % Kollagenase II und 0,24 % Protease I verdaut, mechanisch mit einer Schere zerkleinert und trituriert. Nach 7-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurde das Gemisch aus LMMPs und Enzymen mit 0,05 % DNase I versetzt, erneut trituriert und weitere 10-20 min inkubiert, bis die Lösung keine größeren Gewebestücke mehr enthielt. Um die Enzymreaktion abzustoppen, wurde die Lösung dreimal mit Präparations-HBSS gewaschen. Dies erfolgte jeweils durch 6 min Zentrifugation bei 100 g und anschließendem Triturieren des Pellets in sterilem Präparations-HBSS. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in Einzelzellmedium mit 10 ng/ml GDNF aufgenommen. Jeweils 5×10^4 Zellen/ml der Zellsuspension wurden mittig auf Deckgläsern aus Glas angebracht. Diese wurden zuvor mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Kollagen Typ I aus dem Rattenschwanz beschichtet. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Am folgenden Tag (*DIV* 1) wurde die Tropfenkultur mit Einzelzellmedium und 10 ng/ml GDNF vorsichtig aufgefüllt. Ein Teil der Kultur wurde zusätzlich mit 10 ng/ml NGF versetzt, um eventuelle Unterschiede im Überleben und der Funktionalität der Zellen festzustellen. An *DIV* 2 erfolgte ein halber Medienwechsel, ab *DIV* 4 wurde den Zellen zusätzlich 20 μM Ara-C zugegeben um ein übermäßiges Wachstum von Fibroblasten, Glia- und Muskelzellen, welche die späteren Patch-clamp-Experimente beeinträchtigen könnten zu minimieren. Danach erfolgte der Medienwechsel bis zur weiteren Verwendung der Zellen alle 2-3 Tage.

4.2.1.2.2 Neonatale C56/BL6N Mäuse

Da die Hirschsprung Erkrankung hauptsächlich bei Neugeborenen auftritt, wurden die zeitlebens persistierenden Progenitorzellen aus dem Darm von neonatalen C56/BL6N Mäusen (P 0-1) isoliert und kultiviert. Nach erfolgter elektrophysiologischer Untersuchung sollten direkte Vergleiche zwischen den kultivierten PDCs und der enterischen neuronalen Primärkultur adulter C57/BL6N Mäuse angestellt werden. Die

Präparation und Kultivierung der neonatalen Tiere erfolgte zum Teil durch den Projektpartner *Anatomisches Institut Tübingen*. Das Protokoll wurde von Metzger *et al.*, 2007 entwickelt und für das vorliegende Kooperationsprojekt adaptiert und modifiziert. Um eine optimale Zellqualität zu gewährleisten und Beeinträchtigungen z.B. durch den Transfer der Zellen an das *NMI* auszuschließen wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Progenitorzellen aus neonatalen Tieren (P 0-1) am *NMI* isoliert und kultiviert. Eventuelle Optimierungen hinsichtlich Transfer und Kultivierung der Zellen wurden an den Projektpartner weitergeleitet und berücksichtigt. Das Geschlecht der Tiere ist zu diesem Entwicklungsstadium noch nicht zu erkennen, sodass in diesem Versuchsansatz sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet wurden.

Isolierung enterischer Progenitorzellen

Nach Dekapitation der Neonaten wurde der Dick- und Dünndarm in steriles HBSS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , 1 % P/S) überführt und mittels sehr feinem Präparationsbesteck unter dem Binocular von Blutgefäßen und Mesenterialansätzen befreit. Die präparierten LMMPs wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und enzymatisch mit Kollagenase II (750 U/ml) und Dispase II (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$), beides gelöst in HBSS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}), bei 37 °C im Wasserbad verdaut. Nach 10 min wurde 0,05 % DNase I hinzugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) abgestoppt. Im Anschluss erfolgten mehrere Waschschriffe mit HBSS (nominell ohne Ca^{2+} -und Mg^{2+} , 1 % P/S), DMEM Ham's F-12 und anschließender Aufnahme des Zellpellets in Proliferationsmedium.

Kultivierung enterischer Progenitorzellen

Für die Proliferation der Progenitorzellen wurden $12,5 \times 10^4$ Zellen/ml in einer Kulturschale ausgesät und bis zum Transfer in die Differenzierungsphase täglich frisch mit den Wachstumsfaktoren EGF (20 ng/ml) und FGF (20 ng/ml) versetzt. An DIV 0 wurden die Zellen zusätzlich mit B27 (1:50) behandelt. Das Kulturmedium (Proliferationsmedium) wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Durch sanftes Triturieren der teils adhärenenten Enterosphären konnten diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit DMEM Ham's F-12 gewaschen werden. Das aus Enterosphären bestehende Pellet wurde in Differenzierungsmedium trituriert und die darin befindlichen Enterosphären unter dem Binocular mittels Pipette auf bereits

mit Kollagen Typ I (isoliert aus dem Rattenschwanz) beschichteten Deckgläsern aus Glas überführt werden. Nach ca. 6 Stunden waren die Sphären adhärent und die Tropfenkultur konnte mit Differenzierungsmedium und GDNF aufgefüllt werden. Bis zur weiteren Verwendung der Zellen fand alle 2-3 Tage ein halber Medienwechsel statt. Wie bei den anderen Zellen wurde auch hier ab DIV 4 20 μ M Ara-C zur Hemmung des Fibroblasten-Wachstums zugegeben.

4.2.2 Histologie

Verschiedene Zelltypen und Zellbestandteile innerhalb einer primären Zellkultur können mittels spezifischer fluoreszierender Antikörper (AK) oder durch Umbauprodukte spezifischer Enzymreaktionen nachgewiesen und detektiert werden.

4.2.2.1 Immunfluoreszenz-Färbungen der Meerschweinchen Ganglienkultur

Die zu färbenden Zellkulturen wurden 15 min in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und im Anschluss mehrmals mit PBS gewaschen. Um die Membran der Zellen für die AKs zugänglich zu machen, erfolgte eine Permeabilisierung der Membran durch Inkubation der fixierten Zellen in 0,1 % Triton-X 100, welches nach 5 min mit 0,1 M Phosphatpuffer (PB) wieder ausgewaschen wurde. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen 30 min mit Blocking Reagenz behandelt. Danach konnte der primär Antikörper, entsprechend seiner jeweiligen Konzentration in Blocking Reagenz verdünnt, auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert werden.

Nachdem der primär Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBS bei Raumtemperatur (RT) ausgewaschen wurde, konnte der spezifische sekundäre AK, zuvor entsprechend in Blocking Reagenz verdünnt, auf die Zellen gegeben werden. Die folgenden lichtempfindlichen Reaktionen erfolgten alle im Dunkeln. Die Inkubation der Zellen mit dem spezifischen sekundären Antikörper erfolgte 1 h bei 37 °C. Zuletzt wurden die Zellen mehrmals mit PBS bei RT gewaschen und die Zellkerne durch eine 5-minütige Inkubation mit 200 ng/ml 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt, einem Farbstoff, der in die DNA interkaliert. Nach einem letzten Waschschrift in PBS und H₂O konnten die zellbesiedelten Deckgläser mit Fluoreszenz Eindeckmedium eingebettet und bei den AK-spezifischen Wellenlängen mikroskopisch ausgewertet werden.

Die Färbungen mit den sekundär Antikörpern NeuN (neuronal specific nucleus protein) und GFAP (glial fibrillary acidic protein) unter der Verwendung der primär Antikörper Cy2 (goat anti-mouse IgG) und Cy3, erfolgten wie beschrieben. Bei der Verwendung des sekundären Antikörpers SMI31 war darauf zu achten, dass das PBS und der 0,1 M PB durch 0,9 % NaCl ersetzt wurde. SMI 31 bindet an ein phosphoryliertes Neurofilament-Epitop, daher sollte in den verwendeten Wasch- und Verdünnungspuffern kein Phosphat enthalten sein, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

4.2.2.2 Immunfluoreszenz-Färbungen bei C56/BL6N Mäusen

Die immunhistochemischen Färbungen der Mauskulturen erfolgte größtenteils durch den Projektpartner *Anatomisches Institut Tübingen*. Hierzu wurden die Zellen, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, kultiviert und fixiert und anschließend dem Projektpartner übermittelt.

Bei selbst durchgeführten Färbungen der Mauskulturen wurde das Protokoll der Meerschweinchen Fluoreszenz-Färbung modifiziert angewendet. Der Unterschied war hier, dass die Waschschrte in PBS/Tween20 anstatt in PBS und das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation bei RT mit Ziegenserum (normal goat-serum, NGS), Bovinem Serumalbumin (BSA) und PBS durchgeführt wurde. Die Antikörper wurden entsprechend in BSA/PBS verdünnt und auf die Zellen gegeben.

4.2.2.3 Biocytinfärbung gepatchter adulter muriner enterischer Neurone und PDCs

Biocytin gehört zu den Carbonsäureamiden und wird in der Histologie als neuronaler Tracer verwendet, mit ihm ist es möglich, die weit und fein verzweigten Ausläufer von Zellen sichtbar zu machen. Da Biocytin selbst kein Farbstoff ist, muss dieses nach erfolgter Injektion in die Zellen mittels Patch-clamp sichtbar gemacht werden.

Hierzu gibt es verschiedene Färbemethoden, die, je nach Möglichkeit der späteren Auswertung, mithilfe eines Mikroskops ausgewählt werden.

Das Markieren der Zellen mit Biocytin und die anschließende Fixierung erfolgten, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Anschließend wurden die Proben für die Finalisierung der Färbung zum Projektpartner *Anatomisches Institut Tübingen* transferiert.

Die Biocytin-markierten-Zellen konnten mithilfe eines hochsensitiven Färbekits detektiert werden. Das Kit basiert auf einer Verstärkung des Signals durch die hoch affine irreversible Bindung von Avidin an Biocytin. An das Avidin ist eine biotinylierte Meerrettich-Peroxidase (HRP = horseradish peroxidase) gebunden, welche Diaminobenzidin (DAB) oxidiert. Das DAB bildet so in der Zelle ein braunes, unlösliches und lichtunempfindliches Präzipitat, welches mittels Mikroskop detektiert werden kann. Durch die gezielte Injektion des Biocytin während der Patch-clamp-Methode ist es möglich, einzelne Zelle den jeweiligen Ergebnissen der Messungen zuzuordnen.

Das Befüllen der Zellen mit Biocytin (2 mg/ml) erfolgte bereits während der Patch-clamp-Messungen. Hierzu wurden die Intrazellulärlösungen (IZL) mit Biocytin versetzt. So konnte das Biocytin über die Zeit der Messungen, durch passiven Transport, in das Zellinnere gelangen. Ein stabiler Seal zwischen Patchpipette und Zelle für mindestens 15-20 min war für eine optimale Befüllung der Zellen Voraussetzung. Um ein Herausströmen der Intrazellulärlösung aus der Zelle nach Beendigung des Experimentes zu verhindern, wurde die Patchpipette sehr langsam von der Zelle fortbewegt, sodass eine „outside-out“-Konfiguration an der Pipette entstand und die Zelle sich wieder schloss. Die Lage der Zellen wurde dokumentiert, um sie später den Biocytinmarkierten-Zellen zuordnen zu können.

Die Zellen wurden, wie bei den Fluoreszenz-Färbungen, mit 4 % PFA fixiert und mit PBS gewaschen. Um das Biocytin sichtbar zu machen, waren auch hier eine Permeabilisierung der Zellmembran und Blocken unspezifischer Bindungsstellen notwendig. Hierzu wurden die Zellen für 30 min in Triton-X 100 und Ziegenserum (NGS, normal goat serum) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Als Nächstes erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem ABC-Färbekit (Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex) für 30 min bei RT. Nachdem das ABC-Kit mit PBS ausgewaschen wurde, wurden die Zellen unter ständiger visueller Kontrolle, solange mit DAB inkubiert, bis unter dem Mikroskop ein braunes Präzipitat zu erkennen war. Die enzymatische Reaktion wurde dann durch Zugabe von PBS abgestoppt. Obligatorisch wurde auch hier eine DAPI-Kernfärbung im Dunkeln durchgeführt. Nach Einbettung der Zellen in Fluoreszenz-Eindeckmedium, konnten diese unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

4.2.2.4 BrdU Proliferations Assay der PDCs

Um sicherzustellen, dass die später charakterisierten Zellen progenitor-abgeleitet sind und es sich nicht um bereits in der Zellkultur vorhandene Neurone und andere Zellen handelt, wurde vom Projektpartner *Anatomisches Institut Tübingen* ein BrdU-Proliferations-Assay durchgeführt. Hierzu wurden die murinen enterischen Vorläuferzellen an *DIV 1* mit 1 μ M BrdU (5-bromo-2-deoxyuridin) behandelt. Nach erfolgten Patch-clamp Experimenten und Fixierung der Zellen wurde das BrdU am *Anatomischen Institut der Uni Tübingen* immunhistochemisch prozessiert.

4.2.3 Elektrophysiologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Messungen im manuellen Patch-Clamp-Verfahren bei RT durchgeführt. Alle elektrophysiologischen Ableitungen fanden in der Ganzzell-Konfiguration statt. Zur Minimierung von Messartefakten wie z.B. Leckströmen wurden p/n Protokolle verwendet. So konnten die Stromantworten von den Leckströmen subtrahiert werden.

Verwendete Lösungen sind in Anhang B zu finden. Strom- und Spannungsprotokolle in Anhang D.

4.2.3.1 Anordnung des Messtandes

Der Patch-clamp-Messtand (Setup) setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Geräte zusammen. Hier soll der Grundaufbau eines solchen Messplatzes beschrieben werden. Hersteller und Geräteinformationen sind im Anhang A zu finden.

Um eine schwingungsfreie Messung gewährleisten zu können, wird ein aktiv schwingungsgedämpfter Tisch eingesetzt. Auf diesem befindet sich ein inverses Mikroskop mit entsprechendem Halter für die auf Deckgläser kultivierten Zellen. In diese Messkammer (Halter und Deckglas) kann die entsprechende Extrazellulärlösung (EZL) gefüllt werden. Außerdem befindet sich hier der Vorverstärker mit Pipettenhalter (mit chloriertem Silberdraht). Mithilfe eines Mikromanipulators kann die Patchpipette im Mikrometer Bereich exakt an der Zelle platziert werden. Der Vorverstärker gibt dann die analogen Signale weiter an den Hauptverstärker (EPC 8) welcher die Signale in digitale umwandelt und via Glasfaserkabel zum Computer weiter leitet. Die Signale können dann im Anschluss mittels der Software Patchmaster aufgezeichnet werden. Um eine Messung durchführen zu können, muss zuerst der Stromkreis zwischen Zelle und Messtand geschlossen werden. Hierzu wird eine Badelektrode (gesintertes Silber

und Silberchlorid) in die Badlösung gegeben. Für Substanzapplikationen über das Zellbad selbst wird eine Perfusion, die über Schwerkraft getragen ist, angeschlossen. Hierzu gibt es einen Zu- und Ablauf, der die Badlösung konstant mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min austauscht. Für schnellere Substanzapplikationen, direkt auf die Zelle, war ein 8-Kanal-Applikator vorhanden, der druckgesteuert in einem Manifold endet und Austauschzeiten der Substanzen von wenigen Millisekunden erreicht.

Alle Elemente wurden gründlich geerdet, um unerwünschten Störsignalen entgegenzuwirken.

Mithilfe des Programms Patchmaster können nicht nur alle relevanten Messparameter definiert und bestimmt werden, sondern auch auf die jeweilige Fragestellung angepasste Strom- und Spannungsprotokolle erstellt und ausgeführt werden (siehe Anhang D).

4.2.3.1.1 Versuchsaufbau

Vor Versuchsbeginn wurde die Osmolarität des Zellkulturmediums der kultivierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dementsprechend wurden die Osmolaritäten der Intrazellulärlösungen (IZL) und Extrazellulärlösungen (EZL) angepasst. Je nach Aufgabenstellung der jeweiligen Experimente wurden diese mit entsprechender Zusammensetzung angesetzt. Sollten die Zellen zusätzlich zu den elektrophysiologischen Messungen mit Biocytin markiert werden, wurde die IZL mit 2 mg/ml Biocytin versetzt und mit einem 0,22 µm Spritzenfilter von ungelösten Biocytin-Teilen befreit.

Zur Patchpipetten-Herstellung aus 1,5 mm dicken Bleiglasrohlingen wurde ein Elektrodenziehgerät (P97, Sutter, USA) verwendet. Verwendete Pipetten hatten einen Pipettenwiderstand im Bereich von 1 – 6 MΩ.

Nach diesen Vorbereitungen wurden die kultivierten Glas-Deckgläschen in die Messkammer transferiert und für den Transport zum Messstand mit 500 µl Kulturmedium überschichtet. Für die gesamte Dauer der Experimente wurde eine konstante Badperfusion angelegt, welche die EZL mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min austauschte. Während die Zellen in der EZL für 5-10 min equilibrierten, wurden die Patchpipetten vorbereitet. Für eine optimale, luftblasenfreie Befüllung der Patchpipetten wurden diese zunächst per „tip-filling“ mit IZL befüllt. Die befüllten Glaspipetten wurden dann über die Messelektrode geschoben und luftdicht

abgeschlossen, sodass der sich daran befindende chlorierte Silberdraht ausreichend in die IZL ragte. Für optimale Messergebnisse musste dieser Silberdraht regelmäßig mit einer gesättigten KCl-Lösung nachchloriert werden. An der Patchpipette wurde ein Überdruck von ca. 80 mbar angelegt um ein Verstopfen der Patchpipettenöffnung beim Eintauchen in die Badlösung (EZL) zu verhindern und die Pipette anschließend in das Bad getaucht. Durch die vorher in der EZL platzierte Badelektrode war der Stromkreis geschlossen. Mittels des Programms Patchmaster wurde ein alternierender Test Puls von +5 mV für 5 ms angelegt, mit dessen Hilfe der Pipettenwiderstand errechnet werden konnte. Außerdem konnte der Pipetten-Offset abgeglichen werden, welcher durch die unterschiedlichen Ionenstärken von EZL und IZL zustande kommt. Mit dem Mikromanipulator konnte die Patchpipette vorsichtig an die zuvor „selektierte“ Zelle herangeführt werden. Vor dem Anpatchen der Zelle wurde das Offset-Potenzial erneut abgeglichen. Bei sichtbarer Erhöhung des Pipettenwiderstandes wurde der Überdruck abgeschaltet und durch leichten Unterdruck an die Zelle die Sealbildung zwischen Zellmembran und Pipette unterstützt. Bei Erreichen eines Seals über $1 \text{ M}\Omega$ wurde das Membranpotenzial in -10 mV Schritten auf -70 mV eingestellt, die Zelle befand sich nun im cell-attached-Modus. Nach Abgleichen der Pipettenkapazität C_{fast} und Anlegen kurzer, negativer Saugimpulse wurde die Ganzzell-Konfiguration hergestellt. Während der kompletten Messdauer wurde ein konstanter Unterdruck von -10 mbar an der Pipette angelegt, um die Verbindung zwischen Zelle und Pipette möglichst konstant zu halten. Bevor nun die Messprotokolle ausgeführt werden konnten, musste zuerst die Membrankapazität C_{mem} , sowie der Serienwiderstand R_s der Zelle abgeglichen werden.

Je nach Fragestellung konnten dann entsprechende Strom- und Spannungsprotokolle zur Aktivierung- und Inaktivierung verschiedener Ionenkanäle gestartet werden (siehe Anhang D). Die jeweiligen Stromantworten der Zelle wurden mithilfe des Programms Patchmaster aufgezeichnet und gespeichert. Die interne Bessel Filter filterte bei 2,9 kHz, die Abtastrate betrug bei jeder Messung 50 kHz.

4.2.3.1.2 Messkriterien für auswertbare Zellen

Um die erhobenen Daten der verschiedenen Zellen vergleichbar zu machen, mussten alle Zellen, welche in die Auswertung eingehen sollten, bestimmte Kriterien erfüllen.

Tabelle 1: Übersicht der Messkriterien zur Auswahl der Zellen, welche in die Auswertung einbezogen werden sollten.

Kriterium	Grenzwert
Sealwiderstand	$\geq 1 \text{ G}\Omega$
Serienwiderstand (R_s)	$\leq 15 \text{ M}\Omega$
Serienwiderstandkompensation	$\geq 80 \%$
Leckstrom	$\leq 150 \text{ pA}$
Klemmfehler	$\leq 30 \% I_{\text{Kontroll}}$
Offsetpotential	$\leq 5 \text{ mV}$

4.2.4 Auswertung der Patch-clamp Experimente

Nachdem alle Zellen, die den Messkriterien entsprachen, ausgewählt wurden, konnten diese mit Hilfe des Programms IgorPro 6.34A, selbst geschriebenen Makros und PAT (Patcher's Power Tools) analysiert werden.

4.2.4.1 Analyse von Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken der Natriumkanäle

Für die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken der Natriumkanäle aller untersuchten Zellen wurden die Natriumströme in die jeweilige Leitfähigkeit (G) umgerechnet (1):

$$(1) \quad G = \frac{I_{Na}}{V - V_{Na}}$$

Wobei I_{Na} der Natriumstrom, V die applizierte Spannung und V_{Na} das Umkehrpotential der Natrium-Ionen (entsprechend Nernst) ist.

Die daraus resultierenden Kurven für die Aktivierung und Inaktivierung wurden mit Hilfe einer nicht-linearen Regression auf Basis der Boltzmann Funktion (2) beschrieben:

$$(2) \quad f = \frac{1}{1 + \varepsilon - \frac{V - V_{\text{half}}}{k}}, \quad f = \frac{1}{1 + \varepsilon + \frac{V - V_{\text{half}}}{k}}$$

V steht für das Membranpotenzial, V_{half} ist das Potenzial, bei dem die Boltzmann Funktion den Wert 0,5 annimmt und k ist die Steigung.

Daten, welche mit „±“ markiert sind, stellen die mittlere Standardabweichung dar (SEM, standard error of the mean).

4.2.4.2 Analyse der Aktionspotenziale

Um das Membranpotenzial, an welchem die maximale Anzahl an Natriumkanälen geöffnet ist, zu bestimmen, wurde die Funktion der Aktionspotenziale mit deren ersten Ableitung gleichgesetzt. Die Nullstellenbestimmung beider Kurven soll das Membranpotenzial darstellen, welches überschritten werden muss, um ein natriumgetragenes Aktionspotenzial auslösen zu können.

Die Schnittpunktbestimmung erfolgte gemäß der Differenzialgleichung (3 und 4):

$$(3) \quad f(x) = f'(x)$$

$$(4) \quad f(x) - f'(x) = 0$$

4.2.4.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde zunächst der Wilcoxon-Rang-Test herangezogen, welcher ein parameterfreier statistischer Test ist. Mithilfe der Nullhypothese überprüft dieser, ob zwei unabhängige Datengruppen zu einer gleichen Grundgesamtheit gehören. Wird die Nullhypothese erfüllt, sind die analysierten Datengruppen nicht verschieden zueinander ($p > 0,05$).

Sollten mehr als zwei verschiedene Grundgesamtheiten k miteinander verglichen werden, wurde der Kruskal-Wallis-Test zur statistischen Auswertung herangezogen. Unter Verwendung der Nullhypothese soll unter k Stichproben eine Grundgesamtheit ermittelt werden. Wird die Nullhypothese nicht erfüllt, so sind die Daten zueinander verschieden ($p < 0,05$).

5 Ergebnisse

Da es keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede zwischen enterischen Gliazellen und enterischen Neuronen in einer Kultur gibt, ist es wichtig, die Zellen elektrophysiologisch zu bestimmen (Broussard *et al.*, 1993). Aus diesem Grund wurde zunächst, zum besseren Verständnis und der Etablierung der Isolierung und elektrophysiologischen Charakterisierung enterischer Ganglien bzw. Neurone, der Modellorganismus Meerschweinchen herangezogen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das System dann auf das murine C56/BL6N Modell, sowohl auf adulte als auch progenitor-abgeleitete Zellen (PDCs) aus neonatalen Tieren, übertragen, um speziesspezifische Unterschiede innerhalb des Verbundprojektes bzw. der Datenerhebung der anderen Projektpartner zu vermeiden. Es wurden zwei Zelltypen von progenitor-abgeleiteten Zellen detektiert und untersucht. Zum besseren Verständnis werden die PDCs in der vorliegenden Arbeit in Typ I und Typ II Zellen unterteilt.

5.1 Meerschweinchen

Das Meerschweinchen ist, neben der Ratte, das am besten untersuchte Modell des enterischen Nervensystems im Darm. Deshalb wurde zur Etablierung der Isolierung und Kultivierung enterischer Neurone am *NMI* zunächst der Modellorganismus Meerschweinchen gewählt.

Es eignet sich hervorragend, um sich mit dem enterischen Nervensystem vertraut zu machen, um dieses später auf den Modellorganismus Maus übertragen zu können.

Da das Meerschweinchen-Modell lediglich zum besseren Verständnis dienen sollte, wurden die Schaltkinetiken der Natrium- und Kaliumkanäle, sowie die gemessenen Aktionspotenziale nicht genauer untersucht. Elektrophysiologische Messungen sollten lediglich als Verifikation einer erfolgreichen Isolierung und Kultivierung funktionaler enterischer Ganglien dienen. Hierzu war der Nachweis des Vorhandenseins von Natriumkanälen bzw. natriumgetragenen Aktionspotenzialen ausreichend.

5.1.1 Kultivierung und Immunhistochemie von Meerschweinchen Ganglien

Bei der Kultivierung enterischer Neurone aus Meerschweinchen wurden komplette Ganglien (Abb. 9 A) aus dem myenterischen Plexus des Darms isoliert und direkt in Meerschweinchen Kultivierungsmedium (siehe Anhang B) überführt. Dieses enthielt

bereits den murinen Nervenwachstumsfaktor mNGF 7S, welcher das Überleben der Neurone in Kultur fördert. Bereits nach wenigen Stunden waren die isolierten Ganglien adhärent (Abb. 9 B). Abbildung 9 C zeigt ein solch adhärentes Ganglion, markiert mit dem Antikörper NeuN. Dieser ist neuronenspezifisch und zeigt durch spezifische Bindung an das Protein NeuN eine Färbung des Nukleus und eine leichte Färbung des Zytoplasmas. Wie bereits 1982 von Jessen *et al.*, beschrieben, migrierten die enterischen Gliazellen und Neurone aus dem Ganglienverband heraus und lösten so die Ganglienstruktur auf. Neurone wiesen hierbei eine lichtbrechende Oberfläche unter dem Mikroskop auf. Durch diese Migration entstand bereits nach wenigen Tagen in Kultur ein fein verzweigtes Netzwerk aus neuronalen Strukturen (Abb. 9 E und F). Diese Migration und das Ausbilden fein verzweigter Strukturen zwischen den Zellen konnte erfolgreich in einer 15-tägigen Time-lapse Aufnahme gezeigt werden (siehe Anhang E). Diese Verzweigungen, welche Voraussetzung für eine optimale Netzwerkaktivität sind, stellen jedoch ein großes Problem für elektrophysiologische Messungen dar. Durch diese langen neuronalen Ausläufer und Verzweigungen ist es sehr schwer die Zellen während der Patch-clamp Messungen optimal unter Kontrolle zu halten, sodass es zu gehäuften Space-clamp Artefakten kommt (siehe Abb. 10 B). Resultat dieser Artefakte sind Änderungen des kinetischen Schaltverhaltens von Ionenkanälen so wie Änderungen der Amplitudengrößen durch die Tatsache, dass ein Teil des Stromes über die langen Ausläufer der Zelle verloren geht. Die Abbildungen 9 E und F zeigen diese neuronalen Verbindungen, welche mehrere Hundert Mikrometer Länge erreichten, immunhistochemisch sichtbar gemacht mit dem Antikörper SMI 31. Der Antikörper SMI 31 bindet an ein phosphoryliertes Neurofilament-Epitop und macht so das verzweigte neuronale Netzwerk sichtbar.

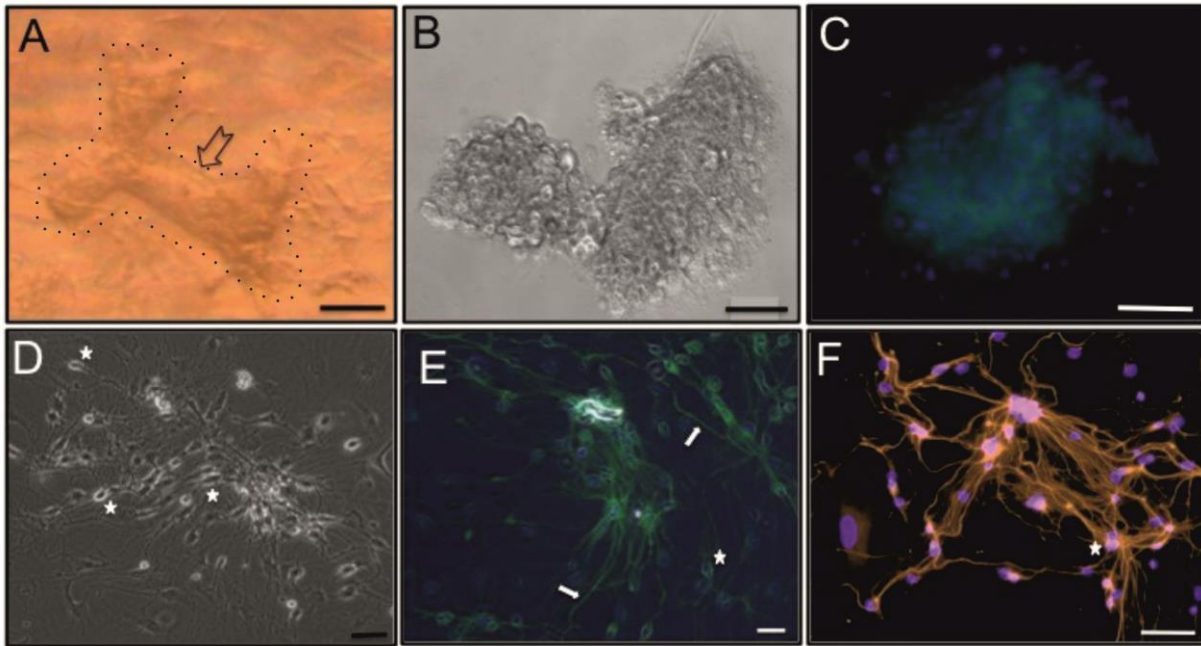


Abbildung 9: Übersicht frisch präparierter, kultivierter und immunhistochemisch markierter Meerschweinchen Ganglien in Kultur.

Abbildung **A** zeigt ein enterisches Ganglion (gepunktete Linie) direkt nach Isolierung im Präparationsmedium (*DIV* 0). Nach 4 Stunden in Kultur fangen die Ganglien an zu adhären (**B**). **C** zeigt ein Ganglion an *DIV* 1, gefärbt mit dem Antikörper NeuN (grün) sodass die neuronalen Strukturen innerhalb eines Ganglions sichtbar sind, die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI markiert. Lichtbrechende Neurone an *DIV* 8 sind in Abbildung **D** mit einem Stern markiert. Die Abbildungen **E** und **F** zeigen eine Ganglienkultur an *DIV* 13 und 16, jeweils immunhistochemisch markiert mit dem Antikörper SMI 31 (grün, orange). Die langen neuronalen Ausläufer wurden mit einem Pfeil markiert. Die Zellkerne (blau) wurden ebenfalls mit DAPI angefärbt (Stern). In Bild **F** entspricht der Maßstabsbalken 100 µm, in allen anderen Bildern 50 µm.

5.1.2 Elektrophysiologische Messungen vollständig isolierter und kultivierter Meerschweinchen Ganglien

Da es nicht ausreichend ist das kultivierte Zellen morphologisch neuronale Charakteristika aufweisen, sondern ihr Ionenkanalbesatz essenziell für die Funktionalität eines Neurons ist, wurden die kultivierten enterischen Ganglien auf das Vorhandensein von Natriumkanälen bzw. natriumgetragenen Aktionspotenzialen untersucht. Dies sollte als Nachweis der erfolgreichen Etablierung der Isolierung und Kultivierung enterischer Neurone am *NMI* gelten. Zur Aktivierung von Natriumkanälen wurde das Spannungsprotokoll im Anhang D Abb. 39 verwendet. Dieses Protokoll wurde auch bei allen später untersuchten Zelltypen verwendet, um eine Konsistenz

innerhalb der untersuchten Natriumantworten zu erzielen. Durch das Vorhandensein stark ausgeprägter neuronaler Verzweigungen konnten die Zellen zum Teil nicht optimal gemessen werden, da es zu unterschiedlich ausgeprägten Space-clamp Artefakten während der elektrophysiologischen Ableitungen kam (Abb. 10 B).

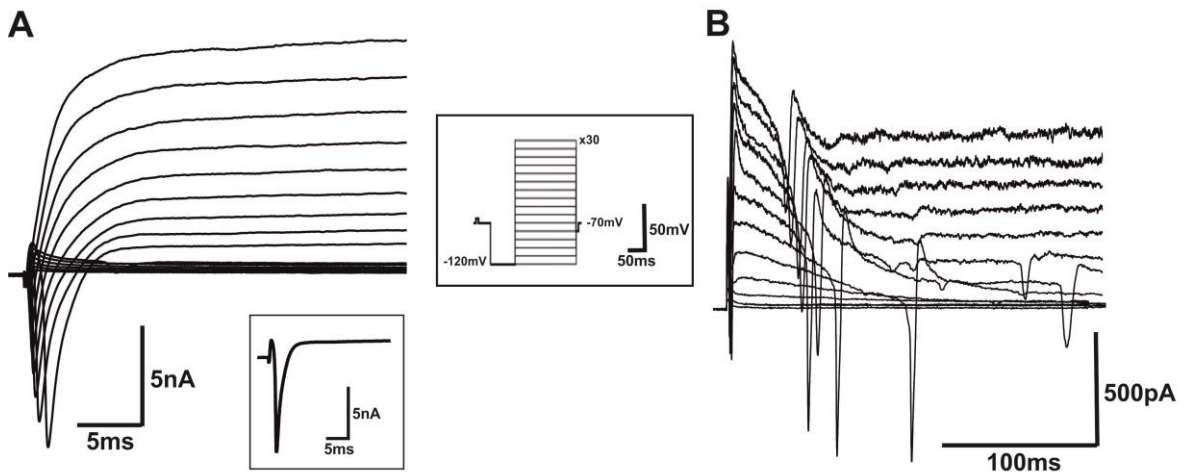


Abbildung 10: Natriumstromantworten enterischer Neurone aus Meerschweinchen auf Spannungsprotokoll zur Natriumaktivierung.

A zeigt ausgewählte, übereinander gelagerte Stromantworten eines enterischen Neurons auf die Spannungspulse der Natriumaktivierung (Einschaltbild Mitte), gemessen an *DIV* 28. Die auswärtsgerichteten Ströme zeigen die Gesamtheit der spannungsabhängigen Kationenkanäle. Der große, leicht zeitverzögerte Einwärtsstrom basiert auf der Tatsache, dass die Zellen sehr schwer zu klemmen sind und es häufig zu Space-clamp Artefakten kommt. Die maximale Stromantwort wurde bei einer Depolarisierung auf -50 mV gemessen und betrug -9 nA, woraus sich bei dieser Zelle eine Stromdichte von 460 pA/pF ergab. Das Einschaltbild unten zeigt die Stromantwort der Zelle auf eine Depolarisierung auf -50 mV. In **Abbildung B** ist die Stromantwort einer Zelle an *DIV* 14 auf dasselbe Spannungsprotokoll zu sehen. Die erheblichen Space-clamp Artefakte machten eine sinnvolle Auswertung dieser Zelle unmöglich. Dargestellt sind nur ausgewählte Stromspuren.

Ausgehend von einem vorgegebenen Ruhehaltepotenzial von -70 mV wurden die Zellen für 100 ms bei -120 mV hyperpolarisiert bevor 250 ms lang anhaltende Hyper-, - und Depolarisierungen folgten (Einschaltbild Mitte). Diese Hyper- und Depolarisierungspulse wurden 16 Mal wiederholt, wobei zwischen jedem Intervall 5 s lagen und der Depolarisierungspuls um +10 mV erhöht wurde, bis dieser beim letzten Puls einen Wert von +30 mV annahm. Nach jeder erfolgten Depolarisation erfolgte ein Rücksprung zum Ausgangsmembranpotenzial von -70 mV.

5.1.3 Natriumgetragene Aktionspotenziale

Durch Änderungen des Membranpotenzials wird das dynamische Schaltverhalten von spannungsgesteuerten Ionenkanälen beeinflusst und führt bei Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes zur Generierung eines Aktionspotenzials. Dies ermöglicht eine exakte Modellierung der neuronalen Netzwerkaktivität.

In der vorliegenden Arbeit wurden Aktionspotenziale untersucht, welche durch die Aktivierung von Natriumkanälen hervorgerufen werden.

Die Messung solcher Potenzialänderungen fand im Current-clamp Modus statt. Bei diesen Messungen wurden die Zellen zunächst auf ein Ruhehaltepotenzial von -70 mV eingestellt und anschließend verschiedene hyper- und depolarisierende Strompulse mit einer Länge von 500 ms appliziert. Zwischen den einzelnen Pulsen wurde die Zelle für 500 ms beim Ruhehaltepotenzial gehalten.

Abbildung 11 zeigt 2 verschiedene Aktionspotenzialmuster auf dasselbe Strompulsprotokoll. Das Verhältnis von tonisch zu phasisch feuernenden Neuronen lag bei den gemessenen Zellen bei 1 : 4.

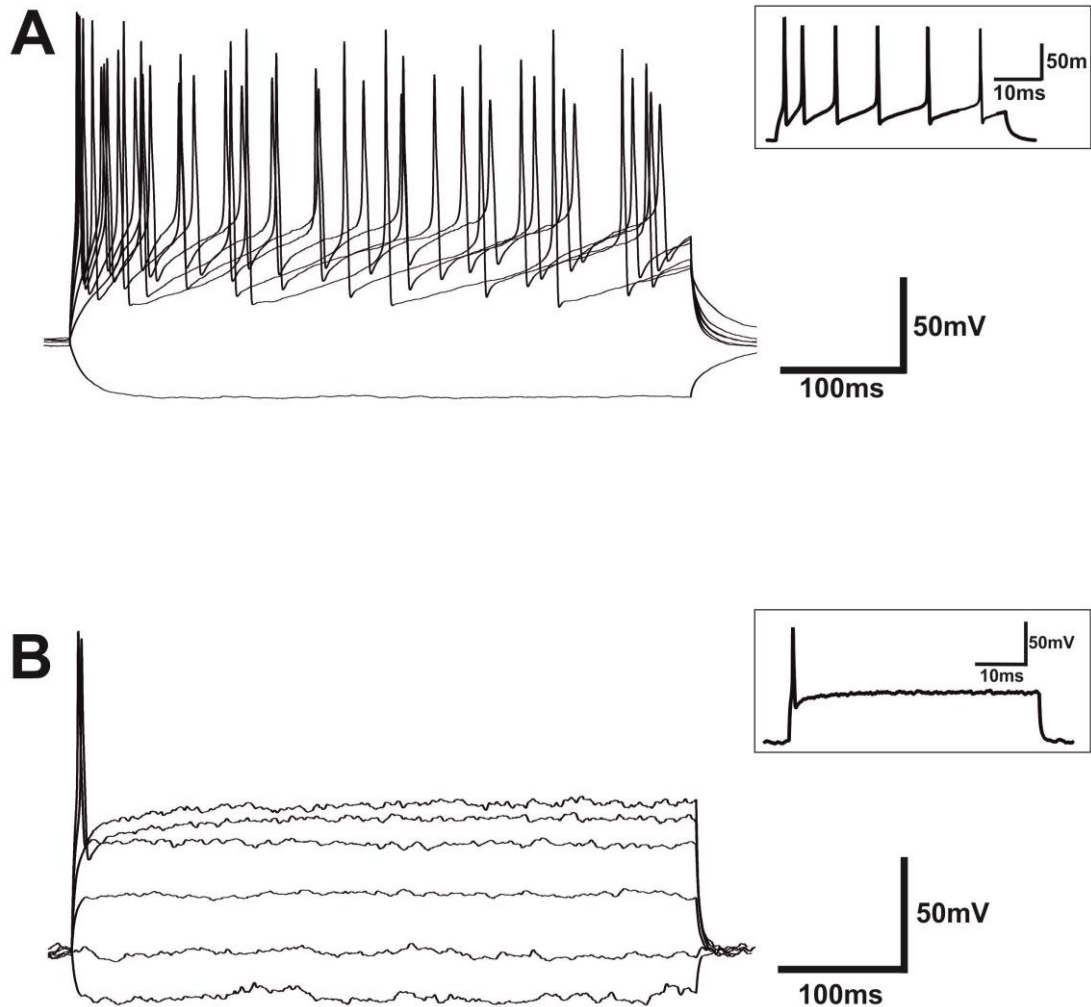


Abbildung 11: Zwei verschiedene Aktionspotenzialmuster enterischer Ganglien des Meerschweinchens an DIV 14, hervorgerufen durch dieselben hyper- und depolarisierenden Strompulse im Current-clamp Modus.

Abbildung A zeigt die Potenzialantwort eines enterischen Neurons auf hyper- und depolarisierende Strompulse. Über die gesamte Länge des Pulses feuert dieses Neuron tonisch Aktionspotenziale. Das Neuron in Abbildung B reagiert auf dieselben depolarisierenden Strompulse mit der Ausbildung eines einzigen Aktionspotenzials zu Beginn des Pulses.

In den Einschaltbildern ist die Potenzialänderung durch einen Strompuls von 200 pA dargestellt. Das Verhältnis von tonischen zu phasischen Aktionspotenzialmustern lag bei 1 : 4.

5.2 Adulte C56/BL6N Mäuse

Nach erfolgreicher Etablierung des Meerschweinchens Modells am *NMI* und Reproduzierbarkeit bereits in der Literatur beschriebener Daten, wurden die

gesammelten Informationen auf das C56/BL6N Mausmodell übertragen. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um ein Kooperationsprojekt handelte, sollten alle beteiligten Projektgruppen mit demselben Tiermodell arbeiten, um so speziesspezifische Unterschiede in der Datenerhebung- und Auswertung zu vermeiden. Dies ermöglichte eine optimale Interpretation der Resultate.

5.2.1 Kultivierung und Immunhistochemie adulter C56/BL6N Mäuse

Aufgrund der anatomischen Unterschiede konnte die Isolierung der enterischen Ganglien aus Meerschweinchen nicht 1 : 1 auf das Mausmodell übertragen werden. Deshalb musste die Isolierung und Kultivierung entsprechend adaptiert und auf das Mausmodell angepasst werden. Nachdem dies etabliert war, wurden im Gegensatz zum Meerschweinchen bei den C56/BL6N Mäusen keine kompletten Ganglien isoliert und kultiviert sondern ein Gemisch aus verschiedenen Einzelzellen des longitudinalen myenterischen Plexus mit dem Wachstumsfaktor GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor) in Kultur genommen. Abbildung 12 A und B zeigen eine solche Einzelzellkultur an *DIV* 2 und *DIV* 10, immunhistochemisch markiert mit dem Antikörper NeuN welcher bereits enterische Neurone aus dem Meerschweinchen erfolgreich sichtbar gemacht hatte. Diese Zellen benötigten etwas mehr Zeit zur Adhärenz als die kultivierten Meerschweinchen Ganglien und waren erst an *DIV* 2 vollständig adhären. Nach ungefähr einer Woche bildeten diese Zellen ebenfalls ein großes Netzwerk aus Neuriten aus, worin sich die Neurone in kleinen Zellgruppen zusammenfanden (Abb. 12 B). Im Bild D der Abbildung 12 sind deutlich die sehr langen Ausläufer der Neurone zu erkennen, markiert mit dem Antikörper SMI 31, an *DIV* 16. Es ist bekannt, dass der neuronale Nervenwachstumsfaktor NGF einen positiven Einfluss auf das Überleben neuronaler Zellen ausübt (Huang und Reichardt, 2001). NGF fördert das Auswachsen von Neuriten und Axonen sowie die neuronale Proliferation und Differenzierung, unter anderem durch Interaktion mit einer transmembranen Tyrosinkinase (Freeman *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2001; Wiesmann *et al.*, 1999). Ausserdem fördert er periphere Nervenregeneration (Sun *et al.*, 2009). 50% der Kulturen wurden deshalb zusätzlich zum GDNF mit 10 ng/ml NGF versetzt. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Kulturen konnte nicht beobachtet werden. Kulturen, die mit NGF behandelt wurden, konnten weder stabiler gemessen werden, noch wiesen sie eine höhere Vitalität auf. Des Weiteren ergaben sich auch keine

Unterschiede in ihrem Wachstum und elektrophysiologischen Charakter (Daten nicht gezeigt).

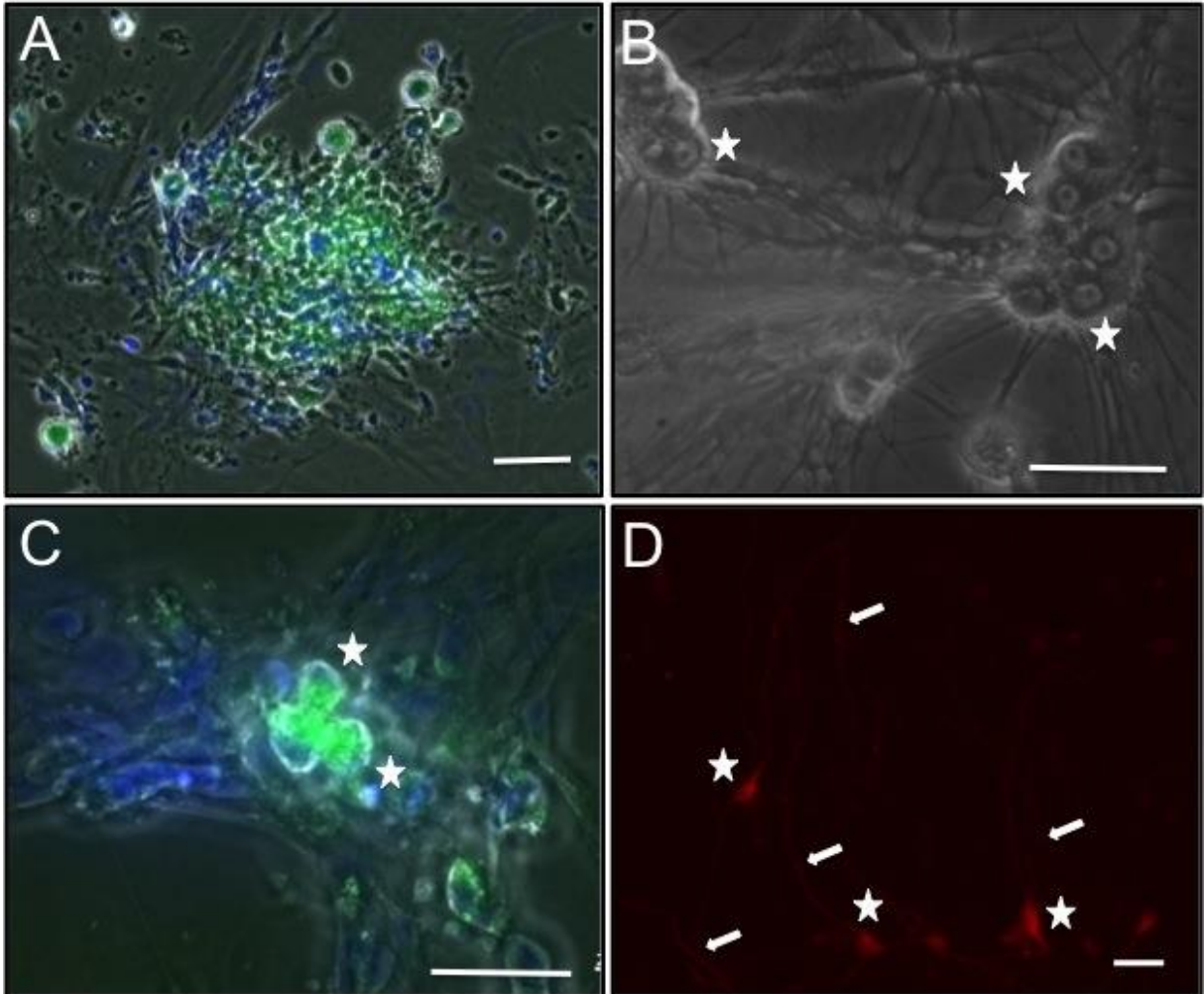


Abbildung 12: Übersicht kultivierter adulter muriner Einzelzellen des longitudinalen myenterischen Plexus des Darms an DIV 2; 10 und 16.

Abbildung **A** zeigt die immunhistochemische Markierung kultivierter Einzelzellen aus adulten Mäusen an *DIV* 2, NeuN (grün); Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). In **B** sind neuronale Zellgruppen (Stern) und deren neuronale Ausläufer an *DIV* 10 dargestellt. **C** zeigt eine solche neuronale Zellgruppe an *DIV* 10, immunhistochemisch sichtbar gemacht mit NeuN (grün); Zellkerne (blau) sind mit DAPI angefärbt. In Abbildung **D** ist eine Einfachfärbung mit TuJ1 einer Einzelzellkultur an *DIV* 16 gezeigt. Der Stern markiert Zellsomata, die Pfeile axonale Strukturen.

Die Maßstabsbalken aller Bilder entsprechen 50 µm.

5.2.1.1 Biocytinfärbungen

Um eine bessere Aussage über die Morphologie der elektrophysiologisch gemessenen Zellen und deren neuronaler Ausläufer treffen zu können, wurden die Zellen während der Messung mit Biocytin gefüllt. Biocytin kann nach der Messung und Fixierung der Zellen immunhistochemisch sichtbar gemacht werden. Verschiedene Aufnahmen zeigten, dass die kultivierten, adulten C56/BL6N Neurone *in vitro*, Ausläufer von mehreren Hundert Mikrometern ausbildeten (Abb. 13 Bc). Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Zellen versuchen ein Netzwerk und Verbindungen zu Nachbarzellen auszubilden. In den Kulturen konnten sowohl Neurone mit einem, als auch mehreren efferenten Nervenzellfortsätzen detektiert werden, was ein Hinweis auf das Vorhandensein verschiedener Neuronen Populationen ist. So sind beispielsweise AH-Neurone immer multiaxonale Neurone (Dogiel Typ II) und S-Neurone uniaxonale (Dogiel Typ I). Dies konnte durch die elektrophysiologische Evaluation dieser Zellen bestätigt werden. Abbildung 13 A zeigt ein AH-Neuron mit mehreren Nervenzellfortsätzen, dessen erste Differenzialgleichung eine Kalzium-Flexion zeigte, wohingegen dem Neuron in Abb. 13 B, mit nur einem efferenten Nervenzellfortsatz, diese Flexion fehlte.

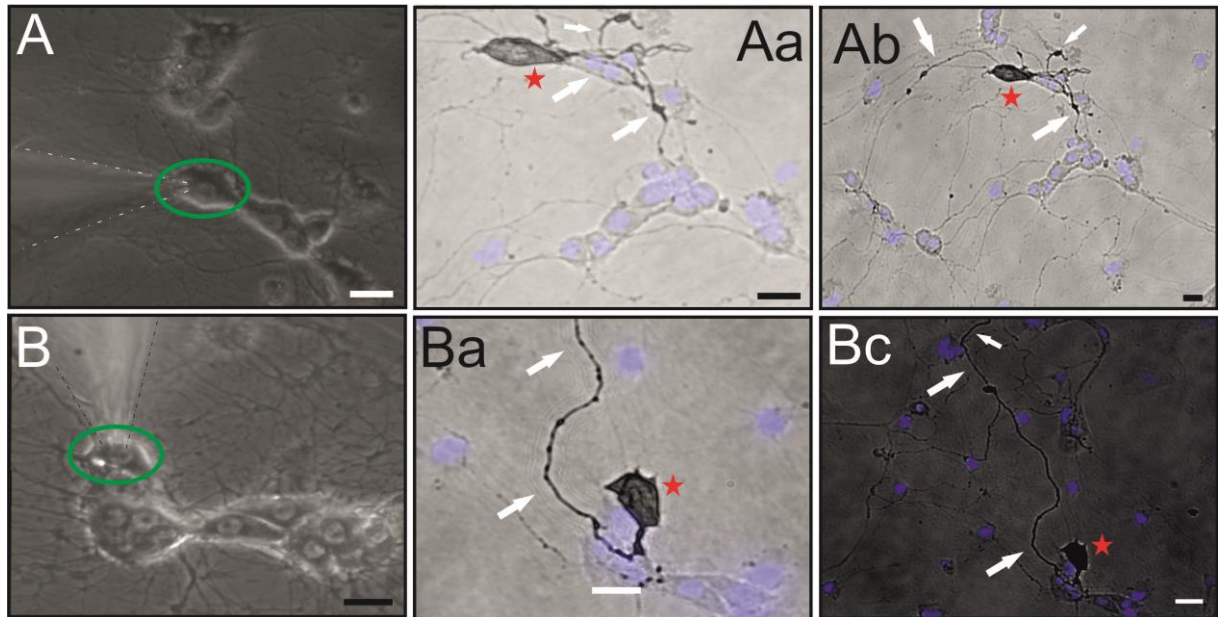


Abbildung 13: Adulte S- und AH-Neurone, die während der elektrophysiologischen Messung mit Biocytin gefüllt wurden.

Die Abbildungen **A** und **B** zeigen jeweils die Phasenkontrast Aufnahme eines AH-Neurons (**A**) und eines S-Neurons (**B**) an *DIV* 20 während der Patch-clamp Messung. Die Patchpipette ist gestrichelt dargestellt. Die grüne Ellipse markiert die gemessene und mit Biocytin gefüllte Zelle. In den Abbildungen **Aa**, **Ab**, **Ba** und **Bc** sind die Zellen jeweils mit einem roten Stern markiert, die Pfeile zeigen die efferenten Nervenzellfortsätze der Zelle an. Blau sind die Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. Alle Maßstabsbalken entsprechen 20 µm.

5.2.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Natriumkanäle

Spannungsaktivierte Natriumkanäle sind wichtige Kriterien für die Zuordnung von Zellen zu Neuronen, denn die Natriumkanäle sind essenziell für ein funktionierendes Nervensystem bzw. dessen Netzwerkaktivität. Ohne funktional aufeinander abgestimmte Schaltkinetiken der Natriumkanäle können keine natriumgetragenen Aktionspotenziale generiert und somit keine Zellkommunikation stattfinden. Deshalb lag in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf den Natriumkanälen.

Im folgenden Kapitel werden die spannungsabhängigen und pharmakologischen Eigenschaften von Natriumkanälen in kultivierten Einzelzellen des longitudinalen myenterischen Plexus aus adulten C56/BL6N Mäusen analysiert. Die in Kapitel 4.2.3.1.2 aufgestellten Messparameter wurden für jede gemessene Zelle berücksichtigt. Zellen, die während oder nach einer Messung nicht mehr diesen Standard-Parametern entsprachen, oder Zellen, bei denen der Kaliumstrom größer als

der Natriumstrom war, wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen. Da die adulten Zellen als direktes Referenzsystem für die progenitor-abgeleiteten Zellen (PDCs) dienen sollten, wurden sie, ebenfalls wie die PDCs, zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Differenzierung analysiert. Die ausgewerteten Zellen wurden in vier Gruppen zusammengefasst: 0-6; 7-13; 14-20 und 21-28 Tage in Kultur. Neben den spannungsabhängigen Schaltkinetiken der Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung zu diesen vier verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung wurden zunächst die Membrankapazitäten und Stromdichten analysiert.

Schließlich stellte sich noch die Frage nach dem pharmakologischen Verhalten der exprimierten Natriumkanäle auf die Behandlung mit Tetrodotoxin (TTX). TTX ist ein Nervengift welches selektiv spannungsgesteuerte Natriumkanäle blockiert.

Alle Patch-clamp Experimente wurden unter denselben Bedingungen und ohne Verwendung von Kationenkanalblockern durchgeführt, da eine vollständige Inhibition dieser Kanäle nicht gewährleistet war.

5.2.2.1 Stromdichte in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer

Da Zellen eine gewisse Zeit maturieren müssen, bis sie komplett funktionale spannungsaktivierte Natriumkanäle ausbilden (Biella *et al.*, 2007, Takazawa *et al.*, 2012), wurden die mittleren Membrankapazitäten und die mittleren Stromgrößen in Abhängigkeit ihrer Kultivierungsdauer ermittelt. Da die kapazitive Umladung der Zellmembran in linearem Zusammenhang mit der Zelloberfläche steht, können Rückschlüsse auf die Zellgröße und das Wachstum *in vitro* über einen bestimmten Zeitraum gezogen werden (Abb. 14 A). Ein direkter Zusammenhang zwischen Membranfläche und der sich in der Membran befindlichen Natriumkanäle kann mit der Normierung des Natriumstroms auf die jeweilige Membranfläche ermittelt werden. Durch die Berechnung der mittleren Stromdichte können unterschiedliche Zellen trotz verschiedener Größe miteinander in den direkten Vergleich gestellt werden, siehe Abbildung 14 B.

Der gemessene Natriumstrom der adulten C56BL/6N Zellen, bei einer Depolarisierung von -120 mV auf -20 mV, wurde auf die jeweilige Membrankapazität der gemessenen Zelle normiert und lässt so Rückschlüsse auf die Anzahl funktioneller Natriumkanäle in der Membran und eventueller Veränderungen über die Dauer der Differenzierung zu. Es ist zu erkennen, dass sich die mittlere Membrankapazität über die Dauer der

Kultivierung kaum ändert, ab 3 Wochen in Kultur jedoch etwas zunimmt (n=3). Statistische Auswertungen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungszeiten auf. Die mittlere Stromdichte ist innerhalb der ersten 6 Tage nach Isolierung höher und bleibt dann ab Tag 7 in Kultur ohne signifikante Änderungen konstant. Die abnehmende Stromdichte ab Kultivierungstag 7 lässt sich durch das Ausbilden sehr langer Neuriten innerhalb der ersten Tage in Kultur erklären (siehe Abb. 12 D). Die genauen Werte sind den Tabellen 23 und 24 im Anhang C zu entnehmen. Der mittlere Eingangswiderstand der Zellen betrug $495 \pm 41 \text{ M}\Omega$.

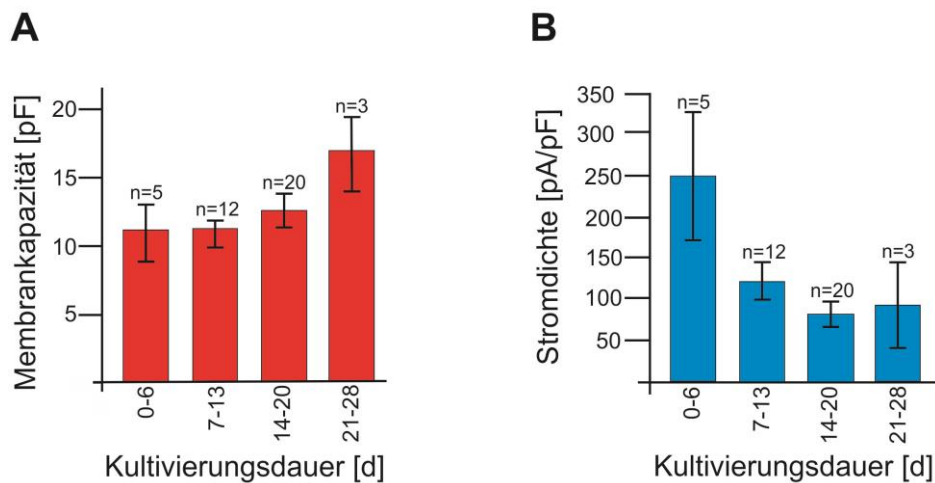


Abbildung 14: Membrankapazitäten und mittlere Stromdichten bei -20 mV in Bezug auf die Kultivierungsdauer.

A: Membrankapazitäten der in die Auswertung eingegangener Neurone in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. Innerhalb der einzelnen Kultivierungszeitfenster gibt es keine signifikanten Abweichungen bezüglich der Membrankapazität.

B zeigt die mittlere Stromdichte bei -20 mV über die Zeit der Kultivierung. Bei gemessenen Zellen innerhalb der ersten 6 Tage nach Kultivierung ist die mittlere Stromdichte höher als in den drauf folgenden Messungen, was sich durch Ausbildung extrem langer Neuriten im weiteren Verlauf der Kultivierung begründet. Innerhalb des Zeitfensters 7-28 Tage sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

5.2.2.2 Spannungsabhängige Schaltkinetik der Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung

Für ein dynamisches Netzwerkverhalten von Ionenkanalklassen ist ein angepasstes Schaltverhalten jedes beteiligten Ionenkanals von höchster Wichtigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Natriumkanäle, welche essenziell für die Ausbildung natriumgetragener Aktionspotenziale sind, untersucht und charakterisiert. Im Folgenden wird gezeigt, bei welchen Membranpotenzialen die Natriumkanäle der Einzelzellkultur aus adulten C56/6BLN Mäusen aktivieren bzw. bei welchen Spannungen die Kanäle in einen inaktiven Zustand übergehen. Für diese Untersuchung wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet (siehe Anhang D, Abb. 39 und 40). In den oberen Einschaltbildern der Abbildung 15 A und B sind diese Spannungsprotokolle dargestellt. Abbildung A zeigt eine Spitzenstromamplitude einer Zelle an *DIV* 4 von -6,4 nA bei einer Depolarisation auf -20 mV und eine mittlere Stromdichte von 180 pA/pF.

Abbildung 15 B zeigt im Einschaltbild oben das Spannungsprotokoll für die Natriuminaktivierung, bei welchem deutlich wird, dass hier der Depolarisierungspuls konstant bleibt und die Hyper- und Depolarisationen in einem Abstand von +10 mV variiert werden. Ausgehend von einem Ruhehaltepotenzial von -70 mV wird die Zelle zunächst hyperpolarisiert (300 ms). Auf diesen Puls folgt eine Depolarisierung auf -10 mV, welche bei jedem Durchlauf konstant blieb. Lediglich die Spannungspulse vor dieser Depolarisierung wurden pro Durchlauf um +10 mV erhöht, sodass sich ermitteln ließ, ab welchem Membranpotenzial die Natriumkanäle in die inaktivierbare Konformation übergangen. Nach erfolgter Umrechnung der Stromantworten in die jeweiligen Leitfähigkeiten wurde die Zeit der Kultivierung, welche die Schaltkinetik beeinflussen kann, mit in die Auswertung einbezogen.

Bereits bei Messungen an *DIV* 4 musste mit Space-clamp Artefakten zu rechnen sein (siehe Abb. 15 A). Genaue Korrelationen mit der Kultivierungszeit konnten nicht aufgestellt werden, da diese Artefakte auch innerhalb einer Messgruppe stark variierten und somit in allen gemessenen Zeitfenstern in unterschiedlicher Ausprägung auftraten.

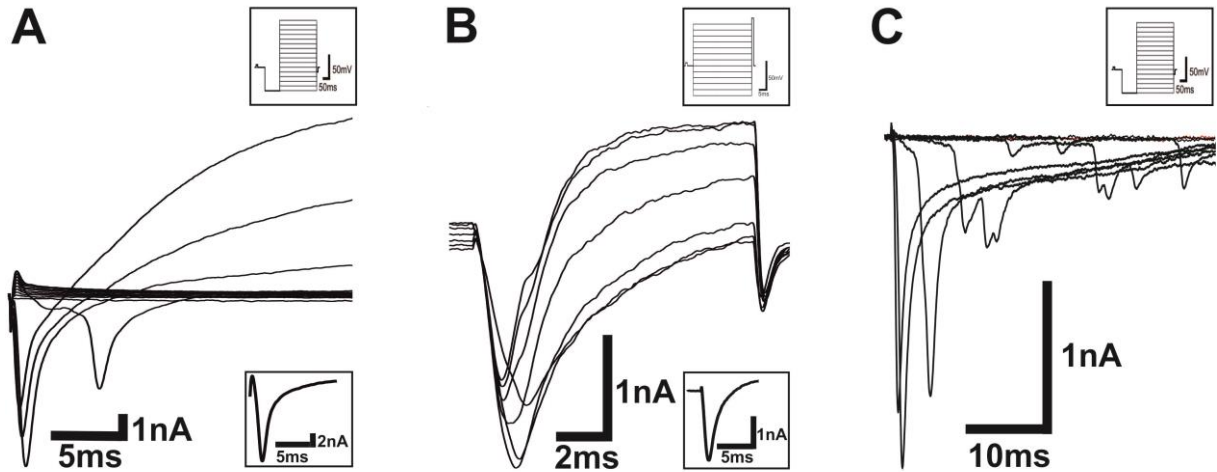


Abbildung 15: Natriumstromantworten kultivierter muriner adulter enterischer Einzelzellen auf Spannungsprotokolle zur Natriumaktivierung und – Inaktivierung.

A zeigt ausgewählte, übereinander gelagerte Stromantworten einer adulten enterischen Zelle auf die Spannungspulse der Natriumaktivierung (Einschaltbild oben), gemessen an *DIV* 4. Die auswärtsgerichteten Ströme zeigen die Gesamtheit der nicht-blockierbaren, spannungsabhängigen Kationenkanäle. Der zeitverzögerte Einwärtsstrom beruht auf einem Space-clamp Artefakt. Die maximale Stromantwort wurde bei einer Depolarisierung auf -20 mV gemessen und betrug $-6,3$ nA, woraus sich eine Stromdichte von 180 pA/pF ergab. Der Eingangswiderstand dieser Zelle lag bei $242,5$ M Ω . Das Einschaltbild unten zeigt die Stromantwort der Zelle auf eine Depolarisierung auf -20 mV. Das verwendete Spannungsprotokoll war dasselbe wie bei den bereits gemessenen enterischen Neuronen enterischer Ganglien aus dem myenterischen Plexus des Meerschweinchens.

B zeigt ausgewählte Stromspuren einer adulten enterischen Zelle an *DIV* 43 auf das Natriuminaktivierungs-Spannungsprotokoll (oberes Einschaltbild). Die auswärtsgerichteten Ströme resultieren aus nicht-blockierbaren spannungsabhängigen Kaliumkanälen, welche bei höheren Depolarisierungen das Offset-Potenzial zu Beginn des Pulses verursachen. Beim Ruhehaltepotenzial sind diese Kationenkanäle, gleich wie die Natriumkanäle, wieder geschlossen.

Einem vorgegebenen Ruhehaltepotenzial von -70 mV folgten für 300 ms Hyper- und Depolarisierungspulse und ein anschließender 10 ms langer Depolarisierungssprung auf -10 mV, welcher die aktivierbaren Kanäle öffnen soll. Nach jedem Depolarisierungssprung erfolgte ein Rücksprung zum Ruhehaltepotenzial von -70 mV. Die Hyper-, - und Depolarisierungen erhöhten sich bei jedem Protokolldurchlauf um $+10$ mV, bis sie einen Endwert von 0 mV annahmen. Zwischen jedem Intervall lagen 5 Sekunden.

In **Abbildung C** ist ebenfalls die Stromantwort einer Zelle an *DIV* 17 auf die Spannungspulse der Natriumaktivierung gezeigt. Deutlich zu sehen sind die zeitverzögerten Natriumströme, sog. Space-clamp Artefakte, welche das Auswerten dieser Messung nicht ermöglichte.

Die Zeitachsen der einzelnen Stromlinien besitzen unterschiedliche Zeitauflösungen.

5.2.2.3 Spannungsabhängige Schaltkinetik in Bezug auf die Kultivierungsdauer

Nachfolgend sind die Leitfähigkeiten der Natriumaktivierung und -Inaktivierung dargestellt. Alle Leitfähigkeiten der Aktivierung wurden auf +10 mV normiert, die der Inaktivierung auf -50 mV. Diese Normierung auf -50 mV wurde gewählt, da bei negativeren Membranpotenzialen Kationenkanäle, wie beispielsweise der I_h aktiviert ist, welcher den Natriumstrom maskieren kann. In Abbildung 16 A sind alle Leitfähigkeiten unabhängig ihrer Zeit in Differenzierung gegen die jeweilige Spannung aufgetragen, in Abb. 16 B ist die Natriumaktivierung zusätzlich für den Kultivierungszeitraum 0-6 Tage und 7-13 Tage aufgetragen. Für die Aktivierungen bzw. Inaktivierungen gibt es große mittlere Standardabweichungen ab einer Woche in Kultur. Dies ist auf das schnelle Auswachsen neuronaler Strukturen und daraus resultierender Space-clamp Artefakte während der Messungen zu erklären. Aus diesem Space-clamp Artefakt und den nichtblockierbaren Kationenkanälen, welche bei Membranpotenzialen negativer -50 mV aktiviert werden, resultiert auch der sehr große Window-current in Abb. 16 A. Es macht den Anschein, als wären die Natriumkanäle bereits zwischen -90 mV und 0 mV geöffnet. Wie aber Abb. 16 B zeigt, öffnen die Natriumkanäle erst bei Spannungen ab -50 mV. Des Weiteren gibt es keine signifikanten entwicklungsbedingten Veränderungen der Natriumkanäle innerhalb der ersten zwei Wochen in Kultur. Dies lässt drauf schließen, dass diese von Beginn an vollständig exprimiert sind und die Kultivierungsdauer keinen Einfluss auf die Schaltkinetik der Natriumkanäle ausübt. Die genauen Werte der halbmaximalen Spannungen der Aktivierung und Inaktivierung, sowie der jeweiligen Steigung, gesamt und in Abhängigkeit der Kultivierungszeit, sind Tabelle 25 im Anhang C zu entnehmen.

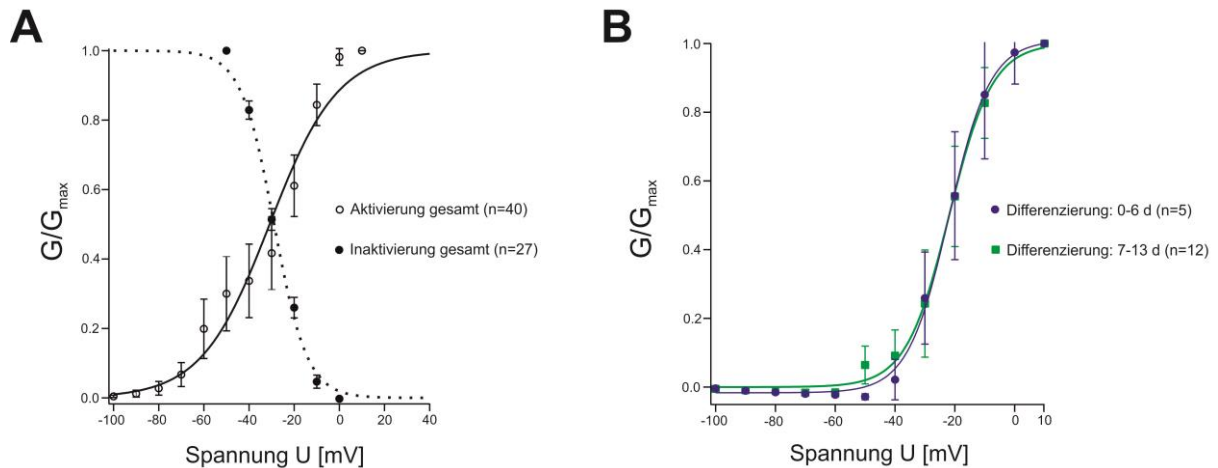


Abbildung 16: Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung über den gesamten Kultivierungszeitraum und innerhalb der ersten zwei Wochen in Kultur.

Auf der Abszisse sind die normierten Leitfähigkeiten G / G_{\max} in Bezug auf die jeweilige Spannung in mV auf die Ordinate aufgetragen. Die einzelnen Werte der Natriumaktivierung und -inaktivierung wurden mathematisch an eine sigmoide Gleichung angeglichen. Fehlerbalken zeigen den jeweiligen SEM.

In **A** sind die Leitfähigkeiten aller in die Auswertung eingegangener adulter muriner Einzelzellen, unabhängig ihrer Kultivierungsdauer, aufgetragen. Für die Natriumaktivierung ($n=40$) konnte eine halbmaximale Spannung von $V_{1/2} = -30,9 \pm 7,8$ mV und für die Natriuminaktivierung ($n=27$) eine $V_{1/2} = -28,9 \pm 4,3$ mV bestimmt werden. **B** zeigt die Natriumaktivierung in Abhängigkeit ihrer Zeit in Kultur, 0-6 Tage in Kultur (blau) und 7-13 Tage Kultivierung (grün). Für die 0-6 Tage alten Zellen konnte eine halbmaximale Spannung von $V_{1/2} = -21,8 \pm 0,5$ mV ($n=5$) gemessen werden. Für die 7-13 Tage alten Zellen in Kultur ergab sich eine $V_{1/2} = -21,9 \pm 0,5$ mV ($n=12$).

In **A** ist ein sehr großer Window-current, beginnend bei -90 mV, zu erkennen, verursacht durch Space-Clamp Artefakte und Maskierung des Natriumstromes durch aktivierte Kationenkanäle **B** zeigt eindeutig, dass die Natriumkanäle bei einem Membranpotenzial ab -50 mV öffnen.

5.2.2.4 Pharmakologische Untersuchung der Natriumkanäle

Es ist bekannt, dass sich im enterischen Nervensystem TTX-sensitive als auch TTX-insensitive Natriumkanäle befinden (Rugiero *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurden TTX-sensitive Natriumkanaltypen untersucht. Das TTX, welches selektiv spannungsgesteuerte Natriumkanäle blockiert, wurde kumulativ in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 3 μ M auf die Zellen gegeben. Zur Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle wurde dasselbe Spannungsprotokoll wie in Abb. 15 A verwendet. Nach einer 100 ms dauernden Hyperpolarisation auf -120 mV wurde die Zelle in +10 mV Schritten bis zu einem

Endwert von +30 mV depolarisiert und die Natriumkanäle so aktiviert. Zur Ermittlung der TTX-Wirkung auf die Natriumkanäle wurde eine Depolarisation auf +10 mV zur Auswertung herangezogen. In Abbildung 17 ist der Reststrom nach Behandlung mit TTX in Bezug auf den Kontrollstrom in % aufgetragen. Bei der Applikation von 1 nM TTX verblieb ein Reststrom von 91,7 %, bei 10 nM 87,3 und bei 100 nM 53,3 %. 23,7 % verblieben bei 1 μ M und 27,8 % bei 3 μ M TTX. Zu sehen ist ein Rückgang des verbleibenden Stroms mit Erhöhung der TTX-Dosis. Aufgrund der niedrigen Anzahl stabil messbarer Zellen konnten keine Rückschlüsse auf die Wirkung im mikromolaren Bereich gezogen werden.

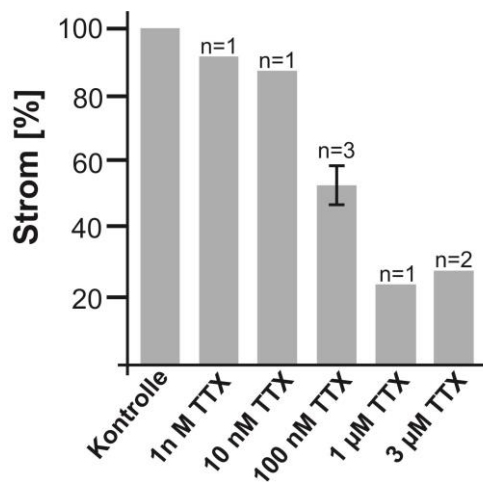


Abbildung 17: Pharmakologische Untersuchung der Natriumkanäle mit Tetrodotoxin

Die Abbildung zeigt den Reststrom nach TTX-Behandlung in Bezug auf den Kontrollstrom in %. Zu erkennen ist, dass bei Erhöhung der TTX-Konzentration der verbleibende Natriumstrom zunehmend geringer wird. Da pro TTX Konzentration jeweils nur ein Datenpunkt (außer bei 100 nM, n=3) vorliegt, wurden die Differenzierungszeiten nicht berücksichtigt.

5.2.3 Natriumgetragene Aktionspotenziale

In Kapitel 5.1.3 wurde bereits erläutert, dass die Ausbildung von Aktionspotenzialen essenziell für die Modellierung der neuronalen Netzwerkaktivität ist. Da es sich im Darm größtenteils um inhibitorische Neurone handelt, ist es hier besonders wichtig, dass eine Aktivierung bzw. Inaktivierung dieser Neurone fein aufeinander abgestimmt ist.

5.2.3.1 AH- /S-Neurone und Aktionspotenzialmuster

Wie bereits bei der Meerschweinchen Analyse beschrieben, reagieren Neurone auf dieselben Strompulse mit unterschiedlichen Aktionspotenzialmustern, entsprechend ihrer Aufgabe innerhalb des myenterischen Plexus bzw. des Darmes. Auch bei den untersuchten murinen Einzelzellkulturen konnte zwischen zwei Aktionspotenzialmustern, sowie zwischen S- und AH-Neuronen unterschieden werden. Neurone, welche über die Länge eines 1500 ms langen Spannungspulses mit einem Aktionspotenzial am Anfang eines Pulses reagieren und solchen, die tonisch Aktionspotenziale über die gesamte Länge des Spannungspulses ausbilden (Abb. 18). Da bekannt ist, dass die Nachhyperpolarisationszeit enterischer Neurone bis zu zwei Sekunden andauern kann, wurde die Dauer des Strompulses von 500 auf 1500 ms gesetzt. Zusätzlich zu phasisch und tonisch feuernenden Neuronen konnte bei den adulten murinen Einzelzellkulturen synaptische Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 18 B).

Rund 2/3 aller Zellen mit Aktionspotenzialen (n=44) zeigten eine Kalzium-Flexion in der Repolarisationsphase. Diese Flexion konnte nur durch Ermittlung der ersten Ableitung der Zellen sichtbar gemacht werden. Anhand des Verlaufs des Aktionspotenzials war es nicht möglich die Zellen eindeutig in AH- oder S-Neurone zu unterteilen.

Neurone, welche die Kalzium-Flexion in der ersten Ableitung aufwiesen, wurden als AH-Neuronen klassifiziert (Kunze *et al.*, 2000; Clerc *et al.*, 1998; Schutte *et al.*, 1995), solche Zellen, denen diese fehlte als S-Neurone. In den gemessenen Zellen lagen S- und AH-Neurone in einem Verhältnis von 1 : 1,5 vor. Des Weiteren bildeten einzelne Neurone einen sogenannten Voltage-Sag beim ersten hyperpolarisierenden Strompuls aus. Der Voltage-Sag ist der für den I_h Strom typische Einbruch der Hyperpolarisation zu Beginn eines Strompulses als Reaktion auf eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Der I_h Strom gehört zur Gruppe der HCN-Kanäle (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel), welche häufig bei myenterischen AH-Neuronen zu finden sind (Galligan *et al.*, 1999). In einer kleinen Subpopulation von filamentösen S-Neuronen wurde der I_h ebenfalls detektiert (Song *et al.*, 1997). Diese Kanäle tragen unter anderem zu der langen Nachhyperpolarisationsphase (AHP) der Neurone bei (Abb. 18A).

Im Gegensatz zu den Meerschweinchen Messungen lag das Verhältnis von phasisch zu tonisch feuernenden Neuronen bei 1 : 1,5.

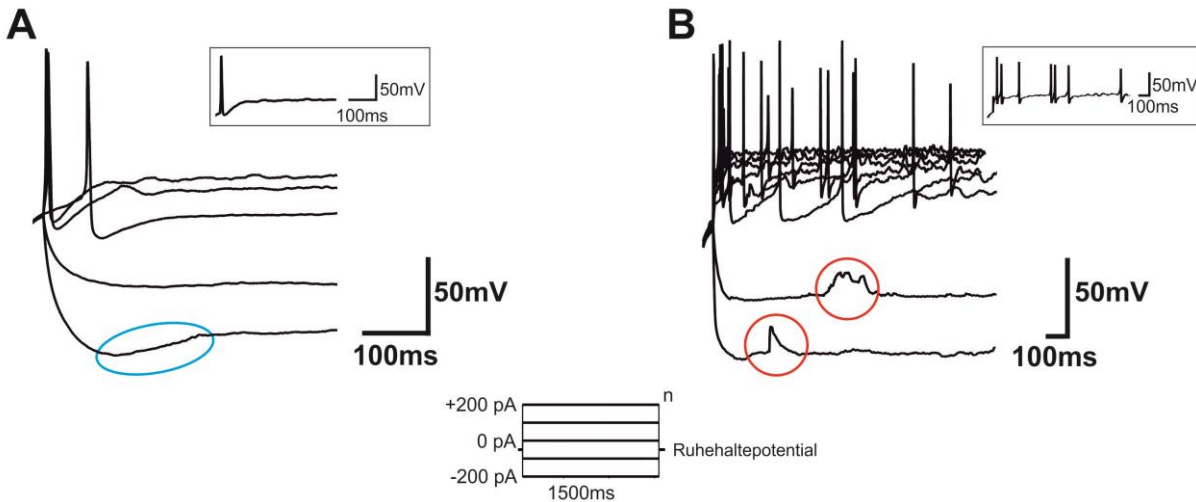


Abbildung 18: Zwei verschiedene Aktionspotenzialmuster eines AH Neurons einer adulten murinen Einzelzellkultur als Antwort auf dieselben hyper- und depolarisierenden Strompulse im Current-clamp Modus.

Abbildung **A** zeigt **phasische** Potenzialantworten eines AH-Neurons an *DIV 3* auf hyper- und depolarisierende Strompulse. Über die gesamte Länge des Pulses feuert dieses Neuron nur ein Aktionspotenzial zu Beginn des depolarisierenden Pulses. Die blaue Ellipse markiert einen Voltage-Sag. Das AH-Neuron in Abbildung **B** (*DIV 26*) feuert auf dieselben depolarisierenden Strompulse **tonisch** Aktionspotenziale über die gesamte Länge der Pulse. Die roten Kreise zeigen die synaptische Aktivität dieser Zelle. In beiden Abbildungen sind nur ausgewählte Potenzialantworten dargestellt, das Einschaltbild zeigt jeweils das Aktionspotenzial auf einen +200 pA Strompuls. Das Stromprotokoll ist in der Mitte dargestellt.

Das Verhältnis von phasisch zu tonisch feuernenden Neuronen in der adulten Einzelzellkultur lag bei 1 : 1,5.

5.2.3.2 Aktionspotenzial Analyse

Bei der Analyse der Aktionspotenziale wurden nach eingehender Betrachtung nur die ersten fünf hyper-, - und depolarisierenden Strompulse ausgewertet (-200 pA, -100 pA, 0 pA, +100 pA, +200 pA, siehe unteres Einschaltbild Abb. 19). Alle folgenden Potenzialänderungen unterschieden sich nicht voneinander.

Um die APs sowohl untereinander als auch mit den progenitor-abgeleiteten Zellen vergleichen zu können, wurde die Breite und Maximalamplitude, sowie die Zeit die zwischen zwei APs verging, ermittelt. Eine Korrelation zwischen den AP-Mustern und der Kultivierungsdauer war nicht vorhanden. Insgesamt konnte in 44 Zellen Aktionspotenziale gemessen werden, wovon letztendlich 32 Zellen den in Kapitel 4.2.3.1.2 aufgestellten Messparametern entsprachen. Das Alter der gemessenen

Zellen korrelierte weder mit der Häufigkeit der gemessenen AH- bzw. S-Neurone noch mit deren AP-Mustern.

Durch die Ermittlung der ersten Differenzialgleichung der Aktionspotenziale konnte in 30 von 44 Neuronen die klassische Kalzium-Flexion in der repolarisierenden Phase des Aktionspotenzials von AH-Neuronen nachgewiesen werden. Diese Kalzium-Flexion war sowohl in tonisch als auch in phasischen Neuronen vorhanden, auch in solchen Neuronen, denen die zweite lange Nachhyperpolarisationsphase fehlte, und sich schnell aus der Hyperpolarisation erholt hatten. Die Breite der APs der 24 ausgewerteten AH-Neurone betrug $4 \pm 0,1$ ms (APs n=108), die Maximalamplitude lag bei $110 \pm 1,3$ mV (APs n=108).

In 13 aller gemessenen Zellen mit Kalzium-Flexion (n=24) konnte ein Voltage-Sag detektiert werden (Abb. 18 A). Da die Zellen während der Messungen generell sehr instabil waren, war die Ermittlung des Voltage-Sags und entsprechendem Rebound sehr schwer.

In acht der 32 ausgewerteten Neurone konnten nach näherer Betrachtung keine Kalzium-Flexion detektiert werden, vier dieser Neurone ohne transiente Kalziumrepolarisation in der ersten Differenzialgleichung zeigten aber einen eindeutigen Voltage-Sag. Aufgrund der fehlenden Kalzium-Flexion wurden diese acht Zellen als S-Neurone klassifiziert. Bei einer Anzahl von 32 ausgewerteten Neuronen konnten somit drei Mal mehr AH-Neurone als S-Neurone ausgewertet werden (24 AH-Neurone, 8 S-Neurone). Die Breite der APs der acht ausgewerteten S-Neurone betrug $4,1 \pm 0,1$ ms (APs n=26), die Maximalamplitude lag bei $114,8 \pm 3,6$ mV (APs n=26) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich der AP Breite und Maximalamplitude von S- und AH-Neuronen (adulte Mäuse).

	Breite AP (ms)	Max. Amplitude (mV)
AH-Neurone	$4 \pm 0,1$	$110 \pm 1,3$
S-Neurone	$4,1 \pm 0,1$	$114,8 \pm 3,6$

Phasische Aktionspotenziale

In der vorliegenden Arbeit wurden all die AP-Muster zur Gruppe der phasischen APs zusammengefasst, welche zu Beginn eines Strompulses nur ein Aktionspotenzial generiert haben (n=17). Insgesamt konnten 11 Zellen, entsprechend den Messkriterien in Tabelle 1, in die Auswertung einbezogen werden. In acht dieser 11 Zellen konnte mittels der ersten Ableitung eine Kalzium-Flexion in der repolarisierenden Phase des APs detektiert werden. Drei dieser acht Zellen zeigten einen Voltage-Sag beim ersten hyperpolarisierenden Strompuls. Alle acht Neurone wurden als AH-Neurone klassifiziert. Drei der ausgewerteten phasisch feuernenden Neurone zeigten weder einen Voltage-Sag noch eine Kalzium-Flexion und wurden daher als S-Neurone klassifiziert. Durch die Schnittstellenbestimmung des Aktionspotenzials mit dessen erster Ableitung wurde das jeweilige Membranpotenzial bestimmt, bei dem die maximale Anzahl der Natriumkanäle geöffnet ist. Anhand dieser Schnittpunkte wurde die Breite eines jeden APs ermittelt.

Die Breite der Aktionspotenziale lag bei $4,2 \pm 0,2$ ms und die Maximalamplitude bei $113,9 \pm 3,6$ mV. Diese Werte entsprechen 22 APs aus 11 verschiedenen Zellen. Betrachtet man nur die Breite und die Maximalamplitude der phasischen AH-Neurone, ergibt sich eine AP Breite von $3,9 \pm 0,3$ ms (n=8) und eine Maximalamplitude von $112,9 \pm 4,3$ mV (n=8). Für die S-Neurone (n=3) konnte eine AP Breite von $4,7 \pm 0,4$ ms und eine Maximalamplitude von $116,5 \pm 6,9$ mV bestimmt werden (diese Werte sind in Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt).

Acht der phasisch feuernenden Neurone wurde $3 \mu\text{M}$ TTX appliziert. Diese acht untersuchten Neurone gliederten sich in sechs AH-Neurone und zwei S-Neurone. In vier der AH-Neurone konnte danach kein Aktionspotenzial mehr ausgelöst werden. Bei den anderen zwei AH-Neuronen verringerte sich die Maximalamplitude beim nächsten Strompuls um 46,5 %.

Bei den beiden S-Neuronen verringerte sich die Maximalamplitude nur um 8 %.

Es liegt die Vermutung nahe, dass AH-Neurone sensitiver auf TTX reagieren als S-Neurone.

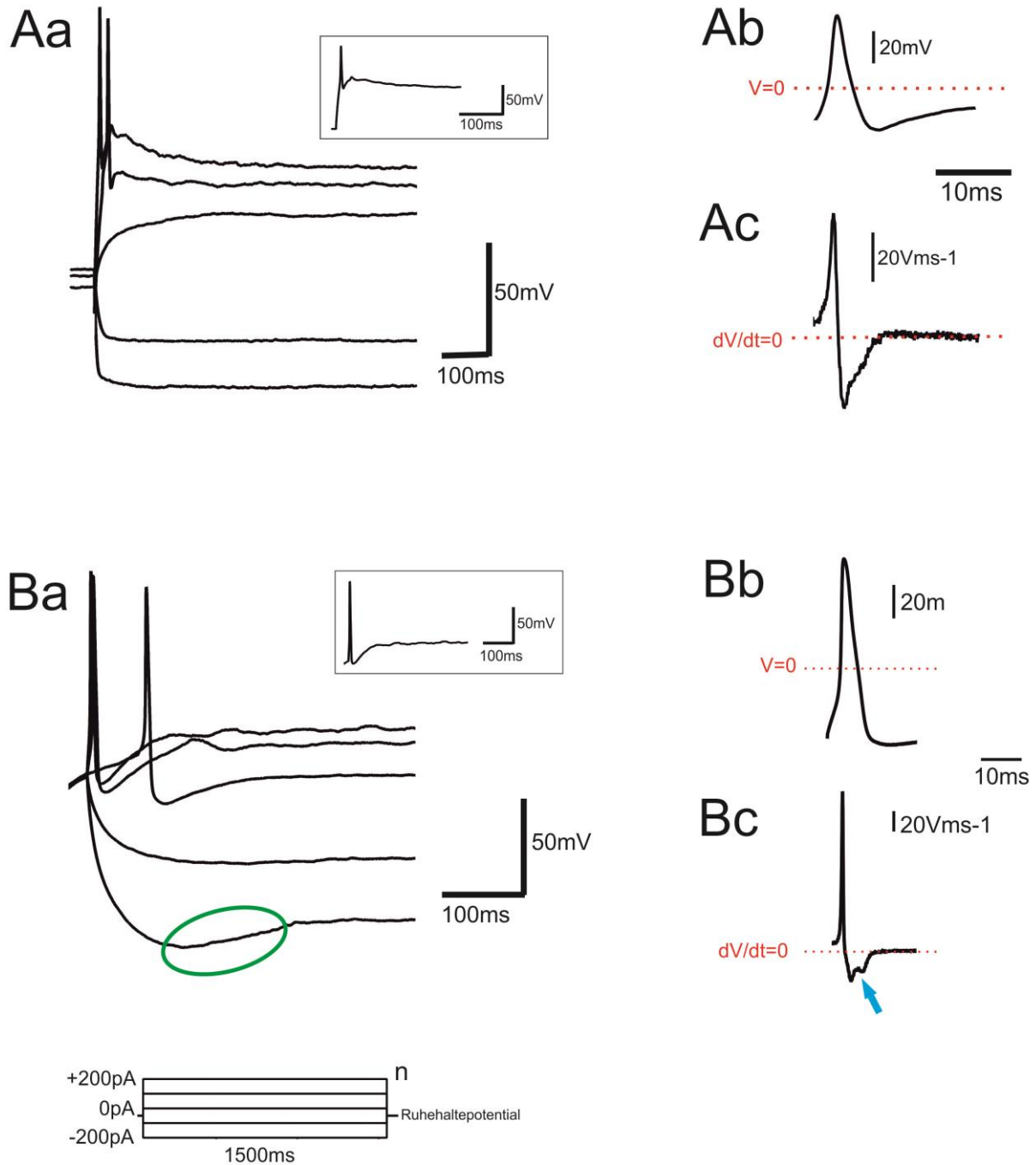


Abbildung 19: Übersicht phasisch feuender AH- und S-Neurone mit entsprechender erster Differenzialgleichung zur Bestimmung der Kalzium-Flexion.

Abbildung **A** zeigt **phasische** Potenzialantworten eines S-Neurons an *DIV* 13 auf 1500 ms andauernde hyper-, - und depolarisierende Strompulse. Über die gesamte Länge des Pulses feuert dieses Neuron nur ein Aktionspotential zu Beginn des depolarisierenden Pulses. Das Einschaltbild zeigt das Aktionspotential auf einen Strompuls von +200 pA. In **Ab** ist dieses Aktionspotential vergrößert dargestellt. Zur besseren Bestimmung des Vorhandenseins einer Kalzium-Flexion ist in **Ac** die entsprechende erste Ableitung gezeigt. Die typische transiente Repolarisation fehlt in S-Neuronen. In **Ba** ist das Aktionspotential eines phasisch feuenden AH-Neurons an *DIV* 3 auf dasselbe Stromprotokoll (**C**) dargestellt. **Bb** zeigt das Aktionspotential auf eine Stromapplikation von +200 pA. In

Bc wurde durch die Bestimmung der ersten Ableitung die transiente Kalzium-Flexion der Repolarisation sichtbar gemacht (blauer Pfeil). In beiden Abbildungen sind nur ausgewählte Potenzialantworten dargestellt, das Einschaltbild zeigt jeweils das Aktionspotenzial auf einen +200 pA Strompuls. Das Stromprotokoll ist in **C** dargestellt.

Das Verhältnis von AH-Neuronen zu S-Neuronen lag bei der Gruppe der phasisch feuernden Neuronen bei 3:1.

Tonische Aktionspotenziale

Zur Gruppe der tonischen APs wurden alle Aktionspotenziale zusammengefasst, welche über den gesamten Strompuls mehr als ein Aktionspotenzial generierten. Insgesamt konnten 27 Zellen stabil gemessen werden, wovon 21 den Messkriterien in Tabelle 1 entsprachen und somit in die Auswertung eingingen.

16 dieser 21 Zellen konnten durch Auswertung der ersten Differenzialgleichung den AH-Neuronen zugeordnet werden. Die restlichen fünf Neurone entsprachen der Gruppe der S-Neurone.

Auch bei den tonisch aktiven Neuronen wurde die Breite des APs mit Hilfe der Schnittstellenbestimmung ermittelt, sie betrug $4,1 \pm 0,1$ ms ($n=21$, 107 APs).

Die Zeit, welche zwischen zwei Aktionspotenzialen verging, lag jeweils bei $90,7 \pm 15$ ms ($n=21$, 61 APs). Die maximale Amplitudengröße betrug $109 \pm 1,2$ mV (107 APs) und die mittlere, nicht signifikante Attenuierung der Amplitudengröße betrug $11 \pm 0,01$ %.

Betrachtet man nur die Breite und die Maximalamplitude der tonischen AH-Neurone ($n=16$) ergibt sich eine AP Breite von $4 \pm 0,1$ ms (APs $n=89$) und eine Maximalamplitude von $109,3 \pm 1,3$ mV (APs $n=89$). Die Zeit, welche zwischen zwei Aktionspotenzialen verging, lag jeweils bei $97,1 \pm 17,1$ ms ($n=21$, APs $n=55$). Die mittlere, nicht signifikante Attenuierung der Amplitudengröße betrug $10,5 \pm 0,01$ % (APs $n=74$) (Diese Werte sind in Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt).

Für die S-Neurone ($n=5$) konnte eine AP Breite von $4,8 \pm 0,4$ ms (APs $n=19$) und eine Maximalamplitude von $107,2 \pm 3,8$ mV (APs $n=19$) bestimmt werden. Die Zeit zwischen zwei APs betrug $48 \pm 5,9$ ms (APs $n=11$). Die Maximalamplitude verringerte sich im Mittel um $16 \pm 0,02$ % (APs $n=13$).

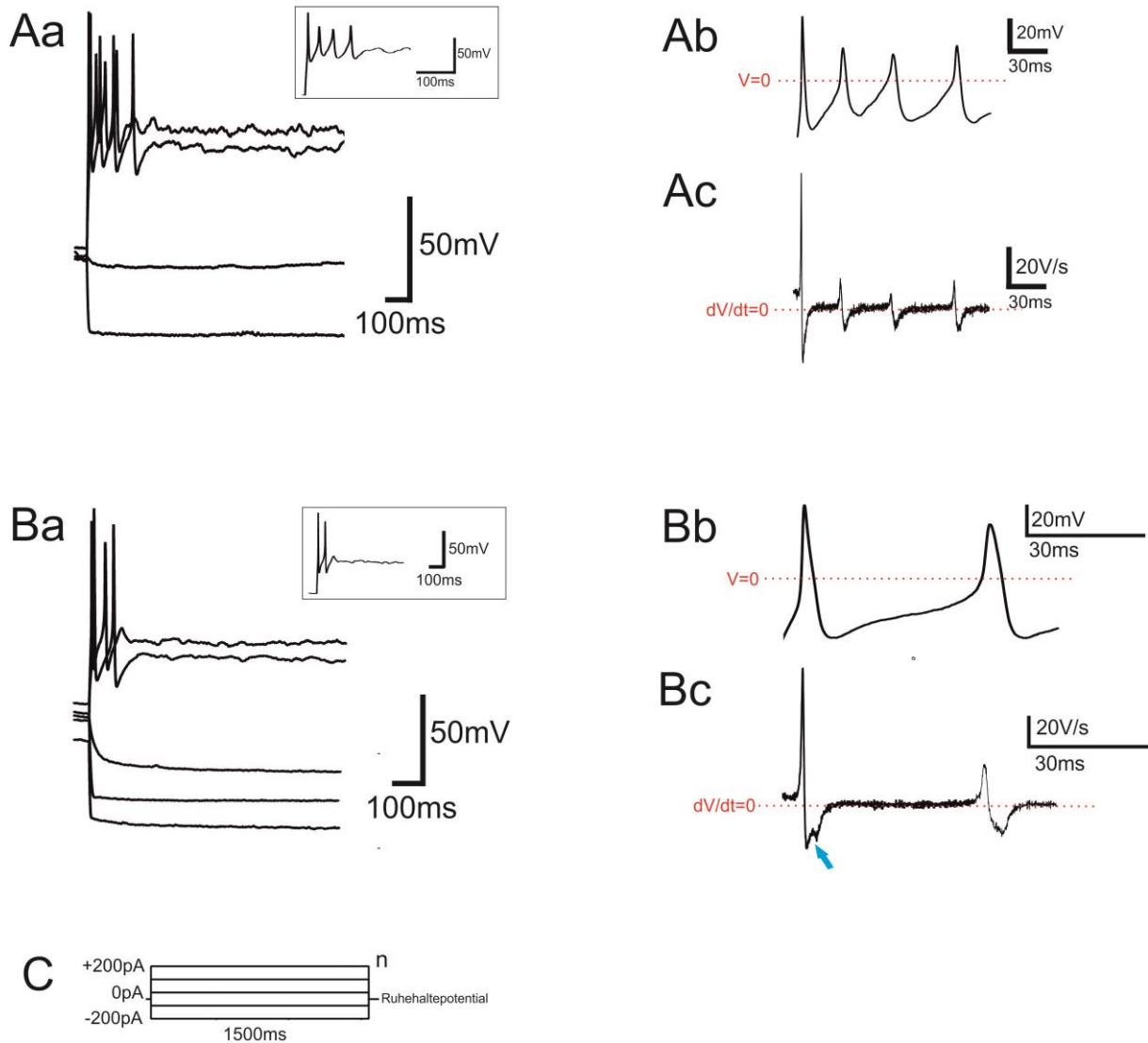


Abbildung 20: Übersicht tonisch feuender AH- und S-Neurone mit entsprechender ersten Differenzialgleichung zur Bestimmung der Kalzium-Flexion.

Abbildung **A** zeigt **tonische** Potenzialantworten eines S-Neurons an *DIV* 13 auf hyper- und depolarisierende Strompulse. Über die gesamte Länge des Pulses feuert dieses Neuron mehrere Aktionspotenziale. Das Einschaltbild zeigt das Aktionspotenzial auf einen Strompuls von +200 pA. In **Ab** ist dieses Aktionspotenzial vergrößert dargestellt. Zur besseren Bestimmung des Vorhandenseins einer Kalzium-Flexion ist in **Ac** die entsprechende erste Ableitung gezeigt. Die typische transiente Repolarisation fehlt in S-Neuronen. In **Ba** ist das Aktionspotenzial eines tonisch feuenden AH-Neurons an *DIV* 20 auf dasselbe Stromprotokoll (**C**) dargestellt, der Voltage-Sag in der Hyperpolarisation fehlt. **Bb** zeigt das Aktionspotenzial auf eine Stromapplikation von +200 pA. In **Bc** wurde durch die Bestimmung der ersten Ableitung die transiente Kalzium-Flexion der Repolarisation sichtbar gemacht (blauer Pfeil). In beiden Abbildungen sind nur ausgewählte Potenzialantworten dargestellt, das

Einschaltbild zeigt jeweils das Aktionspotenzial auf einen +200 pA Strompuls. Das Stromprotokoll ist in **C** dargestellt.

Das Verhältnis von AH-Neuronen zu S-Neuronen lag bei der Gruppe der tonisch feuernenden Neuronen bei 3:1.

Tabelle 3: Vergleich von S- und AH-Neuronen bezüglich AP-Muster, AP-Breite, Maximalamplitude, und Zeit zwischen zwei Aktionspotenzialen.

	AH- Neurone		S-Neurone	
	Phasisch	Tonisch	Phasisch	Tonisch
Breite AP (ms)	3,9 ± 0,3	4 ± 0,1	4,7 ± 0,4	4,8 ± 0,4
Max. Amplitude (mV)	112,9 ± 4,3	109,3 ± 1,3	116,5 ± 6,9	107,2 ± 3,8
Zeit zwischen zwei APs (ms)		97,1 ± 17,1		48 ± 5,9

Tabelle 4: Vergleich der mittleren Attenuierung tonisch feuernender Neurone.

	Mittlere Attenuierung der Maximalamplitude (%)
Tonisch feuernende Neurone (gesamt)	11 ± 0,01
Tonisch feuernende AH-Neurone	10,5 ± 0,01
Tonisch feuernende S-Neurone	16 ± 0,02

5.3 Progenitor-abgeleitete Zellen (PDCs) aus neonatalen C56/BL6N Mäusen

Die Grundidee des vorliegenden Projektverbundes war es, im Tiermodell eine reproduzierbare Basis zu schaffen, welche später auf den Menschen übertragen werden kann, um so Neugeborenen und Kindern, welche an der Hirschsprung Erkrankung leiden, durch Reimplantation körpereigener Nervenzellen die Resektion betroffener Darmabschnitte und das Legen eines Stomas zu ersparen. Damit einhergehend sollen Begleiterkrankungen wie z.B. Resorptionsstörungen und erhebliche Einschränkungen der Lebensqualität verringert werden. Dies soll durch Entnahme zeitlebens persistierender Progenitorzellen des Darmes ermöglicht werden.

Um diesem Leitgedanken des Projektvorhabens so nahe wie möglich zu kommen, lag der Hauptfokus der Arbeit auf der Isolierung, Kultivierung und elektrophysiologischen Charakterisierung und Evaluation nativer adulter stammzell-abgeleiteter enterische Neurone aus neonatalen C56BL/6N Mäusen.

5.3.1 Typ I progenitor-abgeleitete Zellen

Da die Entnahme und Kultivierung progenitor-abgeleiteter Zellen zur späteren Re-Implantation ein recht junger Gedanke ist und es bisher keinerlei elektrophysiologische Belege über die Funktionalität solcher isolierten und kultivierten Progenitorzellen vorliegen, musste sich zunächst ein Überblick über die vorherrschenden Zelltypen innerhalb einer solchen Progenitor-Zell-Kultur verschafft werden. Daher wurde im späteren Verlauf der Arbeit ein zweiter neuronähnlicher Zelltyp von progenitor-abgeleiteten Zellen detektiert und untersucht. Zum besseren Verständnis werden die PDCs in der vorliegenden Arbeit in Typ I und Typ II Zellen unterteilt.

5.3.1.1 Kultivierung von Typ I progenitor-abgeleiteten Zellen

Schon während der Proliferation konnten mit dem Antikörper NeuN immunhistochemisch neuronale Strukturen in proliferierenden Progenitorzellen, den sogenannten Enterosphären, identifiziert werden. Die anschließend differenzierten Enterosphären zeigten zusätzlich morphologische Ähnlichkeiten mit neuronalen Zellen auf (Furness, 2006).

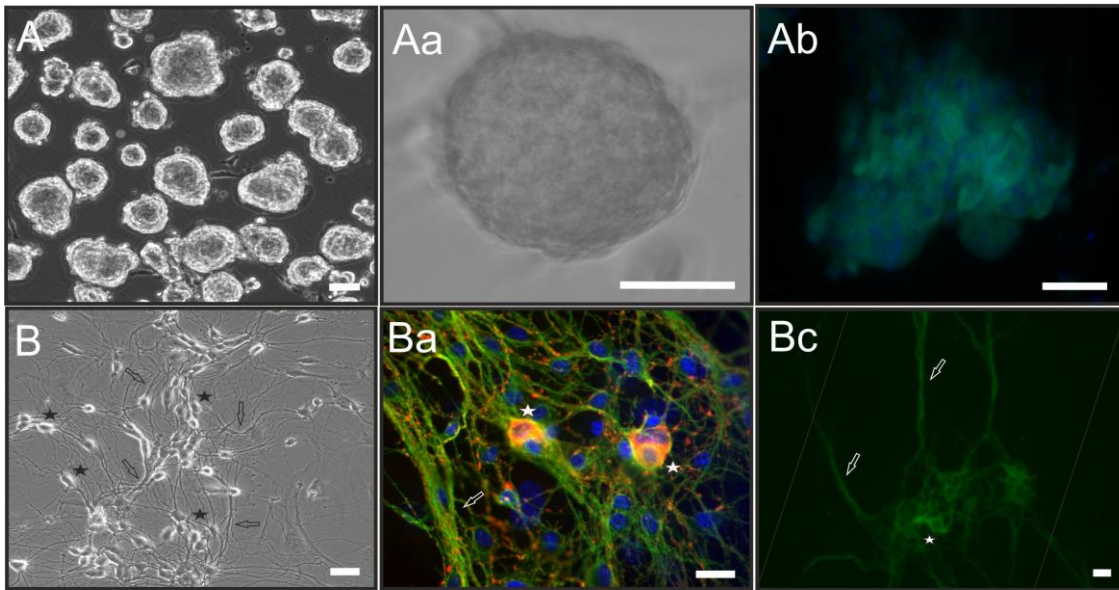


Abbildung 21: Übersicht über proliferierende Enterosphären und differenzierte Zellen.

Abbildung **A** zeigt sich in Proliferation befindende Progenitorzellen zum Zeitpunkt *DIV* 3. Eine einzelne Enterosphäre ist in **Aa** dargestellt. Bild **Ab** zeigt die immunhistochemische Markierung neuronaler Strukturen innerhalb einer Enterosphäre, NeuN (grün); Zellkerne (blau). In Abbildung **B** sind differenzierte Enterosphären an *DIV* 13 dargestellt. **Ba** zeigt die immunhistochemische Vielfachfärbung einer differenzierten Kultur. Dieses Bild ist eine freundliche Bereitstellung des Projektpartners des *Anatomischen Instituts in Tübingen*. NOS-1 (rot); TuJ (grün); blau (Zellkerne). **Bc** ist eine Einfachfärbung mit TuJ einer differenzierten Kultur an *DIV* 13. Der Stern markiert Zellsomata, die Pfeile axonale Strukturen. In Bild **Ba** entspricht der Maßstabsbalken 10 μm , in allen anderen Bildern 50 μm .

Die isolierten Progenitorzellen entwickelten sich durch Proliferation, mithilfe der Wachstumsfaktoren EGF und FGF, innerhalb weniger Stunden zu sogenannten Enterosphären. Diese Enterosphären waren zunächst wenig adhären und proliferierten zu kugelförmigen Sphären (Abb. 21 Aa). In Abb. 21 Ab wurde eine solche Sphäre mit dem Antikörper NeuN markiert. Dieser ist neuronenspezifisch und zeigt in frisch postmitotischen Zellen eine Färbung des Nukleus und eine leichte Färbung des Zytoplasmas. Der Antikörper bindet spezifisch gegen das neuronenspezifische Protein NeuN. So finden sich im Inneren einer Sphäre die frisch postmitotischen Zellen, während sich in der Peripherie proliferierende Zellen befinden. Die Sphären proliferierten 6 oder 9 Tage, bevor sie in die Differenzierung übergeleitet wurden.

Bereits wenige Stunden nach dem Beginn der Differenzierung wurden die Sphären adhären und fingen an, den Zellverband der Enterosphären zu verlassen. Durch das Ausbilden von Neuriten formte sich ein Netzwerk zu benachbarten Zellen. Auch

morphologisch wiesen diese Kulturen große Ähnlichkeit mit isolierten und kultivierten enterischen Meerschweinchen-Neuronen auf (siehe Abb 9 D, Jessen *et al.*, 1983).

Immunhistochemisch wurde dies durch die Behandlung der Zellkulturen mit den Antikörpern NeuN und TUJ1 am *NMI* selbst und von den Projektpartnern des *Anatomischen Institutes der Universität Tübingen* mit dem Antikörper NOS-1 untermauert (siehe Abb. 21 Ba und Bc). NOS-1 bindet an die Stickstoffmonoxid Synthase (NOS), welche für die Synthese des Neurotransmitters Stickstoff (NO) verantwortlich ist. TuJ1 bindet spezifisch an neuronales β -Tubulin und markiert so unter anderem axonale Strukturen.

5.3.1.2 Elektrophysiologische Untersuchungen von Typ I progenitor-abgeleiteten Zellen

Patch-clamp Experimente der differenzierten PDCs vom Typ I zeigten in 75 (62,5 %) der 120 stabil gemessenen Zellen eine Kombination aus verschiedenen Kalium- und Kationenströmen. 31 dieser 120 Zellen entsprachen den in Kapitel 4.2.3.1.2 aufgestellten Messparametern und zeigten unter anderem den neuronenspezifischen A-Strom (I_A) (Abb. 23). Die mittlere Membrankapazität dieser Zellen betrug $14,3 \pm 1,16$ pF ($n=31$). Bei einer Normalisierung auf 0 mV zeigten diese Zellen eine mittlere Stromgröße von $3,8 \pm 9,9$ pF/pA ($n=31$). Da in keiner der gemessenen Zellen ein Natriumstrom detektiert werden konnte, es aber bekannt ist das Neurone erst eine gewisse Zeit maturieren müssen bevor sie einem funktionalen Neuron entsprechen (Biella *et al.*, 2007, Takazawa *et al.*, 2012), wurden die PDCs bis zu 80 Tage in Kultur gehalten, um ihnen so genug Zeit zur Reifung zu geben. Es konnte bis *DIV* 80 kein Natriumstrom nachgewiesen werden.

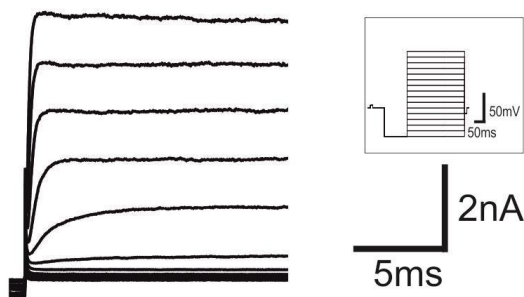


Abbildung 22: Stromantwort ohne sichtbaren I_A einer Typ I PDC auf ein Spannungsprotokoll zur Natriumaktivierung.

Gezeigt sind übereinander gelagerte Stromantworten einer PDC I auf die Spannungspulse der Natriumaktivierung (Einschaltbild rechts), gemessen an DIV 26 (Proliferation 3 d). Die auswärtsgerichteten Ströme zeigen die Gesamtheit der nicht-blockierbaren, spannungsabhängigen Kationenkanäle.

Um sicherzugehen, dass es sich um neuronale Zellen und den neuronenspezifischen I_A handelt, wurde den Zellen während der Messung der Kationenkanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP) in die Extrazellulärflüssigkeit gegeben.

4-AP inhibiert spezifisch nur den neuronenspezifischen A-Strom (I_A). Eine vollständige Isolierung des I_A durch Inhibition weiterer auswärtsrektifizierender Kationenströme war nicht möglich. Ebenfalls war es nicht möglich diesen Strom durch Subtraktionsverfahren rechnerisch zu isolieren, da die Zellen während der Messung instabil wurden und sehr sensitiv auf Änderungen der Zusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit reagierten.

Der I_A entwickelt sich zwischen 10 und 25 ms nach Beginn der Depolarisierung und fällt dann nach 220 bis 600 ms ab (Starodub *et al.*, 2000). Er hat somit eine sigmoidale Entstehungs- und eine exponentielle Abfallphase (Hille, 1991). In Abb. 23 ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Konzentration an 4-AP mehr I_A Kanäle inhibiert werden. Aufgrund der Instabilität der Zellen konnte kein IC_{50} für 4-AP auf Typ I PDCs ermittelt werden.

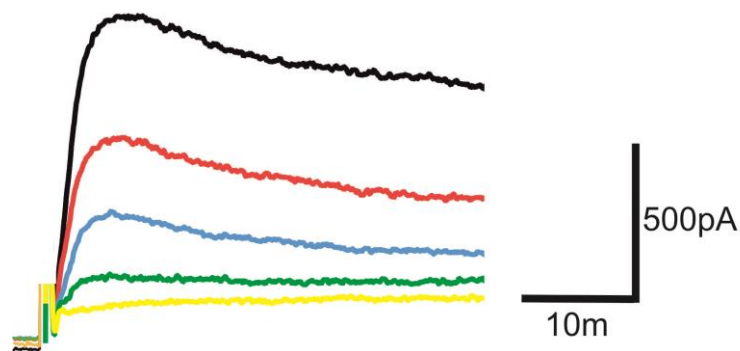


Abbildung 23: Stromantwort einer Typ I PDC unter zunehmender Konzentration von 4-AP.

Zu sehen ist die elektrophysiologische Antwort einer PDC Typ I (Proliferation 6 d, DIV 48) auf eine Depolarisation auf +10 mV. Schwarz ist der native Strom, rot ist die Stromantwort bei einer Applikation von 0,1 mM 4-AP. Die blaue Stromspur zeigt die Stromantwort auf eine Applikation von 0,3 mM, grün die von 1 mM und die gelbe Stromspur zeigt die Stromantwort bei einer Applikation von 3 mM 4-AP. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Konzentration an 4-AP der I_A zunehmend inhibiert wird.

Durch diese immunhistochemischen und elektrophysiologischen Experimente konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den untersuchten Zellen wahrscheinlich um neuronenhähnliche bzw. neuronale Vorläuferzellen handelt. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Kooperationsarbeit wurde ein weiterer neuronaler Zelltyp (Typ II PDC) in den differenzierten PDC-Kulturen mittels immunhistochemischen Markierungen identifiziert und anschließend elektrophysiologisch charakterisiert.

5.3.2 Typ II progenitor-abgeleitete Zellen

Zwar wiesen die Typ I PDCs immunhistochemisch und morphologisch auf neuronale Zellen hin, jedoch konnten bis zu DIV 80 in Differenzierung keine für neuronale Aktivität essenziellen Natriumströme gemessen werden. Daraufhin wurden die Kulturen vom *Anatomischen Institut in Tübingen* mit einem weiteren neuronalen Marker behandelt. Bei dieser Antikörpermarkierung konnte ein zweiter Zelltyp detektiert werden, der sich vom ersten Typ morphologisch unterschied. Dieser zweite Zelltyp wies keinerlei Ähnlichkeiten mit neuronalen Zellen auf, exprimierte jedoch funktionelle Natriumkanäle.

5.3.2.1 Kultivierung und Immunhistochemie von Typ II PDCs

Sowohl die Enterosphären als auch die PDCs wurden weiterhin nach demselben Protokoll wie die PDCs von Typ I auf Kollagen Typ I beschichteten Glas Deckgläschen kultiviert. Bei der Behandlung der PDCs mit dem Antikörper HuC/HuD durch das *Anatomische Institut in Tübingen* wurde ein weiterer Zelltyp detektiert, die Typ II PDCs. HuC/HuD bindet spezifisch an ein RNA-bindendes Protein, welches nur in Neuronen exprimiert wird. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, liegen diese Typ II PDCs in kleinen Nestern diffus im Hintergrund. Diese „Zellnester“ waren von einer laminaähnlichen Hülle umgeben, ähnlich wie in einem Ganglienverband. Diese Lamina musste für die elektrophysiologische Messung zunächst durchbrochen werden, was die Untersuchung der Zellen etwas erschwerte. Zunächst sollte diese Hülle mit der Umspülung von Protease vor den Patch-clamp Experimenten aufgelöst werden, sodass die Zellen frei zugänglich in ihren Zellnestern lagen. Dieser Ansatz wurde im weiteren Verlauf der Arbeit jedoch wieder verworfen, da sich die kurzzeitige Veränderung der Osmolaritäten um die Zelle negativ auf die folgende Messung auswirkte und stabile Messungen kaum möglich waren. So musste diese Hüllmembran zunächst mit der Patchpipette durchbrochen werden, bevor die Zelle angepatcht werden konnte. Um ein Verstopfen der Patchpipette während dieses Durchbrechens zu verhindern, wurde ein Überdruck von wenigen Millibar auf die Patchpipette ausgeübt.

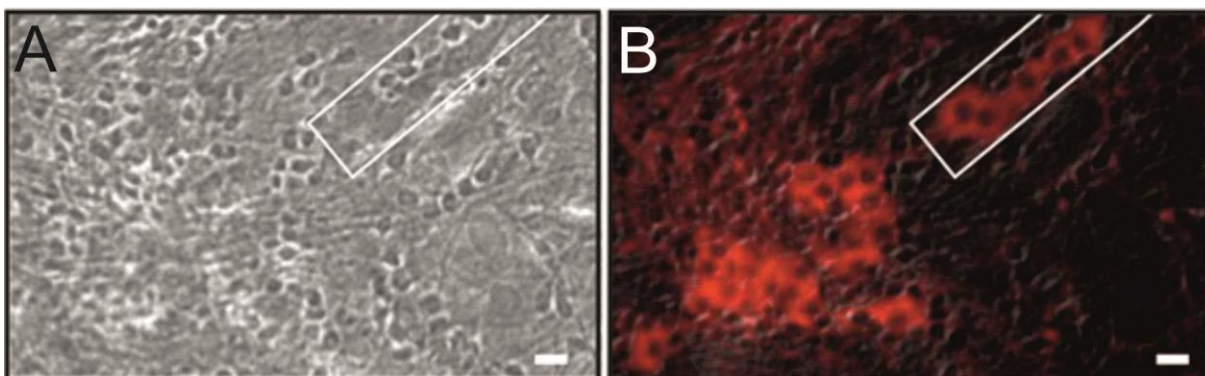


Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper HuC/HuD.

Bild **A** zeigt die Phasenkontrastaufnahme einer Kultur an DIV 14 (Proliferation 6 d). Zu sehen sind diffus im Hintergrund liegende Zellnester (Markierung). In Abbildung **B** ist die Fluoreszenzaufnahme mit dem Antikörper HuC/HuD (rot) gezeigt, welche die im Phasenkontrast kaum erkennbaren neuronalen

Strukturen sichtbar macht. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm . Beide Aufnahmen sind eine freundliche Bereitstellung des Projektpartners des *Anatomischen Instituts in Tübingen*.

Im weiteren Verlauf der elektrophysiologischen Untersuchungen konnten in diesen Zellen sowohl die bereits bekannten Kalium- und Kationenströme der PDCs Typ I nachgewiesen werden als auch Natriumströme.

Um sicherzustellen, dass es sich bei diesen natriumpositiven Typ II Zellen tatsächlich um progenitor-abgeleitete Zellen handelt und nicht um adulte Neurone, die ebenfalls isoliert und kultiviert wurden, wurden die Enterosphären bereits während ihrer Proliferation mit BrdU behandelt. BrdU interkaliert als Nukleosid-Analogon während der Zellteilung in die DNA und kann später immunhistochemisch sichtbar gemacht werden. Somit konnten nur Zellen, welche sich in der Proliferationsphase tatsächlich geteilt hatten positiv für die BrdU Prozessierung sein und stammten somit von Progenitorzellen ab.

Um die elektrophysiologisch untersuchten Zellen nach ihren Messungen eindeutig zu identifizieren und den BrdU-positiven Zellen zuordnen zu können, wurden diese während der Messung mit Biocytin gefüllt. Hier war darauf zu achten, dass die jeweilige Zelle am Ende des Experiments mit einer out-side-out Konfiguration verschlossen wurde, sodass die mit Biocytin versetzte Intrazellularflüssigkeit bis zur Fixierung nicht aus der Zelle entweichen konnte. Dies wurde durch sehr langsames und vorsichtiges Entfernen der Patchpipette von der Zelle erreicht. An der Patchpipette befand sich dann der out-side out Patch und die Zelle war verschlossen. Die Zellen wurden im Anschluss an jedes Experiment sofort fixiert und zur weiteren Prozessierung zum *Anatomischen Institut der Universität Tübingen* transferiert.

Nach erfolgter immunhistochemischer Behandlung der fixierten Zellen konnte durch Sichtbarmachen des interkalierten BrdUs in die DNA und der Biocytin gefüllten Zellen, eindeutige Rückschlüsse auf die Herkunft der elektrophysiologisch gemessenen Zellen geschlossen werden. Da nur Zellen, welche zuvor proliferiert hatten BrdU positiv sein konnten, ergab die spätere Auswertung, dass alle BrdU positiven Zellen, welche einen Natriumstrom aufwiesen, von Progenitorzellen abstammten. Diese war ein positiver Nachweis dafür, dass es möglich ist, aus Progenitorzellen Zellen zu differenzieren, welche neuronales Potenzial besitzen.

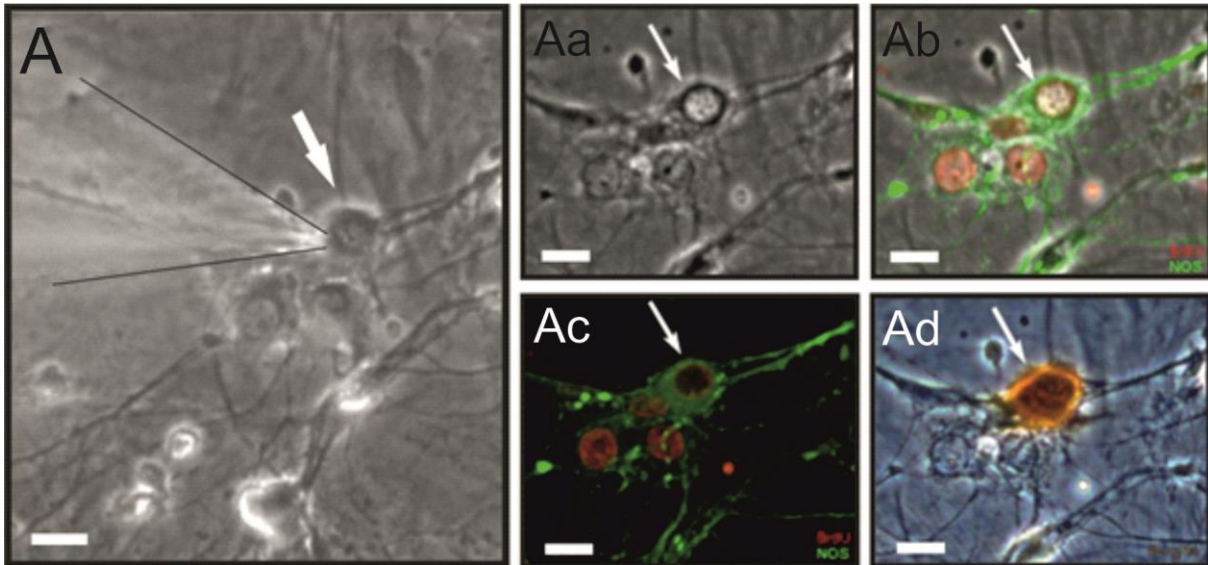


Abbildung 25: Aufnahmen einer natrium- und BrdU-positiven Typ II PDC.

Die Bilder **A** und **Aa** zeigen eine Phasenkontrastaufnahme einer PDC Typ II an *DIV* 10 (Proliferation 6d) während und kurz nach der Patch-clamp Messung. Die Patchpipette ist in Bild **A** angedeutet. In **Ab** und **Ac** wurde diese Zellkultur zusätzlich zur BrdU und Biocytin-Auswertung mit dem Antikörper NOS-1 behandelt. NOS-1 (grün); BrdU (rot). Abbildung **Ad** zeigt die mit Biocytin gefüllte Zelle und bestätigt, dass es sich bei der BrdU-positiven Zelle um die gemessene natriumpositive Zelle handelt. Die Pfeile markieren jeweils die gemessene Zelle. Alle Maßstabsbalken entsprechen 20 µm.

Die Aufnahmen sind eine freundliche Bereitstellung des Projektpartners des *Anatomischen Instituts in Tübingen*.

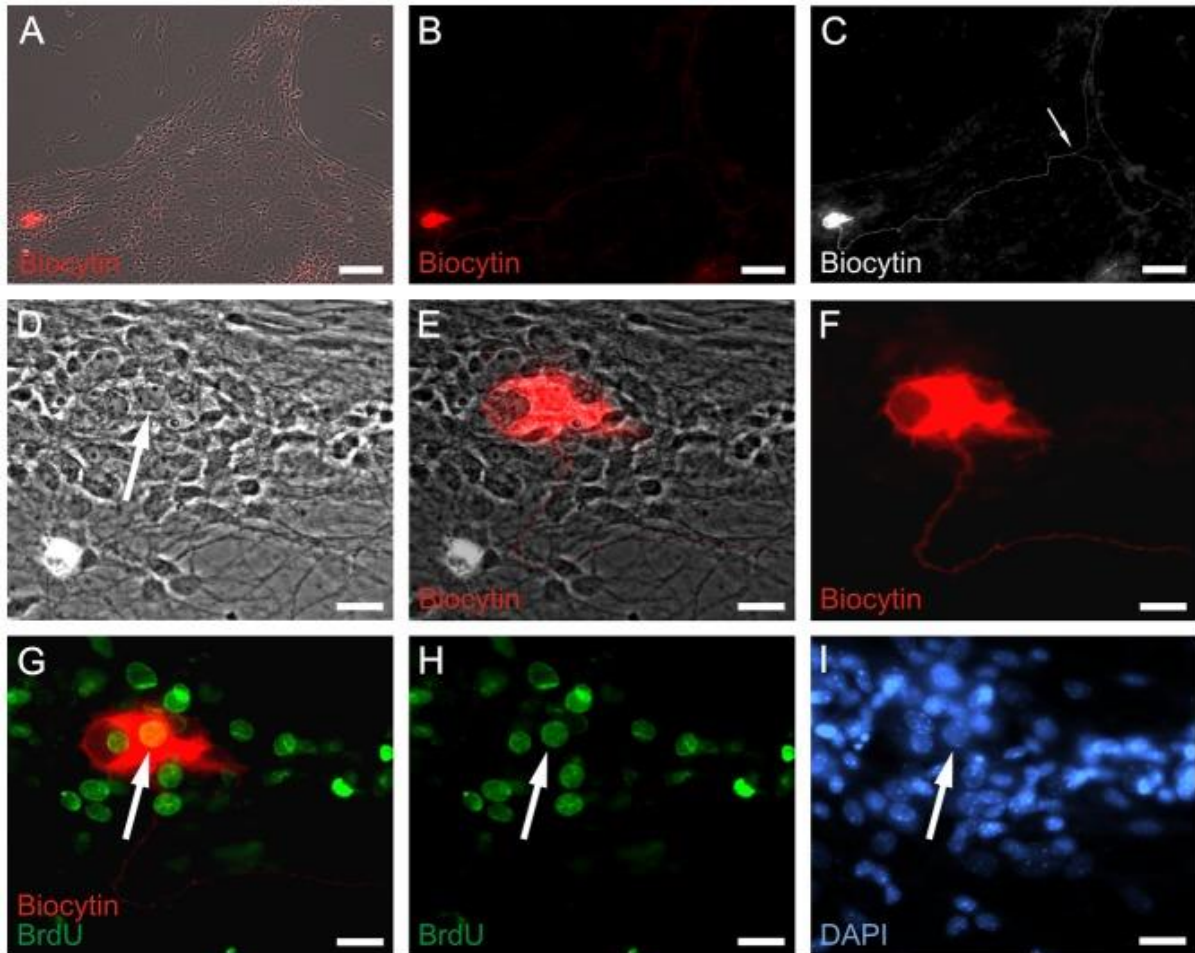


Abbildung 26: Natrium- und BrdU-positive Typ II PDC mit mehreren Hundert Mikrometer langem neuronalen Ausläufer.

Die Abbildungen zeigen eine natrium- und BrdU-positive PDC Typ II an DIV 18 (Proliferation 6 d).

In **A** ist die Phasekontrastaufnahme mit überlagertem Fluoreszenzaufnahme einer PDC Kultur mit einer Biocytin gefüllten Zelle (rot) dargestellt. In **B** und **C** ist die Biocytinfärbung allein dargestellt. Zur besseren Übersicht der neuronalen Ausläufer ist dieselbe Aufnahme in **C** in schwarz/weiß dargestellt. Die Länge des neuronalen Ausläufers vom Zellkörper bis zur Gabelung (Pfeil) beträgt 665 μm . In den Abbildungen **D**, **E** und **F** ist eine größere Phasekontrast- und Biocytinaufnahme (rot) der elektrophysiologisch gemessenen Zelle aus Abbildung **A** zu sehen (Pfeil). **G** zeigt eine immunhistochemische Aufnahme der Biocytin markierten Zelle (rot) und BrdU (grün). In **H** sind die BrdU Markierungen allein dargestellt. Abbildung **I** zeigt die Zellkerne, sichtbar gemacht mit DAPI (blau). Die Pfeile in **D**, **G**, **H**, und **I** zeigen denselben Zellkern der natriumpositiven und mit Biocytin gefüllten Zelle.

Die Maßstabsbalken in den Abbildungen **A**, **B** und **C** entsprechen 100 μm , in den übrigen Bildern 20 μm .

Die Aufnahmen sind eine freundliche Bereitstellung des Projektpartners des *Anatomischen Instituts in Tübingen*. Diese Ergebnisse des Kooperationsprojektes wurden 2014 in der Fachzeitschrift *PloS One* (Dettmann HM, *et al.*, 2014) veröffentlicht.

5.3.2.1.1 Biocytinfärbungen

Durch das Füllen der Zellen mit Biocytin während der elektrophysiologischen Messungen konnten diese nicht nur innerhalb einer Kultur lokalisiert werden, sondern es konnten auch die neuronalen Ausläufer der jeweiligen Zelle detektiert werden. Voraussetzung für eine optimale Markierung der Zellen mit Biocytin war ein stabiler Gigaseal zwischen Zelle und Patchpipette. Je stabiler die Messung war und je länger die Zelle mit Biocytin gefüllt werden konnte, desto mehr Biocytin konnte sich in der Zelle und ihren Ausläufern verteilen. Es wurden neuronale Verzweigungen von mehreren Hundert Mikrometern detektiert (Abbildung 26 C). Ein weiterer Beleg dafür, dass die progenitor-abgeleiteten Zellen *in vitro* das Bestreben hatten, ein neuronales Netzwerk auszubilden. Außerdem besaßen alle evaluierten Zellen eine multiaxonale Morphologie, was einen Hinweis auf Dogiel Typ II Neurone ist. Die in Abb. 27 dargestellten Zellen zeigen mehrere efferente Nervenzellfortsätze, spätere elektrophysiologische Auswertungen ergaben, dass beide Zellen in der ersten Differenzialgleichung die AH-Neuronen typische Kalzium-Flexion zeigte.

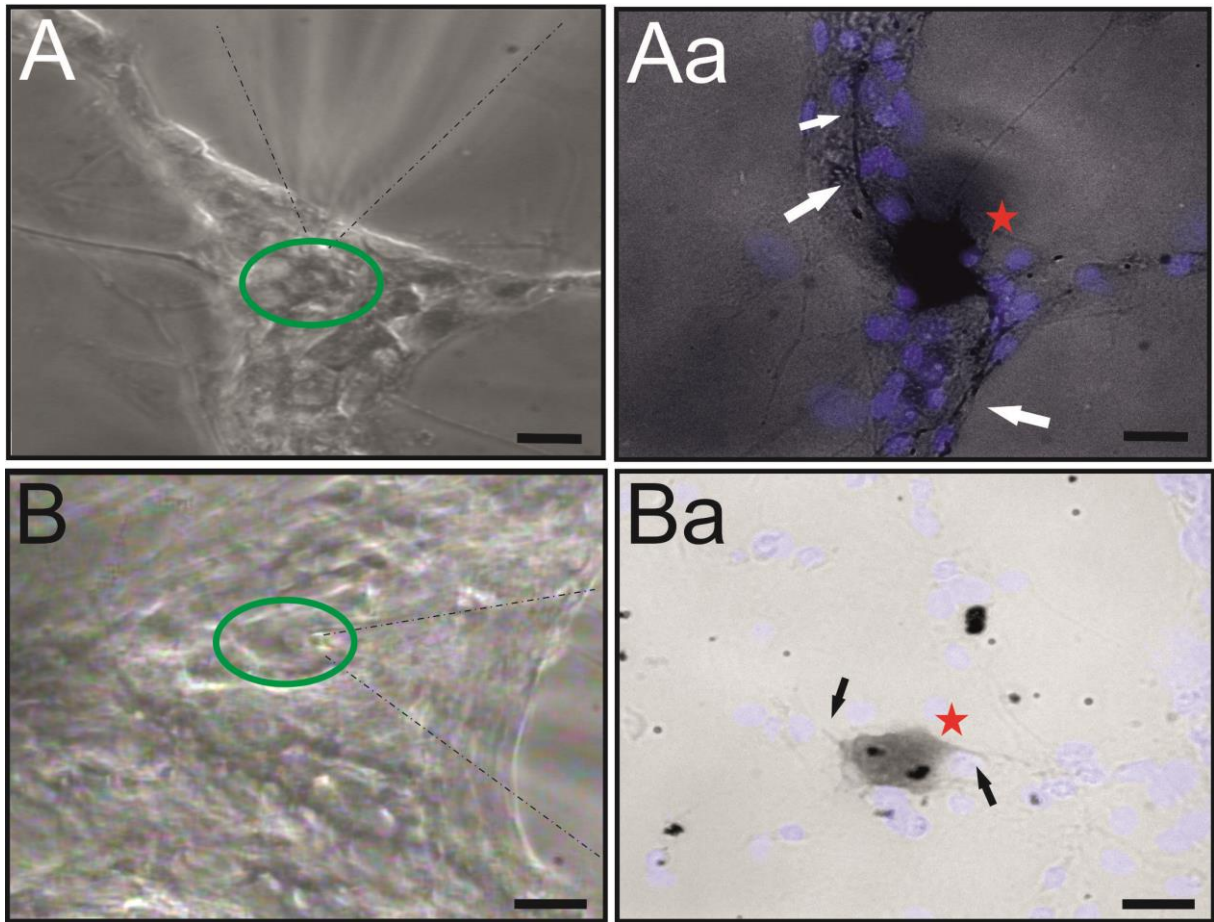


Abbildung 27: Biocytin gefüllte AH-Neurone, während der elektrophysiologischen Messung und nach der immunhistochemischen Prozessierung.

Die Abbildungen **A** und **B** zeigen jeweils die Phasenkontrastaufnahme eines AH-Neurons (Proliferation 6 d, DIV 24) während der elektrophysiologischen Messung. Die Patchpipette ist mit der gepunkteten Linie dargestellt, der grüne Kreis markiert die gepatchte Zelle. Aufgrund mehrerer efferenter Nervenzellfortsätze und späteren elektrophysiologischen Auswertung handelt es sich um ein Dogiel Typ II Neuron.

Aa und **Ba** zeigen die gemessene Zelle nach der Biocytin Prozessierung (roter Stern). Die Pfeile markieren jeweils efferente Nervenzellfortsätze der Zelle. In **Aa** wurden zusätzlich die Kerne der umliegenden Zellen mit DAPI sichtbar gemacht. **Ba** zeigt nur kurze efferente Nervenzellfortsätze, da die Zelle nur kurze Zeit stabil an der Patchpipette gehalten werden konnte und sich das Biocytin nicht richtig verteilen konnte.

Alle Maßstabsbalken entsprechen 20 μm .

5.3.2.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Natriumkanäle

Im folgenden Kapitel werden, wie bereits bei den adulten C56/BL6N Messungen beschrieben, die spannungsabhängigen und pharmakologischen Eigenschaften von Natriumkanälen der Typ II progenitor-abgeleiteten Zellen besprochen. Neben den

spannungsabhängigen Schaltkinetiken der Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung werden zunächst die Membrankapazitäten und Stromdichten über die Dauer der Differenzierung in Abhängigkeit der vorausgegangenen Proliferationszeit analysiert.

Zum Schluss folgt die Ermittlung des dynamischen Schaltverhaltens bezüglich der Erholung aus der Inaktivierung und dem pharmakologischen Verhalten der exprimierten Natriumkanäle auf die Behandlung mit Tetrodotoxin (TTX).

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Patch-clamp Experimente unter denselben Bedingungen und ohne Verwendung von Kationenkanalblockern durchgeführt, da eine vollständige Inhibition dieser Kanäle nicht gewährleistet war.

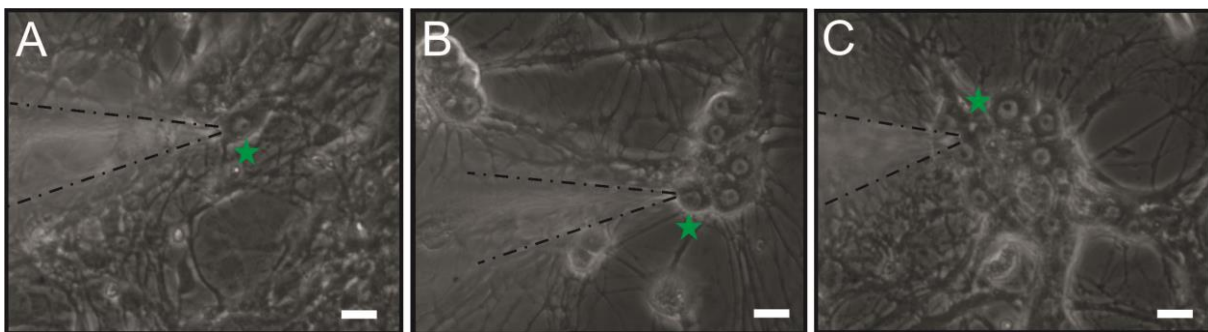


Abbildung 28: Typ II PDCs während elektrophysiologischer Messungen.

Zu sehen sind PDCs Typ II zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (Proliferation jeweils 6 Tage) während der elektrophysiologischen Messung. **A:** DIV 8; **B:** DIV 14; **C:** DIV 22.

Die grünen Sterne markieren jeweils eine PDC, die Patchpipette ist mit der gestrichelten Linie angedeutet. Maßstabsbalken entsprechen alle 20 μm .

Auch auf die natriumpositiven PDCs wurden die in Kapitel 4.2.3.1.2 aufgestellten Messparameter für jede gemessene Zelle übertragen. Entsprachen Zellen während oder nach einer Messung nicht mehr diesen Standard-Parametern, wurden diese nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Abbildung 29 zeigt das Verhältnis gemessener Zellen zu natriumpositiven PDCs und den Anteil der davon in die Auswertung eingegangenen Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse in Abhängigkeit der Zeit, welche die Enterosphären unter Proliferationsbedingungen in Kultur gehalten wurden.

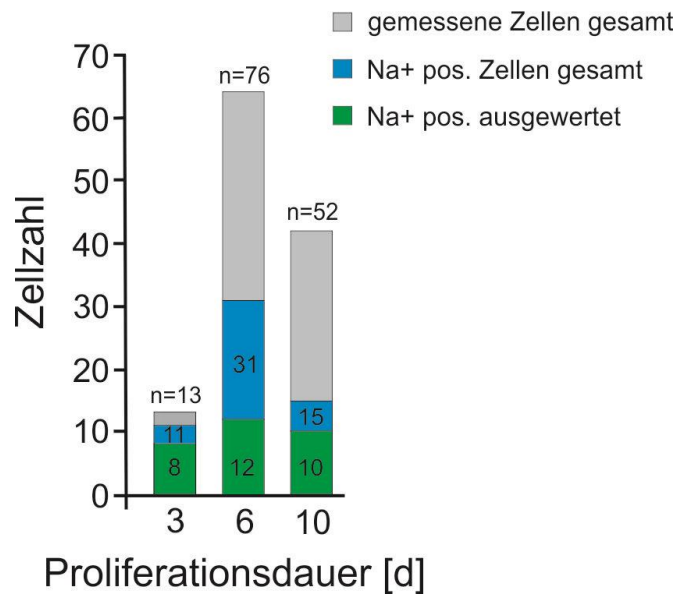


Abbildung 29: Verhältnis insgesamt gemessener zu natriumpositiver Zellen. Gegenübergestellt sind die in die Auswertung eingegangenen Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl natriumpositiver Zellen, jeweils in Abhängigkeit der Proliferationsdauer.

A: Anzahl der gemessenen Zellen (grau) und natriumpositiven Zellen (blau) in Bezug auf die Proliferationsdauer. Zellen, die den Messkriterien aus Tabelle 1 entsprachen und in die Auswertung eingegangen sind, sind grün dargestellt.

Bei 3 Tagen in Proliferationsdauer wiesen 84,6 % der gemessenen Zellen Natriumströme auf, wovon 72,7 % der Zellen den Messkriterien entsprachen. Bei einer Proliferationsdauer von 6 Tagen waren 40,8 % Zellen natriumpositiv, 38,7 % gingen in die Auswertung ein. 28,9 % der Zellen, die 10 Tage proliferierten, wiesen Natriumströme auf, 66,7 % davon wurden in die Auswertung aufgenommen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine erhöhte Anzahl gemessener Zellen nicht mit einer erhöhten Ausbeute an natriumpositiven Zellen einhergeht. Auch eine signifikante Änderung der Anzahl der natriumpositiven bzw. der in die Auswertung eingegangenen Zellen korreliert nicht mit der Dauer der Proliferationsdauer und der Gesamtzahl der gemessenen Zellen. Die erhöhte Gesamtzahl gemessener Zellen bei einer Proliferationsdauer von 6 Tagen resultiert aus einer höheren Verfügbarkeit an Zellen, welche sich 6 Tage in Proliferationsdauer befanden.

Bei Zellen, die 3 Tage unter Proliferationsbedingungen kultiviert wurden, konnten bei 84,6 % (n=11) aller gemessenen Zellen (n=13) Natriumströme detektiert werden. Von diesen entsprachen n=8 den Messparametern und gingen in die Auswertung mit ein. 40,8 % (n=31) der PDCs die 6 Tage proliferiert wurden wiesen Natriumströme auf,

n=12 dieser Zellen gingen in die Auswertung ein. Bei einer Proliferation von 10 Tagen wurden bei einer Gesamtzahl von 52 Zellen bei 28,9 % (n=15) Natriumströme gemessen, n=10 dieser natriumpositiven Zellen wurden in die Auswertung mit aufgenommen.

5.3.2.2.1 Stromdichte in Abhängigkeit der Proliferations-, - und Differenzierungsdauer

Da nicht nur die Proliferationsdauer, sondern auch die Zeit, in der sich Zellen in Differenzierung befinden, essenziell für die optimale Entwicklung der progenitor-abgeleiteten Zellen und deren Ionenkanalexpression ist (Biella *et al.*, 2007; Takazawa *et al.*, 2012) wurden die mittleren Membrankapazitäten und die mittleren Stromgrößen in Abhängigkeit ihrer Proliferations- und Differenzierungszeit, wie bereits bei der Auswertung der adulten C56/BL6N Einzelzellen beschrieben, ausgewertet.

Um einen direkten Zusammenhang zwischen der Membranfläche und den membranständigen Natriumkanälen zu ermitteln, wurde der gemessene Natriumstrom bei einer Depolarisierung von -120 mV auf -20 mV auf die jeweilige Membrankapazität der gemessenen Zelle normiert. Dies lässt Rückschlüsse auf die Anzahl funktioneller Natriumkanäle in der Membran und eventueller Veränderungen über die Dauer der Differenzierung und vorangegangener Proliferationszeit zu. In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass die mittlere Membrankapazität über die Dauer der Differenzierung zwar zu, die mittlere Stromdichte jedoch abnimmt. Die genauen Werte sind den Tabellen 26 und 27 im Anhang C zu entnehmen. Der mittlere Eingangswiderstand der Zellen betrug $632 \pm 126,49 \text{ M}\Omega$.

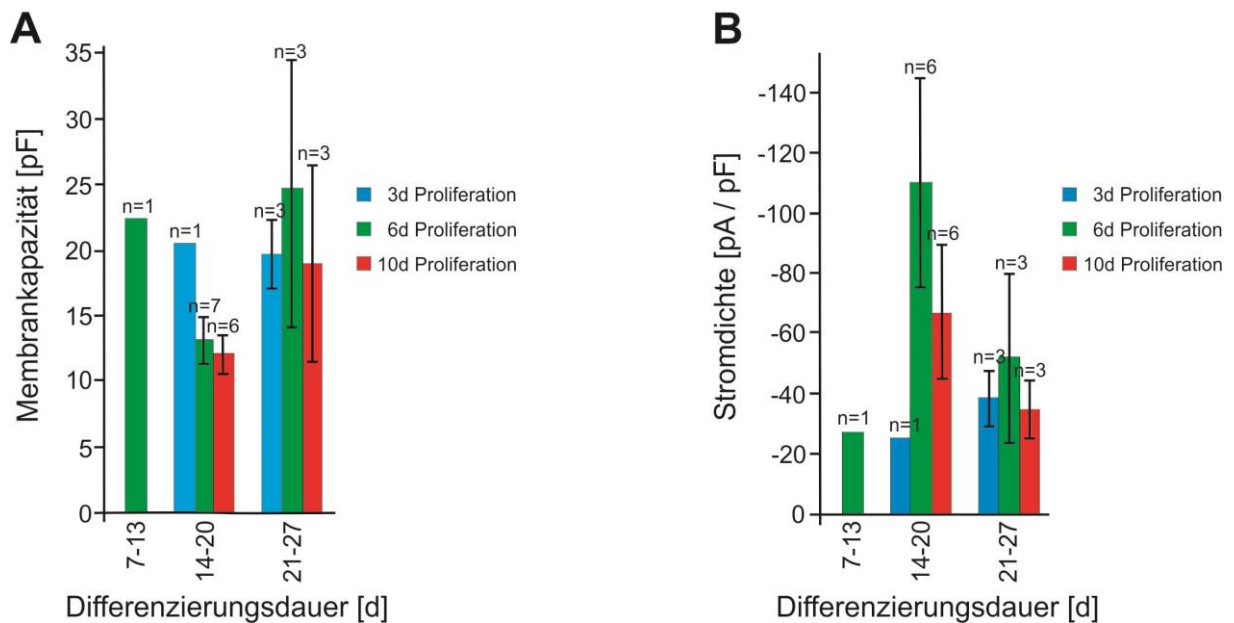


Abbildung 30: Membrankapazitäten und mittlere Stromdichten bei -20 mV in Abhängigkeit der Proliferationsdauer und anschließender Zeit in Differenzierung.

A: Membrankapazitäten der in die Auswertung eingegangener PDCs ($n=24$) in Abhängigkeit der Differenzierungsdauer. Innerhalb der einzelnen Proliferationszeiten und der Differenzierungsdauer gibt es keine signifikanten Abweichungen bezüglich der Membrankapazität.

B zeigt die mittlere Stromdichte über die Zeit der Differenzierung in Abhängigkeit der Proliferationsdauer der Enterosphären ($n=23$). Trotz hoher Schwankungen innerhalb einer Proliferationsgruppe bezüglich der mittleren Stromdichte bei -20 mV sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Auch in Bezug auf die verschiedenen Differenzierungszeiten gibt es keine signifikanten Abweichungen. Blau: 3 Tage Proliferation, grün: 6 Tage Proliferation und rot bei 10-tägiger Proliferation.

5.3.2.2.2 Spannungsabhängige Schaltkinetik der Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung

Für ein dynamisches Netzwerkverhalten von Ionenkanalklassen ist ein angepasstes Schaltverhalten jedes beteiligten Ionenkanals von höchster Wichtigkeit. Der Hauptfokus der vorliegenden Arbeit liegt auf natriumgetragenen Aktionspotenzialen, weshalb Natriumkanäle untersucht und charakterisiert werden.

Im Folgenden wird gezeigt, bei welchen Membranpotenzialen die Natriumkanäle der PDCs Typ II aktivieren bzw. bei welchen Spannungen die Kanäle in einen inaktiven Zustand übergehen. Für diese Untersuchung wurden zwei verschiedene Protokolle

verwendet, eines zur Natriumaktivierung und eines zur Natriuminaktivierung (siehe Anhang D Abb. 39 und 40). In den oberen Einschaltbildern der Abbildung 31 A und B sind diese Spannungsprotokolle dargestellt. Für die Natriumaktivierung wurden die Zellen, ausgehend von einem Ruhehaltepotenzial von -70 mV zunächst für 100 ms bei -120 mV hyperpolarisiert, um möglichst viele Natriumkanäle in den geschlossenen aktivierbaren Zustand zu bringen. Abbildung A zeigt eine Spitzenstromamplitude von 1,08 nA bei einer Depolarisation auf -20 mV und eine mittlere Stromdichte von 107 pA/pF.

Abbildung 31 B zeigt im Einschaltbild oben das Spannungsprotokoll für die Natriuminaktivierung, bei welchem deutlich wird, dass hier der Depolarisierungspuls konstant bleibt und die Hyper- und Depolarisationen in einem Abstand von +10 mV variiert werden. Ausgehend von einem Ruhehaltepotenzial wird die Zelle zunächst hyperpolarisiert. Auf diesen Puls folgt eine Depolarisierung, welche bei jedem Durchlauf konstant blieb. Lediglich die Spannungspulse vor dieser Depolarisierung werden pro Durchlauf erhöht, sodass sich ermitteln lässt, ab welchem Membranpotenzial die Natriumkanäle in die inaktivierbare Konformation übergehen. Nach erfolgter Umrechnung der Stromantworten in die jeweiligen Leitfähigkeiten wurden weitere Parameter wie z.B. die Proliferations- und Differenzierungszeit, welche die Schaltkinetik beeinflussen können, mit in die Auswertung einbezogen.

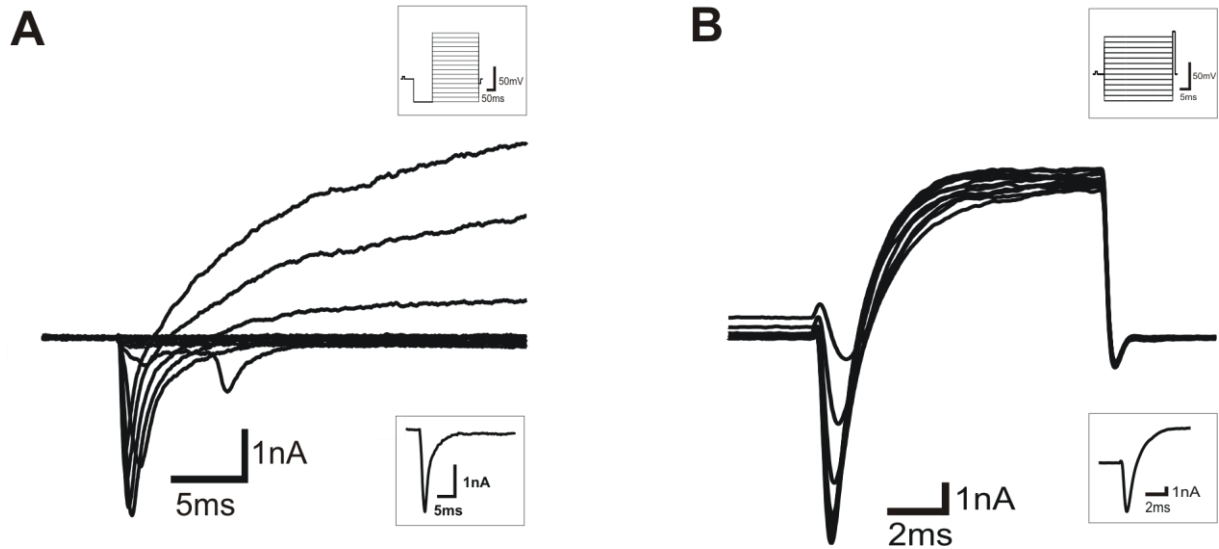


Abbildung 31: Natriumstromantworten einer PDC Typ II auf Natriumaktivierungs- und Inaktivierungs-Spannungsprotokolle.

A zeigt ausgewählte, übereinander gelagerte Stromantworten einer PDC auf die Spannungspulse der Natriumaktivierung (Einschaltbild oben), gemessen an *DIV* 17 (Proliferation 6 d). Die auswärtsgerichteten Ströme zeigen die Gesamtheit der nicht-blockierbaren, spannungsabhängigen Kationenkanäle. Der kleine zeitverzögerte Einwärtsstrom basiert auf der Tatsache, dass die Zellen sehr schwer zu klemmen sind und es häufig zu Space-clamp-Artefakten kommt. Die maximale Stromantwort wurde bei einer Depolarisierung auf -20 mV gemessen und betrug -1,08 nA, woraus sich eine Stromdichte von 107 pA/pF ergab. Der Eingangswiderstand dieser PDC lag bei 1,14 G Ω . Das Einschaltbild unten zeigt die Stromantwort der Zelle auf eine Depolarisierung auf -10 mV.

Ausgehend von einem vorgegebenen Ruhehaltepotenzial von -70 mV wurde die Zelle für 100 ms bei -120mV hyperpolarisiert bevor 250 ms lang anhaltende Hyper- und Depolarisierungen folgten. Diese Hyper- und Depolarisierungspulse wurden 16 mal wiederholt, wobei zwischen jedem Intervall 5 s lagen und der Depolarisierungspuls um +10 mV erhöht wurde, bis dieser beim letzten Puls einen Wert von +30 mV annahm. Nach jeder erfolgten Depolarisation erfolgte ein Rücksprung zum Ausgangsmembranpotenzial von -70 mV.

B zeigt ausgewählte Stromspuren einer PDC an Tag 19 (Proliferation 10 d) auf das Natriuminaktivierungs-Spannungsprotokoll (oberes Einschaltbild). Die auswärtsgerichteten Ströme resultieren aus nicht-blockierbaren spannungsabhängigen Kaliumkanälen, welche bei höheren Depolarisierungen das Offset-Potenzial zu Beginn des Pulses verursachen. Beim Ruhehaltepotenzial sind diese Kationenkanäle, gleich wie die Natriumkanäle, wieder geschlossen.

Einem vorgegebenen Ruhehaltepotenzial von -70 mV folgten für 300 ms Hyper- und Depolarisierungspulse und ein anschließender 10 ms langer Depolarisierungssprung auf -10 mV, welcher die aktivierbaren Kanäle öffnen soll. Nach jedem Depolarisierungssprung erfolgte ein Rücksprung zum Ruhehaltepotenzial von -70 mV. Die Hyper- und Depolarisierungen erhöhten sich bei

jedem Protokolldurchlauf um +10 mV, bis sie einen Endwert von 0 mV annahmen. Zwischen jedem Intervall lagen 5 s.

5.3.2.2.3 Spannungsabhängige Schaltkinetik in Bezug auf die Proliferationsdauer

Nachfolgend sind die Leitfähigkeiten der Natriumaktivierung und -inaktivierung hinsichtlich der Proliferationsdauer der Enterosphären dargestellt. Bisher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Proliferationszeiten Auswirkungen auf die spätere Entwicklung des dynamischen Schaltverhaltens der Natriumkanäle haben können.

Alle Leitfähigkeiten der Aktivierung wurden auf +10 mV normiert, die der Inaktivierung auf -60 mV. In Abbildung 32 A sind alle Leitfähigkeiten in Abhängigkeit ihrer Proliferationszeiten gegen die jeweilige Spannung aufgetragen. Gepunktete Kurven repräsentieren die Natriuminaktivierung, durchgezogene Kurven die Leitfähigkeiten der Natriumaktivierung. Zum besseren Verständnis wurden diese in Aa, Ab und Ac jeweils einzeln noch einmal dargestellt. Es ist zu erkennen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proliferationszeiten und der späteren Leitfähigkeiten der Zellen gibt. Die genauen Werte der halbmaximalen Spannungen der Aktivierung und Inaktivierung sowie der jeweiligen Steigungen sind Anhang C zu entnehmen. In Abbildung 32 B sind die Leitfähigkeiten unabhängig von ihrer Proliferationsdauer dargestellt. Auch hier sind im Vergleich zu den einzeln dargestellten Proliferationszeiten keine signifikanten Unterschiede festzustellen, sodass anzunehmen ist, dass die Dauer der Proliferation keinen direkten Einfluss auf die spätere Entwicklung der Schaltkinetiken der Natriumkanäle ausübt. Alle Kurven zeigen einen sogenannten Window-current, welcher definiert ist als der Überlappungsbereich der Aktivierung und Inaktivierung, in dem die Natriumkanäle immer geöffnet sind. Dieser Window-current unterliegt keiner signifikanten Änderung zwischen den jeweiligen Proliferationszeiten und befindet sich zwischen +40 und -10 mV.

Die halbmaximalen Spannungen und Steigungen der Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung in Abhängigkeit der Proliferationsdauer und aller in die Auswertung eingegangener Typ II PDCs, unabhängig von der Differenzierungszeit, sind Tabelle 28 im Anhang C zu entnehmen.

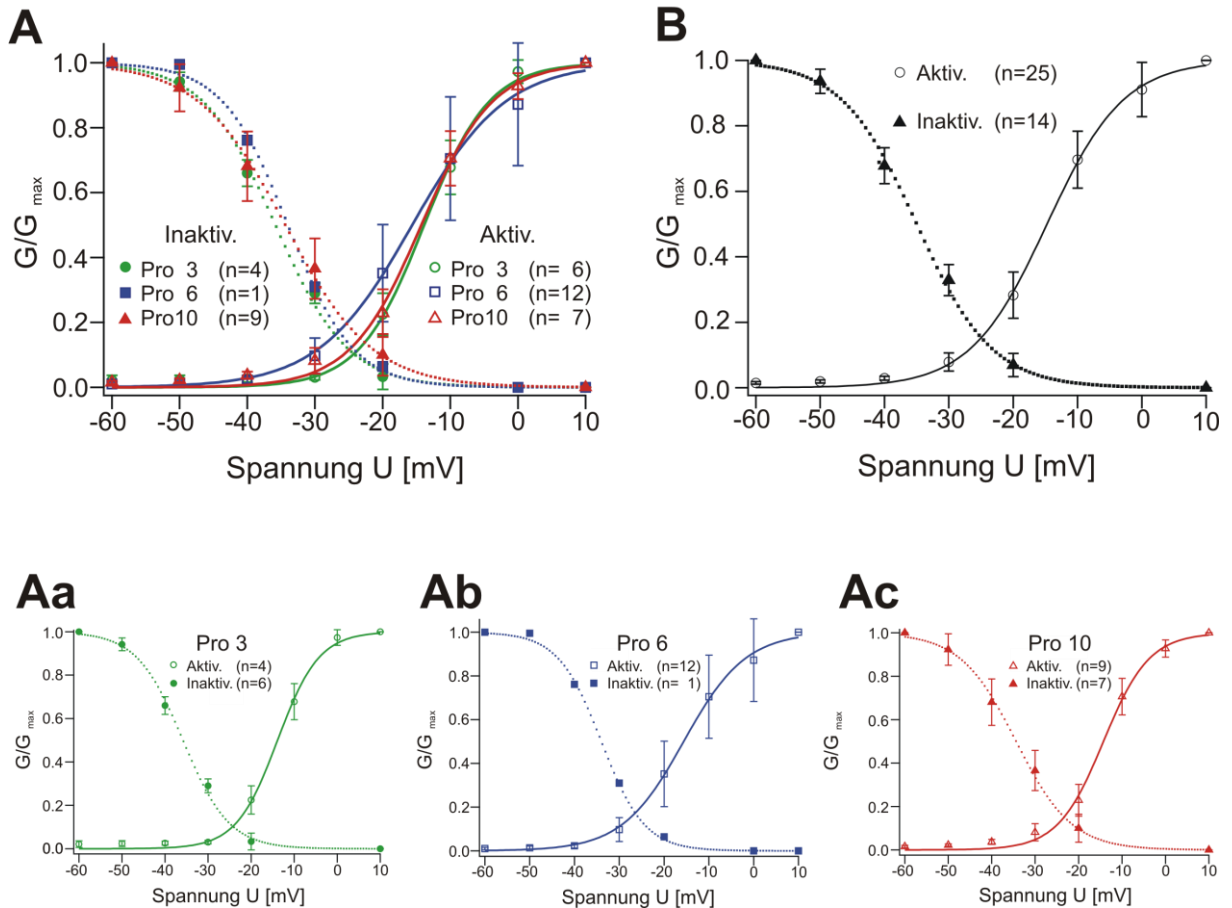


Abbildung 32: Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung in Abhängigkeit der Proliferationsdauer.

Dargestellt sind auf der Abszisse die normierten Leitfähigkeiten G / G_{\max} in Bezug auf die jeweilige Klemmspannung in mV, aufgetragen auf die Ordinate. Gestrichelte Kurven mit ausgefüllten Symbolen zeigen die Natriuminaktivierungskurven, durchgezogene Kurven mit offenen Symbolen die Natriumaktivierung. Die einzelnen Werte der Natriumaktivierung und -inaktivierung wurden mathematisch an eine sigmoide Gleichung angeglichen. Fehlerbalken repräsentieren den jeweiligen SEM.

In **A** sind die einzelnen Leitfähigkeiten in Abhängigkeit ihrer Proliferationsdauer dargestellt. 3 Tage in Proliferation (grün), 6 Tage in Proliferation (blau) und PDCs, die sich 10 Tage in Proliferation befanden, sind rot dargestellt. In **Aa**, **Ab** und **Ac** sind die Leitfähigkeiten der Natriumaktivierung und Inaktivierung jeweils einzeln nach ihrer Zeit in Proliferation aufgetragen.

Aa: Proliferationsdauer 3 Tage. Für die Aktivierung ($n=4$) konnte eine halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ von $-13,85 \pm 0,26$ mV und für die Inaktivierung ($n=6$) eine $V_{1/2}$ von $-35,82 \pm 2,81$ mV bestimmt werden.

Ab: Proliferationsdauer 6 Tage: Für die Aktivierung ($n=12$) konnte eine halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ von $-15,62 \pm 0,28$ mV und für die Inaktivierung ($n=1$) eine $V_{1/2}$ von -34 mV bestimmt werden.

Ac: Proliferationsdauer 10 Tage: Für die Aktivierung (n=9) konnte eine halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ von $-14,26 \pm 0,32$ mV und für die Inaktivierung (n=7) eine $V_{1/2}$ von $-34,38 \pm 2,4$ mV bestimmt werden.

B zeigt die Leitfähigkeiten aller in die Auswertung eingegangener PDCs unabhängig ihrer Proliferationszeit. Für die Aktivierung (n=25) konnte eine halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ von $-14,73 \pm 0,21$ mV und für die Inaktivierung (n=14) eine $V_{1/2}$ von $-34,80 \pm 2,64$ mV bestimmt werden.

Hinsichtlich der Natriumleitfähigkeiten in Bezug auf die Proliferationsdauer der Enterosphären gibt es keine signifikanten Unterschiede der halbmaximalen Spannungen der Natriumaktivierung und -inaktivierung. Bei allen Aktivierungs- und Inaktivierungskurven ist zwischen -40 und -10 mV ein Window-current zu erkennen.

5.3.2.2.4 Spannungsabhängige Schaltkinetik in Bezug auf die Differenzierungsdauer

In 5.3.2.2.4 konnte ein direkter Einfluss der Proliferationsdauer auf die Schaltkinetik der Natriumaktivierungs- und inaktivierung ausgeschlossen werden. Auch die Dauer der Differenzierung kann Einfluss auf die Schaltdynamik der sich differenzierenden Natriumkanäle haben, da sich diese nach der Proliferationsphase neu entwickeln müssen. Nachfolgend wird der Parameter der Differenzierungsdauer unabhängig von der Proliferationszeit betrachtet. Die Einteilung der Differenzierungszeiten gliedert sich in 7-13, 14-20 und 21-27 Tage. Für die Aktivierung wurden alle Leitfähigkeiten auf +10 mV (Abb. 33, durchgezogene Kurven), für die Inaktivierung auf eine Spannung von -60 mV (gepunktete Kurven) normiert. Hinsichtlich der Natriumleitfähigkeiten in Bezug auf die Differenzierungsdauer gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den halbmaximalen Spannungen der Natriumaktivierung und -inaktivierung. Bei allen Aktivierungs- und Inaktivierungskurven ist zwischen -40 und -10 mV ein Window-current zu erkennen.

Die exakten halbmaximalen Spannungen und Steigungen der Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung, in Abhängigkeit der Differenzierungsdauer und aller in die Auswertung eingegangener Typ II PDCs, unabhängig von ihrer Proliferationszeit, sind Tabelle 29 im Anhang C zu entnehmen.

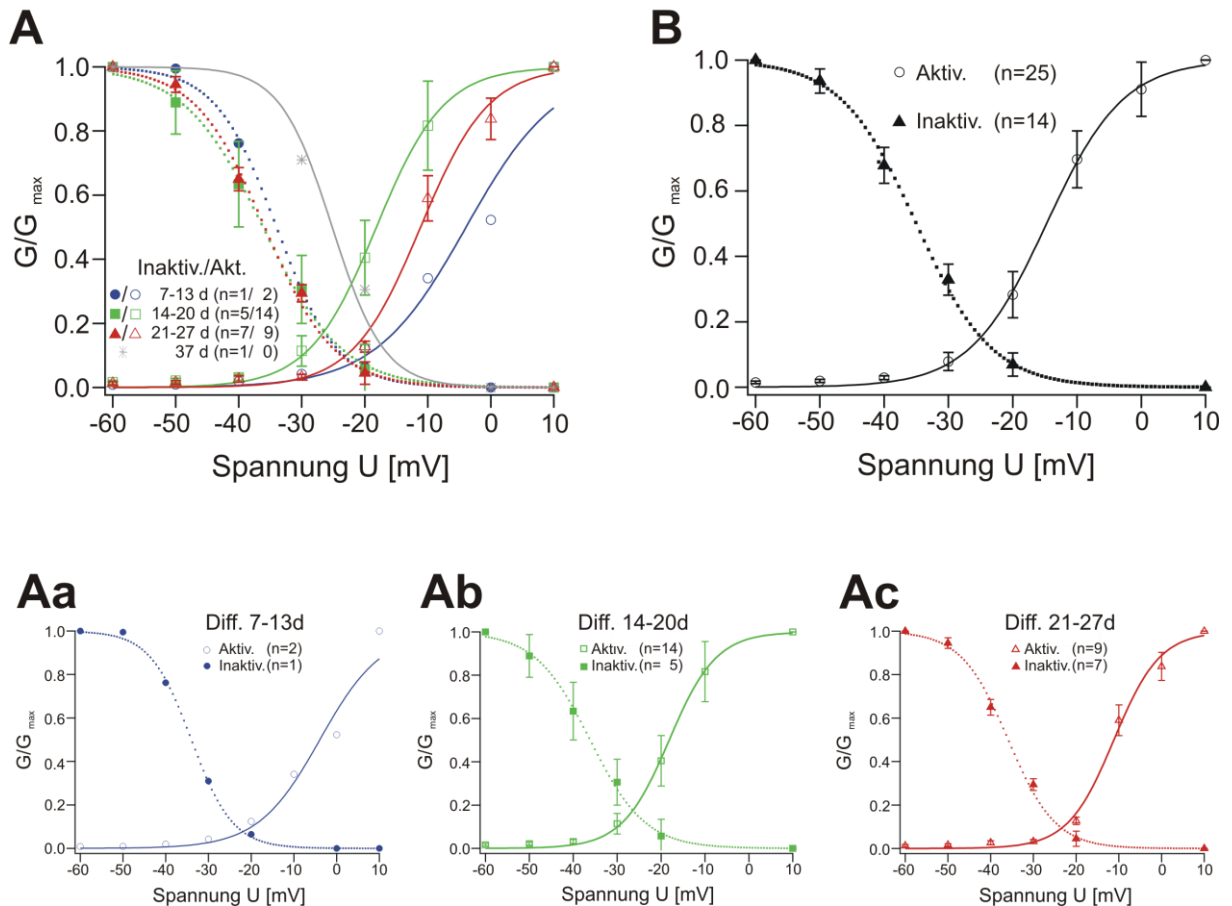


Abbildung 33: Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung in Abhängigkeit der Differenzierungsdauer.

Dargestellt sind auf der Abszisse die normierten Leitfähigkeiten G / G_{max} in Bezug auf die jeweilige Klemmspannung in mV (aufgetragen auf die Ordinate). Gestrichelte Kurven mit ausgefüllten Symbolen zeigen die Natriuminaktivierungskurven, durchgezogene Kurven mit offenen Symbolen die Natriumaktivierung. Die einzelnen Werte der Natriumaktivierung und -inaktivierung wurden mathematisch an eine sigmoide Gleichung angeglichen. Fehlerbalken repräsentieren den jeweiligen SEM.

In **A** sind die einzelnen Leitfähigkeiten in Abhängigkeit der Zeit in Differenzierung dargestellt. 7-13 Tage Differenzierung (blau), 14-20 Tage in Differenzierung (grün) und PDCs, die 21-27 Tage differenziert wurden, sind rot dargestellt. In **Aa**, **Ab** und **Ac** sind die Leitfähigkeiten der Natriumaktivierung und -Inaktivierung jeweils einzeln nach ihrer Differenzierungsdauer dargestellt.

Aa: Differenzierung 7-13 Tage: Für die Aktivierung ($n=2$) konnte eine halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ von $-3,92 \pm 1,07$ mV und für die Inaktivierung ($n=1$) eine $V_{1/2}$ von $-34 \pm 2,17$ mV bestimmt werden.

Ab: Differenzierung 14-20 Tage: Für die Aktivierung ($n=14$) konnte eine halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ von $-18,16 \pm 0,29$ mV und für die Inaktivierung ($n=5$) eine $V_{1/2}$ von $-36,13 \pm 1,83$ mV bestimmt werden.

Ac: Differenzierung 21-27 Tage: Für die Aktivierung (n=9) konnte eine halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ von $-11,15 \pm 0,42$ mV und für die Inaktivierung (n=7) eine $V_{1/2}$ von $-35,88 \pm 2,84$ mV bestimmt werden.

B zeigt die Leitfähigkeiten aller in die Auswertung eingegangener PDCs unabhängig ihrer Zeit in Differenzierung. Für die Aktivierung (n=25) konnte eine halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ von $-14,73 \pm 0,21$ mV und für die Inaktivierung (n=14) eine $V_{1/2}$ von $-34,80 \pm 2,64$ mV bestimmt werden.

5.3.2.2.5 Refraktärzeit der Natriumkanäle

Hinsichtlich der Ausbildung von natriumgetragenen Aktionspotenzialen ist eine Bestimmung der Refraktärzeit der Natriumkanäle besonders wichtig. Durch das dynamische Schaltverhalten der Natriumkanäle wird nicht nur das Auslösen eines Aktionspotenzials beeinflusst, sondern auch das Aktionspotenzialmuster, im dynamischen Zusammenspiel mit anderen Kationenkanälen, maßgeblich determiniert. Abbildung 34 A zeigt das zur Bestimmung der Refraktärzeit verwendete Paar-Puls-Protokoll, bei welchem die Zelle zunächst, ausgehend von einem Ruhehaltepotenzial von -70 mV, für 300 ms bei -100 mV hyperpolarisiert wird. Anschließend erfolgen zwei Depolarisierungssprünge auf -10 mV für je 5 ms mit einer Pause von 4,5 ms, wobei sich bei jedem Durchlauf das Zeitintervall zwischen beiden Depolarisierungen um je 3 ms erhöht und somit die Anzahl möglich aktivierbarer Natriumkanäle erhöhen soll.

Aa zeigt exemplarisch jede dritte Stromantwort einer Zelle auf das Paar-Puls-Protokoll. Da die erste Depolarisierung zeitlich konstant bleibt und die Stromantworten der Zelle je Durchlauf übereinander gelagert werden, erscheint die erste Stromamplitude am größten. Die zweite Stromamplitude ist am kleinsten, da nach dem ersten Puls die meisten Natriumkanäle im inaktivierten Zustand vorliegen, die darauffolgenden Stromamplituden nehmen langsam zu. Dies lässt drauf schließen, dass sich mit zunehmendem Zeitabstand zwischen zwei Depolarisierungen mehr Natriumkanäle aus der Inaktivierung erholen und wieder zur Verfügung stehen. Bei genauerer Betrachtung sieht man, dass die Stromamplitude als Antwort auf die erste Depolarisierung nicht konstant ist. In B ist der Quotient aus den Spitzenstromamplituden jedes Durchlaufs gegen das Zeitintervall aufgetragen. Zu erkennen ist, dass die gemessenen Zellen (n=9) solche Natriumkanäle besitzen, welche sehr schnell aus der inaktiven in die aktive Konformation wechseln können und bereits nach 4,5 ms wieder vollständig aktivierbar sind. Aufgrund dieser Tatsache lässt sich die Kurve nicht an eine exponentielle Funktion anpassen und aus diesen Daten

somit keine Zeitkonstante τ ermitteln, da sich die Kanäle nach 3 ms bereits schon wieder im aktivierbaren Zustand befanden.

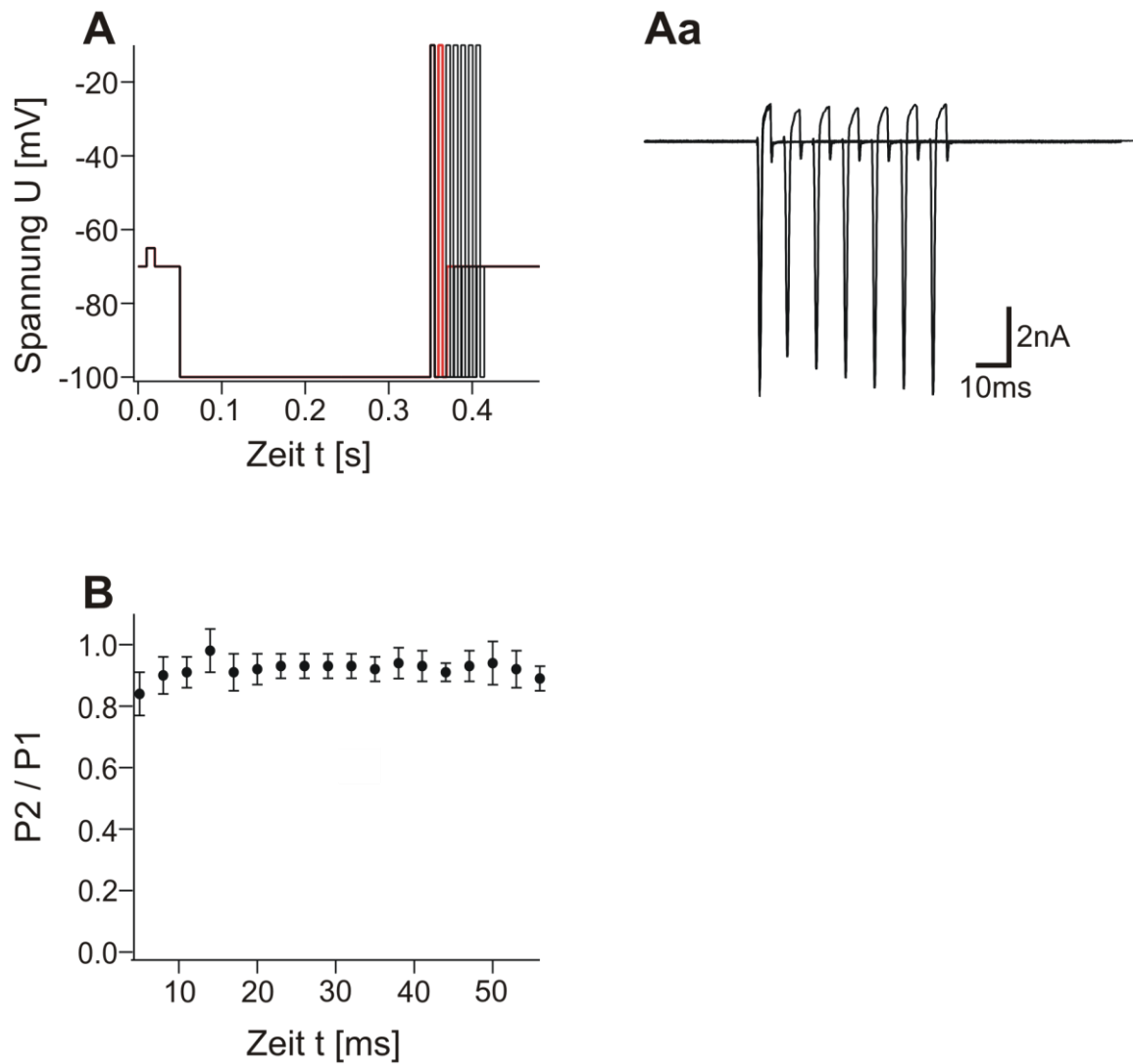


Abbildung 34: Refraktärzeit der Natriumkanäle.

A: Paar-Puls-Protokoll zur Ermittlung der Erholung der Natriumkanäle aus der Inaktivierung. Zur besseren Übersicht ist nur jeder 3. Durchlauf dargestellt. Ausgehend von einem Ruhehaltepotenzial von -70 mV wurde die Zelle bei -100 mV für 300 ms hyperpolarisiert. Anschließend erfolgte ein 5 ms langer Depolarisierungspuls auf -10 mV gefolgt von einem Rücksprung auf -100 mV für 4,5 ms. Daraufhin erfolgte eine erneute Depolarisierung auf -10 mV für 5 ms, ein Rücksprung auf -100 mV und anschließend wurde die Zelle beim Ruhehaltepotenzial geklemmt. Bei jedem der 18 Intervalle erhöhte sich der Zeitabstand zwischen den zwei Depolarisierungspulsen auf -10 mV um 3 ms. Die Pause zwischen jedem Intervall betrug 8 s.

Der erste Spannungspuls ist zur besseren Darstellung rot dargestellt. In **Aa** sind exemplarisch ausgewählte Stromantworten (übereinander gelagert) einer PDC auf das Paar-Puls-Protokoll dargestellt. Durch Überlagerung der Stromspuren scheinen die auf den ersten Puls folgenden Stromamplituden größer zu werden und sich die Natriumkanäle somit aus ihrer Inaktivierung zu erholen. Die erste Stromamplitude variiert jedoch bei jedem Durchlauf, sodass sich kein typisches Refraktärverhalten im angegebenen Zeitintervall ergibt (**B**). **B** zeigt das Verhältnis der Stromantwort des zweiten Pulses zum ersten Depolarisierungspuls. Aus den vorliegenden Daten ($n=9$) konnte keine Zeitkonstante τ berechnet werden. Die Kanäle befanden sich bereits nach 3 ms schon wieder im aktivierbaren Zustand. Eine Anpassung an eine exponentielle Funktion war nicht möglich.

5.3.2.2.6 Pharmakologische Untersuchung der Natriumkanäle

Der Hauptfokus der in dieser Arbeit durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen lag auf TTX-sensitiven und TTX-insensitiven Natriumkanaltypen, um herauszufinden, wie die Natriumkanäle der progenitor-abgeleiteten Zellen auf die Gabe von TTX in verschiedenen Konzentrationen reagieren und ob zwischen TTX-sensitiven und TTX-insensitiven Natriumkanälen unterschieden werden kann. Das TTX wurde, wie bereits bei den adulten murinen Zellen, kumulativ in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 3 μ M auf die Zellen gegeben. Zur Aktivierung wurde dasselbe Spannungsprotokoll wie in Abb. 31 A verwendet. Zur Ermittlung der TTX-Wirkung auf die Natriumkanäle wurde eine Depolarisation auf +10 mV zur Auswertung herangezogen, sodass durch die vorangegangenen Spannungen möglichst viele Natriumkanäle aktiviert wurden. Abb. 35 A zeigt die Stromamplitude von -1,7 nA einer Zelle (Proliferation 6d, DIV 26) ohne Substanzeinwirkung. Durch Applikation von 3 μ M TTX reduzierte sich der Reststrom auf 20 %. In Schaubild B ist der Reststrom nach Behandlung mit TTX in Bezug auf den Kontrollstrom aufgetragen. Bei Gabe von 1 nM TTX verblieb ein Reststrom von 75,6 %, bei 10 nM 55% und bei 100 nM 29,3 %. Zu sehen ist ein Rückgang des verbleibenden Stroms mit Erhöhung der TTX-Dosis. Da die Typ II PDCs während der Messungen sehr instabil waren und pro TTX Konzentration jeweils nur ein Datenpunkt vorlag, konnte kein IC_{50} der PDC Typ II Zellen ermittelt werden. Deshalb konnten auch die Proliferations- und Differenzierungszeiten der gemessenen Zellen nicht berücksichtigt werden.

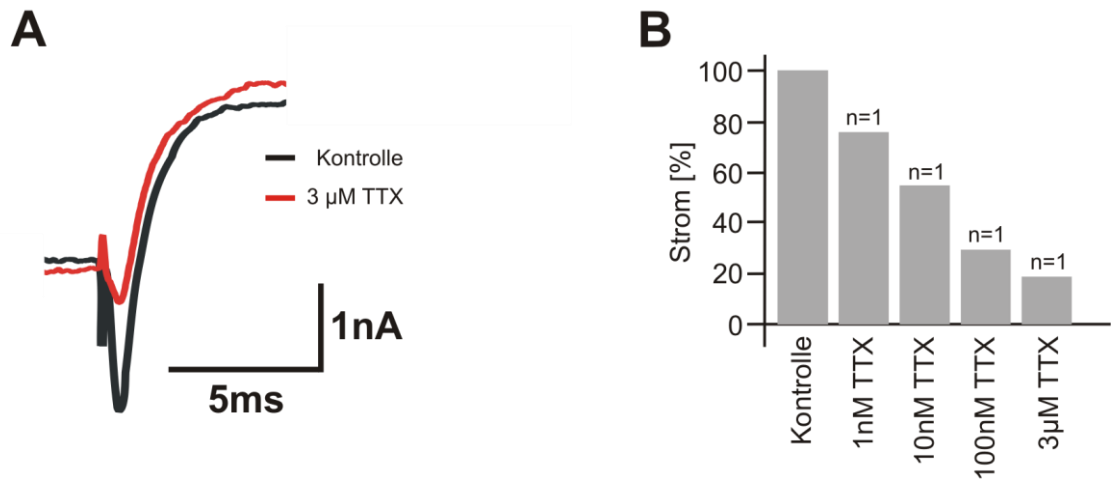


Abbildung 35: Pharmakologische Untersuchung der Natriumkanäle mit Tetrodotoxin.

A zeigt die Stromantwort einer PDC (Proliferation 6d, DIV 26) auf eine Depolarisierung von +10 mV ausgehend von einer Hyperpolarisation von -120 mV. Der native Strom (schwarz) verringert sich bei Zugabe von 3 μM TTX (rot) um 80,6 %.

In B ist der Reststrom nach TTX-Behandlung in Bezug auf den Kontrollstrom in % angegeben. Zu erkennen ist, dass bei Erhöhung der TTX-Konzentration der verbleibende Natriumstrom zunehmend geringer wurde. Da pro TTX Konzentration jeweils nur ein Datenpunkt vorlag, wurden die Proliferations- und Differenzierungszeiten nicht berücksichtigt.

5.3.2.3 Natriumgetragene Aktionspotenziale

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, ist für die Regulation der Darmmuskulatur und somit für die Steuerung der Darmmotilität ein funktionierendes neuronales Netzwerk essenziell. Grundvoraussetzung hierfür ist, dass neuronale Zellen erregbar und dazu in der Lage sind, Aktionspotenziale auslösen zu können. Für eine optimale Regulation sind außerdem verschiedene Aktionspotenzialmuster erforderlich, um eine fein abgestimmte Modellierung der Reizweiterleitung zu ermöglichen.

5.3.2.3.1 AH-/ S-Neurone und Aktionspotenzialmuster

Bereits in den Kapiteln 5.1.3 und 5.2.3 wurde beschrieben, dass Neurone auf dieselben Strompulse mit unterschiedlichen Aktionspotenzialmustern reagieren können. Je nach Neuronentyp und Bestimmung innerhalb des myenterischen Plexus werden Aktionspotenziale phasisch oder tonisch ausgelöst.

Auch bei den PDC Typ II Zellen konnte zwischen AH-/ S-Neuronen und phasisch und tonisch feuernenden Neuronen unterschieden werden. Phasische Neurone (n=4), welche auf einen 1500 ms andauernden Spannungspuls mit der Ausbildung eines APs zu Beginn der Depolarisation reagierten und tonisch feuernende Neurone (n=6), welche auf denselben Spannungspuls \geq drei APs generierten (Abb. 36 und 37 B). Im Gegensatz zu den adulten murinen Einzelzellen konnte bei den PDCs keine synaptische Aktivität nachgewiesen werden. Wie bereits bei den adulten murinen Neuronen war es nicht möglich anhand der Form der Aktionspotenziale zwischen S- und AH-Neuronen eindeutig unterscheiden zu können, d.h. die charakteristische Nachhyperpolarisationsphase war nicht immer eindeutig zu sehen. Bei genauerer Betrachtung der ersten Ableitung des Aktionspotenzials stellte sich heraus, dass alle tonisch feuernenden Neurone (n=6) die AH-Neuronen typische Kalziumflexion während der Repolarisation zeigten. In einzelnen Zellen wurde ein Voltage-Sag gemessen, jedoch konnte das Auftreten des Voltage-Sag nicht mit der Dauer der Kultivierung in Korrelation gebracht werden. Morphologisch war während der Messungen kein Unterschied zwischen den einzelnen Zellen zu erkennen. Die Zellen, welche keine Kalzium-Flexion zeigten, wurden als S-Neurone klassifiziert (n=4).

Somit wurden bei den PDC Typ II 1,5-mal mehr AH-Neurone als S-Neurone gemessen (Verhältnis 1,5 : 1). Insgesamt entsprachen sieben von 10 PDCs Typ II den in Tabelle 1 aufgestellten Messparametern.

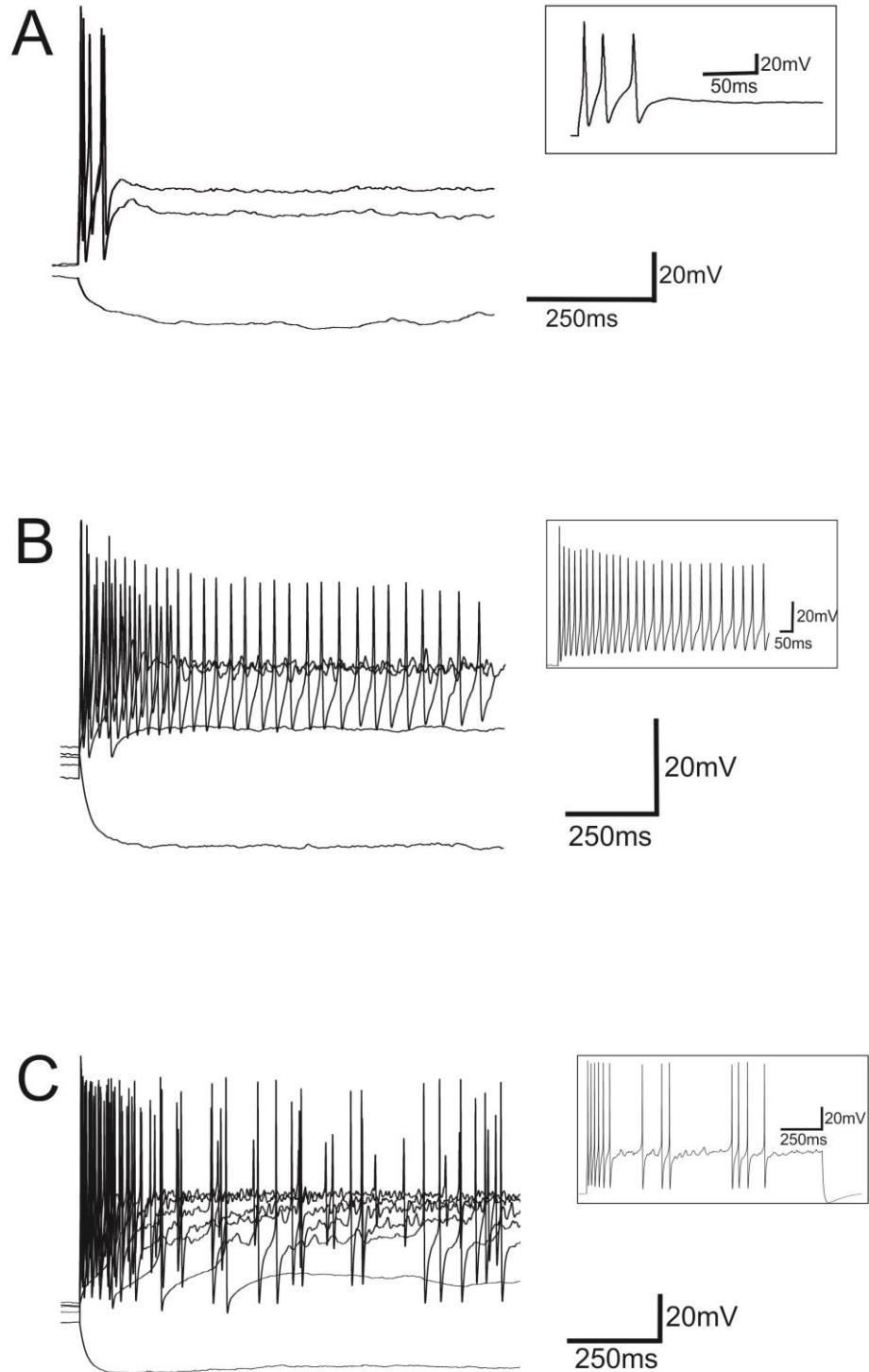


Abbildung 36: Vergleich verschiedener tonischer Aktionspotenzialmuster muriner progenitor-abgeleiteter Zellen.

Zwei bzw. drei verschiedene Aktionspotenzialmuster von PDCs als Antwort auf dieselben 1500 ms andauernden hyper- und depolarisierenden Strompulse im Current-clamp Modus.

Abbildung **A** zeigt tonische Potenzialantworten einer murinen PDC (Proliferation 9 d, DIV 24) auf hyper- und depolarisierende Strompulse. Über die gesamte Länge des Pulses feuert dieses Neuron drei

Aktionspotenziale zu Beginn des depolarisierenden Pulses. Das Einschaltbild zeigt die Potenzialantwort auf einen Strompuls von 200 pA. Das Neuron in Abbildung **B** (Proliferation 9 d, DIV 24) feuert auf dieselben depolarisierenden Strompulse **tonisch** Aktionspotenziale über die gesamte Länge der Pulse. Das Einschaltbild zeigt ebenfalls die Potenzialantwort auf einen depolarisierenden Strompuls von 200 pA.

Abbildung **C** zeigt eine Besonderheit der AP-Antworten. Dieses Neuron (Proliferation 6 d, DIV 24) feuerte zwar tonisch Aktionspotenziale, jedoch nicht gleichmäßig über die gesamte Zeit des Strompulses. Aufgrund der Zeitabstände zwischen den einzelnen APs, scheint es als hätte es eine Art Taktung.

In allen drei Abbildungen sind nur ausgewählte Potenzialantworten dargestellt.

Das Verhältnis tonisch zu phasisch feuernenden Neuronen (und somit auch von AH- zu S-Neuronen) lag bei den PDCs bei 1:1,5 (n=10).

5.3.2.3.2 Aktionspotenzial Analyse

Auch bei den PDCs wurden, wie bereits in Kapitel 5.2.3.2 beschrieben, nach näherer Betrachtung nur die ersten fünf hyper-, - bzw. depolarisierenden Strompulse zur Auswertung herangezogen (-200 pA, -100 pA, 0 pA, +100 pA, +200 pA).

Um die APs untereinander und mit den adulten murinen Einzelzellen vergleichen zu können, wurde die Breite und Größe, sowie die Zeit die zwischen zwei APs liegt, ermittelt. Auch bei den PDCs vom Typ II gab es keine Korrelation zwischen den AP-Mustern (phasisch und tonisch) und der Zeit in Proliferation bzw. Differenzierung. In n=6 der Zellen war mittels der ersten Ableitung die für die AH-Neurone klassische Kalzium Flexion in der fallenden Phase des APs zu sehen. Die zweite Hyperpolarisationsphase zeigte sich in keiner der gemessenen Zellen.

In drei der 10 ausgewerteten Zellen konnte ein Voltage-Sag gemessen werden, in zwei Zellen zeigte sich zusätzlich zu diesem ein entsprechender Rebound am Ende des hyperpolarisierenden Strompulses.

Phasische Aktionspotenziale

Insgesamt wurden vier phasisch feuernende Neurone gemessen, wovon zwei während der Messung stabil genug waren, um in die Auswertung einzugehen. Eine Kalzium-Flexion in der Repolarisationsphase konnte bei der Bestimmung der ersten Ableitung der Aktionspotenziale, in keinem der vier phasisch feuernenden Neurone detektiert werden. Beide ausgewerteten Neurone zeigten einen Voltage-Sag (Abb. 37 A).

Die Breite eines Aktionspotenzials wurde wie in Kapitel 4.2.4.2 beschrieben anhand der Schnittstellenbestimmung ermittelt. Die Breite jedes Aktionspotenzials lag bei $4,4 \pm 0,9$ ms (Anzahl APs n=5), die Maximalamplitude bei $70,4 \pm 4,3$ mV (Anzahl APs n=5) (diese Werte sind in Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt).

Tonische Aktionspotenziale

Zur Gruppe der tonischen Aktionspotenziale konnten sechs Zellen gezählt werden. Fünf dieser Neurone entsprachen den Messkriterien in Tabelle 1 und gingen somit in die Auswertung mit ein.

Eine Kalzium-Flexion in der Repolarisationsphase konnte durch Ermittlung der ersten Ableitung der Aktionspotenziale in allen tonisch feuernenden Neuronen detektiert werden (Abb. 37), ein Voltage-Sag war in drei der Zellen sichtbar.

Auch bei den tonisch aktiven Neuronen wurde die Breite des APs mithilfe der Schnittstellenbestimmung ermittelt und betrug $3,9 \pm 0,2$ ms (n=78). Die durchschnittliche Maximalamplitude der Neurone lag bei $92,7 \pm 2$ mV (n=59).

Die Zeit, welche zwischen zwei Aktionspotenzialen verging, lag jeweils bei $46,4 \pm 4,2$ ms (n=42). Die nicht signifikante mittlere Attenuierung der Maximalamplituden betrug $17,1 \pm 5,6$ % (diese Werte sind in Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt).

Zwei der tonisch feuernenden Neurone waren während der Messung stabil genug, um ihnen $3 \mu\text{M}$ TTX zu applizieren. In n=1 konnte danach kein Aktionspotenzial mehr ausgelöst werden, bei n=1 verringerte sich die Maximalamplitude um 5 %. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Zelle TTX-sensitive, eine TTX-insensitive Natriumkanäle besaß.

Tabelle 5: Vergleich progenitor-abgeleiteter PDC II Neurone bezüglich AP-Breite, Maximalamplitude und Zeit zwischen zwei APs.

	AH- Neurone (tonisch)	S-Neurone (phasisch)
Breite AP (ms)	3,9 ± 0,2	4,4 ± 0,9
Max. Amplitude (mV)	92,7 ± 2	70,4 ± 4,3
Zeit zwischen zwei APs (ms)	46,4 ± 4,2	/
Mittlere Attenuierung der Maximalamplitude (%)	17,1 ± 5,6	/

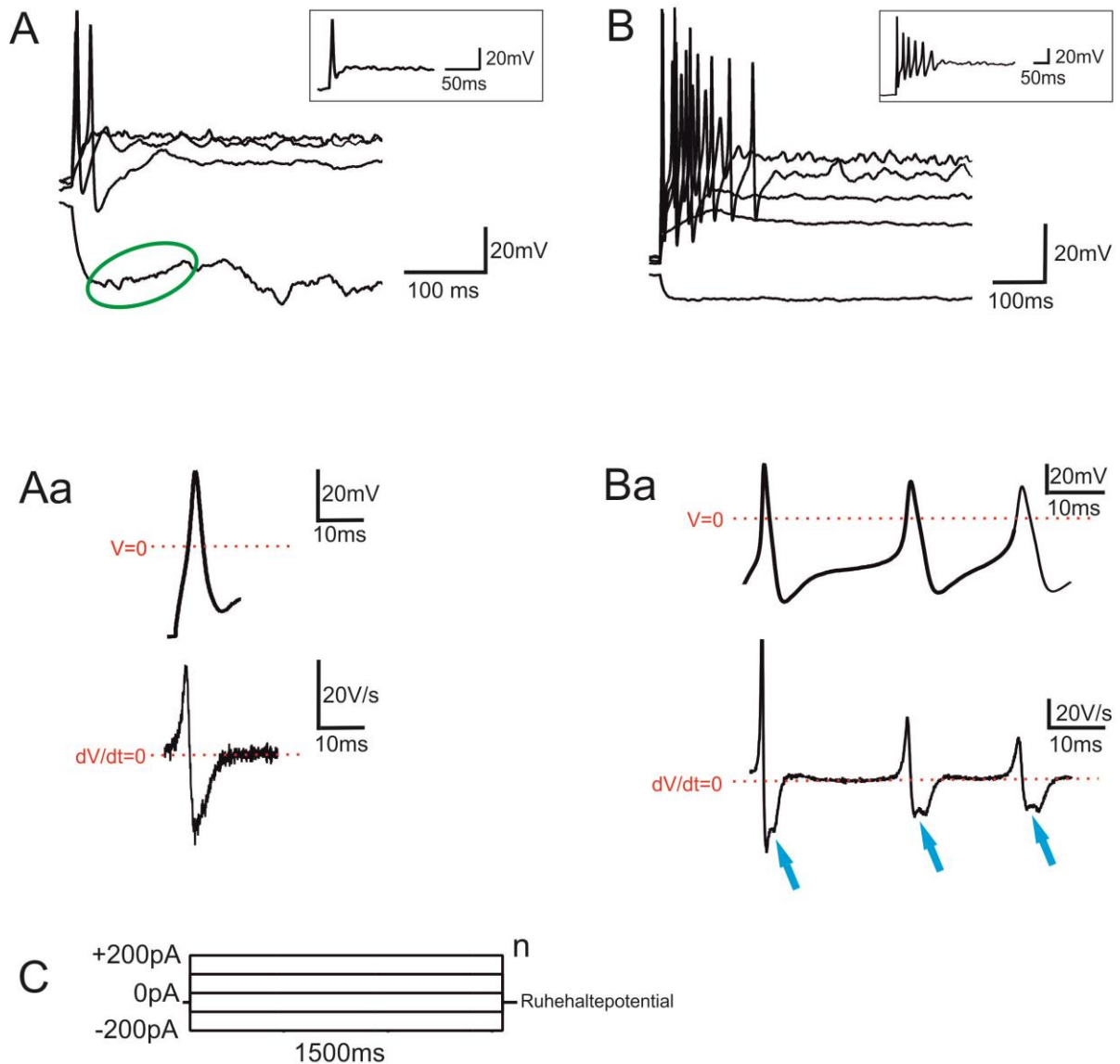


Abbildung 37: Übersicht phasisch und tonisch feuender PDC Typ II Zellen mit entsprechender Differenzialgleichung zur Bestimmung der Kalzium-Flexion.

Abbildung **A** zeigt **phasische** Potenzialantworten eines S-Neurons (Proliferation 6 d, DIV 18) auf hyper- und depolarisierende Strompulse. Über die gesamte Länge des Pulses feuert dieses Neuron nur ein Aktionspotenzial. Das Einschaltbild zeigt das Aktionspotenzial auf einen Strompuls von +200 pA. Oben in **Aa** ist dieses Aktionspotenzial vergrößert dargestellt. Zur besseren Bestimmung des Vorhandenseins der Kalzium-Flexion wurde die erste Differenzialgleichung bestimmt, die typische transiente Kalzium-Repolarisation fehlt im S-Neuron. In **B** ist das Aktionspotenzial eines tonisch feuenden AH-Neurons (Proliferation 6 d, DIV 18) auf dasselbe Stromprotokoll wie in **(C)** dargestellt, der Voltage-Sag in der Hyperpolarisation fehlt. Das Einschaltbild zeigt das Aktionspotenzial auf eine Stromapplikation von +200 pA. In Abbildung **Ba** wurde dieses AP vergrößert dargestellt und durch die Bestimmung der ersten Ableitung die transiente Kalzium-Flexion der Repolarisation sichtbar gemacht (blauer Pfeil). In beiden

Abbildungen sind nur ausgewählte Potenzialantworten dargestellt, das Einschaltbild zeigt jeweils das Aktionspotenzial auf einen +200 pA Strompuls. Das Stromprotokoll ist in **C** dargestellt.

Das Verhältnis von S- zu AH-Neuronen lag bei den PDC II bei 1 : 1,5.

5.3.2.4 Elektrophysiologische Charakterisierung der Kaliumkanäle

Im Folgenden werden die auswärtsrektifizierenden Kationen- und Kaliumkanäle dargestellt. Eine genauere elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchung war aufgrund der Instabilität der Zellen während der Messungen nicht möglich. Des Weiteren war eine vollständige Inhibition der auswärtsgerichteten Ströme mittels Ionenkanalblockern nicht zu 100% gewährleistet, sodass die Analyse eines einzelnen Kanals, beispielsweise mittels Subtraktionsverfahren, nicht anwendbar war. In Folge dieser Tatsache und dem Hauptfokus dieser Arbeit auf den spannungsgesteuerten Natriumkanälen folgend, wurde auf eine eingehende Analyse verzichtet, sodass die vorliegenden Ergebnisse nur deskriptiv sind.

Wie bereits in Kapitel 5.3.2.1 beschrieben, wurde in Typ I PDCs neben anderen auswärtsrektifizierenden Kationenkanälen der neuronenspezifische I_A -Strom gemessen. Dieser konnte ebenfalls in Typ II PDCs mit Natriumstrom, als auch in solchen ohne detektiert werden. Da der Hauptfokus dieser Arbeit auf der Analyse der Natriumkanäle lag, wurde dasselbe Spannungsprotokoll wie in allen anderen Kapiteln verwendet. Die Zellen wurden alle bei -70 mV gehalten, bevor sie für 100 ms bei -120 mV hyperpolarisiert wurden. Diesem Hyperpolarisierungspuls folgten 16 Mal 250 ms lange Hyper-, - und Depolarisationen, welche sich bei jedem Zyklus um +10 mV erhöhten, sodass die Zelle ab einem Membranpotenzial von +60 mV depolarisiert wurde. Exemplarisch ist dieses Protokoll dem Einschaltbild 1 aus Abbildung 38 zu entnehmen. Da es sich in jeder gemessenen Zelle um eine Vielzahl von auswärtsrektifizierenden Kationenkanälen handelt, die bei dem gleichen Membranpotenzial aktiviert sind, ist es ohne pharmakologische Untersuchungen nicht möglich eine genaue Aussage über das Verhältnis von Zellen mit I_A zu Zellen ohne I_A zu machen. Den Ergebnissen aus Abbildung 38 ist zu entnehmen, dass die Kationenströme bei einem Membranpotenzial unter -40 mV in der inaktiven Form vorliegen und zwischen -40 und -20 mV aktiviert werden. Für die Analyse wurde der Gesamtstrom zwischen 0 und 120 ms gemessen und auf 0 mV normalisiert. In Abbildung 38 D werden die Werte der Typ I PDCs mit denen der Typ II PDCs ohne Natrium verglichen. Die Messwerte der Typ II PDCs wurden mathematisch an eine

sigmoide Gleichung angeglichen. Deutlich zu erkennen ist, dass sich die einzelnen PDCs in ihrem Aktivierungsverhalten nicht voneinander unterscheiden. In E der Abbildung 38 ist zusätzlich der analysierte Strom von Typ II PDCs mit Natrium aufgetragen. Dieser weist einen großen mittleren Standardfehler aufgrund des Natriumstromes auf, nähert sich dennoch derselben sigmoidalen Kurve an.

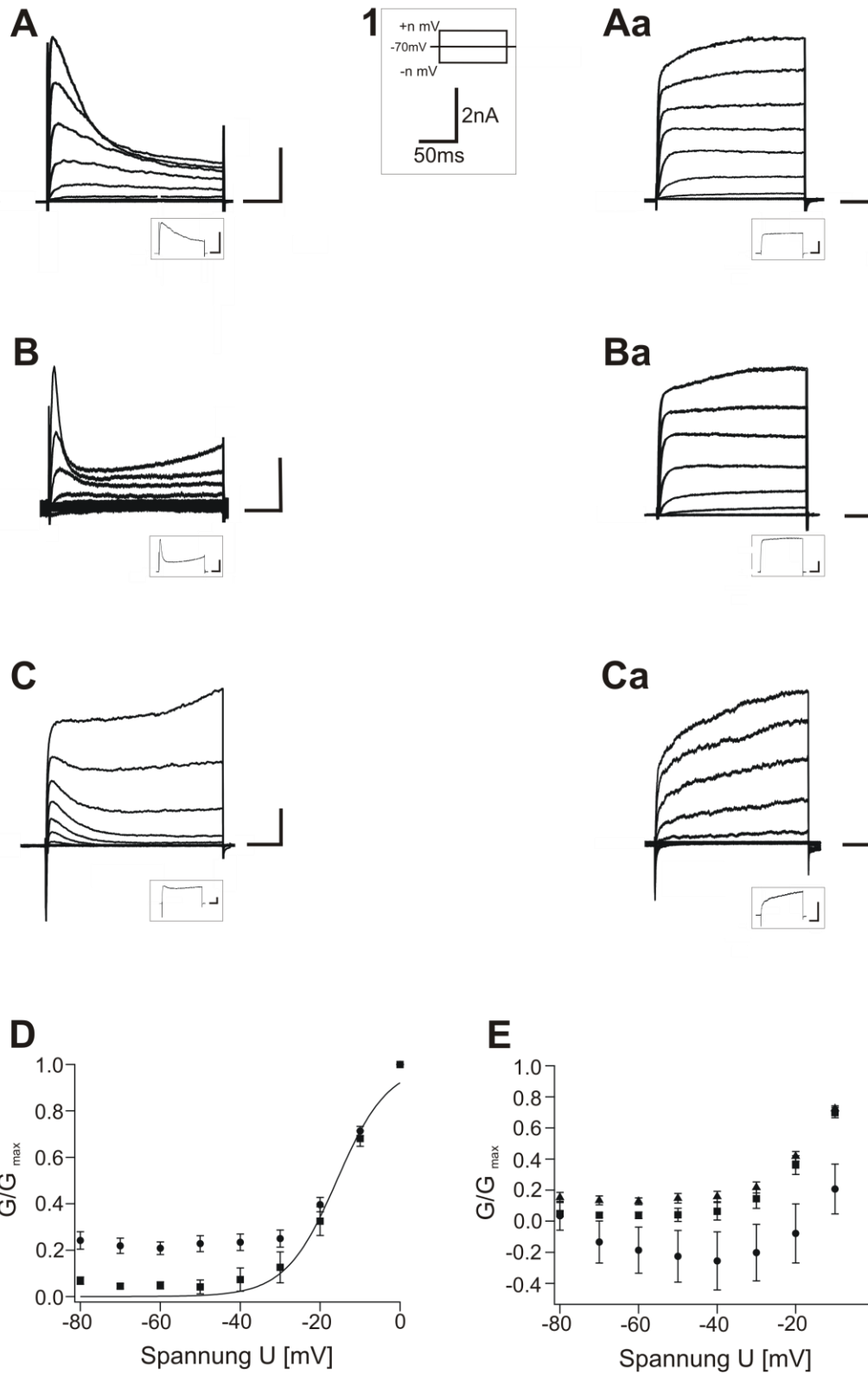


Abbildung 38: Vergleich zweier Stromantworten auf dasselbe Spannungsprotokoll von Typ I PDCs und Typ II PDCs mit und ohne Natriumstrom.

Einschaltbild 1 zeigt das angewendete Spannungsprotokoll und den entsprechenden Maßstab eines jeden Strom-Einschaltbildes. Die Einschaltbilder entsprechen jeweils einer Stromantwort bei einer Depolarisierung auf +10 mV.

A und **Aa** zeigen die Stromantworten einer Typ I PDC. (**A**: Proliferation 9 d, *DIV* 79, **Aa**: Proliferation 9 d, *DIV* 29). **B** und **Ba** sind die Stromantworten einer Typ II PDC ohne Natrium (beide Zellen: Proliferation 9 d, *DIV* 16) und **C** und **Ca** die jeweiligen Antworten einer natriumpositiven Typ II PDC. (**C**: Proliferation 3 d, *DIV* 23, **Ca**: Proliferation 9 d, *DIV* 17) In **D** sind die auf 0mV normierten Werte der Typ I PDCs (Kreise, n=31) und Typ II PDCs ohne Natriumstrom (Kästchen, n=11) verglichen. Die Werte der Typ II PDCs sind mathematisch an eine sigmoide Gleichung angeglichen. In **E** sind zusätzlich die auf 0mV normalisierten Werte der Typ II PDCs mit Natriumstrom (Dreiecke, n=25) aufgetragen.

6 Diskussion

Gastrointestinale Erkrankungen mit eingeschränkter neuronaler Funktion bis hin zum völligen Verlust neuronaler Besiedlung, als Folge von Entwicklungsstörungen während der Embryogenese, wie z.B. die Hirschsprung-Erkrankung sind bis heute nur schwer zu kontrollieren. In den meisten Fällen ist die Behandlung betroffener Personen nur unbefriedigend und einhergehend mit zahlreichen Komplikationen und einer erheblichen Minderung der Lebensqualität (Granstrom *et al.*, 2015; Rintala und Pakarinen, 2010 und 2012; Tsuji *et al.*, 1999). Je nach Ausprägung der Hirschsprung-Erkrankung bzw. je nach Art der Aganglionose kann es dazu führen, dass Betroffene zeitlebens einen künstlichen Darmausgang bekommen, sich nur noch parenteral ernähren können oder eine Teilresektion des Darms durchgeführt werden muss (Ruttenstock und Puri, 2009; Sauvat *et al.*, 2008).

Zur Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten mit deutlich besserer Langzeitprognose und einer damit einhergehenden Verbesserung der Lebensqualität wird nach neuen Therapieansätzen gesucht. Ein besonders vielversprechender Ansatz ist eine zellbasierte Therapie basierend auf enterischen Progenitorzellen (Almond *et al.*, 2007; Metzger *et al.*, 2009a und 2000b; Hotta *et al.*, 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals elektrophysiologische Funktionalität von murinen progenitor-abgeleiteten Zellen *in vitro* nachgewiesen werden. Enterische Progenitorzellen, als Basis für ein autologes Transplantat, haben unter den richtigen Bedingungen *in vitro* das Potenzial, sich hin zu funktionalen enterischen Neuronen entwickeln zu können. Dies bietet die Möglichkeit die Progenitorzellen direkt auf einem geeigneten Zellträger, wie beispielsweise einem Kollagenträger, *in vitro* zu differenzieren und so direkt an aganglionäre Darmbereiche transplantieren zu können. Ein großer Vorteil dieses Therapieansatzes, als Grundidee des vorliegenden Verbundprojektes ist es, dass zellbesiedelte Kollagenträger den Bestimmungsort der Zellen innerhalb des Darms bereits vorgeben und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit gewährleistet wird, dass diese Zellen tatsächlich an den aganglionären Bereichen verbleiben. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber direkt transplantierten progenitor-abgeleiteter Zellen, bei welchen die Migration und Differenzierung *in vivo* nicht gesteuert werden kann und eine Besiedlung enterischer neuronaler Zellen in aganglionären Darmabschnitten nicht sichergestellt ist.

6.1 Potenzial postnataler enterischer Progenitorzellen für einen zellbasierten Therapieansatz

Für einen zellbasierten Therapieansatz gibt es verschiedene Möglichkeiten, bestehend aus verschiedenen Zellquellen (Wilkinson *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte durch BrdU-Markierung der proliferierenden Neurosphären erstmals der Nachweis erbracht werden, dass natriumpositive Zellen tatsächlich *in vitro* aus Progenitorzellen entstanden sind und nicht aufgrund einer Verunreinigung während der Isolierung mit in Kultur genommen wurden. Dadurch ist erstmals der Nachweis gelungen, dass sich funktionale enterische Neurone aus progenitor-abgeleiteten Zellen entwickeln können.

Die Wahl, postnatale Progenitorzellen für die vorliegende Arbeit zu verwenden basiert auf den Ergebnissen von Metzger *et al.*, (Metzger *et al.*, 2000a) die das Vorhandensein von spannungsgesteuerten Natriumkanälen in humanen progenitor-abgeleiteten Zellen nachweisen konnten. Zusätzlich zu diesen Beobachtungen ist die Wahl enterischer Progenitorzellen ideal, da ihre Differenzierung bereits determiniert ist (multipotente Stammzellen) und somit die Wahrscheinlichkeit einer Differenzierung hin zu enterischen Zellen/Neuronen erheblich gesteigert und die Möglichkeit der Tumorbildung verringert ist. Diesen Vorteil machten sich in einer neuen Arbeit von 2015 Noisa *et al.*, zum Nutzen und generierten zunächst aus pluripotenten humanen embryonalen Stammzellen, neuronale Progenitorzellen, aus welchen dann dopaminerge Neurone differenziert werden konnten.

Embryonale Stammzellen können in Kultur zwar unendlich expandiert werden (Williams *et al.*, 1988), jedoch bergen diese Zellen durch ihre Pluripotenz die Gefahr der Tumorbildung (Wakabayashi *et al.*, 1988). Verschiedenen Forschungsgruppen gelang bereits der positive Nachweis für die Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen hin zu Motoneuronen (Li *et al.*, 2005), dopaminergen (Zeng *et al.*, 2004) sowie peripheren sensorischen und sympathischen Neuronen (Pomp *et al.*, 2005). Hinsichtlich der Tatsache, dass eine Basis für eine spätere Therapie hirschsprungerkrankter Menschen geschaffen werden soll, darf der ethisch kontrovers diskutierte Einsatz von embryonalen Stammzellen und die signifikante Einschränkung der Nutzung solcher Zellen durch das Embryonenschutzgesetz nicht außer Acht gelassen werden (Robertson, 2001). Ein weiterer Vorteil der gastrointestinalen Progenitorzellen ist, dass diese aus patienteneigenem Material isoliert und autolog transplantiert werden können (Wilkinson *et al.*, 2015).

Bestätigt durch immunhistochemische Markierungen neuronaler Oberflächenmarker zeigten verschiedene Forschungsgruppen bereits *in vitro* eine erfolgreiche Proliferation und Differenzierung enterischer Progenitorzellen hin zu Neuronen und Gliazellen. Ein Nachweis darüber, dass diese Zellen tatsächlich aus *in vitro* proliferierten Progenitorzellen stammten, fehlte jedoch (Natarajan *et al.*, 1999; Kruger *et al.*, 2002; Bondurand *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 2003). Desweiteren scheint das Potenzial der Zellen, postnatal verschiedene neuronale Sub-Typen ausbilden zu können eingeschränkt (Kruger *et al.*, 2002). Zusätzlich zur morphologischen Evaluierung dieser Zellen fehlt bis heute allerdings eine komplette elektrophysiologische Charakterisierung hinsichtlich der Funktionalität als enterische Neurone und deren Fähigkeit zur Netzwerkaktivität. Hotta *et al.*, zeigten 2013 durch intrazelluläre Messungen, dass transplantierte Neurosphären im murinen Darm in der Lage sind Aktionspotenziale zu generieren und synaptische Inputs empfangen zu können. Diese Beobachtung untermauert die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse, welche zum ersten Mal den Nachweis erbringen, dass Zellen, welche von Progenitorzellen abgeleitet sind, funktionale spannungsgesteuerte Ionenkanäle, wie Natrium- und Kaliumkanäle, ausbilden und Aktionspotenziale generieren können. Hinsichtlich einer möglichen Therapie ist es darüber hinaus wünschenswert anstelle von Neurosphären, bereits vollständige differenzierte enterische Neurone an aganglionäre Darmabschnitte (autolog) transplantieren zu können, um so deren Entwicklung und den späteren Bestimmungsort innerhalb des Darmsegmentes genau bestimmen zu können. Bis heute ist unklar wie die Migration und Differenzierung von Neurosphären *in vivo* gesteuert werden soll, ebenso wie die exakte Steuerung der Differenzierung *in vitro*. Aktuell gibt es keinerlei neuronale Marker, die einen hundertprozentigen Nachweis von progenitor-abgeleiteten Zellen erbringen, sodass sowohl eine Untersuchung *in vitro* als auch eine hohe Aufreinigung für mögliche (autologe) Transplantationen schwierig sind.

Bereits 2006 zeigten Rauch *et al.*, dass Neurosphären, gewonnen aus humanen Hirschsprung-Biopsien von Neugeborenen und Kleinkindern, erfolgreich aganglionäre Darmbereiche *in vitro* besiedeln. Ebenso erfolgreich gelang es 2007 Almond *et al.*, neonatale enterische humane und embryonische murine Neurosphären in aganglionäre embryonische Enddarm Explantate zu transplantieren und erbrachten den Hinweis darauf, dass die Kontraktilität wieder hergestellt werden kann. 2014 erbrachten Hetz *et al.*, zusätzlich den Nachweis, dass Neurosphären, welche aus

adulten postnatalen humanen Progenitorzellen expandiert wurden, im immundefizienten Mausmodell die Kontraktilität in aganglionären Darmabschnitten wieder herstellen können.

6.2 Isolierung, Proliferation und Differenzierung enterischer Zellen *in vitro*

6.2.1 Meerschweinchen

Der Hauptfokus dieser Arbeit war die elektrophysiologische Charakterisierung muriner postnataler progenitor-abgeleiteter Zellen. Um sich mit der Isolierung, Kultivierung und der späteren elektrophysiologischen Messungen enterischer Neurone vertraut zu machen und somit valide Ergebnisse erzielen zu können, wurden zunächst ganze Ganglienverbände aus adulten Meerschweinchen isoliert. Grundlage hierfür war die bereits etablierte Methode von Hanani *et al.*, 2000 und Prof. Schemann von der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Humanbiologie (persönliche Anleitung) zur Isolierung, Kultivierung und elektrophysiologischen Messung. Die erzielten Ergebnisse, sowohl morphologisch als auch elektrophysiologisch, können direkt verglichen werden mit den von Hanani *et al.*, 2000 veröffentlichten Ergebnissen, sowohl morphologisch als auch elektrophysiologisch. Das charakteristische Auswachsen der Zellen (siehe Abb. 9 und Anhang E), entsprach dem Jessen *et al.*, 1983a;b und 1992 von Mulholland *et al.*, beschriebenen Wachstum enterischer Neurone des myenterischen Plexus in Primärkulturen. Nach dieser erfolgreichen Etablierung (Kapitel 4.2.1.1.1) wurde dieses System zur besseren Evaluierung der PDCs auf das adulte Mausmodell adaptiert. Um einen optimalen Vergleich von adulten und progenitor-abgeleiteten Zellen herstellen zu können, musste ebenfalls das hier verwendete Protokoll zur Isolierung und Kultivierung progenitor-abgeleiteter Zellen (Kapitel 4.2.1.2.2) berücksichtigt werden.

6.2.2 Adulte und progenitor-abgeleitete murine Zellen (PDCs)

Eine Schwierigkeit in der Kultivierung adulter muriner enterische Neurone bestand in der speziesspezifischen Größe der Ganglienverbände, welche beim murinen ENS deutlich kleiner sind als beim Meerschweinchen. Des Weiteren war zu beachten, dass die Neurosphären zwar als Zellverband in Differenzierung gebracht wurden, diese jedoch nicht äquivalent zu einem intakten Ganglion sind. Die Neurosphären sind kugelige Zellhaufen, bestehend aus sich proliferierenden enterischen

Progenitorzellen, deren exakte spätere Funktion noch nicht determiniert ist. Enterische Ganglien hingegen sind die funktionale Einheit des enterischen Nervensystems, bestehen aus verschiedenen funktionalen neuronalen Zellen und enterischen Gliazellen. Als funktionale Einheit sind sie von einer schützenden Lamina umgeben.

Da die progenitor-abgeleiteten Zellen in Kultur komplett neue synaptische Verbindungen ausbilden müssen und sich in ganglienartigen Zellverbänden zusammenfinden müssen, wurden die adulten murinen Neurone ebenfalls als Einzelzellen in Kultur gebracht und somit jegliche synaptischen Verbindungen eliminiert. Folgende elektrophysiologische Messungen zeigten, dass sowohl die adulten, als auch die PDCs mehrere Wochen in Kultur überleben können. Während der elektrophysiologischen Messungen waren beide Zelltypen, unabhängig ihrer Zeit in Differenzierung, sehr instabil und gingen zugrunde. Diese Instabilität resultiert wahrscheinlich unter anderem daraus, dass die Zellen nicht wie bei den Meerschweinchen in intakten Ganglien in Kultur lagen. Die Zellen fanden sich zwar zu Zellhaufen zusammen und bildeten eine laminaartige Struktur über diesen Zellnestern aus, verbesserten die Vitalität während der elektrophysiologischen Messungen jedoch nicht, sondern erschwerten diese zusätzlich. Auch die Veränderung verschiedener Kultivierungsparameter wie z.B. unterschiedliche Konzentrationen an FKS während der Isolierung und während der Kultivierung und zusätzliche Behandlung mit NGF (Huang und Reichardt, 2001) verbesserte weder die Ausbeute an stabil messbaren Zellen noch war eine Änderung des Ionenkanalbesatzes zu erkennen. Da bekannt ist, dass Zellen oftmals die Umgebung, Signale und Stoffwechselprodukte benachbarter Zellen benötigen (Rafft *et al.*, 1993), wurden ebenfalls verschiedene Ansätze bezüglich des Medienwechsels durchgeführt. Keiner dieser Ansätze wirkte sich positiv auf die Kulturen bezüglich ihrer Messstabilität aus. Prinzipiell ist zu sagen, dass sich die Zellen morphologisch in Kultur gut entwickelten wie verschiedene Antikörper- und Biocytinfärbungen zeigen (siehe Kapitel 5.2.1 und 5.3.2.1). Sowohl die adulten murinen Zellen als auch die PDCs vom Zelltyp II bildeten sehr lange efferente Nervenzellfortsätze zu benachbarten Zellen/Zellhaufen aus (siehe Abb. 12). Dies konnte bereits bei kultivierten Meerschweinchen Neuronen beobachtet werden (Mulholland *et al.*, 1992; Jessen *et al.*, 1983b; Kapitel 5.1.1) und ist ein Indiz darauf, dass die Zellen vital sind und das Bestreben haben ein neuronales Netzwerk auszubilden. Die progenitor-abgeleiteten Zellen vom Typ II waren in der Lage natriumgetragene Aktionspotenziale auslösen zu können (Kapitel 5.3.2.3), wenngleich

es *in vitro* nicht möglich war, bei den progenitor-abgeleiteten Zellen synaptische Aktivität zu messen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die enterischen Zellen ein bestimmtes Umfeld benötigen, um sich vollständig funktional entwickeln zu können. Eine große Rolle hinsichtlich der Entwicklung könnte das sauerstoffarme Milieu im Darm spielen, welches bei *in vitro* Kulturen und elektrophysiologischen Messungen nur schwer zu realisieren ist. Auch ist unklar, welche äußeren Faktoren, wie beispielsweise pH-Wert, Wachstumsfaktoren, andere Zellen und deren Stoffwechselprodukte, auf die Entwicklung und Funktionalität enterischen Neuronen einwirken und dadurch die Differenzierung beeinflusst werden kann. Des Weiteren könnten auch biophysikalische Einflüsse eine Rolle bei der neuronalen Differenzierung spielen. Keung *et al.*, zeigten 2013, dass bei neuronalen Stammzellen die Differenzierung hin zu verschiedenen Subtypen durch die Festigkeit des Substrates nicht direkt beeinflusst wird, jedoch die pan-neurale Maturation moduliert werden kann. Zu bedenken ist aber dass das Substrat auf verschiedene Zellsysteme des Körpers verschiedene Auswirkungen hinsichtlich der Differenzierung haben kann. Vorstellbar ist durchaus, dass sich gastrointestinal entwickelnde Neurone gewisse Scherkräfte benötigen, um vollständig zu Maturieren und/oder verschiedene neuronale Sub-Populationen ausbilden zu können.

6.3 Immunhistochemische Antikörpermarkierung als positiver Nachweis enterischer Neurone

Wie bereits in Kapitel 6.1 erläutert, gelang es verschiedenen Forschergruppen progenitor-abgeleitete Zellen erfolgreich *in vitro* mit pan-neuralen Antikörperfärbungen zu markieren (Bondurand *et al.*, 2003). Um die Zellkulturen der vorliegenden Arbeit morphologisch evaluieren zu können, wurden die Kulturen der PDCs durch das *Anatomische Institut der Universität Tübingen* mit verschiedenen pan-neuralen Oberflächenmarkern behandelt. Da es sich um pan-neurale Marker handelte, sollten alle vorhandenen Neurone in den Kulturen markiert werden, dies war in der vorliegenden Arbeit aber nicht der Fall. Typ I PDCs waren nur positiv auf TuJ1, Typ II PDCs konnten zusätzlich mit HuC/HuD markiert werden. Dies lässt vermuten, dass TuJ1 bereits an neuronalen Zellen bindet, welche noch kein HuC/HuD exprimieren und somit noch nicht vollständig differenziert sind (mündliche Überlieferung Anatomisches Institut). Dies würde auch die vorliegenden elektrophysiologischen Ergebnisse erklären, in welchen in keiner der PDC Typ I Zellen ein spannungsabhängiger

Natriumstrom gemessen werden konnte. Hendershot *et al.*, 2007 vermuten zusätzlich, dass TuJ1 nicht ausschließlich von Neuronen exprimiert wird.

Biocytin Auswertungen adulter Zellen in Kultur sind vergleichbar mit denen von Nurgali *et al.*, 2004, bei welchen multiaxonale murine Neurone (Dogiel Typ II) größer waren als die uniaxonalen Dogiel Typ I Zellen.

6.4 Elektrophysiologischer Vergleich adulter enterischer Neurone und postnataler enterischer progenitor-abgeleiteter Zellen *in vitro*

Für einen direkten Vergleich der adulten murinen Zellen und den PDCs von Typ I und II wurden die Versuchsprotokolle verschiedener Publikationen am enterischen Nervensystem übernommen und wenn nötig entsprechend den Möglichkeiten der verwendeten Zellen adaptiert (Hanani *et al.*, 2000; Zholos *et al.*, 2002; Rugiero *et al.*, 2002).

Es wurden erstmals elektrophysiologische Eigenschaften progenitor-abgeleiteter Neurone *in vitro* ermittelt. Ihr dynamisches Schaltverhalten von Natrium,- als auch Kaliumkanälen ist mit denen aus enterischen Meerschweinchen und Maus Experimenten vergleichbar (Hanani *et al.*, 2000; Zholos *et al.*, 2002; Rugiero *et al.*, 2002). Auch die Ausbildung natriumgetragener Aktionspotenziale entspricht den bereits veröffentlichten Ergebnissen adulter enterischer Neurone.

Eine Abstammung der elektrophysiologisch untersuchten Zellen von Progenitorzellen konnte durch die Markierung proliferierender Enterosphären mit BrdU eindeutig nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den progenitor-abgeleiteten Zellkulturen wurden in den adulten Kulturen spontan rhythmisch aktive Zellhaufen beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass während der Präparation glatte Muskelzellen mit in Kultur genommen wurden (Nakayama und Torihashi, 2002). Da diese spontan rhythmische Aktivität bei den PDC II Kulturen ausblieb, ist zu vermuten, dass sich aus den Progenitorzellen keine glatten Muskelzellen differenziert haben bzw. dass diese nicht spontan rhythmisch aktiv waren.

6.4.1 Reifung und Expression von Ionenkanälen

Bereits 2007 beschrieben Biella *et al.*, dass embryonale stammzellabgeleitete Zellen aus hippocampalem Gewebe eine gewisse Zeit in Kultur maturieren müssen, bevor ihr Ionenkanalbesatz vollständig funktional ausgebildet ist. Bis zu 60 Tage in Kultur konnte in 62,5% der elektrophysiologisch stabil gemessenen PDC Typ I Zellen neben den auswärtsrektifizierenden Kaliumkanälen kein Natriumstrom gemessen werden. Neben Biella *et al.*, 2007 beschrieben auch Takazawa *et al.*, 2012 bei embryonalen Stammzellen in Kultur eine signifikante Änderung der Ionenkanalexpression innerhalb der ersten 20-40 Tage. Da bei einem Teil dieser kaliumpositiven PDC Typ II Zellen der neuronenspezifische A-Strom (I_A) detektiert wurde, lässt dies in Kombination mit der positiven neuronenspezifischen Antikörperfärbung mit TUJ 1, GFAP und NeuN den Rückschluss zu, dass es sich beim PDC Typ I Zelltyp um neuronale Vorläuferzellen oder enterogliale Zellen handelt. Ebenfalls könnte bei diesen Zellen die Möglichkeit bestehen, dass ihre vollständige Ionenkanalexpression durch noch nicht bekannte oder mangelnde Faktoren während der Differenzierung gehemmt wurde. Zusätzlich wiesen diese Zellen morphologische Ähnlichkeiten mit enterischen Neuronen aus verschiedenen Spezies auf (Furness, 2006; Metzger *et al.*, 2009; Vogalis *et al.*, 2000, Jessen *et al.*, 1983b).

Bei den PDC Typ II Zellen wurde eine Verschiebung der Natriumaktivierung in positivere Spannungsbereiche ermittelt. Dies lässt jedoch keinen eindeutigen Rückschluss auf eine entwicklungsbedingte Veränderung der Ionenkanäle über die Dauer der Kultur zu. Viel mehr ist anzunehmen, dass diese Rechtsverschiebung ein Resultat der gemessenen Space-Clamp Artefakte ist. Die von Biella *et al.*, 2007 beschriebene Verschiebung der Natrium-aktivierung und –inaktivierung in negativere bzw. positivere Spannungsbereiche bei Zellen mit unvollständig exprimierten Natriumkanälen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Ebenfalls konnten den verschiedenen Proliferationszeiten von 3; 6 und 10 Tagen und den verschieden lang andauernden Differenzierungszeiten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ionenkanalexpression zugeschrieben werden.

Die Tatsache, dass die Dauer der Proliferation keinen Einfluss auf die spätere Entwicklung der Neurone ausübt, könnte eine kostengünstige und zeitvariable autologe Transplantation sowie eine schnelle Therapie für Hirschsprung-Patienten ermöglichen, gerade im Hinblick auf die Therapie von Neugeborenen. Zusätzlich wird durch die Proliferation wenig patienteneigenes Material benötigt.

Die Ermittlung der Membrankapazität aller murinen Zellen (PDC I, PDC II und adulte murine Zellen), untermauert ebenfalls das Fehlen einer Zunahme funktionsfähiger Ionenkanäle über die Dauer der Differenzierung. Dies lässt die Vermutung zu, dass neuronale Zellen, welche von Progenitorzellen abgeleitet wurden keine verzögerte Ionenkanalexpression aufweisen im Vergleich zu Zellen, die von embryonalen Stammzellen abgeleitet wurden (Biella *et al.*, 2007). Auch die Behandlung mit NGF förderte entgegen verschiedener Publikationen, wie beispielsweise 2001 von Huan & Reichardt, die Vitalität der Zellen in Kultur nicht. Mögliche Erklärungen für die Instabilität der Zellen während der elektrophysiologischen Messungen könnte zum einen eine zu gering eingesetzte Konzentration an NGF sein oder eine zu späte Behandlung der Zellen mit NGF. Das NGF wurde den Zellen erst während der Differenzierung, nicht schon während der Proliferationsphase zugegeben. Möglicherweise wird dieser neurotrophische Faktor bereits während der Proliferation benötigt, um einen positiven Einfluss auf die Progenitorzellen ausüben zu können. Da NGF und GDF jedoch an der Transkription von Genen für die Expression von Natriumkanälen essenziell beteiligt sind und verschiedene Subtypen von Natriumkanälen sowohl hoch- als auch herunterregulieren können (Waxman, 2001), muss die optimale Konzentration beider neurotrophischer Faktoren ermittelt werden um einen optimalen Ionenkanalbesatz der *in vitro* PDC Kulturen zu erzielen. Generell darf der Einfluss von neurotrophischen Faktoren nicht außer Acht gelassen werden, da diese eine Schlüsselrolle in der Regulation der Natriumkanalexpressionen spielen (Dib-Hajj *et al.*, 1998; Baker und Wood, 2001; Cummins *et al.*, 2001). Außerdem wird vermutet, dass sie einen direkten Einfluss auf die Expression von TTX-sensitiven und TTX-insensitiven Natriumkanälen ausüben (Rugiero *et al.*, 2003). Nur durch eine optimale Anpassung neurotrophischer Faktoren kann eine funktionale dynamische Verschaltung der Neurone gewährleistet werden.

6.4.2 Natriumkanäle

Neben der Expression verschiedener Kat- und Anionenkanälen ist das Vorhandensein von Natriumkanälen essenziell für die Funktionalität von Neuronen. Ein fein aufeinander abgestimmtes dynamisches Schaltverhalten eines jeden einzelnen Ionenkanals ist von zentraler Bedeutung um eine optimale neuronale Funktionalität zu gewährleisten. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf Natriumkanälen und natriumgetragenen Aktionspotenzialen. Dies galt als Hinweis einer erfolgreichen

Differenzierung hin zu enterischen Neuronen. Um sicherzustellen, dass die Natriumkanäle vollständig exprimiert wurden, wurde das dynamische Schaltverhalten der adulten murinen Zellen und PDC Typ II Zellen analysiert und verglichen.

Bei der Untersuchung der halbmaximalen Spannungen der Natriuminaktivierung wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den PDC Typ II, den adulten murinen Zellen und der Literatur festgestellt. Auch die Dauer der vorangegangenen Proliferation der Enterosphären scheint keine Rolle auf das spätere Schaltverhalten der Natriumkanäle bezüglich ihrer Aktivierung und Inaktivierung auszuüben. Rugiero *et al.*, beschrieb 2003 halbmaximale Spannungen für die Natriumaktivierung von Mäusen und Ratten von $V_{1/2} = -32$ mV und eine halbmaximale Spannung der Natriuminaktivierung von $V_{1/2} = -31$ mV. Der Wert der Natriuminaktivierung ist vergleichbar mit den PDC Typ II Zellen als auch mit den adulten murinen Zellen (PDC II: $V_{1/2} = -35$ mV; adulte Zellen: $V_{1/2} = -29$ mV). Auch die Natriumaktivierung der adulten murinen Zellen entspricht mit einer $V_{1/2} = -31$ mV diesen Ergebnissen. Die halbmaximale Natriumaktivierung der PDC Typ II Zellen liegt jedoch mit einer $V_{1/2} = -15$ mV in positiveren Spannungsbereichen als in der Literatur beschrieben. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die oben erzielten Ergebnisse von Rugiero *et al.*, 2003 unter Anwesenheit von Kalium- und Kalzium-Inhibitoren in den Messlösungen durchgeführt wurden, dies war in der vorliegenden Arbeit bei den PDC Typ II Zellen jedoch nicht möglich. Bei den adulten murinen Zellen wurden die Natriumaktivierungsexperimente jedoch unter Substitution von Cäsium anstelle von Kalium in der Intrazellulärlösung durchgeführt, bei diesen Messungen wurde keine Rechtsverschiebung der Natriumaktivierung gemessen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Rechtsverschiebung der Natriumaktivierung bei den PDC Typ II Zellen ein Resultat nicht inhibierter Kationenströme ist und nicht ein Ergebnis fehlerhafter Expression. Zholos *et al.*, konnten 2001 bei Experimenten ohne Substitution von Kalium und Kalziumkanalblockern ebenfalls keine Aussage über die halbmaximalen Spannungen der Natriumaktivierung liefern, da zu viele kapazitive Ströme, besonderes in Bereichen positiver als -20 mV, das Ergebnis verfälschten. Zusätzlich ist der I_h zwischen -120 und -45 mV aktiv (Rugiero *et al.*, 2002, Pape, 1996) und beeinflusst das Ergebnis zusätzlich. Seine Ausprägung variiert zudem in verschiedenen neuronalen Sub-Populationen (Furness, 2006). Es ist also möglich, dass die Natriumaktivierung von verschiedenen Ionenkanal-Subtypen maskiert wird, welche dieselbe Aktivierung jedoch eine andere Inaktivierung aufweisen. Da diese

Beobachtung nur bei den PDC Typ II gemacht wurden, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Natriumkanäle eventuell nicht vollständig funktional entwickelt sind. Da die Natriumaktivierung und –Inaktivierung zwei voneinander verschiedene Mechanismen sind, ist es durchaus möglich, dass der Mechanismus der Aktivierung noch nicht vollständig entwickelt ist, der der Natriuminaktivierung hingegen schon.

Betrachtet man das Schaltverhalten in Abhängigkeit der Differenzierungszeit, so zeigen sich keine signifikanten Schwankungen bezüglich der halbmaximalen Aktivierung und Inaktivierung der Natriumkanäle.

6.4.3 Kaliumkanäle

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle können über die Dauer ihrer Entwicklung eine Änderung hinsichtlich ihres kinetischen Schaltverhaltens durchlaufen, dies wurde bereits 1999 von Reiff und Günther bei retinalen Ganglienzellen beschrieben. Um eine genaue Aussage über die Schaltkinetik einzelner Kaliumkanäle treffen zu können, ist es notwendig den zu untersuchenden Strom von anderen Kationenkanälen, die gegebenenfalls dieselbe Aktivierung besitzen, zu isolieren. Da in der vorliegenden Arbeit eine vollständige Inhibierung der auswärtsgerichteten Ströme durch spezifische Ionenkanalblocker nicht möglich war, können keine Rückschlüsse auf eventuelle entwicklungsbedingte Veränderungen im Kationenkanalbesatz und deren Entwicklung über den Zeitraum der Kultivierung gezogen werden. Die jeweilig beobachteten Kaliumstromprofile sind nicht auf bestimmte Kultivierungszeiten begrenzt. Überdies herrscht im ENS eine Vielzahl an verschiedenen Kaliumkanälen vor (Furness, 2006), welche ohne entsprechende pharmakologische Untersuchungen kaum zu identifizieren sind. Eine mögliche Begründung für das insensitive Verhalten der gemessenen PDC Typ I Zellen auf Kationkanalblocker könnte zum einen eine Folge unvollständiger Differenzierung aus progenitor-abgeleiteten Zellen sein. Da in den Typ I PDCs ebenfalls kein Natriumstrom nachgewiesen werden konnte, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Isolierung und/oder Proliferation und/oder Differenzierung hinsichtlich der Zellvitalität und Ionenkanalexpression optimiert werden muss, um vollständig funktionale Zellen zu erhalten. Zusätzlich stellt sie ein Hinweis auf die enorme Komplexität des Kationenkanalbesatzes dieser Zellen dar. Um einen möglichst großen Anteil der Kaliumkanäle blockieren zu können, ist es von Nöten verschiedene Ionenkanalblocker, wie beispielsweise Cäsium, Barium, 4-AP und TEA auf die Zellen zu geben. Da diese Substanzen toxisch sind, erfordert dies

zusätzlich eine Bestimmung des IC_{50} für jeden Ionenkanalblocker für diesen Zelltyp. Dies war auf Grund der Instabilität der Zellen während der Messungen, trotz Beachtung der Osmolaritäten, nicht möglich.

Bisher ist nur wenig über die pharmakologischen Eigenschaften enterischer Neurone bekannt. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Konzentrationen verwendeter Kationenkanalblocker, welche bei anderen Zelltypen angewendet werden, bei den PDC Zellen keine ausreichende Inhibierung erzielen können. Bordey und Sontheimer zeigten 1999 beispielsweise durch extreme Erhöhung der Konzentration eines Kaliumkanalblockers die Inhibierung von Kaliumkanälen, von denen bisher angenommen wurde, sie wären nur durch Barium und Cäsium blockierbar. Aufgrund des komplexen Kationenkanalbesatzes müssen bei künftigen Experimenten weitere Kationenkanalblocker in höheren Konzentrationen getestet werden.

Da in den PDC I Zellen kein Natriumstrom gemessen werden konnte, lag der Verdacht nahe, dass diese Zellen enterogliale Zellen sind. Ein wichtiger Hinweis auf die positive Entwicklung der Neurosphären hin zu neuronalen Zellen ist die Messung des neuronenspezifischen A-Stroms (I_A), welcher in den kaliumpositiven PDC Typ I Zellen gemessen werden konnte. Der I_A wurde sowohl in AH- als auch S-Neuronen sowie verschiedenen Subpopulationen nachgewiesen (Starodub und Wood, 2000; Xiao *et al.*, 2004). Auch wenn er bei der Form des Aktionspotenzials nur eine untergeordnete Rolle spielt (Rugiero *et al.*, 2002), ist er ein wichtiger Hinweis auf eine neuronale Entwicklung der Zellen.

Broussard *et al.*, zeigten bereits 1993 in ihren Experimenten, dass gliale Meerschweinchen Zellen des ENS keinen A-Strom aufzeigen. Zusätzlich bestätigten Starodub und Wood 2000 in ihrer Arbeit am Meerschweinchen, die bereits 1989 aufgestellte Vermutung von Wood, dass der A-Typ Kaliumstrom bei der Erregbarkeit enterischer Neurone involviert ist.

6.4.4 Aktionspotenziale und die Möglichkeit von Netzwerkaktivität

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals *in vitro* verschiedene progenitor-abgeleitete Neuronentypen elektrophysiologisch bestimmt werden. Die erzielten Ergebnisse sind vergleichbar mit denen aus der Literatur. Experimente zur Netzwerkaktivität an Maus und Meerschweinchen zeigten unter Verwendung gleicher Intrazellulärlösungen ähnliche Ergebnisse (Rugiero *et al.*, 2002; Xao *et al.*, 2006; Clerc *et al.*, 1998; Kunze *et al.*, 2000).

Anhand der Aktionspotenziale konnten S- als auch AH-Neurone unterschieden werden, die sowohl phasische als auch tonische Aktionspotenzialmuster ausbildeten. Die Formen der Aktionspotenziale entsprachen alle denen, bereits veröffentlichter Daten von Maus, Meerschweinchen und Ratte (Rugiero *et al.*, 2002; 2003; Mao *et al.*, 2006; Nurgali *et al.*, 2004). Die Ergebnisse zur Aktionspotenzial-Analyse der PDCs vom Typ II sind alle vergleichbar mit den erhobenen Referenzdaten der adulten murinen Einzelzellkulturen. Wie bereits erläutert, ist anzunehmen dass durch Isolierung, Kultivierung und der Menge an endogenen Faktoren, welche eine komplette funktionale Entwicklung beeinflussen können, der Ionenkanalbesatz der Zellen nicht vollständig entwickelt ist. Dies könnte auch erklären, wieso in den PDCs Typ II im Gegensatz zu den adulten murinen Zellen keine synaptische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Zeng *et al.*, zeigten 2010 an Ratten, dass GDNF die synaptische Kommunikation fördert. GDNF kann die Ionenkanalexpression sowohl herab als auch herauf regulieren (Zeng *et al.*, 2010). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Konzentration an GDNF, mit welcher die Zellen behandelt wurden, erhöht bzw. entsprechend angepasst werden muss. Es wird angenommen, dass AH- und S-Neurone verschiedene Kompositionen an spannungsgesteuerten Ionenkanälen besitzen, welche pharmakologische und elektrophysiologische Subtypen einwärts-rectifizierender Kalzium- und kalziumabhängiger Kaliumströme ausbilden (Galligan *et al.*, 1990; Vogalis *et al.*, 2000; Rugiero *et al.*, 2002).

Dennoch konnten mit den vorliegenden Ergebnissen der PDCs Typ II Zellen grundlegende Parameter der S- und AH-Neurone bestimmt werden.

6.4.4.1 AH-Neurone

Mehrere morphologische wie auch elektrophysiologische Parameter weisen auf das Vorhandensein von AH-Neuronen in den PDC Kulturen hin. Die Morphologie von AH-Neuronen ist vom Dogiel Typ II und weist multiaxonale Ausläufer auf (Rugiero *et al.*, 2003, Nurgali *et al.*, 2004) Neurone mit solch einer Morphologie konnten in den Zellkulturen mithilfe einer Biocytinfärbung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 27).

Verschiedene Forschungsgruppen benutzen die Bezeichnung AH-Neuron für Neurone, welche die Kalzium-Flexion in der fallenden Phase der Repolarisation zeigen (Hanani *et al.*, 2000; Rugiero *et al.*, 2002; Baidan *et al.*, 1992, Nurgali *et al.*, 2004). Diese Kalziumflexion bedingt breite Aktionspotenziale, hauptsächlich verursacht durch einen N-Typ Kalziumkanal (Rugiero *et al.*, 2002). In 30 von 44 gemessenen adulten

murinen Neuronen konnte diese Kalzium-Flexion durch Ermittlung der ersten Differenzialgleichung nachgewiesen werden. Bei den PDCs Typ II war das Verhältnis ähnlich, hier konnte die Flexion in sechs von 10 Zellen nachgewiesen werden.

Generell unterliegen die AH-Neurone 4 prominenten Strömen, dem I_{AHP} , welcher für die lange Nachhyperpolarisationsphase (AHP) verantwortlich ist, dem I_h , der für die Repolarisation verantwortlich ist, dem N-Typ Kalziumkanal, der für die relativ breiten APs verantwortlich ist und einem langsam inaktivierenden Natriumkanal (Rugiero *et al.*, 2002).

Andere Arbeitsgruppen konnten bei der Aktionspotenzial-Analyse von enterischen Neuronen von Maus und Meerschweinchen mittlere Maximalamplituden von ca. 102 mV und AP Breiten zwischen 2,2 und 2,8 ms ermitteln (Mao *et al.*, 2006; Rugiero *et al.*, 2002 und 2003).

In der vorliegenden Arbeit sind die APs der adulten Mäuse sowie die der PDC Typ II Zellen sind mit rund 4 ms etwas breiter. Die Maximalamplituden der adulten Mäuse (110 mV) sind vergleichbar mit Maos und Rugieros Ergebnissen. Die PDC II Zellen zeigten eine kleinere Maximalamplitude von 93 mV. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Maximalamplitude gemessener AH-Neurone aus dem distalen Maus Colon von 78 mV (Mao *et al.*, 2006). Jedoch lag die AP Breite dieser Colon Neurone bei 2 ms. Nurgali *et al.*, 2001 vermuteten bereits, dass in verschiedenen Spezies sowie Darmabschnitten unterschiedliche neuronale Subpopulationen vorhanden sind. Diese Unterschiede hinsichtlich der Maximalamplitude und AP Breite könnten einen Hinweis auf verschiedene Neuronenpopulation in verschiedenen Darmabschnitten sein. Da die PDC Typ II Zellen progenitor-abgeleitet Zellen sind, kann nicht zwischen verschiedenen Darmregionen unterschieden werden. Vielmehr muss im Hinblick auf eine autologe Transplantation eine Differenzierungsmethode etabliert werden um diese Zellen gezielt in verschiedene neuronale Subpopulationen differenzieren zu können je nach betroffenem aganglionärem Darmabschnitt.

Aufgrund der Instabilität der Zellen konnte der I_h nicht in allen Zellen nachgewiesen bzw. ausgewertet werden. Es ist aber anzunehmen, dass er, entsprechend der Literatur, in allen AH-Neuronen exprimiert wurde (Mao *et al.*, 2006; Rugiero *et al.*, 2002).

Das langsame AHP bzw. der I_{AHP} wurde in der vorliegenden Arbeit nicht explizit untersucht und konnte anhand des Aktionspotenzialverlaufs nicht in jeder Zelle eindeutig erkannt werden. Da bekannt ist, dass es speziesspezifische Unterschiede

im AHP und dessen Ausbildung/Vorhandensein und der jeweiligen Messmethode gibt (Nurgali *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2002), wären jegliche Aussagen spekulativ.

6.4.4.2 S-Neurone

Den S-Neuronen, welche vom Dogiel Typ II sind, fehlt die Kalzium-Flexion in der fallenden Phase der Aktionspotenziale (Rugiero *et al.*, 2003). Außerdem fehlt den meisten der S-Neurone der I_h Strom. Dieser konnte bislang nur in einer kleinen Subpopulation filamentöser S-Neurone nachgewiesen werden (Song *et al.*, 1997). Das Fehlen der Kalzium-Flexion konnte in 14 der 44 adulten murinen Zellen und in 4 der PDC Typ II Zellen nachgewiesen werden. Sowohl ein Teil der adulten als auch der PDC II Neurone zeigten einen Voltage-Sag, verursacht durch den I_h Strom. Dies lässt vermuten, dass sich verschiedene neuronale Subpopulationen in Kultur differenzieren haben. Die in der Literatur beschriebene Maximalamplitude von S-Neuronen liegt zwischen 48 und 73 mV, die Breite der APs liegt bei 1 – 2,5 ms (Rugiero *et al.*, 2003; Nurgali *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den gemessenen Parametern der PDC Typ II S-Neurone und denen der adulten murinen S-Neurone. Die APs beider Zelltypen sind etwas breiter als die von Rugiero und Nurgali, wohingegen die Maximalamplituden der PDC Typ II Zellen deren Ergebnissen entsprechen. Prinzipiell ist zu sagen, dass die Maximalamplituden der S-Neurone etwas kleiner sind als die der AH-Neurone. Nicht außer Acht gelassen werden dürfen auch hier die verschiedenen Mess-, Isolierungs-, und Kultivierungsmethoden der einzelnen Zellen.

Generell werden die S-Neurone zu den tonisch feuernenden Neuronen gezählt, da sie schnelle synaptische Inputs verarbeiten können (Brookes *et al.*, 2001; Furness 2006). Werden diesen Neuronen jedoch Strompulse appliziert, die länger als 500 ms andauern, nimmt die Feuerrate der Neurone ab (Kunze *et al.*, 1997), so kann die Netzwerkaktivität moduliert und Informationen gefiltert werden. Wahrscheinlich wird die Feuerrate limitiert durch einen auswärtsrektifizierenden Strom. Diese Fähigkeit der Modulation erklärt das Vorhandensein von tonisch als auch phasisch feuernenden S-Neuronen bei der adulten murinen Zellkultur. Bei den PDC Typ II Zellen konnte dies nicht beobachtet werden. Aufgrund des Fehlens synaptischer Aktivität ist anzunehmen, dass die PDC II Zellen noch nicht optimal untereinander verschaltet sind und deshalb bei den gemessenen Zellen keine Modulation der Feuerrate stattfand.

6.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die Grundidee, aus progenitor-abgeleiteten Zellen funktionale enterische Neurone *in vitro* zu differenzieren, hohes Potenzial hat. Gerade im Hinblick auf die bisher unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten der Hirschsprung-Erkrankung ist dies ein vielversprechender Ansatz eines ethisch vertretbaren autologen zellbasierten Therapieprinzips. Da jedoch das Wissen über die elektrophysiologischen Eigenschaften enterischer Neurone im Darm generell noch sehr lückenhaft ist und auch die Art der Isolierung und Kultivierung von Progenitorzellen, gerade im Hinblick auf verschiedene endogene Faktoren optimiert werden muss, ist noch viel Grundlagenforschung zu betreiben. Bevor der Ansatz eines autologen zellbasierten Transplantates auf den Menschen übertragen werden kann, muss eine standardisierte Isolierungs- und Kultivierungsmethode etabliert werden, die eine Differenzierung hin zu funktionalen enterischen Neuronen gewährleistet. Um statistisch belastbare Daten erheben zu können, erfordert die Zellisolierung und spätere Kultivierung *in vitro* einerseits einen sehr hohen Reinheitsgrad der Zellkulturen, andererseits muss eine hohe Anzahl an progenitor-abgeleiteten Zellen gemessen werden, um deren neuronale Funktionalität eindeutig evaluieren und gegebenenfalls durch die Kultivierung anpassen zu können. Der Hauptfokus weiterer Forschungsarbeiten sollte jedoch nicht nur auf der Expression verschiedener Ionenkanäle, deren dynamischen Schaltverhaltens und Netzwerkaktivität von progenitor-abgeleiteten Zellen liegen, sondern auch die Möglichkeit deren Erregbarkeit durch verschiedene Targetsubstanzen berücksichtigen (Clerc *et al.*, 2002, Furness 2006). Nur eine detaillierte Erfassung dieser Daten kann eine optimale Funktionalität des autologen zellbasierten Transplantats gewährleisten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch bereits jetzt das Potenzial, dass wichtige Grundparameter funktionaler enterischer Neurone *in vitro* vorhanden sind und sich verschiedene neuronale Subpopulationen entwickeln können, welche sogar modulierende Netzwerk- und Filtereigenschaften zeigen.

Diese elektrophysiologischen Ergebnisse bieten einen ersten vielversprechenden Ansatz für eine mögliche autologe zellbasierte Therapie der Hirschsprung-Erkrankung mit positiver Langzeitprognose, da sowohl das Vorhandensein morphologisch neuronaler Marker als auch das Vorhandensein neuronenspezifischer Ionenkanäle der progenitor-abgeleiteten Zellen *in vitro* demonstriert werden konnte. Für weitere Untersuchungen müssen zusätzlich mögliche postnatale altersbedingte Änderungen

humaner enterischer Neurone berücksichtigt werden, auch in Bezug auf Ionenkanalexpression und Neurotransmittersysteme (Wade und Cowen, 2004).

Eine solche Therapie, basierend auf autologen progenitor-abgeleiteten enterischen Neuronen, könnte *in vitro* durch Proliferation patienteneigener gastrointestinaler Progenitorzellen und einer drauffolgenden Differenzierung der Zellen auf einem Kollagenträger realisiert werden. Ein großer Vorteil des Kollagenträgers wäre, dass dieser direkt an aganglionäre Darmabschnitte transplantiert werden kann und somit die lokale Besiedlung der betroffenen Darmabschnitte mit bereits funktional differenzierter Neurone sichergestellt ist. Dies stellt einen erheblichen Vorteil gegenüber lokal applizierten Progenitorzellen dar, da deren Differenzierung und Migration nicht kontrolliert werden können. Eine Besiedlung aganglionärer Darmsegmente wäre somit nicht gewährleistet.

7 Referenzen

- Almond, S., Lindley, R. M., Kenny, S. E., Connell, M. G. and Edgar, D. H. (2007) Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut*, 56, 489-496.
- Badner, J. A., Sieber, W. K., Garver, K. L. and Chakravarti, A. (1990) A genetic study of Hirschsprung disease. *American journal of human genetics*, 46, 568-580.
- Baidan, L. V., Zholos, A. V., Shuba, M. F. and Wood, J. D. (1992) Patch-clamp recording in myenteric neurons of guinea pig small intestine. *The American journal of physiology*, 262, G1074-1078.
- Baillie, C. T., Kenny, S. E., Rintala, R. J., Booth, J. M. and Lloyd, D. A. (1999) Long-term outcome and colonic motility after the Duhamel procedure for Hirschsprung's disease. *Journal of pediatric surgery*, 34, 325-329.
- Baker, M. D. and Wood, J. N. (2001) Involvement of Na⁺ channels in pain pathways. *Trends in pharmacological sciences*, 22, 27-31.
- Biella, G., Di Febo, F., Goffredo, D., Moiana, A., Taglietti, V., Conti, L., Cattaneo, E. and Toselli, M. (2007) Differentiating embryonic stem-derived neural stem cells show a maturation-dependent pattern of voltage-gated sodium current expression and graded action potentials. *Neuroscience*, 149, 38-52.
- Bolande, R. P. (1997) Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatric pathology & laboratory medicine : journal of the Society for Pediatric Pathology*, affiliated with the International Paediatric Pathology Association, 17, 1-25.
- Bondurand, N., Natarajan, D., Thapar, N., Atkins, C. and Pachnis, V. (2003) Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development*, 130, 6387-6400.
- Bordey, A. and Sontheimer, H. (1999) Differential inhibition of glial K(+) currents by 4-AP. *Journal of neurophysiology*, 82, 3476-3487.
- Bornstein, J. C., Hendriks, R., Furness, J. B. and Trussell, D. C. (1991) Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *The Journal of comparative neurology*, 314, 437-451.
- Brookes, S. J. (2001) Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *The Anatomical record*, 262, 58-70.
- Brookes, S. J., Song, Z. M., Ramsay, G. A. and Costa, M. (1995) Long aboral projections of Dogiel type II, AH neurons within the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15, 4013-4022.
- Broussard, D. L., Bannerman, P. G., Tang, C. M., Hardy, M. and Pleasure, D. (1993) Electrophysiologic and molecular properties of cultured enteric glia. *Journal of neuroscience research*, 34, 24-31.
- Burkardt, D. D., Graham, J. M., Jr., Short, S. S. and Frykman, P. K. (2014) Advances in Hirschsprung disease genetics and treatment strategies: an update for the primary care pediatrician. *Clinical pediatrics*, 53, 71-81.
- Butler Tjaden, N. E. and Trainor, P. A. (2013) The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 162, 1-15.
- Cass, D. (1986) Hirschsprung's disease: an historical review. *Progress in pediatric surgery*, 20, 199-214.

- Clerc, N., Furness, J. B., Bornstein, J. C. and Kunze, W. A. (1998) Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of myenteric neurons of the duodenum in the guinea-pig. *Neuroscience*, 82, 899-914.
- Cornelissen, W., De Laet, A., Kroese, A. B., Van Bogaert, P. P., Scheuermann, D. W. and Timmermans, J. P. (2000) Electrophysiological features of morphological Dogiel type II neurons in the myenteric plexus of pig small intestine. *Journal of neurophysiology*, 84, 102-111.
- Costa, M., Brookes, S. J., Steele, P. A., Gibbins, I., Burcher, E. and Kandiah, C. J. (1996) Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience*, 75, 949-967.
- Cummins, T. R., Black, J. A., Dib-Hajj, S. D. and Waxman, S. G. (2000) Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20, 8754-8761.
- Dettmann, H. M., Zhang, Y., Wronna, N., Kraushaar, U., Guenther, E., Mohr, R., Neckel, P. H., Mack, A., Fuchs, J., Just, L. and Obermayr, F. (2014) Isolation, expansion and transplantation of postnatal murine progenitor cells of the enteric nervous system. *PloS one*, 9, e97792.
- Dib-Hajj, S. D., Tyrrell, L., Black, J. A. and Waxman, S. G. (1998) NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 8963-8968.
- Ederly, P., Lyonnet, S., Mulligan, L. M., Pelet, A., Dow, E., Abel, L., Holder, S., Nihoul-Fekete, C., Ponder, B. A. and Munnich, A. (1994) Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 367, 378-380.
- Eng, C. (1999) RET proto-oncogene in the development of human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17, 380-393.
- Estrada-Mondaca, S., Carreon-Rodriguez, A. and Belkind-Gerson, J. (2007) Biology of the adult enteric neural stem cell. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 236, 20-32.
- Freeman, R. S., Burch, R. L., Crowder, R. J., Lomb, D. J., Schoell, M. C., Straub, J. A. and Xie, L. (2004) NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand? *Progress in brain research*, 146, 111-126.
- Frykman, P. K. and Short, S. S. (2012) Hirschsprung-associated enterocolitis: prevention and therapy. *Seminars in pediatric surgery*, 21, 328-335.
- Fullerton, A. (1927) Congenital Idiopathic Dilatation of the Colon Treated by Stretching of the Pelvi-Rectal Sphincter. *British medical journal*, 1, 753-754.
- Furness, J. B. (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*, 81, 87-96.
- Furness, J. B. (2006) *The enteric nervous system*. Blackwell Publishing Inc., 1.
- Furness, J. B. (2012) The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9, 286-294.
- Furness, J. B., Johnson, P. J., Pompolo, S. and Bornstein, J. C. (1995) Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 7, 89-96.
- Furness, J. B., Kunze, W. A., Bertrand, P. P., Clerc, N. and Bornstein, J. C. (1998) Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Progress in neurobiology*, 54, 1-18.

- Furness, J. B., Lloyd, K. C., Sternini, C. and Walsh, J. H. (1990a) Projections of substance P, vasoactive intestinal peptide and tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibres in the canine intestine, with special reference to the innervation of the circular muscle. *Arch Histol Cytol*, 53, 129-140.
- Furness, J. B., Trussell, D. C., Pompolo, S., Bornstein, J. C. and Smith, T. K. (1990b) Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. *Cell and tissue research*, 260, 261-272.
- Furukawa, K., Taylor, G. S. and Bywater, R. A. (1986) An intracellular study of myenteric neurons in the mouse colon. *Journal of neurophysiology*, 55, 1395-1406.
- Gabella, G. and Trigg, P. (1984) Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *Journal of neurocytology*, 13, 49-71.
- Galligan, J. J., North, R. A. and Tokimasa, T. (1989) Muscarinic agonists and potassium currents in guinea-pig myenteric neurones. *British journal of pharmacology*, 96, 193-203.
- Galligan, J. J., Tatsumi, H., Shen, K. Z., Surprenant, A. and North, R. A. (1990) Cation current activated by hyperpolarization (IH) in guinea pig enteric neurons. *The American journal of physiology*, 259, G966-972.
- Gershon, M. D. (2007) Transplanting the enteric nervous system: a step closer to treatment for aganglionosis. *Gut*, 56, 459-461.
- Gershon, M. D., Chalazonitis, A. and Rothman, T. P. (1993) From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. *Journal of neurobiology*, 24, 199-214.
- Gola, M., Niel, J. P., Bessone, R. and Fayolle, R. (1992) Single-channel and whole-cell recordings from non-dissociated sympathetic neurones in rabbit coeliac ganglia. *Journal of neuroscience methods*, 43, 13-22.
- Granstrom, A. L., Danielson, J., Husberg, B., Nordenskjold, A. and Wester, T. (2015) Adult outcomes after surgery for Hirschsprung's disease: Evaluation of bowel function and quality of life. *Journal of pediatric surgery*.
- Hanani, M., Francke, M., Hartig, W., Grosche, J., Reichenbach, A. and Pannicke, T. (2000) Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 278, G644-651.
- Hao, M. M., Boesmans, W., Van den Abbeel, V., Jennings, E. A., Bornstein, J. C., Young, H. M. and Vanden Berghe, P. (2011) Early emergence of neural activity in the developing mouse enteric nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31, 15352-15361.
- Heanue, T. A. and Pachnis, V. (2007) Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nature reviews. Neuroscience*, 8, 466-479.
- Hearn, C. J., Murphy, M. and Newgreen, D. (1998) GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Developmental biology*, 197, 93-105.
- Hendershot, T. J., Liu, H., Sarkar, A. A., Giovannucci, D. R., Clouthier, D. E., Abe, M. and Howard, M. J. (2007) Expression of Hand2 is sufficient for neurogenesis and cell type-specific gene expression in the enteric nervous system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 236, 93-105.
- Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R. A., Simpson, L. C. c. t. S.

- L., Koliatsos, V. E., Rosenthal, A. and et al. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, 266, 1062-1064.
- Hendriks, R., Bornstein, J. C. and Furness, J. B. (1990) An electrophysiological study of the projections of putative sensory neurons within the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *Neuroscience letters*, 110, 286-290.
- Hetz, S., Acikgoez, A., Voss, U., Nieber, K., Holland, H., Hegewald, C., Till, H., Metzger, R. and Metzger, M. (2014) In vivo transplantation of neurosphere-like bodies derived from the human postnatal and adult enteric nervous system: a pilot study. *PloS one*, 9, e93605.
- Hille, B. (1991) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates Inc., U.S.
- Hirst, G. D., Johnson, S. M. and van Helden, D. F. (1985a) The calcium current in a myenteric neurone of the guinea-pig ileum. *The Journal of physiology*, 361, 297-314.
- Hirst, G. D., Johnson, S. M. and van Helden, D. F. (1985b) The slow calcium-dependent potassium current in a myenteric neurone of the guinea-pig ileum. *The Journal of physiology*, 361, 315-337.
- Hirst, G. D. and McKirdy, H. C. (1974) A nervous mechanism for descending inhibition in guinea-pig small intestine. *The Journal of physiology*, 238, 129-143.
- Hirst, G. D. and Spence, I. (1973) Calcium action potentials in mammalian peripheral neurones. *Nature: New biology*, 243, 54-56.
- Holschneider and Puri (2008) *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*.
- Hotta, R., Stamp, L. A., Foong, J. P., McConnell, S. N., Bergner, A. J., Anderson, R. B., Enomoto, H., Newgreen, D. F., Obermayr, F., Furness, J. B. and Young, H. M. (2013) Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. *The Journal of clinical investigation*, 123, 1182-1191.
- Hoyle, C. H. and Burnstock, G. (1989) Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *Journal of anatomy*, 166, 7-22.
- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*, 24, 677-736.
- Inoue, K., Shimotake, T. and Iwai, N. (2000) Mutational analysis of RET/GDNF/NTN genes in children with total colonic aganglionosis with small bowel involvement. *American journal of medical genetics*, 93, 278-284.
- Inoue, K., Shimotake, T., Tomiyama, H. and Iwai, N. (2001) Mutational analysis of the RET and GDNF gene in children with hypoganglionosis. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie*, 11, 120-123.
- Jarvi, K., Laitakari, E. M., Koivusalo, A., Rintala, R. J. and Pakarinen, M. P. (2010) Bowel function and gastrointestinal quality of life among adults operated for Hirschsprung disease during childhood: a population-based study. *Annals of surgery*, 252, 977-981.
- Jessen, K. R., Saffrey, M. J., Baluk, P., Hanani, M. and Burnstock, G. (1983a) The enteric nervous system in tissue culture. III. Studies on neuronal survival and the retention of biochemical and morphological differentiation. *Brain research*, 262, 49-62.
- Jessen, K. R., Saffrey, M. J. and Burnstock, G. (1983b) The enteric nervous system in tissue culture. I. Cell types and their interactions in explants of the myenteric and submucous plexuses from guinea pig, rabbit and rat. *Brain research*, 262, 17-35.

- Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P. L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., Louis, J. C., Hu, S., Altrock, B. W. and Fox, G. M. (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell*, 85, 1113-1124.
- Johnson, P. J., Bornstein, J. C., Yuan, S. Y. and Furness, J. B. (1996) Analysis of contributions of acetylcholine and tachykinins to neuro-neuronal transmission in motility reflexes in the guinea-pig ileum. *British journal of pharmacology*, 118, 973-983.
- Judd, E. S. and Adson, A. W. (1928) Lumbar Sympathetic Ganglionectomy and Ramisectomy for Congenital Idiopathic Dilatation of the Colon. *Annals of surgery*, 88, 479-498.
- Kang, S. H., Vanden Berghe, P. and Smith, T. K. (2003) Ca²⁺-activated Cl⁻ current in cultured myenteric neurons from murine proximal colon. *American journal of physiology. Cell physiology*, 284, C839-847.
- Kapur, R. P. (1993) Contemporary approaches toward understanding the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Pediatric pathology / affiliated with the International Paediatric Pathology Association*, 13, 83-100.
- Kapur, R. P., Gershon, M. D., Milla, P. J. and Pachnis, V. (2004) The influence of Hox genes and three intercellular signalling pathways on enteric neuromuscular development. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 16 Suppl 1, 8-13.
- Keung, A. J., Dong, M., Schaffer, D. V. and Kumar, S. (2013) Pan-neuronal maturation but not neuronal subtype differentiation of adult neural stem cells is mechanosensitive. *Scientific reports*, 3, 1817.
- Kirchgessner, A. L., Tamir, H. and Gershon, M. D. (1992) Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 12, 235-248.
- Kosterlitz, H. W. and Lydon, R. J. (1971) Impulse transmission in the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation of the guinea-pig ileum. *British journal of pharmacology*, 43, 74-85.
- Kruger, G. M., Mosher, J. T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T. and Morrison, S. J. (2002) Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*, 35, 657-669.
- Kunze, W. A., Bertrand, P. P., Furness, J. B. and Bornstein, J. C. (1997) Influence of the mucosa on the excitability of myenteric neurons. *Neuroscience*, 76, 619-634.
- Kunze, W. A., Bornstein, J. C., Furness, J. B., Hendriks, R. and Stephenson, D. S. (1994) Charybdotoxin and iberiotoxin but not apamin abolish the slow after-hyperpolarization in myenteric plexus neurons. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 428, 300-306.
- Kunze, W. A., Clerc, N., Furness, J. B. and Gola, M. (2000) The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation. *The Journal of physiology*, 526 Pt 2, 375-385.
- Kunze, W. A. and Furness, J. B. (1999) The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annual review of physiology*, 61, 117-142.
- Langer, J. C. (2012) Laparoscopic and transanal pull-through for Hirschsprung disease. *Seminars in pediatric surgery*, 21, 283-290.

- LeDouarin, N. M. and Kalcheim, C. (1999) *The Neural Crest*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K. and Hempstead, B. L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294, 1945-1948.
- Levin, D. N., Marcon, M. A., Rintala, R. J., Jacobson, D. and Langer, J. C. (2012) Inflammatory bowel disease manifesting after surgical treatment for Hirschsprung disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 55, 272-277.
- Li, X. J., Du, Z. W., Zarnowska, E. D., Pankratz, M., Hansen, L. O., Pearce, R. A. and Zhang, S. C. (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, 23, 215-221.
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S. and Collins, F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260, 1130-1132.
- Liu, M. T., Rayport, S., Jiang, Y., Murphy, D. L. and Gershon, M. D. (2002) Expression and function of 5-HT₃ receptors in the enteric neurons of mice lacking the serotonin transporter. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 283, G1398-1411.
- Llewellyn-Smith, I. J., Costa, M., Furness, J. B. and Bornstein, J. C. (1993) Structure of the tertiary component of the myenteric plexus in the guinea-pig small intestine. *Cell and tissue research*, 272, 509-516.
- Lomax, A. E., Bertrand, P. P. and Furness, J. B. (2001) Electrophysiological characteristics distinguish three classes of neuron in submucosal ganglia of the guinea-pig distal colon. *Neuroscience*, 103, 245-255.
- Luckensmeyer, G. B. and Keast, J. R. (1998) Projections of pelvic autonomic neurons within the lower bowel of the male rat: an anterograde labelling study. *Neuroscience*, 84, 263-280.
- Ludman, L., Spitz, L. and Kiely, E. M. (1994) Social and emotional impact of faecal incontinence after surgery for anorectal abnormalities. *Archives of disease in childhood*, 71, 194-200.
- Mao, Y., Wang, B. and Kunze, W. (2006) Characterization of myenteric sensory neurons in the mouse small intestine. *Journal of neurophysiology*, 96, 998-1010.
- Matheson, C. R., Carnahan, J., Urich, J. L., Bocangel, D., Zhang, T. J. and Yan, Q. (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins. *Journal of neurobiology*, 32, 22-32.
- Metzger, M., Bareiss, P. M., Danker, T., Wagner, S., Hennenlotter, J., Guenther, E., Obermayr, F., Stenzl, A., Koenigsrainer, A., Skutella, T. and Just, L. (2009a) Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system. *Gastroenterology*, 137, 2063-2073 e2064.
- Metzger, M., Bareiss, P. M., Nikolov, I., Skutella, T. and Just, L. (2007) Three-dimensional slice cultures from murine fetal gut for investigations of the enteric nervous system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 236, 128-133.
- Metzger, M., Caldwell, C., Barlow, A. J., Burns, A. J. and Thapar, N. (2009b) Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology*, 136, 2214-2225 e2211-2213.
- Morita, K. and North, R. A. (1985) Significance of slow synaptic potentials for transmission of excitation in guinea-pig myenteric plexus. *Neuroscience*, 14, 661-672.

- Mulholland, M. W., Romanchuk, G. and Flowe, K. (1992) Dendritic outgrowth of myenteric plexus neurons in primary culture. *The Journal of surgical research*, 52, 320-327.
- Nakayama, S. and Torihashi, S. (2002) Spontaneous rhythmicity in cultured cell clusters isolated from mouse small intestine. *The Japanese journal of physiology*, 52, 217-227.
- Natarajan, D., Grigoriou, M., Marcos-Gutierrez, C. V., Atkins, C. and Pachnis, V. (1999) Multipotential progenitors of the mammalian enteric nervous system capable of colonising aganglionic bowel in organ culture. *Development*, 126, 157-168.
- Newgreen, D. and Young, H. M. (2002a) Enteric Nervous System: Development and Developmental Disturbances--Part 1. *Pediatric and Developmental Pathology*, 5, 224-247.
- Newgreen, D. and Young, H. M. (2002b) Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, 5, 329-349.
- Nguyen, T. V., Poole, D. P., Harvey, J. R., Stebbing, M. J. and Furness, J. B. (2005) Investigation of PKC isoform-specific translocation and targeting of the current of the late afterhyperpolarizing potential of myenteric AH neurons. *The European journal of neuroscience*, 21, 905-913.
- Nishi, S. and North, R. A. (1973) Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *The Journal of physiology*, 231, 471-491.
- Noisa, P., Raivio, T. and Cui, W. (2015) Neural Progenitor Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells as an Origin of Dopaminergic Neurons. *Stem cells international*, 2015, 647437.
- North, R. A. (1973) The calcium-dependent slow after-hyperpolarization in myenteric plexus neurones with tetrodotoxin-resistant action potentials. *British journal of pharmacology*, 49, 709-711.
- North, R. A. and Tokimasa, T. (1987) Persistent calcium-sensitive potassium current and the resting properties of guinea-pig myenteric neurones. *The Journal of physiology*, 386, 333-353.
- Nurgali, K. (2009) Plasticity and ambiguity of the electrophysiological phenotypes of enteric neurons. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 21, 903-913.
- Nurgali, K., Stebbing, M. J. and Furness, J. B. (2004) Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of enteric neurons in the mouse colon. *The Journal of comparative neurology*, 468, 112-124.
- Osorio, N., Delmas, P. and Jones, P. A. (2011) Patch clamp recording from enteric neurons in situ. *Nature protocols*, 6, 15-27.
- Parisi, M. A. (1993) Hirschsprung Disease Overview. In *GeneReviews(R)* (Eds, Pagon, R. A., Adam, M. P., Ardinger, H. H., Wallace, S. E., Amemiya, A., Bean, L. J. H., Bird, T. D., Fong, C. T., Mefford, H. C., Smith, R. J. H. and Stephens, K.) Seattle (WA).
- Parisi, M. A. and Kapur, R. P. (2000) Genetics of Hirschsprung disease. *Current opinion in pediatrics*, 12, 610-617.
- Pomp O, B. I., Ben-Dor I; Reubinoff B, Goldstein RS (2005) Generation of peripheral sensory and sympathetic neurons and neural crest cells from human embryonic stem cells. *Stem cells*, 23, 923-930.

- Porter, A. J., Wattchow, D. A., Brookes, S. J. and Costa, M. (1997) The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. *Gastroenterology*, 113, 1916-1923.
- Porter, A. J., Wattchow, D. A., Brookes, S. J. and Costa, M. (1999) Projections of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 14, 1180-1187.
- Powely, T. L. (2000) Vagal input to the enteric nervous system. *Gut*, 47, 30-32.
- Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 262, 695-700.
- Rauch, U., Hansgen, A., Hagl, C., Holland-Cunz, S. and Schafer, K. H. (2006) Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *International journal of colorectal disease*, 21, 554-559.
- Reed, D. E. and Vanner, S. J. (2001) Converging and diverging cholinergic inputs from submucosal neurons amplify activity of secretomotor neurons in guinea-pig ileal submucosa. *Neuroscience*, 107, 685-696.
- Reiff, D. F. and Guenther, E. (1999) Developmental changes in voltage-activated potassium currents of rat retinal ganglion cells. *Neuroscience*, 92, 1103-1117.
- Richardson, K. C. (1958) Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. *The American journal of anatomy*, 103, 99-135.
- Rintala, R. J. and Pakarinen, M. P. (2010) Outcome of anorectal malformations and Hirschsprung's disease beyond childhood. *Seminars in pediatric surgery*, 19, 160-167.
- Rintala, R. J. and Pakarinen, M. P. (2012) Long-term outcomes of Hirschsprung's disease. *Seminars in pediatric surgery*, 21, 336-343.
- Robertson, J. (2001) Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. *Nat. Rev. Genet*, 2, 74-78.
- Robertson, K., Mason, I. and Hall, S. (1997) Hirschsprung's disease: genetic mutations in mice and men. *Gut*, 41, 436-441.
- Romeo, G., Ronchetto, P., Luo, Y., Barone, V., Seri, M., Ceccherini, I., Pasini, B., Bocciardi, R., Lerone, M., Kaariainen, H. and et al. (1994) Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 367, 377-378.
- Rosenthal, A. (1999) The GDNF protein family: gene ablation studies reveal what they really do and how. *Neuron*, 22, 201-203.
- Rugiero, F., Gola, M., Kunze, W. A., Reynaud, J. C., Furness, J. B. and Clerc, N. (2002) Analysis of whole-cell currents by patch clamp of guinea-pig myenteric neurones in intact ganglia. *The Journal of physiology*, 538, 447-463.
- Rugiero, F., Mistry, M., Sage, D., Black, J. A., Waxman, S. G., Crest, M., Clerc, N., Delmas, P. and Gola, M. (2003) Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na⁺ current and NaV1.9 subunit in myenteric sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23, 2715-2725.
- Ruttenstock, E. and Puri, P. (2009) A meta-analysis of clinical outcome in patients with total intestinal aganglionosis. *Pediatric surgery international*, 25, 833-839.
- Ryan, D. P. (1995) Neuronal intestinal dysplasia. *Seminars in pediatric surgery*, 4, 22-25.

- Sancandi, M., Ceccherini, I., Costa, M., Fava, M., Chen, B., Wu, Y., Hofstra, R., Laurie, T., Griffiths, M., Burge, D. and Tam, P. K. (2000) Incidence of RET mutations in patients with Hirschsprung's disease. *Journal of pediatric surgery*, 35, 139-142; discussion 142-133.
- Sauvat, F., Grimaldi, C., Lacaille, F., Ruemmele, F., Dupic, L., Bourdaud, N., Fusaro, F., Colomb, V., Jan, D., Cezard, J. P., Aigrain, Y., Revillon, Y. and Goulet, O. (2008) Intestinal transplantation for total intestinal aganglionosis: a series of 12 consecutive children. *Journal of pediatric surgery*, 43, 1833-1838.
- Schafer, K. H., Hagl, C. I. and Rauch, U. (2003) Differentiation of neurospheres from the enteric nervous system. *Pediatric surgery international*, 19, 340-344.
- Schemann, M., Reiche, D. and Michel, K. (2001) Enteric pathways in the stomach. *The Anatomical record*, 262, 47-57.
- Scheuermann, D. W., Stach, W. and Timmermans, J. P. (1987a) Topography, architecture and structure of the plexus submucosus externus (Schabadasch) of the porcine small intestine in scanning electron microscopy. *Acta anatomica*, 129, 105-115.
- Scheuermann, D. W., Stach, W. and Timmermans, J. P. (1987b) Topography, architecture and structure of the plexus submucosus internus (Meissner) of the porcine small intestine in scanning electron microscopy. *Acta anatomica*, 129, 96-104.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Constatini, F. and Pachnis, V. (1994) Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*, 367, 380-383.
- Schutte, I. W., Kroese, A. B. and Akkermans, L. M. (1995) Somal size and location within the ganglia for electrophysiologically identified myenteric neurons of the guinea pig ileum. *The Journal of comparative neurology*, 355, 563-572.
- Seri, M., Yin, L., Barone, V., Bolino, A., Celli, I., Bocciardi, R., Pasini, B., Ceccherini, I., Lerone, M., Kristoffersson, U., Larsson, L. T., Casasa, J. M., Cass, D. T., Abramowicz, M. J., Vanderwinden, J. M., Kravcenkiene, I., Baric, I., Silengo, M., Martucciello, G. and Romeo, G. (1997) Frequency of RET mutations in long- and short-segment Hirschsprung disease. *Human mutation*, 9, 243-249.
- Smith, T. K., Burke, E. P. and Shuttleworth, C. W. (1999) Topographical and electrophysiological characteristics of highly excitable S neurones in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *The Journal of physiology*, 517 (Pt 3), 817-830.
- Song, Z. M., Brookes, S. J., Ramsay, G. A. and Costa, M. (1997) Characterization of myenteric interneurons with somatostatin immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience*, 80, 907-923.
- Song, Z. M., Brookes, S. J., Steele, P. A. and Costa, M. (1992) Projections and pathways of submucous neurons to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Cell and tissue research*, 269, 87-98.
- Starodub, A. M. and Wood, J. D. (2000) A-type potassium current in myenteric neurons from guinea-pig small intestine. *Neuroscience*, 99, 389-396.
- Sun, W., Sun, C., Lin, H., Zhao, H., Wang, J., Ma, H., Chen, B., Xiao, Z. and Dai, J. (2009) The effect of collagen-binding NGF-beta on the promotion of sciatic nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush injury model. *Biomaterials*, 30, 4649-4656.
- Swenson, O., Neuhauser, E. B. and Pickett, L. K. (1949) New concepts of the etiology, diagnosis and treatment of congenital megacolon (Hirschsprung's disease). *Pediatrics*, 4, 201-209.

- Takats, M. D. G. d. and Biggs, M. D. A. D. (1938) Observations on congenital megacolon. *The Journal of Pediatrics* 13, 819–846.
- Takazawa, T., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Studer, L., Wichterle, H. and Macdermott, A. B. (2012) Maturation of spinal motor neurons derived from human embryonic stem cells. *PloS one*, 7, e40154.
- Telford, E. D. and Haxton, H. A. (1948) Congenital megacolon; results of treatment by spinal anaesthesia. *British medical journal*, 1, 827.
- Timmermans, J. P., Hens, J. and Adriaensen, D. (2001) Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *The Anatomical record*, 262, 71-78.
- Timmermans, J. P., Scheuermann, D. W., Stach, W., Adriaensen, D. and De Grootd-Lasseel, M. H. (1990) Distinct distribution of CGRP-, enkephalin-, galanin-, neuromedin U-, neuropeptide Y-, somatostatin-, substance P-, VIP- and serotonin-containing neurons in the two submucosal ganglionic neural networks of the porcine small intestine. *Cell and tissue research*, 260, 367-379.
- Treanor, J. J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D. M., Poulsen, K. T., Beck, C. D., Gray, C., Armanini, M. P., Pollock, R. A., Hefti, F., Phillips, H. S., Goddard, A., Moore, M. W., Buj-Bello, A., Davies, A. M., Asai, N., Takahashi, M., Vandlen, R., Henderson, C. E. and Rosenthal, A. (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*, 382, 80-83.
- Trudrung, P., Furness, J. B., Pompolo, S. and Messenger, J. (1994) Locations and chemistries of sympathetic nerve cells that project to the gastrointestinal tract and spleen. *Arch Histol Cytol*, 57, 139-150.
- Tsuji, H., Spitz, L., Kiely, E. M., Drake, D. P. and Pierro, A. (1999) Management and long-term follow-up of infants with total colonic aganglionosis. *Journal of pediatric surgery*, 34, 158-161; discussion 162.
- Vanden Berghe, P., Kenyon, J. L. and Smith, T. K. (2002) Mitochondrial Ca²⁺ uptake regulates the excitability of myenteric neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22, 6962-6971.
- Vanner, S. and Surprenant, A. (1996) Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *The American journal of physiology*, 271, G223-230.
- Vogalis, F., Hillsley, K. and Smith, T. K. (2000) Diverse ionic currents and electrical activity of cultured myenteric neurons from the guinea pig proximal colon. *Journal of neurophysiology*, 83, 1253-1263.
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E. and Ikuta, F. (1988) Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta neuropathologica*, 76, 217-221.
- Waxman, S. G. (2001) Transcriptional channelopathies: an emerging class of disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 2, 652-659.
- Wedel, T., Bottner, M. and Krammer, H. J. (2007) [The enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. Changes in chronic constipation in adults]. *Der Pathologe*, 28, 143-148.
- Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H. and de Vos, A. M. (1999) Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature*, 401, 184-188.
- Wilkinson, D. J., Bethell, G. S., Shukla, R., Kenny, S. E. and Edgar, D. H. (2015) Isolation of Enteric Nervous System Progenitor Cells from the Aganglionic Gut of Patients with Hirschsprung's Disease. *PloS one*, 10, e0125724.
- Wilkinson, D. J., Edgar, D. H. and Kenny, S. E. (2012) Future therapies for Hirschsprung's disease. *Seminars in pediatric surgery*, 21, 364-370.

- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. and Gough, N. M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336, 684-687.
- Wong, V., Blennerhassett, M. and Vanner, S. (2008) Electrophysiological and morphological properties of submucosal neurons in the mouse distal colon. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 20, 725-734.
- Wood, J. D. and Mayer, C. J. (1978) Intracellular study of electrical activity of Auerbach's plexus in guinea-pig small intestine. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 374, 265-275.
- Wu, J. J., Chen, J. X., Rothman, T. P. and Gershon, M. D. (1999) Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development*, 126, 1161-1173.
- Xiao, J., Nguyen, T. V., Ngui, K., Strijbos, P. J., Selmer, I. S., Neylon, C. B. and Furness, J. B. (2004) Molecular and functional analysis of hyperpolarisation-activated nucleotide-gated (HCN) channels in the enteric nervous system. *Neuroscience*, 129, 603-614.
- Yancey, A. G., Cromartie, J. E., Jr., Ford, J. R., Nichols, R. R., Jr. and Saville, A. F., Jr. (1952) A modification of the Swenson technique for congenital megacolon. *Journal of the National Medical Association*, 44, 356-363.
- Yeazell, L. A. and Bell, H. G. (1949) Results of medical and surgical management in ten cases of congenital megacolon. *California medicine*, 70, 398-400.
- Yokoyama, S., Ozaki, T. and Kajitsuka, T. (1977) Excitation conduction in Auerbach's plexus of rabbit small intestine. *The American journal of physiology*, 232, E100-108.
- Young, H. M., Anderson, R. B. and Anderson, C. R. (2004) Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 112, 1-14.
- Young, H. M., Hearn, C. J., Farlie, P. G., Canty, A. J., Thomas, P. Q. and Newgreen, D. F. (2001) GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Developmental biology*, 229, 503-516.
- Zeng, F., Watson, R.P., Nash, M.S. (2010) Glial cell-derived neurotrophic factor enhances synaptic communication and 5-hydroxytryptamine 3a receptor expression in enteric neurons. *Gastroenterology*, 138, 1491-1501.
- Zeng, X., Cai, J., Chen, J., Luo, Y., You, Z. B., Fotter, E., Wang, Y., Harvey, B., Miura, T., Backman, C., Chen, G. J., Rao, M. S. and Freed, W. J. (2004) Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem cells*, 22, 925-940.
- Zholos, A. V., Baidan, L. V., Starodub, A. M. and Wood, J. D. (1999) Potassium channels of myenteric neurons in guinea-pig small intestine. *Neuroscience*, 89, 603-618.
- Zholos, A. V., Baidan, L. V. and Wood, J. D. (2002) Sodium conductance in cultured myenteric AH-type neurons from guinea-pig small intestine. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 96, 93-102.

8 Anhang A

8.1 Verwendete Materialien

8.1.1 Verbrauchsmaterial und Laborinstrumente

Alle verwendeten Laborinstrumente stammten von der Firma Fine Science Tools GmbH und VWR International GmbH.

Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Eppendorf AG (Hamburg) und Greiner Bio-One International AG (Frickenhausen) bezogen.

Tabelle 6: Verbrauchsmaterial.

Produkt	Hersteller
Spritzen Filter (0,22 µm)	Corning Incorporated
Borosilikatglas	World Precision Instruments Inc.
Bleiglas	World Precision Instruments Inc.
12-well Platten	Corning Incorporated
24-well Platten	Corning Incorporated
25 ml Tubes	Corning Incorporated
50 ml Tubes	Corning Incorporated
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

8.1.2 Chemikalien, Zellkulturmedien und –lösungen

Alle verwendeten Zellkulturmedien, Intra- und Extrazellulärlösungen sind Anhang B zu entnehmen.

Tabelle 7: Chemikalien allgemein.

Produkt	Hersteller
4-Aminopyridin (4-AP)	Sigma-Aldrich, CDS009306
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth, 8076.2
Cadmium (Cd)	Sigma-Aldrich, 202908
Caesiumchlorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, 232068
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth, T8885.2
Cytosin β-D-arabinofuranosid (Ara-C)	Sigma-Aldrich, C1768
D-Gluconsäure	Sigma-Aldrich, G1951
Di-Natrium-ATP (Na ₂ ATP)	Sigma-Aldrich, A6419
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, 03779
Glukose	Carl Roth, HN06.2
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Carl Roth, 9105.3
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, 6781.1
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth, 2189.1
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, HN00.2
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, 1.06346,0500
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, HN01.2
PBS (Phosphatgepufferte Saline)	Gibco, 14190-094
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA Laboratories, P11-010
Saccharose	Carl Roth, 4621.1
Tetraethylammonium (TEA)	Sigma-Aldrich, T2265
Tetrodotoxin (TTX)	Tocris, 1069
Tolbutamid	Sigma-Aldrich, T0891
Trypanblau	Sigma-Aldrich, T8154

Tabelle 8: Chemikalien Meerschweinchen.

Produkt	Hersteller
Kollagenase II	Sigma-Aldrich, C6885
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories, A15-151
Medium 199/GlutaMAX	Life Technologies, 41150-087
mNGF 7S	Sigma-Aldrich, N0513
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, P1274
Protease Typ I	Sigma-Aldrich, P4630

Tabelle 9: Chemikalien C56/BL6N Mäuse, neonatal und adult.

Produkt	Hersteller
Kollagenase II	Worthington Biochemical Corporation
Dispase II	Roche GmbH
DMEM/Ham's F-12	Life Technologies
DNase I	Sigma-Aldrich, DN25
EGF	Sigma-Aldrich, E9644
Fötale Kälberserum Superior	Biochrom, Merck kGaA
FGF	Sigma-Aldrich, F0291
GDNF	PeptoTech
HBSS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Life Technologies, 14065-049
HBSS mit Ca ²⁺ ohne Mg ²⁺	Life Technologies, 14170-120
Heparin	Sigma-Aldrich, H5515
A2P	Sigma-Aldrich, A8960
N2-Supplement	Life Technologies, 17502-048
Growth-Supplement (B27)	Life Technologies, 17504-044
Rat tail Kollagen Typ I	BD Biosciences

8.1.3 Immunhistochemie

Tabelle 10: Immunhistologische Reagenzien.

Produkt	Hersteller
DAPI	Sigma-Aldrich, D95542
ABC-Komplex	Vector Laboratories Inc., PK 7100
Biocytin	Tocris Bioscience, 3349
Blocking Reagenz	Roche GmbH, 921673001
BrdU	Life Technologies, 00-0103
Cy2 (goat anti-mouse IgG)	Millipore, Merck kGaA
Cy3 (goat anti-rabbit IgG)	Millipore, Merck kGaA
Fluoreszenzeinbett-Medium	Dako
Diaminobenzidin	Vector Laboratories Inc., SK 4100
GFAP	Dako, Z0334
Imidazol	Sigma-Aldrich, 56750
NeuN	Millipore, Merck kGaA, MAB377
Ziegenserum (NGS)	Sigma-Aldrich, G9023
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, 76240
SMI 31	Covance Inc.
Trishydrochlorid	Sigma-Aldrich, T5941
Triton-X-100	Sigma-Aldrich; T8787

8.1.4 Tiere

Die verwendeten Dunkin-Hartley Meerschweinchen wurden von der Firma Charles River Laboratories geliefert, die C56/BL6N Mäuse stammten von der Firma Janvier Labs, Frankreich.

8.1.5 Geräte.

Tabelle 11: Verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Wasserbad WNB 14	Memmert GmbH + Co.KG
Sutter Model P97	Sutterinstrument Co.
DMZ-Universal Puller	Zeitz Instruments
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG.
Zentrifuge Laborfuge 400	Thermo Scientific
Binocular	Motic Digital Microscope
Brutschrank CB150 990049S	Binder GmbH
Schüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments
EPC8	Heka GmbH
Schwingungsgedämpfter Tisch	Accurion GmbH
Manifold	Ala Scientific Instruments Inc.
Vorverstärker	Heka GmbH
Mikroskop	Carl Zeiss AG.
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG.
8-Kanal-Applikator	RAPP Elektronik

8.1.6 Software

Tabelle 12: Verwendete Software.

Software	Hersteller
Axio Vision 4.8	Carl Zeiss AG.
Corel Draw	Corel Corporation
Igor Pro	WaveMetrics
Patchmaster	Heka GmbH
PAT (Patcher's Power Tools)	J. Bergsmann
Microsoft Office 2003	Microsoft Corporation

9 Anhang B

9.1 Präparations,- und Kultivierungsmedien, Intra- und Extrazellulärlösungen

9.1.1 Präparations-, und Kultivierungsmedien

Tabelle 13: Krebslösung zur Präparation intakter Meerschweinchen Ganglien.

Der pH-Wert wurde bei 4 °C durch Begasung mit CO₂ auf pH 7,4 eingestellt

Substanz	Molekulargewicht (g)	Konzentration (mM)
NaCl	58,44	120,9
KCl	74,55	5,9
Glucose	180,2	11,5
NaHCO ₃	84,01	25
NaH ₂ PO ₄	138	1,2
MgCl ₂ *6H ₂ O	203,3	1,2
CaCl ₂ *6H ₂ O	147,02	2,5

Tabelle 14: Meerschweinchen Kultivierungsmedium.

Das Medium wird ohne FKS und NGF steril filtriert

Substanz	Endkonzentration in Medium 199 + GlutaMAX
Penicillin/Streptomycin	1 %
Glucose	30 mM
NGF	50 ng/ml

Tabelle 15: Einzelzellmedium zur kultivierung adulter muriner Einzelzellen.

Bei jedem MW werden 10 ng/ml GDNF und 1µM/ml Ara-C hinzugefügt. Optional 10 ng/ml NGF

Substanz	Endkonzentration in Medium 199 + GlutaMAX
Penicillin/Streptomycin	1 %
Glucose	10 mM
Fötales Kälberserum	10 %

Tabelle 16: Proliferationsmedium von Enterosphären.

An Tag 1 werden die Kulturen zusätzlich mit Growth Supplement (ehemals B27) in einer Konzentration von 1:50 versetzt. Alle zwei Tage werden den Kulturen EGF und FGF in einer Endkonzentration 20 ng/ml zugegeben

Substanz	Endkonzentration in DMEM/Ham´s F12 mit stabilem Glutamat
Penicillin/Streptomycin	1 %
N2-Supplement	1:50

Tabelle 17: Differenzierungsmedium der Enterosphären.

Bei jedem MW werden 10 ng/ml GDNF und 1µM/ml Ara-C hinzugefügt. Optional 10 ng/ml NGF

Substanz	Endkonzentration in DMEM/Ham´s F12 mit stabilem Glutamat
Penicillin/Streptomycin	1 %
N2-Supplement	1:50
Fötale Kälberserum	2 %
A2P (L-ascorbic acid 2-phosphate)	200 µM

9.1.2 Intra,-und Extrazellulärlösungen

Die folgenden Intra,- und Extrazellulärlösungen wurden bei den Zellen, die in die Auswertung eingegangenen sind verwendet.

9.1.2.1 Intrazellulärlösungen

Die Intrazellulärlösung Kalium-Gluconat mit 0,5 mM EGTA wurde nur bei den Meerschweinchen Messungen verwendet. Die Cäsium-Gluconat Lösung nur bei der Ermittlung der Natriumaktivierung der adulten murinen Zellen. Alle anderen Messungen der adulten murinen Zellen und PDC Typ I und II Zellen fanden unter Verwendung von Kalium-Gluconat mit 0,1 mM EGTA statt.

Tabelle 18: Intrazellulärlösung Kalium-Gluconat mit 0,5 mM EGTA

Diese IZL wurde nur bei den Messungen der Meerschweinchen Ganglien verwendet.

Der pH-Wert wurde auf 7,4 mit KOH eingestellt

Substanz	Molekulargewicht (g)	Konzentration (mM)
Gluconsäure	196,16	130
HEPES	238,3	10
TEA	165,7	10
Na ₂ ATP	551,1	2
MgCl ₂	203,3	2
EGTA	380,4	0,5

Tabelle 19: Intrazellulärlösung Cäsium-Gluconat.

Diese IZL wurde nur bei der Bestimmung der Natriumaktivierung adulter muriner Zellen verwendet.

Der pH-Wert wurde auf 7,4 mit CsOH/HCl eingestellt

Substanz	Molekulargewicht (g)	Konzentration (mM)
Gluconsäure	196,16	130
HEPES	238,3	10
TEA	165,7	10
Na ₂ ATP	551,1	2
MgCl ₂	203,3	2
EGTA	380,4	0,5

Tabelle 20: Intrazellulärlösung Kalium-Gluconat mit 0,1 mM EGTA.

Diese IZL wurde bei allen Messungen verwendet, ausser bei der Natriumaktivierung der adulten murinen Zellen.

Der pH-Wert wurde auf 7,4 mit KOH eingestellt

Substanz	Molekulargewicht (g)	Konzentration (mM)
KCl	74,56	20
K-Gluconat	234,25	135
MgCl ₂	203,3	2
Na ₂ ATP	551,1	2
HEPES	238,3	10
EGTA	380,4	0,1

9.1.2.2 Extrazellulärlösungen

Die Extrazellulärlösung ExHepes low Kalium high Natrium wurde nur bei den Meerschweinchen Messungen verwendet. Alle anderen Messungen der adulten murinen Zellen und PDC Typ I und II Zellen fanden unter Verwendung der Extrazellulärlösung ExHepes low Kalium statt

Tabelle 21: Extrazellulärlösung ExHepes low Kalium high Natrium.

Diese EZL wurde bei den Meerschweinchen sowie bei den PDC Typ I Zellen verwendet. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt mit NaOH/HCl

Substanz	Molekulargewicht (g)	Konzentration (mM)
NaCl	58,44	145
KCl	74,55	2,5
Glucose	180,2	10
HEPES	238,3	10
MgCl ₂	203,3	1
Saccharose	342,3	10
CaCl ₂	147,02	2

Tabelle 22: Extrazellulärlösung ExHepes low Kalium.

Diese EZL wurde bei bei allen Messungen verwendet, ausser bei Meerschweinchen und PDC Typ I Zellen. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt mit NaOH/HCl

Substanz	Molekulargewicht (g)	Konzentration (mM)
NaCl	58,44	135
KCl	74,55	2,5
Glucose	180,2	10
HEPES	238,3	10
MgCl ₂	203,3	1
CaCl ₂	147,02	2

10 Anhang C

10.1 Zusammenfassung relevanter elektrophysiologischer Daten

10.1.1 Elektrophysiologische Daten adulter muriner Zellen

Tabelle 23: Mittlere Membrankapazitäten adulter muriner Zellen in Abhängigkeit ihrer Kultivierungsdauer.

Kultivierungsdauer (d)	Mittlere Membrankapazität (pF)
0-6	11,3 ± 2,1 (n=5)
7-13	11,3 ± 1 (n=12)
14-20	12,7 ± 1,2 (n=20)
21-27	16,9 ± 2,8 (n=3)

Tabelle 24: Mittlere Stromdichte adulter muriner Zellen in Abhängigkeit ihrer Kultivierungsdauer.

Kultivierungsdauer (d)	Mittlere Stromdichte (pA/pF)
0-6	246 ± 76 (n=5)
7-13	119 ± 22 (n=12)
14-20	81,6 ± 14 (n=20)
21-27	90,3 ± 51 (n=3)

Tabelle 25: Halbmaximale Spannungen der Natriumaktivierung und – inaktivierung muriner adulter Zellen mit entsprechender Steigung.

Für die Natriumaktivierung sind die halbmaximalen Natriumaktivierungen bei 0-6 Tagen in Differenzierung und 7-13 Tagen in Differenzierung gezeigt

Diff. (d)	$V_{1/2} \text{ Na}^{\text{-Akt}} \text{ (mV)}$	Steigung (k)	$V_{1/2} \text{ Na}^{\text{-InAkt}} \text{ (mV)}$	Steigung (k)
0-6	$-21,82 \pm 0,45 \text{ (n=5)}$	$6,57 \pm 0,4$	/	/
7-13	$-21,89 \pm 0,5 \text{ (n=12)}$	$7,22 \pm 0,44$	/	/
gesamt	$-30,9 \pm 7,8 \text{ (n=40)}$	$15,06 \pm 1,6$	$-28,9 \pm 4,3 \text{ (n=27)}$	$7,34 \pm 3,8$

10.1.2 Elektrophysiologische Daten progenitor-abgeleiteter Zellen (PDC Typ II)

Tabelle 26: Mittlere Membrankapazität von PDC Typ II Zellen in Abhängigkeit der Proliferationsdauer und der drauf folgenden Differenzierungszeit.

Proliferation (d)	Differenzierung (d)	Mittlere Membrankapazitäten (pF)
3	7-13	/
3	14-20	20,3 (n=1)
3	21-27	$19,5 \pm 2,6 \text{ (n=3)}$
6	7-13	23,5 (n=1)
6	14-20	$13,7 \pm 1,7 \text{ (n=7)}$
6	21-27	$24,5 \pm 9,3 \text{ (n=3)}$
10	7-13	/
10	14-20	$13,1 \pm 1,7 \text{ (n=6)}$
10	21-27	$19,9 \pm 7,5 \text{ (n=3)}$

Tabelle 27: Mittlere Stromdichte von PDC Typ II Zellen in Abhängigkeit der Proliferationsdauer und der drauf folgenden Differenzierungszeit.

Proliferation (d)	Differenzierung (d)	Mittlere Stromdichte (pA/pF)
3	7-13	/
3	14-20	-25,3 (n=1)
3	21-27	-28,6 ± 8,83 (n=3)
6	7-13	-27 (n=1)
6	14-20	-110 ± 34,8 (n=7)
6	21-27	-52,2 ± 28,4 (n=3)
10	7-13	/
10	14-20	-66,8 ± 22,1 (n=6)
10	21-27	-34,9 ± 9,97 (n=3)

Tabelle 28: Halbmaximale Spannungen und Steigungen der Natriumaktivierung und – inaktivierung von PDC Typ II Zellen in Abhängigkeit der Proliferationszeit.

Pro. (d)	V_{1/2} Na⁺-Akt (mV)	Steigung (k)	V_{1/2} Na⁺-InAkt (mV)	Steigung (k)
3	-13,85 ± 0,26 (n=4)	4,8 ± 0,22	-35,82 ± 2,81 (n=6)	5,47 ± 2,42
6	-15,62 ± 0,28 (n=12)	6,9 ± 0,25	-34 (n=1)	4,8
10	-14,26 ± 0,32 (n=9)	5,26 ± 0,27	-34,38 ± 2,4 (n=7)	6,42 ± 2,1
gesamt	-14,73 ± 0,21 (n=25)	5,97 ± 0,18	-34,8 ± 2,64 (n=14)	5,87 ± 2,29

Tabelle 29: Halbmaximale Spannungen und Steigungen der Natriumaktivierung und – inaktivierung von PDC Typ II Zellen in Abhängigkeit der Differenzierungszeit.

Bei dem Gesamtergebnis der halbmaximalen Steigung der Natriuminaktivierung beträgt die Zellzahl n=14, da in dieses Ergebnis eine ausgewertete Zelle an DIV 37 mit einbezogen wurde

Diff. (d)	V_{1/2} Na⁺-Akt (mV)	Steigung (k)	V_{1/2} Na⁺-InAkt (mV)	Steigung (k)
7-13	-3,92 ± 1,07 (n=2)	7,27 ± 0,98	-34 ± 2,17 (n=1)	4,84 ± 1,81
14-20	-18,16 ± 0,29 (n=14)	5,35 ± 0,26	-36,13 ± 1,83 (n=5)	6,28 ± 1,6
21-27	-11,5 ± 0,42 (n=9)	5,39 ± 0,38	-35,88 ± 2,84 (n=7)	5,51 ± 2,44
gesamt	-14,73 ± 0,21 (n=25)	5,97 ± 0,18	-34,8 ± 2,64 (n=14)	5,87 ± 2,29

11 Anhang D

11.1 Strom- und Spannungsprotokolle

11.1.1 Natrimaktivierung

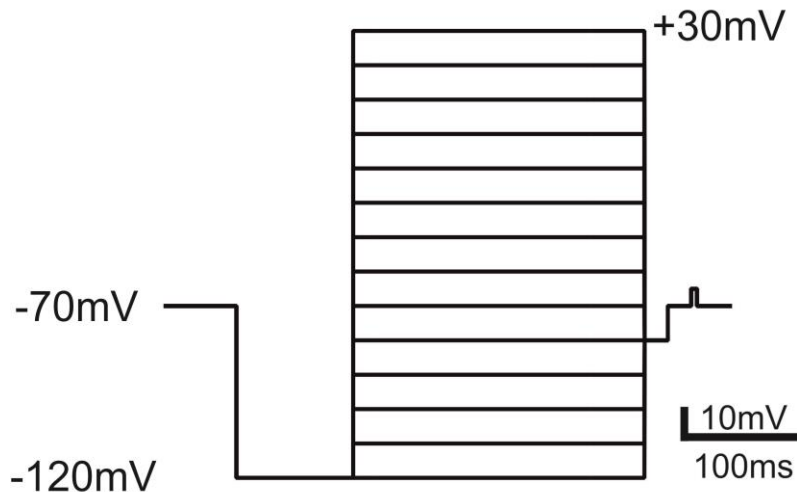


Abbildung 39: Spannungsprotokoll zur Ermittlung der Kinetik der Natriumaktivierung

Ausgehend eines vorgegebenen Ruhehaltepotenzials von -70 mV wurden die Zellen für 100 ms bei -120 mV hyperpolarisiert, bevor 250 ms langanhaltende Hyper- und Depolarisierungen folgten. Diese Hyper- und Depolarisierungspulse wurden 16 mal wiederholt, wobei zwischen jedem Intervall 5s lagen und der Depolarisierungspuls um +10 mV erhöht wurde, bis dieser beim letzten Puls einen Wert von +30 mV annahm. Nach jeder erfolgten Depolarisation erfolgte ein Rücksprung zum Ausgangsmembranpotenzial von -70mV.

11.1.2 Natriuminaktivierung

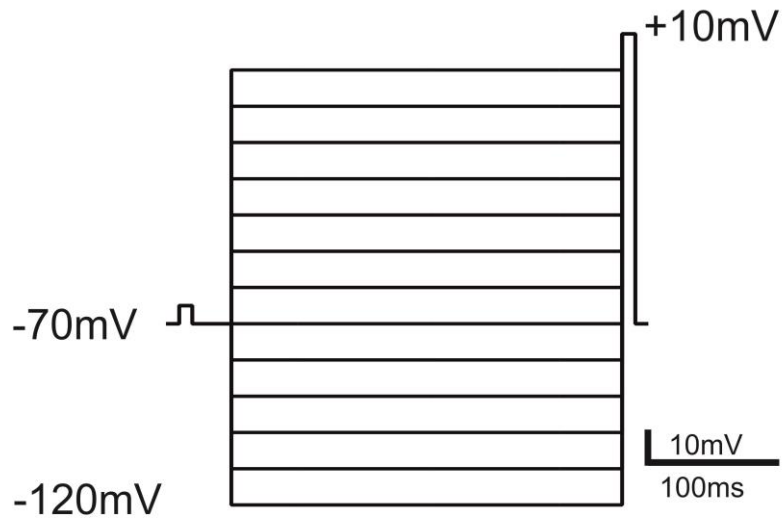


Abbildung 40: Spannungsprotokoll zur Ermittlung der Kinetiken der Natriuminaktivierung

Einem vorgegebenen Ruhehaltepotenzial von -70 mV folgten für 300 ms Hyper- und Depolarisierungspulse und ein anschließender 10 ms langer Depolarisierungssprung auf $+10\text{ mV}$, welcher die aktivierbaren Kanäle öffnen soll. Nach jedem Depolarisierungssprung erfolgte ein Rücksprung zum Ruhehaltepotenzial von -70 mV . Die Hyper- und Depolarisierungen erhöhten sich bei jedem Protokolldurchlauf um $+10\text{ mV}$, bis sie einen Endwert von 0 mV annahmen. Zwischen jedem Intervall lagen 5 s .

11.1.3 Refraktärzeit der Natriumkanäle

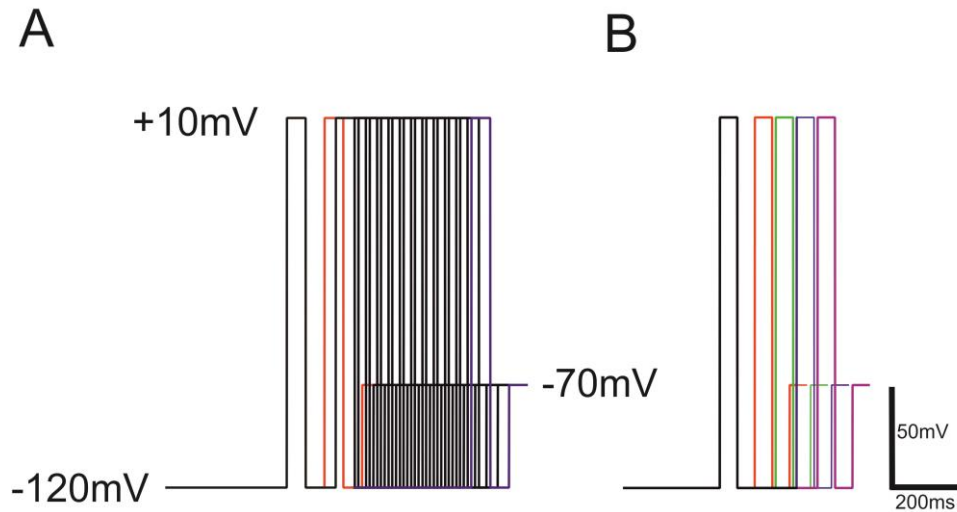


Abbildung 41: Paar-Puls-Protokoll zur Ermittlung der Refraktärzeit der Natriumkanäle

Paar-Puls-Protokoll zur Ermittlung der Erholung der Natriumkanäle aus der Inaktivierung. Zur besseren Übersicht ist in **B** nur jeder 3. Durchlauf dargestellt. **A**: Ausgehend von einem Ruhehaltepotenzial von -70 mV wurde die Zelle bei -100 mV für 300 ms hyperpolarisiert. Anschließend erfolgte ein 5 ms langer Depolarisierungspuls auf -10 mV, gefolgt von einem Rücksprung auf -100 mV für $4,5$ ms. Daraufhin erfolgte eine erneute Depolarisierung auf -10 mV für 5 ms, ein Rücksprung auf -100 mV und anschließend wurde die Zelle beim Ruhehaltepotenzial geklemmt. Bei jedem der 18 Intervalle erhöhte sich der Zeitabstand zwischen den zwei Depolarisierungspulsen auf -10 mV um 3 ms. Die Pause zwischen jedem Intervall betrug 8 s. Der erste variable Spannungspuls ist zur besseren Darstellung dargestellt, der letzte blau. **B**: Dargestellt ist der erste (rot), vierte (grün), siebte (blau) und zehnte (violett) Depolarisierungspulst.

11.1.4 Stromprotokoll (Current-clamp Protokoll)



Abbildung 42: Stromprotokoll zur Ermittlung von Membranpotenzialänderungen.

Ausgehend von einem Ruhehaltepotenzial von -70 mV wurden den Zellen hyper- und depolarisierende Strompulse mit einer Länge von 1500 ms appliziert. Zwischen den einzelnen Pulsen wurde die Zelle für 500 ms beim Ruhehaltepotenzial gehalten.

Bei den Meerschweinchen Experimenten betrug die Länge der depolarisierenden Strompulse 500 ms.

12 Anhang E

12.1 Time lapse Aufnahme einer Meerschweinchen Primärkultur

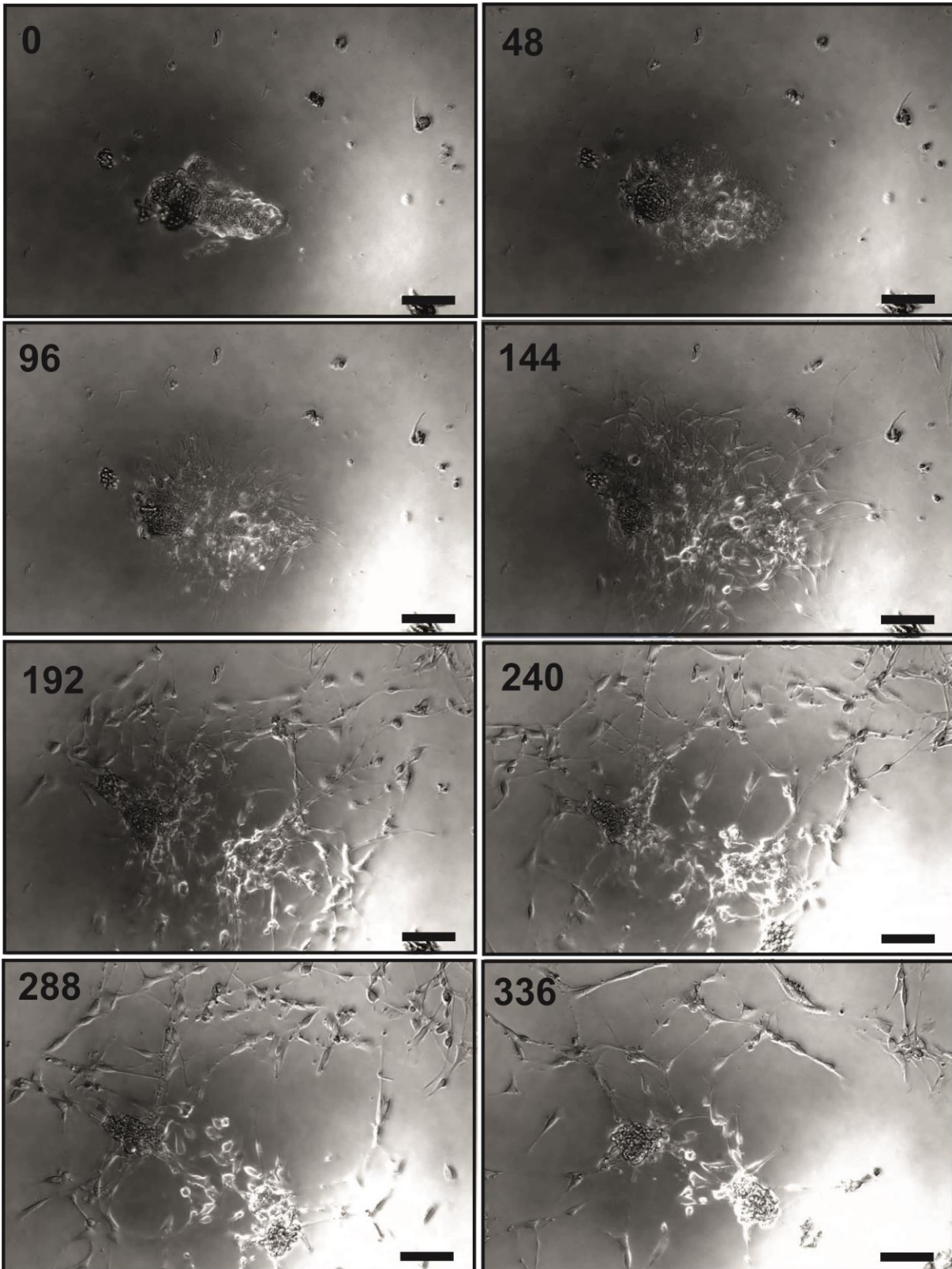


Abbildung 43: Time lapse Aufnahme einer primären Meerscheinchen Kultur über eine Kulturdauer von 15 Tagen.

Dargestellt sind Aufnahmen einer primären Zellkultur vom Meerscheinchen im Abstand von 48 Stunden. Bei Zeitpunkt 0 ist das Ganglion frisch in die Zellkultur überführt und noch nicht adhärent. Nach 48 war es adhärent und die Zellen fingen bereits an sich aus ihrem Ganglienverband zu lösen. Über die Dauer der Kultur war zu erkennen, dass die Zellen das Ganglion immer mehr verlassen und Kontakt zu benachbarten Zellverbänden suchen. Ab Stunde **192** (Tag 8) sind oben rechts im Bild Zellen aus einem anderen Ganglion zu erkennen. Während der 15-tägigen Time lapse Aufnahme war zu beobachten, dass die Zellen mit anderen, benachbarten Ganglien interagieren und sich innerhalb der Zellkultur neu anordnen. Der Maßstabsbalken entspricht in allen Bildern 50 µm.

13 Publikationen

Dettmann HM, Zhang Y, **Wronna N**, Kraushaar U, Guenther E, Mohr R, Neckel PH, Mack A, Fuchs J, Just L, Obermyr F. (2014)

Isolation, expansion and transplantation of postnatal murine progenitor cells of the enteric nervous system

PLOS ONE

13.1 Posterbeiträge

Wronna N., Kraushaar U., Guenther E. (2010)

Electrophysiological comparison of native and progenitor cell derived enteric neurons
“ScieTalk“ in Heidelberg am 8.Juni 2010; Posterpräsentation

Wronna N., Kraushaar U., Guenther E. (2010)

Electrophysiological characterization of native and stem cell derived enteric neurons for a therapy of Hirschsprung´s disease

BioStar – Science in Exchange Meeting, 4th Kongress zur Regenerativen Biologie und Medizin in Stuttgart vom 13.-15. Oktober 2010; Posterpräsentation

Weiser T., **Wronna N.**, Kraushaar U.

Effects of Butylscopolamine bromide on nicotinic acetylcholine receptors in cultured guinea pig enteric neurons. T. Weiser, N. Wronna, U. Kraushaar

Join international neurogastroenterology and motility meeting in Bologna, Italien 2012

14 Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis

14.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt durch die Darmwand mit den wichtigsten Komponenten des enterischen Nervensystems	6
Abbildung 2: Der myenterische Plexus (Auerbach Plexus)	8
Abbildung 3: Dogiel Typ I Neurone. Bestimmt und gezeichnet 1899 von Dogiel.....	10
Abbildung 4: Neurone vom Dogiel Typ II. Bestimmt und gezeichnet 1899 von Dogiel	11
Abbildung 5: Dogiel Typ III Neurone. Bestimmt und gezeichnet 1899 von Dogiel.....	12
Abbildung 6: Vergleich des Aktionspotenzialverlaufs eines S-Neurons und eines AH-Neurons.....	16
Abbildung 7: Schematische Darstellung aller Ionenkanäle eines AH-Neurons (Meerschweinchen) und deren Beteiligung am Ruhehaltepotenzial, Aktionspotenzial und nachhyperpolarisierendem Potenzial	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines normalen Intestinaltraktes und eines Intestinaltraktes mit aganglionärem Rektum	19
Abbildung 9 Übersicht frisch präparierter, kultivierter und immunhistochemisch markierter Meerschweinchen Ganglien in Kultur	40
Abbildung 10: Natriumstromantworten enterischer Neurone aus Meerschweinchen auf Spannungsprotokoll zur Natriumaktivierung.....	41
Abbildung 11: Zwei verschiedene Aktionspotenzialmuster enterischer Ganglien des Meerschweinchens an <i>DIV</i> 14, hervorgerufen durch dieselben hyper- und depolarisierenden Strompulse im Current-clamp Modus.....	43

Abbildung 12: Übersicht kultivierter adulter muriner Einzelzellen des longitudinalen myenterischen Plexus des Darms an DIV 2; 10 und 16.....	45
Abbildung 13: Adulte S- und AH-Neurone, die während der elektrophysiologischen Messung mit Biocytin gefüllt wurden.....	47
Abbildung 14: Membrankapazitäten und mittlere Stromdichten bei -20 mV in Bezug auf die Kultivierungsdauer	49
Abbildung 15: Natriumstromantworten kultivierter muriner adulter enterischer Einzelzellen auf Spannungsprotokolle zur Natriumaktivierung und – Inaktivierung. .	51
Abbildung 16: Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung über den gesamten Kultivierungszeitraum und innerhalb der ersten zwei Wochen in Kultur	53
Abbildung 17: Pharmakologische Untersuchung der Natriumkanäle mit Tetrodotoxin	54
Abbildung 18: Zwei verschiedene Aktionspotenzialmuster eines AH Neurons einer adulten murinen Einzelzellkultur als Antwort auf dieselben hyper- und depolarisierenden Strompulse im Current-clamp Modus	56
Abbildung 19: Übersicht phasisch feuender AH- und S-Neurone mit entsprechender erster Differenzialgleichung zur Bestimmung der Kalzium-Flexion	59
Abbildung 20: Übersicht tonisch feuender AH- und S-Neurone mit entsprechender ersten Differenzialgleichung zur Bestimmung der Kalzium-Flexion.	61
Abbildung 21: Übersicht über proliferierende Enterosphären und differenzierte Zellen	64
Abbildung 22: Stromantwort ohne sichtbaren I_A einer Typ I PDC auf ein Spannungsprotokoll zur Natriumaktivierung	66

Abbildung 23: Stromantwort einer Typ I PDC unter zunehmender Konzentration von 4-AP	67
Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper HuC/HuD	68
Abbildung 25: Aufnahmen einer natrium- und BrdU-positiven Typ II PDC	70
Abbildung 26: Natrium- und BrdU-positive Typ II PDC mit mehreren Hundert Mikrometer langem neuronalen Ausläufer.....	71
Abbildung 27: Biocytin gefüllte AH-Neurone, während der elektrophysiologischen Messung und nach der immunhistochemischen Prozessierung.....	73
Abbildung 28: Typ II PDCs während elektrophysiologischer Messungen.....	74
Abbildung 29: Verhältnis insgesamt gemessener zu natriumpositiver Zellen. Gegenübergestellt sind die in die Auswertung eingegangenen Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl natriumpositiver Zellen, jeweils in Abhängigkeit der Proliferationsdauer	75
Abbildung 30: Membrankapazitäten und mittlere Stromdichten bei -20 mV in Abhängigkeit der Proliferationsdauer und anschließender Zeit in Differenzierung	77
Abbildung 31: Natriumstromantworten einer PDC Typ II auf Natriumaktivierungs- und Inaktivierungs-Spannungsprotokolle	79
Abbildung 32: Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung in Abhängigkeit der Proliferationsdauer	81
Abbildung 33: Natriumaktivierung und Natriuminaktivierung in Abhängigkeit der Differenzierungsdauer	83
Abbildung 34: Refraktärzeit der Natriumkanäle	85

Abbildung 35: Pharmakologische Untersuchung der Natriumkanäle mit Tetrodotoxin	87
Abbildung 36: Vergleich verschiedener tonischer Aktionspotenzialmuster muriner progenitor-abgeleiteter Zellen	89
Abbildung 37: Übersicht phasisch und tonisch feuender PDC Typ II Zellen mit entsprechender Differenzialgleichung zur Bestimmung der Kalzium-Flexion	93
Abbildung 38: Vergleich zweier Stromantworten auf dasselbe Spannungsprotokoll von Typ I PDCs und Typ II PDCs mit und ohne Natriumstrom	96
Abbildung 39: Spannungsprotokoll zur Ermittlung der Kinetik der Natriumaktivierung	138
Abbildung 40: Spannungsprotokoll zur Ermittlung der Kinetiken der Natriuminaktivierung	139
Abbildung 41: Paar-Puls-Protokoll zur Ermittlung der Refraktärzeit der Natriumkanäle	140
Abbildung 42: Stromprotokoll zur Ermittlung von Membranpotenzialänderungen...	141
Abbildung 43: Time lapse Aufnahme einer primären Meerscheinchen Kultur über eine Kulturdauer von 15 Tagen.....	142

14.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Messkriterien zur Auswahl der Zellen, welche in die Auswertung einbezogen werden sollten.	36
Tabelle 2: Vergleich der AP Breite und Maximalamplitude von S- und AH-Neuronen (adulte Mäuse).	57
Tabelle 3: Vergleich von S- und AH-Neuronen bezüglich AP-Muster, AP-Breite, Maximalamplitude, und Zeit zwischen zwei Aktionspotenzialen.	62
Tabelle 4: Vergleich der mittleren Attenuierung tonisch feuender Neurone.	62
Tabelle 5: Vergleich progenitor-abgeleiteter PDC II Neurone bezüglich AP-Breite, Maximalamplitude und Zeit zwischen zwei APs.	92
Tabelle 6: Verbrauchsmaterial.	126
Tabelle 7: Chemikalien allgemein.	127
Tabelle 8: Chemikalien Meerschweinchen.	127
Tabelle 9: Chemikalien C56/BL6N Mäuse, neonatal und adult.	128
Tabelle 10: Immunhistologische Reagenzien.	128
Tabelle 11: Verwendeten Geräte.	129
Tabelle 12: Verwendete Software.	129
Tabelle 13: Krebslösung zur Präparation intakter Meerschweinchen Ganglien.	130
Tabelle 14: Meerschweinchen Kultivierungsmedium.	130
Tabelle 15: Einzelzellmedium zur kultivierung adulter muriner Einzelzellen.	130
Tabelle 16: Proliferationsmedium von Enterosphären.	131
Tabelle 17: Differenzierungsmedium der Enterosphären.	131

Tabelle 18: Intrazellulärlösung Kalium-Gluconat mit 0,5 mM EGTA	132
Tabelle 19: Intrazellulärlösung Cäsium-Gluconat.	132
Tabelle 20: Intrazellulärlösung Kalium-Gluconat mit 0,1 mM EGTA.	132
Tabelle 21: Extrazellulärlösung ExHepes low Kalium high Natrium.	133
Tabelle 22: Extrazellulärlösung ExHepes low Kalium.	133
Tabelle 23: Mittlere Membrankapazitäten adulter muriner Zellen in Abhängigkeit ihrer Kultivierungsdauer.	134
Tabelle 24: Mittlere Stromdichte adulter muriner Zellen in Abhängigkeit ihrer Kultivierungsdauer.	134
Tabelle 25: Halbmaximale Spannungen der Natriumaktivierung und – inaktivierung muriner adulter Zellen mit entsprechender Steigung.	135
Tabelle 26: Mittlere Membrankapazität von PDC Typ II Zellen in Abhängigkeit der Proliferationsdauer und der drauf folgenden Differenzierungszeit.	135
Tabelle 27: Mittlere Stromdichte von PDC Typ II Zellen in Abhängigkeit der Proliferationsdauer und der drauf folgenden Differenzierungszeit.	136
Tabelle 28: Halbmaximale Spannungen und Steigungen der Natriumaktivierung und – inaktivierung von PDC Typ II Zellen in Abhängigkeit der Proliferationszeit.	137
Tabelle 29: Halbmaximale Spannungen und Steigungen der Natriumaktivierung und – inaktivierung von PDC Typ II Zellen in Abhängigkeit der Differenzierungszeit.	137