

Elektrophysiologische Charakterisierung mesenchymaler
Stammzellen in myogener Differenzierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Schmid, geb. Nething, Sandra

2015

Dekan

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. W. K. Aicher

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Northoff

INHALT

1. Einleitung.....	1
1.1 Inkontinenz.....	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Anatomische Grundlagen und Miktion	1
1.1.3 Ursachen und Formen der Inkontinenz.....	3
1.1.4 Therapeutische Ansätze der Belastungsinkontinenz.....	4
1.2 Glatte Muskelzellen.....	5
1.2.1. Allgemeine Eigenschaften glatter Muskelzellen	5
1.2.2 Elektrophysiologische Eigenschaften glatter Muskelzellen	5
1.2.2.1 Allgemeines	5
1.2.2.2 Spezielle Eigenschaften glatter Muskelzellen der Urethra	6
1.2.2.3 Spezielle Eigenschaften glatter Muskelzellen des M. detrusor vesicae	6
1.2.2.4 Natriumkanäle glatter Muskelzellen	7
1.3 Mesenchymale Stammzellen.....	7
1.3.1 Allgemeine Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen.....	7
1.3.2 Elektrophysiologische Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen	8
1.3.2.1 Allgemeines	8
1.3.2.2 Kaliumkanäle	8
1.3.2.3 Calciumkanäle	9
1.3.2.4 Natriumkanäle.....	9
1.4 Regenerative Medizin als Therapieoption der Belastungsinkontinenz	9
1.4.1 Mesenchymale Stammzellen in der Sphinkterregeneration	9
1.4.2 Mesenchymale Stammzellen in der Regeneration von erregbarem Gewebe.....	11
1.5 Fragestellung.....	11
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Zellmaterial und Zellkultur	13

2.1.1 Zellmaterial.....	13
2.1.1.1 Mesenchymale Stammzellen	13
2.1.1.2 Glatte Muskelzellen.....	13
2.1.1.3 Mesenchymale Stammzellen in myogener Differenzierung	13
2.1.2 Zellkultur	14
2.1.2.1 Kulturbedingungen.....	14
2.1.2.2 Passagieren der Zellen	14
2.1.2.3 Kryokonservierung der Zellen	14
2.1.3 Materialien für die Zellkultur	15
2.1.3.1 Medien für mesenchymale Stammzellen	15
2.1.3.2 Medien für glatte Muskelzellen.....	15
2.1.3.3 Differenzierungsmedium für die myogene Differenzierung der MSC .	15
2.1.3.4 Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Zellkultur	16
2.2 Patch-Clamp-Technik.....	16
2.2.1 Theoretische Grundlagen.....	16
2.2.1.1 Membran- und Gleichgewichtspotential	16
2.2.1.2 Historische Grundlagen der Patch-Clamp-Technik	18
2.2.1.3 Patch-Clamp-Konfigurationen	19
2.2.1.4 Perforierter Patch.....	20
2.2.1.5 Messungen mit der Spannungsklemme	20
2.2.1.6 Messungen mit der Stromklemme	20
2.2.1.7 Patch-Clamp-Vorverstärker.....	21
2.2.2 Praktische Durchführung.....	22
2.2.2.1 Substanzen, Verbrauchsmaterialien und Geräte zur Patch-Clamp- Messung	22
2.2.2.2 Lösungen zur Patch-Clamp-Messung.....	23
2.2.2.3 Pipetten und Elektroden.....	26
2.2.2.4 Zellpräparation	26

2.2.2.5 Patch-Clamp-Messstand.....	27
2.2.2.6 Durchführung der Messungen.....	28
2.2.2.7 Verwendete Protokolle.....	30
2.2.3 Datenauswertung.....	33
2.2.3.1 Einschlusskriterien bei der Auswertung	33
2.2.3.2 Datenverarbeitung	33
2.2.3.3 Statistische Auswertung.....	33
3. Ergebnisse.....	35
3.1 Glatte Muskelzellen.....	35
3.1.1 Kultureigenschaften glatter Muskelzellen.....	35
3.1.2 Allgemeine elektrophysiologische Eigenschaften glatter Muskelzellen	35
3.1.3 Auswärtsströme glatter Muskelzellen.....	36
3.1.4 Natriumströme glatter Muskelzellen	37
3.1.4.1 Identifikation eines Einwärtsstroms glatter Muskelzellen	37
3.1.4.2 Verhalten des Einwärtsstroms glatter Muskelzellen unter Nifedipin ...	39
3.1.4.3 Verhalten des Einwärtsstroms glatter Muskelzellen unter variierender extrazellulärer Natriumkonzentration	40
3.1.4.4 Verhalten des Natriumstroms glatter Muskelzellen unter TTX	42
3.1.4.5 Verhalten des Natriumstroms glatter Muskelzellen unter Ranolazin ..	44
3.1.4.6 Verhalten des Natriumstroms glatter Muskelzellen unter ProToxin-II	44
3.1.4.7 Stromdichte und Häufigkeit von Natriumströmen glatter Muskelzellen über die Kulturdauer	46
3.1.5 Calciumströme glatter Muskelzellen.....	47
3.2 Mesenchymale Stammzellen.....	49
3.2.1 Kultureigenschaften mesenchymaler Stammzellen.....	49
3.2.2 Allgemeine elektrophysiologische Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen	50
3.2.3 Auswärtsströme mesenchymaler Stammzellen.....	50

3.2.3.1 Stromverhalten mesenchymaler Stammzellen unter repetitiver Depolarisation.....	50
3.2.3.2 Schneller Auswärtsstrom I_{Ks} der mesenchymalen Stammzellen.....	52
3.2.3.3 Langsamer Auswärtsstrom I_{Kl} der mesenchymalen Stammzellen.....	53
3.2.3.4 Überschießender Auswärtsstrom I_{Ku} der mesenchymalen Stammzellen	54
3.2.3.5 Grafischer Vergleich der Auswärtsströme I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} mesenchymaler Stammzellen.....	56
3.2.3.6 Verteilung der Auswärtsstrommuster I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} mesenchymaler Stammzellen über die Kulturdauer.....	56
3.2.4 Natriumströme mesenchymaler Stammzellen.....	57
3.2.4.1 Identifikation eines Einwärtsstroms mesenchymaler Stammzellen	57
3.2.4.2 Verhalten des Einwärtsstroms mesenchymaler Stammzellen unter Ranolazin.....	59
3.2.4.3 Häufigkeit von Natriumströmen mesenchymaler Stammzellen in Passage 2.....	59
3.2.5 Calciumströme mesenchymaler Stammzellen	61
3.3 Myogen differenzierende mesenchymale Stammzellen im Vergleich zu nativen mesenchymalen Stammzellen und glatten Muskelzellen	63
3.3.1 Kultureigenschaften mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung.....	63
3.3.2 Besonderheiten von Patch-Clamp-Messungen an in Differenzierung befindlichen MSC.....	64
3.3.2.1 Festlegung der Messtage und Erläuterungen zu abweichenden Zellzahlen	64
3.3.2.2 Einfluss von Wachstumseigenschaften auf die Patch-Clamp-Messungen	65
3.3.3 Vergleich der allgemeinen elektrophysiologischen Eigenschaften	65
3.3.4 Vergleich der Auswärtsströme	66
3.3.5 Vergleich der Natriumströme.....	67

3.3.5.1 Allgemeine Eigenschaften von Natriumströmen im Vergleich	67
3.3.5.2 Vergleich der Natriumstromgröße in Abhängigkeit von der Membrankapazität	68
3.3.5.3 Verhalten des Natriumstroms mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung unter TTX.....	70
3.3.5.4 Verhalten des Natriumstroms unter Ranolazin im Vergleich	71
3.3.5.5 Verhalten des Natriumstroms unter ProToxin-II im Vergleich	72
3.3.5.6 Entwicklung von Stromdichte und Häufigkeit von Natriumströmen innerhalb einer Zelllinie mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung.....	73
3.3.5.7 Entwicklung von Stromdichte und Häufigkeit von Natriumströmen verschiedener Zelllinien mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung im Vergleich	74
3.3.5.8 Stromdichte und Häufigkeit von Natriumströmen im Vergleich	76
3.3.6 Vergleich der Calciumströme	78
3.3.6.1 Allgemeine Eigenschaften von Calciumströmen im Vergleich	78
3.3.6.2 Verhalten von Calciumströmen mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung unter Nifedipin und Cd^{2+}	79
3.3.6.3 Stromdichte und Häufigkeit von Calciumströmen im Vergleich.....	81
3.3.6.4 Koexistenz von Calcium- und Natriumströmen bei mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung	82
4. Diskussion	84
4.1 Charakterisierung glatter Muskelzellen des M. detusor vesicae.....	85
4.1.1 Beurteilung der Kultur- und allgemeinen elektrophysiologischen Eigenschaften glatter Muskelzellen.....	85
4.1.2 Beurteilung des Auswärtsstroms I_{Ks} glatter Muskelzellen	85
4.1.3 Beurteilung des fehlenden Nachweises von Calciumströmen auf glatten Muskelzellen	86
4.1.4 Beurteilung der Natriumströme glatter Muskelzellen.....	86

4.1.5 Beurteilung der Eignung der Zelllinie glatter Muskelzellen als elektrophysiologische Referenz für die myogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen	87
4.2 Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen	89
4.2.1 Beurteilung der Kultureigenschaften und der Auswärtsströme mesenchymaler Stammzellen	89
4.2.2 Beurteilung der Natrium- und Calciumströme mesenchymaler Stammzellen	92
4.3 Elektrophysiologischer Vergleich mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung, nativer mesenchymalen Stammzellen und glatter Muskelzellen des Detrusors	93
4.3.1 Vergleich der Auswärtsströme I_{Ks} , I_{K1} und I_{Ku} und des Membranpotentials	93
4.3.2 Vergleich der Natriumkanäle	95
4.3.3 Vergleich der Calciumkanäle.....	98
4.3.4 Bestimmung des optimalen Differenzierungszeitpunkts aus elektrophysiologischer Sicht.....	98
4.3.5 Kritische Betrachtung des Differenzierungserfolgs.....	100
5. Zusammenfassung	101
6. Literaturverzeichnis.....	102
7. Anhang	107
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	107
7.2 Tabellenverzeichnis.....	109
8. Erklärung zum Eigenanteil.....	111

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
Ba ²⁺	Barium-Ion
BaCl ₂ *2H ₂ O	Bariumchlorid-Dihydrat
BG	berufsgenossenschaftlich
BK-Kanal	high conductance Ca ²⁺ -sensitive K ⁺ -channel (auch MaxiK-Kanal)
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cd ²⁺	Cadmium-Ion
CdCl ₂ *2.5H ₂ O	Cadmiumchlorid-Hemipentahydrat
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CsCl	Caesiumchlorid
CsOH	Caesiumhydroxid
d	Tag
d0-d21	Differenzierungstag 0-21
DIV	Kulturtag (<i>days in vitro</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(D)PBS	(Dulbecco's) Phosphate Buffered Saline
eag-K ⁺ -Kanal	ether-a-go-go Kalium-Kanal
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FBS	Fetales bovines Serum
g	Einheit der Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
GΩ	Gigaohm
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I	Strom (Formelzeichen)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
I _{Kl}	langsamer Kaliumstrom
I _{Ks}	schneller Kaliumstrom
I _{Ku}	überschießender Kaliumstrom
I _{max}	maximaler Strom
I _{Na}	Natriumstrom
in vitro	außerhalb des Körpers
K ⁺	Kalium-Ion
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
K _V -Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal
M.	Musculus
MaxiK-Kanal	high conductance Ca ²⁺ -sensitive K ⁺ -channel (auch BK-Kanal)
mbar	Millibar
Mg ²⁺	Magnesium-Ion

MgCl ₂ ·6H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
mOsm/l	Milliosmol pro Liter
ms	Millisekunde
MSC	mesenchymale Stammzelle (<i>mesenchymal stem cell</i>)
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
N.	Nervus
n	Anzahl
nA	Nanoampere
Na ₂ -ATP	Adenosintriphosphat-Dinatriumsalz
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na _v	spannungsabhängiger Natriumkanal
nM	nanomolar
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
P	Passage
pA	Picoampere
PDGF	Platelet derived growth factor
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pF	Picofarad
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
ProTx II	ProToxin-II
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SK-Kanal	small conductance Ca ²⁺ -sensitive K ⁺ -channel
SMC	glatte Muskelzelle (<i>smooth muscle cell</i>)
sog.	sogenannte/r/s
t	Zeit
TEA(Cl ⁻)	Tetraethylammonium(chlorid)
TTX	Tetrodotoxin
TGFβ1	Transforming growth factor β1
TNS	Trypsin neutralising solution
U	Spannung (Formelzeichen)
V	Volt
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μM	mikromolar
μm	Mikrometer
μm ²	Quadratmikrometer

1. EINLEITUNG

1.1 INKONTINENZ

1.1.1 DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE

Urininkontinenz wird von der *International Continence Society* als jeder unwillkürliche Abgang von Urin definiert [1]. Eine Studie von 2005 deckte eine Prävalenz der Urininkontinenz in der deutschen Bevölkerung von 12,6% auf. Zwischen dem Anteil Betroffener unter 40 Jahren und dem der über 60-Jährigen ist ein Anstieg von 6,1% auf 23% zu verzeichnen [2]. Durch die gleichzeitige Verschiebung der Alterspyramide ist daher von einer deutlichen Zunahme der Inkontinenzproblematik in den nächsten Jahren auszugehen [3]. Das weibliche Geschlecht überwiegt hierbei mit einem Mittel von 15%, wohingegen nur 9,5% der männlichen Bevölkerung von Inkontinenz betroffen sind [4]. Neben medizinischen Folgeerkrankungen wie Harnwegsinfektionen sind insbesondere Einbußen an Lebensqualität durch soziale Ausgrenzung und daraus resultierende psychische Komorbiditäten ein großes Problem für die Erkrankten [3]. Ökonomisch gesehen stellt die Inkontinenz das Gesundheitssystem vor eine große finanzielle Herausforderung. Die *PURE*-Studie beziffert die Ausgaben für Diagnose und Therapie der Harninkontinenz bei Frauen in Deutschland bereits jetzt mit über 500 Millionen Euro jährlich, wobei über die Hälfte der Kosten auf Behelfsmittel wie Vorlagen und Windeln entfallen [5]. Nicht eingerechnet sind Folgekosten durch die Einweisung ins Pflegeheim, für die in Deutschland Inkontinenz die Hauptursache darstellt [3].

1.1.2 ANATOMISCHE GRUNDLAGEN UND MIKTION

Um Ursachen und Mechanismen der Harninkontinenz zu verstehen, ist eine Vergegenwärtigung der Morphologie des Kontinenzapparates nötig.

Die Harnblase ist ein Hohlorgan, deren Wand komplex angeordnete, glattmuskuläre Faserzüge beinhaltet, die in ihrer Gesamtheit den *Musculus detrusor vesicae* darstellen. Zirkulär einstrahlende Fasern dieses glatten

Muskelfasergeflechts am Übergang zur Urethra bilden den Musculus sphincter urethrae internus [6]. Da sich männliche und weibliche Anatomie der Harnröhre maßgeblich unterscheiden, wird aufgrund der deutlich höheren Prävalenz der Inkontinenz bei Frauen im Folgenden näher auf die weibliche Anatomie eingegangen. Die weibliche Urethra ist mit 3-5cm sehr kurz und wird bei ihrem Durchtritt durch den Beckenboden hufeisenförmig von einer nach dorsal offenen Schlinge aus quergestreifter Muskulatur, dem Musculus sphincter urethrae externus, umschlossen [7].

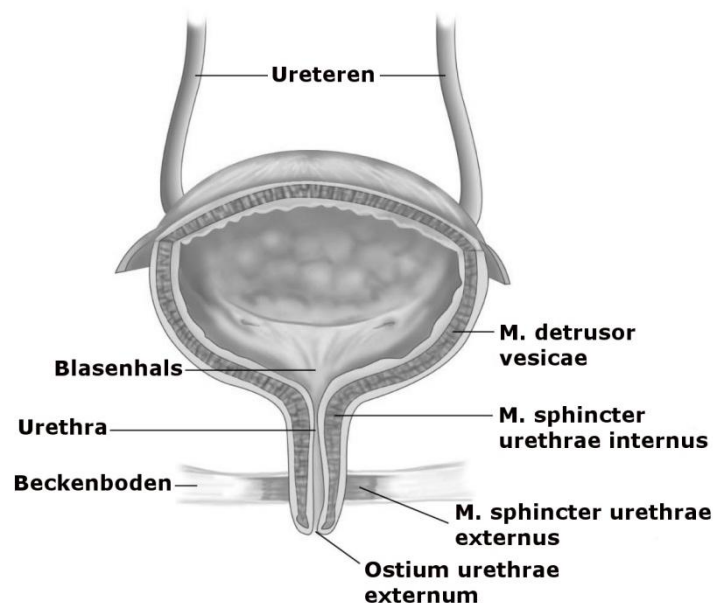


Abbildung 1: Anatomie der weiblichen Harnblase und Urethra

Die Harnblase ist ein Hohlorgan, dessen muskuläre Wand durch den M. detrusor vesicae gebildet wird. Am Blasenhals geht die Harnblase in die Urethra über, hier befindet sich der glattemuskuläre M. sphincter urethrae internus. Beim Durchtritt durch den Beckenboden wird die Urethra schlingenförmig durch die Muskelzüge des quergestreiften M. sphincter urethrae externus umfasst. Die Urethra mündet im Ostium urethrae externum.

(Abbildung modifiziert nach

http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202007/figure_18_21_labeled.jpg) [8].

Interner Sphinkter und M. detrusor sind als glatte Muskeln autonom innerviert, der äußere Harnröhrensphinkter wird über den N. pudendus somatisch innerviert. Während der Blasenfüllung überwiegt der Sympathikotonus, der interne Sphinkter verschließt die proximale Urethra. Mit steigender Füllmenge

wird der Tonus des äußeren Sphinkters bewusst gesteigert, um Kontinenz zu gewährleisten. Zur bewussten Miktion wird der äußere Sphinkter relaxiert. Durch Überwiegen des Parasympathikotonus sinkt auch der Tonus des internen Urethralosphinkters, der M. detrusor kontrahiert sich und entleert dadurch die Blase [9].

1.1.3 URSACHEN UND FORMEN DER INKONTINENZ

Bei Fehlfunktionen des komplexen Blasenverschlussapparates oder seiner Innervation kommt es zum ungewollten Abgang von Urin, es besteht Urininkontinenz. Abhängig von der Art der Dysfunktion werden verschiedene Formen der Inkontinenz unterschieden.

Auf die Stress- oder Belastungsinkontinenz entfallen laut PURE-Studie 34% aller Inkontinenzfälle [10]. Sie ist definiert als spontaner Urinabgang unter körperlicher Belastung ohne vorhergehenden Harndrang. Oft wird die Symptomatik erstmals bei Erhöhung des intraabdominellen Drucks im Rahmen von Husten oder Niesen beobachtet. Das kann soweit fortschreiten, dass bereits in Ruhe ungewollter Urinverlust besteht. Ursächlich ist eine Schwäche oder Fehlfunktion von Beckenboden und Blasenschließmuskeln, bedingt unter anderem durch vaginale Entbindungen, Übergewicht, gynäkologische Operationen und Bestrahlungen. Begünstigend bei Frauen wirkt zudem eine Schleimhautatrophie bei postmenopausalem Östrogenmangel. Bei Männern sind in erster Linie traumatische Schädigungen des Schließmuskels infolge von Eingriffen an der Prostata verantwortlich [3]. Weiterhin wurde im Rhabdosphinkter mit zunehmendem Alter eine erhöhte Apoptoserate der quergestreiften Muskelzellen festgestellt [11], womit das Alter als eigenständiger Risikofaktor bei der Entstehung von Stressinkontinenz gesehen werden kann.

Hiervon abzugrenzen ist die Dranginkontinenz mit einem prozentualen Anteil von 20% [10]. Betroffene beschreiben einen plötzlichen, imperativen Harndrang, der das rechtzeitige Erreichen der Toilette oft unmöglich macht. Ursächlich ist eine Hyperaktivität des M. detrusor vesicae bedingt durch

zentralneurologische Erkrankungen, eine gesteigerte Erregbarkeit oder degenerative Veränderungen der Blasenmuskulatur im Alter [3].

Weiterhin wird mit einer Häufigkeit von 46% [10] die Mischinkontinenz als Kombination von Stress- und Dranginkontinenz beschrieben, bei der es sowohl zu imperativem Harndrang, als auch zu unwillkürlichem Harnverlust unter körperlicher Belastung kommt [3].

Im Weiteren soll näher auf die Belastungsinkontinenz eingegangen werden.

1.1.4 THERAPEUTISCHE ANSÄTZE DER BELASTUNGSINKONTINENZ

Die Therapie der Belastungsinkontinenz umfasst eine Vielzahl an Möglichkeiten. Grundsätzlich sollten zunächst alle konservativen Maßnahmen wie Verhaltensmodifikation, Gewichtsreduktion und Beckenbodentraining, unterstützt durch Biofeedback oder Elektrostimulation, ausgeschöpft werden. Weiterhin stehen medikamentöse Therapien zur Erhöhung des Sphinktertonus zur Verfügung [3].

Bringen diese nicht die erwartete Besserung, muss eine operative Therapie in Betracht gezogen werden. Abhängig von der Ursache der Inkontinenz kommen verschiedene Techniken wie die Kolposuspension, Schlingen- und Bandplastiken und die Einbringung von Füllstoffen zur Verbesserung der Koaptation der Harnröhre zum Einsatz, ultima ratio ist die Sphinkterprothese [3, 12]. Allen operativen Verfahren gemeinsam sind das potentielle Auftreten von Komplikationen und die oft fehlende Nachhaltigkeit, da sie lediglich supportiven Charakter in Bezug auf die Schließmuskelfunktion besitzen.

Einen möglichen Lösungsansatz verspricht die regenerative Medizin, die sich mit der Heilung von Organ- oder Gewebeschäden durch Anregung körpereigener Reparaturprozesse oder Einbringung von biologischem Ersatz in Form von Zellen oder im Labor gezüchtetem Gewebe befasst [13]. Ziel ist die Wiederherstellung der funktionellen Gewebeeigenschaften, das bedeutet bezogen auf die Belastungsinkontinenz, die gezielte Schaffung eines

Muskeleratzes als nachhaltige kurative Therapiemöglichkeit zur Verbesserung der Schließmuskelfunktion.

1.2 GLATTE MUSKELZELLEN

1.2.1. ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN GLATTER MUSKELZELLEN

Glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) finden sich in der Wand von Hohlorganen des Atmungs- und Gefäßsystems, sowie im Verdauungs- und Urogenitaltrakt. Die Kontraktion der glatten Muskelschicht eines Hohlorgans führt zur Lumeneinengung, damit sind glatte Muskelzellen an der Regulation vieler autonomer Prozesse beteiligt, was ihre Innervation durch das autonome Nervensystem erklärt [6].

Anders als in der quergestreiften Muskulatur, zu der Skelett- und Herzmuskeln zählen, sind ihre Myofibrillen als kontraktile Strukturen des Muskels nicht zu Sarkomeren angeordnet, weshalb glatte Muskelzellen lichtmikroskopisch keine typische Querstreifung aufweisen. Auch im adulten Organismus ist glattes Muskelgewebe mitotisch aktiv, glatte Muskelfasern können je nach Anforderung im funktionellen, kontraktile Zustand oder in der synthetischen, proliferativen Phase vorliegen, woraus ein großes regeneratives Potential bei Muskelschädigungen resultiert [6].

1.2.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN GLATTER MUSKELZELLEN

1.2.2.1 Allgemeines

Nach ihrer Innervation und elektrischen Kopplung untereinander werden glatte Muskelzellen in zwei Formen unterteilt. Muskelzellen vom Single-Unit-Typ sind über sogenannte Gap Junctions elektrisch gekoppelt und agieren als Synzytium. Schrittmacherzellen innerhalb des Zellverbands, die vegetativ moduliert werden und dehnungsreaktive Eigenschaften besitzen, generieren Ca^{2+} -Aktionspotentiale, die zur Aufrechterhaltung einer tonischen Kontraktion führen. Muskelzellen vom Multi-Unit-Typ sind untereinander nur gering gekoppelt und werden stark vegetativ innerviert [14].

Zur Kontraktion glatter Muskelzellen ist eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nötig. Ein Ca^{2+} -Einstrom wird über spannungsgesteuerte Calciumkanäle vermittelt, weiterhin kann über rezeptorgesteuerte oder dehnungsabhängige unspezifische Kationenkanäle eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erreicht werden. Als Folge kommt es zur Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums, was eine zytoskelettale Maschinerie in Gang setzt, die in der Kontraktion der glatten Muskelzelle resultiert [15]. Dieser Mechanismus wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Wird eine Kontraktion statt über eine vorhergehende Depolarisation der Zellmembran durch Neurotransmitter, Hormone oder Pharmaka vermittelt, spricht man von einer pharmakomechanischen Kopplung [14]. Eine Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Relaxation des glatten Muskels [15].

1.2.2.2 Spezielle Eigenschaften glatter Muskelzellen der Urethra

Während der Füllungsphase der Harnblase erhalten die glatten Muskelzellen der Urethra durch spontane tonische Kontraktionen, die über sympathische Reize moduliert werden, die Kontinenz, was durch einen kontinuierlichen Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ Calciumkanäle gewährleistet wird. Unterstützend bei Erhöhung des intraabdominellen Drucks wirkt der Einfluss sympathischer Afferenzen, sowie der somatisch innervierte Rhabdosphinkter. Zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials wurden spannungs- und Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle vom SK- und BK-Typ identifiziert [16]. Die Relaxation des internen Blasensphinkters erfolgt über parasympathische Afferenzen [7].

1.2.2.3 Spezielle Eigenschaften glatter Muskelzellen des M. detrusor vesicae

Die den M. detrusor vesicae bildenden Muskelfasern zeigen spontane phasische Aktivität, die über Dehnung und vegetative Reize moduliert wird. Hieran sind K_{ATP} -Kanäle, die durch Hyperpolarisation der Zellmembran die Erregbarkeit herabsetzen, beteiligt [9]. Bei Erreichen eines Schwellenpotentials werden über spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle Ca^{2+} -Aktionspotentiale ausgelöst [14], die über Gap Junctions propagiert werden [9]. Die Regulation

von Amplitude und Frequenz eines Aktionspotentials, sowie die Repolarisation erfolgt über MaxiK-Kanäle. Weiterhin wurden SK-Kanäle als kleinere Vertreter von MaxiK-Kanälen mit geringerer Einzelkanalleitfähigkeit für K^+ und spannungsgesteuerte K_v -Kanäle identifiziert [9].

Über Mikrokontraktionen von umschriebenen Teilen der Blasenwand wird eine gleichmäßige Blasenfüllung gewährleistet. So kann eine bewusste Miktion, die durch die dichte parasymphatische Innervation gesteuert wird, jederzeit eingeleitet werden [16].

1.2.2.4 Natriumkanäle glatter Muskelzellen

Spannungsabhängige Natriumkanäle der Na_v -Familie sind wesentlich an der Generierung von Aktionspotentialen in erregbarem Gewebe beteiligt. Sie werden nach ihren Eigenschaften in die Subtypen $Na_v1.1$ - $Na_v1.9$ unterteilt, die auf verschiedenen Geweben, unter anderem auch glatter Muskulatur, exprimiert werden [17]. Es kann davon ausgegangen werden, dass glatte Muskelzellen, abhängig von ihrer Herkunft, über unterschiedliche Na_v -Subtypen verfügen [18, 19, 20]. Bezüglich der glatten Muskelzellen des Detrusors ist lediglich bekannt, dass die murine Harnblase über tonisch aktive Natriumkanäle verfügt, die zur Depolarisation der Zellmembran führen und dadurch die Kontraktilität der Blase erhöhen [21]. Von klinischer Seite bestehen Hinweise, dass auch im humanen Detrusor Natriumkanäle an der Aufrechterhaltung des Muskeltonus beteiligt sind [22]. Eine nähere Beschreibung dieser Kanäle und ihre Zuordnung zu einem Vertreter der Na_v -Familie sind bisher nicht erfolgt.

1.3 MESENCHYMALE STAMMZELLEN

1.3.1 ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN MESENCHYMALER STAMMZELLEN

Mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cell*, MSC) sind multipotente Zellen, die aus vielen adulten und fetalen Geweben, unter anderem Knochenmark [23], Fettgewebe [24] und Plazenta [25], isoliert werden können. Da es sich um eine sowohl in ihrer Herkunft, als auch in ihren Eigenschaften

heterogene Zellpopulation handelt, besteht ein Konsensus über die zu erfüllenden Minimalkriterien einer als MSC bezeichneten Zelle. Diese beinhalten die Plastikadhärenz in Kultur, die Expression bestimmter Oberflächenmarker und die Fähigkeit zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung *in vitro* [26].

MSC können relativ einfach isoliert und kultiviert werden. Sie zeigen *in vitro* eine extensive Proliferation und besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung [27]. Neben der Differenzierung in Gewebe, die ihren Ursprung im Mesoderm haben, aus welchem auch glatte und quergestreifte Muskelzellen hervorgehen, wurde eine Differenzierung von MSC in Neuronen und Epithel beobachtet [28], deren embryologischer Ursprung das Ektoderm ist. Weiterhin besitzen MSC immunmodulatorische und -suppressive Eigenschaften [28], deren Mechanismen jedoch noch größtenteils ungeklärt sind.

1.3.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN MESENCHYMALER STAMMZELLEN

1.3.2.1 Allgemeines

Die elektrophysiologischen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen sind bislang wenig untersucht, im Wesentlichen kann nur auf die Veröffentlichungen von Heubach et. al. [29] und Li et. al. [30] zurückgegriffen werden. Beide Autoren beschreiben MSC bezüglich ihrer Ionenkanalexpression als inhomogene Zellpopulation, die jedoch über die Kulturdauer stabile Strommuster aufweisen.

1.3.2.2 Kaliumkanäle

Über 90% der untersuchten MSC verfügte über Kaliumströme. In beiden Studien wurden verschiedene spannungsabhängige Kaliumkanäle identifiziert, teilweise waren mehrere Kaliumkanaltypen koexistent auf einer Zelle.

Praktisch alle gemessenen MSC besaßen MaxiK-Kanäle (auch BK-Kanäle) [29] [30].

Ein geringer Teil der Zellen verfügte über einen verzögert gleichrichtenden Kaliumstrom [29, 30], der der eag-Kanal-Familie zugeordnet wurde [30]. MSC

mit diesem Kanaltyp wiesen ein vergleichsweise negativeres Membranpotential auf als Zellen, auf denen kein eag-Kanal nachgewiesen wurde [29, 30].

Weiterhin wurde bei einem sehr kleinen Teil der untersuchten MSC ein transienter Kaliumstrom nachgewiesen, dieser wurde der K_v -Familie zugeordnet [30].

1.3.2.3 Calciumkanäle

Bei etwa 15% der MSC wurde ein spannungsabhängiger Calciumkanal beobachtet, der aufgrund seiner Empfindlichkeit gegenüber Dihydropyridinen als L-Typ Calciumkanal identifiziert wurde [29, 30].

1.3.2.4 Natriumkanäle

Ein Drittel der untersuchten Zellen wies einen TTX-sensiblen spannungsabhängigen Natriumkanal auf, der teilweise koexistent mit L-Typ Calciumkanälen war [29].

1.4 REGENERATIVE MEDIZIN ALS THERAPIEOPTION DER BELASTUNGSINKONTINENZ

1.4.1 MESENCHYMALE STAMMZELLEN IN DER SPHINKTERREGENERATION

Mit wachsenden Möglichkeiten der regenerativen Medizin liegt die Entwicklung eines zellbasierten Verfahrens zur Therapie der Belastungsinkontinenz nahe. Die Einbringung geeigneter Stammzellen zur Funktionsverbesserung des insuffizienten Sphinkterapparates wird heute als vielversprechender Ansatz in der Inkontinenztherapie betrachtet [31]. Bei Einsatz eines minimal-invasiven Verfahrens zur Zellapplikation könnte so nicht nur eine funktionelle Sphinkterrekonstruktion erreicht, sondern gleichzeitig auch die Komplikationsrate und Hospitalisationsdauer im Vergleich zu bisherigen operativen Verfahren minimiert werden [12].

Zunächst steht das Finden einer für diesen Zweck geeigneten Zellpopulation im Vordergrund. Der Überbegriff „Stammzelle“ beinhaltet eine Vielzahl an

Zelltypen, die sich in ihrem Ursprung, ihren Eigenschaften und ihrer Gewinnung voneinander unterscheiden. Da es sich bei der Inkontinenz um eine nicht lebensbedrohliche Erkrankung handelt, steht die Patientensicherheit bezüglich Infektionsrisiko durch Spendermaterial, maligner Entartung des Transplantats, sowie möglicher Abstoßungsreaktionen im Vordergrund, weshalb adulte, körpereigene Stammzellen in den Fokus dieser Fragestellung gerückt sind [32].

Bei Verletzungen des Skelettmuskels sind unter physiologischen Bedingungen sogenannte Satellitenzellen, eine adulte Form von Myoblasten, an der Muskelregeneration beteiligt [12]. Bisherige Studien, bei denen entnommene Satellitenzellen in den geschädigten Sphinkterapparat eingebracht wurden, zeigten uneinheitliche Ergebnisse. Ein sicherer klinischer Nutzen ließ sich nicht erkennen [33, 34].

Anders verhält es sich mit mesenchymalen Stammzellen. Diese in ihrer Gewinnung relativ einfachen Zellen besitzen ein großes Proliferations- und Differenzierungspotential in verschiedene Formen von Bindegewebe [35] bei gleichzeitig geringem Entartungsrisiko nach Transplantation [36]. Eine Besserung der Inkontinenz durch Transplantation von mesenchymalen Stammzellen in den geschädigten Sphinkterapparat wird in zahlreichen Studien beschrieben, jedoch besteht Uneinigkeit über den zugrunde liegenden Mechanismus. Eine simple Erklärung wäre, dass die eingebrachten Zellen eine reine Füllfunktion einnehmen und dadurch den Verschlussmechanismus der Harnröhre verbessern [37]. Weiterhin denkbar ist eine funktionelle Integration in das bestehende Gewebe durch Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in glatte [36, 38, 39] oder quergestreifte Muskulatur [40]. Durch ihre neuroregenerativen- und protektiven Eigenschaften wird auch eine Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in periphere Neurone zur Regeneration geschädigter Nervenstrukturen diskutiert [40]. Weiterhin stehen parakrine Effekte im Raum, wobei gezeigt werden konnte, dass bereits die Applikation von durch Stammzellen synthetisierten Faktoren einen positiven Effekt auf die Gewebeheilung besitzt [41].

Insgesamt besteht auf diesem Gebiet ein großes Entwicklungspotential. Vor einem therapeutischen Einsatz gilt es jedoch, noch einige grundlegende Fragen zu klären, um den Therapieerfolg vor dem Hintergrund maximaler Patientensicherheit zu optimieren.

1.4.2 MESENCHYMALE STAMMZELLEN IN DER REGENERATION VON ERREGBAREM GEWEBE

Bei der Regeneration von elektrisch erregbarem Gewebe wie Muskulatur spielt die Fähigkeit der implantierten Zellen zur elektromechanischen Kopplung und Integration in das bestehende Synzytium eine entscheidende Rolle.

Insbesondere in der stammzellbasierten Therapie von infarktbedingtem Myokardverlust wurden diesbezüglich zahlreiche Studien durchgeführt. Nach Einbringung nativer MSC in ein Myokardinfarktmodell wurde mehrfach beobachtet, dass die transplantierten Zellen auf Proteinebene zwar spezifische kardiale Ionenkanäle aufwiesen, diese jedoch nicht funktionell exprimiert wurden [42-44], womit keine elektromechanische Kopplung oder die Möglichkeit der Integration in das bestehende Synzytium gegeben war. Überträgt man die aus Myokardinfarktmodellen gewonnenen Erfahrungen auf die Regeneration des geschädigten Harnröhrensphinkters, verdeutlicht dies die Wichtigkeit der Betrachtung der funktionellen und damit auch elektrophysiologischen Eigenschaften beim Einsatz von MSC im Ersatz erregbaren Gewebes.

Ein vielversprechender Ansatz, um die funktionelle Integration von MSC in das geschädigte Gewebe zu verbessern, ist die der Transplantation vorausgehende *in vitro*-Induktion einer Differenzierung in das Zielgewebe. Auch für diese Methode gilt, dass neben einer Untersuchung der differenzierten Zellen auf Proteinebene eine funktionelle Charakterisierung zur Evaluation des Differenzierungserfolgs essentiell ist.

1.5 FRAGESTELLUNG

Ziel dieser Arbeit ist eine elektrophysiologische Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro*-

Differenzierung zu glatten Muskelzellen zur Feststellung des Differenzierungsfortschritts. Sie leistet dadurch einen Beitrag zur Arbeit der Klinischen Forschergruppe 273, einem von der Deutschen Forschungsgesellschaft geförderten Projekt an der Universität Tübingen, deren Zielsetzung die Therapie der Harninkontinenz durch zellbasierte Regeneration des Harnröhrensphinkters ist [45].

Als Maß für den Differenzierungserfolg dient eine Zelllinie glatter Muskelzellen aus dem humanen M. detrusor vesicae, die zunächst detailliert untersucht wird. Im nächsten Schritt werden native humane mesenchymale Stammzellen als Ausgangsmaterial für die Differenzierung elektrophysiologisch charakterisiert. Aus den gewonnenen Daten wird ein geeigneter Indikatorstrom als Surrogatparameter für die nachfolgende Untersuchung der mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung gewählt. Anhand dessen soll in einem letzten Schritt die Antwort auf die Frage nach dem aus elektrophysiologischer Sicht optimalen Zeitpunkt für die Transplantation der in myogener Differenzierung befindlichen mesenchymalen Stammzellen in den geschädigten Sphinkterapparat ermittelt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 ZELLMATERIAL UND ZELLKULTUR

2.1.1 ZELLMATERIAL

2.1.1.1 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark wurden unter Einverständnis der gesunden Spender im Rahmen von orthopädischen Eingriffen an der BG Unfallklinik Tübingen gewonnen. Sie wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Hart in Tübingen isoliert und charakterisiert und jeweils in Passage 1 bezogen.

Für die Experimente mit undifferenzierten MSC wurden Zelllinien von 2 weiblichen und 10 männlichen Spendern im Alter von 50-81 Jahren verwendet.

2.1.1.2 Glatte Muskelzellen

Die als Referenz verwendeten glatten Muskelzellen aus dem humanen M. detrusor vesicae wurden in Kultur als käufliche Zelllinie von *PromoCell, Heidelberg* bezogen.

2.1.1.3 Mesenchymale Stammzellen in myogener Differenzierung

Die myogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen erfolgte ebenfalls durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Hart. Die Differenzierung wurde jeweils in Passage 2 ab einem konfluenten Zellwachstum von 60% durch einen Wechsel von Kultur- auf Differenzierungsmedium induziert. Als Kompromiss, um einerseits standardisierte Differenzierungsbedingungen zwischen den Arbeitsgruppen zu erhalten und andererseits eine ausreichende Erholungsphase für die Zellen nach dem Transport zu gewährleisten, wurden mesenchymale Stammzellen in Differenzierung jeweils zwei Tage vor den Messungen bezogen.

Insgesamt wurde für die Versuche mit MSC in myogener Differenzierung Zellmaterial von einer weiblichen Spenderin und vier männlichen Spendern im Alter zwischen 50 und 81 Jahren verwendet.

2.1.2 ZELLKULTUR

2.1.2.1 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden im Brutschrank unter konstanten Bedingungen bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Anteil von 5% kultiviert. Zur Expansion wurden Kulturflaschen mit einer Fläche von 25 bzw. 75cm² verwendet. Die für Messungen kultivierten Zellen wurden in Petrischalen mit 8,8cm² ausgesät, für die myogene Differenzierung wurden in ihrer Größe entsprechende 6-well-Platten verwendet. Zweimal (MSC) bzw. dreimal (SMC) wöchentlich erfolgte ein kompletter Medienwechsel.

2.1.2.2 Passagieren der Zellen

Bei Erreichen einer Zelldichte von 80-90% (MSC) bzw. 70-80% (SMC) wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die am Boden der Kulturflasche adhärenen Zellen zunächst mit PBS-Puffer gewaschen, die enzymatische Ablösung durch Trypsin/EDTA erfolgte unter Inkubation bei 37°C für 2 min. Nach optischer Kontrolle wurde die Wirkung von Trypsin durch Zugabe von Kulturmedium (MSC) bzw. TNS (SMC) gehemmt. Die erhaltene Zellsuspension wurde für 5 min bei 181g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer erfolgte die Wiederaussaat in der gewünschten Zelldichte.

2.1.2.3 Kryokonservierung der Zellen

Um für spätere Fragestellungen und Versuche Zellmaterial zur Verfügung zu haben, wurde jeweils in Passage 2 ein Teil der Zellen kryokonserviert. Die Zellen wurden hierfür abgelöst, die gewünschte Zellzahl wurde abgenommen und das nach Zentrifugation erhaltene Pellet sofort in kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Einfriergefäße abgefüllt. Die Zellen wurden für mindestens 24h bei -80°C gelagert, bevor sie in den Stickstofftank überführt wurden.

Zum Auftauen wurden die Einfriergefäße nach Entnahme aus dem Stickstofftank auf Trockeneis ins Labor transportiert, sofort im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und ihr Inhalt in Kulturmedium aufgenommen. Das nach dem

Zentrifugieren erhaltene Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät.

2.1.3 MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

2.1.3.1 Medien für mesenchymale Stammzellen

DMEM low glucose	87,8%	PAA, Österreich
Pen/Strep	1%	Gibco, USA
Glutamin	1%	Gibco, USA
Heparin 1000IE	0,2%	Roth, Deutschland
humanes Plasma (Überstand nach Zentrifugation bei 1137g für 30 min)	5%	PAA, Österreich
gepooltes Thrombozytenlysate (Überstand nach Zentrifugation bei 1137g für 30 min)	5%	Blutbank Tübingen, Deutschland

Tabelle 1: Kulturmedium MSC

Kulturmedium MSC ohne Zusatz von Pen/Strep	50%	
humanes Plasma (Überstand nach Zentrifugation bei 1137g für 30 min)	40%	PAA, Österreich
DMSO 99,5%	10%	Sigma-Aldrich, USA

Tabelle 2: Einfriermedium MSC

2.1.3.2 Medien für glatte Muskelzellen

Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	Promocell, Deutschland
------------------------------------	------------------------

Tabelle 3: Kulturmedium SMC

Cryo SFM	Promocell, Deutschland
----------	------------------------

Tabelle 4: Einfriermedium SMC

2.1.3.3 Differenzierungsmedium für die myogene Differenzierung der MSC

DMEM high glucose	88,4%	Gibco, USA
FBS	10%	Gibco, USA
Pen/Strep	1%	Lonza, Schweiz
Fungizone	0,6%	Biochrom, Deutschland
TGF β 1	5ng/ml	R&D Systems, USA
PDGF	5ng/ml	Peptotech, Deutschland
Ascorbinsäure	30 μ M	Roth, Deutschland

Tabelle 5: Myogenes Differenzierungsmedium

2.1.3.4 Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Zellkultur

DPBS	Gibco, USA
Detachin	Genlantis, USA
Trypsin/ EDTA	Sigma-Aldrich, USA
DetachKit (HepesBSS, Trypsin/EDTA-Lösung, TNS)	PromoCell, Deutschland

Tabelle 6: Lösungen Zellkultur

T25- und T75-Zellkulturflasche	Corning, USA
Centristar 15ml und 50ml	Corning, USA
Stripetten Costar 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning, USA
Zellkultur-Petrischale Nunclon Surface 8,8cm ²	Nunc, Dänemark
CellBind surface T25- und T75-Zellkulturflasche, 8,8cm ² Petrischale	Corning, USA
TipOne Pipettenspitzen 20µl, 300µl, 1250µl	Starlab, Deutschland
Cryogenic vial 2ml	Corning, USA

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien Zellkultur

CO ₂ -Inkubator CB150	Binder WTC, Deutschland
Zentrifuge Laborfuge 400	Heraeus, Deutschland
Zählkammer Neubauer improved	Marienfeld-Superior, Deutschland
Sterilbank Hera Safe KS 12	Heraeus, Deutschland
Wasserbad Lauda ecoline staredition	Lauda Dr. Wobser, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Bioscience, Schweiz

Tabelle 8: Geräte Zellkultur

2.2 PATCH-CLAMP-TECHNIK

2.2.1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.2.1.1 Membran- und Gleichgewichtspotential

Jede Zelle ist zur Aufrechterhaltung ihrer Homöostase bestrebt, eine Ladung gegenüber dem Extrazellulärraum aufzubauen, wobei es sich meist um eine negative Ladung handelt. Diese wird als Membranpotential bezeichnet und ist je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt. Zum Aufbau des Membranpotentials muss die Zelle die Passage von Ionen, die über die Lipiddoppelschicht nicht frei diffundieren können, kontrollieren, was über

Ionenkanäle erreicht wird. Diese aus Transmembranproteinen bestehenden Komplexe können nach ihrer Ionenselektivität, sowie der Art ihrer Regulation in spannungsgesteuerte, ligandengesteuerte, rezeptorgekoppelte und komplex regulierte Ionenkanäle unterteilt werden [15].

Ionenkanäle können in verschiedenen Zuständen vorliegen. Am Beispiel des spannungsgesteuerten Natriumkanals bedeutet das das Vorhandensein eines geschlossenen aktiven, eines offenen aktiven und eines geschlossenen inaktiven Zustands. Durch Depolarisation der Zellmembran kann ein Kanal im geschlossenen aktiven Zustand in den offenen aktiven Zustand überführt werden, was zu einem Einstrom von Natriumionen nach intrazellulär führt. Mit Inaktivierung geht der Kanal in den geschlossenen inaktiven Zustand über und kann erst durch eine Hyperpolarisation der Zellmembran wieder in den geschlossenen aktiven Zustand überführt werden [46].

Da es sich bei Strömen über Ionenkanäle um einen passiven Transport handelt, ist eine Triebkraft notwendig, die die Ionen durch den Kanal treibt. Diese wird als elektrochemische Potentialdifferenz bezeichnet. Der Begriff impliziert sowohl eine elektrische Komponente, die durch die elektrische Potentialdifferenz zwischen Außen- und Innenseite der Zellmembran, dem Membranpotential, beschrieben wird, sowie eine chemischen Komponente, deren Triebkraft der Konzentrationsgradient eines Ions zwischen Extra- und Intrazellulärraum darstellt. Ist eine Membran nur für eine Ionensorte durchlässig, stellt sich durch Diffusion ein Gleichgewicht zwischen seiner extra- und intrazellulären Konzentration ein. Es erfolgt kein Nettostrom über die Membran. Das sich unter diesen Bedingungen einstellende Potential wird als Gleichgewichtspotential bezeichnet, elektrische und chemische Triebkraft sind an diesem Punkt gleich groß, jedoch einander entgegen gerichtet. Zur Berechnung dieses Potentials lässt sich die Nernstgleichung heranziehen:

$$E_x = -\frac{RT}{z_x} * \ln\left(\frac{X_a}{X_i}\right) [mV]$$

E_x stellt das Nernst- oder Gleichgewichtspotential dar, R die universelle Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin, z_x die Wertigkeit des Ions, X_a die extrazelluläre, X_i die intrazelluläre Ionenkonzentration.

Sind die Konzentrationen eines Ions bekannt, kann eine Vorhersage über die Richtung des Ionenstroms bei einem bestimmten Membranpotential getroffen werden [47]. Da die Zellmembran unter Ruhebedingungen insbesondere für Kaliumionen permeabel ist, beeinflusst das Kaliumgleichgewichtspotential, welches bei ca. -90mV liegt, das Ruhemembranpotential maßgeblich. Die Leitfähigkeit der Membran für andere Ionen wie Na^+ und Chlorid ist zwar geringer, sie führen jedoch durch ihr im Vergleich zu K^+ positiveres Gleichgewichtspotential zu einer Einstellung des Ruhemembranpotentials je nach Zelltyp um etwa -60mV [15].

2.2.1.2 Historische Grundlagen der Patch-Clamp-Technik

Erwin Neher und Bert Sakmann revolutionierten mit der zwischen 1976-80 entwickelten Patch-Clamp-Technik, zu Deutsch so viel wie „Membranflicken-Klemme“, die Elektrophysiologie. Die Technik baute auf der von Cole und Curtis Ende der 1930er entwickelten „Spannungsklemme“ auf. Durch den Einsatz intrazellulärer Elektroden konnten sie bei Erregung von Neuronen Ionenströme über die Membran als Ausdruck einer Leitfähigkeitsänderung nachweisen [48]. Hodgkin und Huxley identifizierten diese Ströme 1952 als Kalium- und Natriumströme [49], die aufgrund ihrer Kinetik durch spannungsabhängige „Tore“ geleitet werden mussten. Eine genauere Analyse eines einzelnen dieser „Tore“ war zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, da das elektrische Hintergrundrauschen, resultierend aus der Gesamtheit aller Ströme über die Zellmembran, den Einzelkanalstrom überlagerte. Neher und Sakmann gelang es unter Verwendung einer Glaspipette, deren sehr feine Öffnung zunächst lose auf der Zellmembran platziert wurde, ein kleines Stück der Membran elektrisch zu isolieren und dadurch erstmals Einzelkanalaktivitäten aufzuzeichnen, was aufgrund des Rauschens jedoch nur bei Kanälen mit großer Leitfähigkeit möglich war. Revolutionierend war die Entdeckung, dass unter Verwendung einer sauberen Pipette und Anlage eines leichten

Unterdrucks nach Annäherung an die Zellmembran ein Abdichtwiderstand im Gigaohm-Bereich zwischen Zellmembran und Pipette erreicht wurde (sog. „Gigaseal“), wodurch das Hintergrundrauschen minimiert und auch kleine Ströme dargestellt werden konnten. Die so erreichte Konfiguration wird als Cell-attached-Konfiguration bezeichnet [48].

Noch heute stellt die Patch-Clamp-Technik weltweit die wichtigste Methode in der Elektrophysiologie bei der Untersuchung von Ionenkanälen dar.

2.2.1.3 Patch-Clamp-Konfigurationen

Die beschriebene Cell-attached-Konfiguration, bei der die Zellmembran intakt bleibt und lediglich ein kleiner Teil der Membran elektrisch isoliert wird, eignet sich zur Messung von Einzelkanalaktivitäten. Das Membranpotential und die Zusammensetzung des Zytosols können nicht beeinflusst werden [48].

Um die Gesamtheit an Strömen über die Zellmembran messen zu können, ist es notwendig, eine Verbindung zwischen Pipette und Intrazellulärraum herzustellen. Dies wird durch Rupturierung des Membranflecks innerhalb der Pipettenöffnung mithilfe der Anlage eines kurzen Unterdrucks möglich, die Whole-cell-Konfiguration ist erreicht. Neben der Kontrolle über das Membranpotential besteht die Möglichkeit, zusätzlich zur Extra- auch die Intrazellulärlösung zu kontrollieren [48].

Für spezielle Fragestellungen ist es nötig, zellfreie Messungen des Membranflecks innerhalb der Pipettenöffnung unter Austausch von Intra- und Extrazellulärlösung durchzuführen. Dies wird, ausgehend von der Cell-attached-Konfiguration, durch Zurückziehen der Pipette erreicht, wobei durch verschiedene Manipulationen entweder die zytoplasmatische oder die extrazelluläre Membranseite zur Badlösung gerichtet ist. Die erreichten Konfigurationen werden nach der Ausrichtung der Membran in Relation zur Badlösung als *Inside-out*- und *Outside-out*-Patch bezeichnet [50].

Unter den beschriebenen Techniken wird die Whole-cell-Konfiguration am häufigsten eingesetzt. Die dieser Arbeit zugrunde gelegten Daten wurden ausschließlich in dieser Konfiguration akquiriert.

2.2.1.4 Perforierter Patch

In der Whole-cell-Konfiguration wird, aufgrund des in Relation zur Pipettenlösung vernachlässigbar kleinen Volumens an Zytoplasma, eine rasche Diffusion und damit ein Auswaschen der intrazellulären Substanzen beobachtet. Auch unter Einsatz möglichst physiologischer Intrazellulärlösungen kommt es daher mit der Dauer der Messung häufig zu Veränderungen des Messsignals. Beim perforierten Patch wird der Intrazellulärlösung ein Membran-perforierendes Agens zugesetzt, welches nach Erreichen der Cell-attached-Konfiguration Öffnungen in der Membran generiert, die lediglich für kleinere Moleküle durchlässig sind. Ein elektrischer Kontakt zwischen Pipette und Intrazellulärraum entsteht, ohne dass höhermolekulare Bestandteile des Zytoplasmas ausgewaschen werden, wodurch Ströme auch unter längerer Messung konstant bleiben. Hierfür muss ein erhöhter Serienwiderstand in Kauf genommen werden [50].

2.2.1.5 Messungen mit der Spannungsklemme

Im Whole-cell-Modus ist durch den Kontakt der Intrazellulärelektrode mit dem Zytosol die Kontrolle des Membranpotentials möglich, was als Spannungsklemme (*voltage-clamp*) bezeichnet wird. Durch Injektion von Strom über die Elektrode kann so gezielt das Membran- oder Kommandopotential verändert und die Reaktion der Zelle in Form eines Stromflusses über die Membran beobachtet werden [48]. Soweit nicht anders erwähnt, wurde in dieser Arbeit die Technik der Spannungsklemme verwendet.

2.2.1.6 Messungen mit der Stromklemme

Wird in der Whole-cell-Konfiguration nicht das Membranpotential, sondern der Strom über die Membran vorgegeben, spricht man von der Stromklemme (*current-clamp*). Durch gezielte Strominjektionen kann das Verhalten des Membranpotentials der Zelle studiert werden. Die Ermittlung des Ruhemembranpotentials erfolgt ebenfalls mithilfe der Stromklemme, indem unmittelbar nach Erstellung der Whole-cell-Konfiguration das Membranpotential ohne Vorgabe eines Kommandostroms gemessen wird [48]. Der gewählte

Zeitpunkt ist wichtig, da die Messung nur minimal durch die Diffusion zwischen Zytosol und Intrazellulärlösung der Pipette verfälscht wird.

2.2.1.7 Patch-Clamp-Vorverstärker

Auf die verwendeten Komponenten des Patch-Clamp-Messstands wird in *Kapitel 2.2.2.5 Patch-Clamp-Messstand* näher eingegangen. Da der Vorverstärker das Kernstück der Datenerhebung darstellt, wird im Folgenden genauer auf seine Funktionsweise eingegangen.

Der Patch-Clamp-Vorverstärker agiert als Strom-Spannungs-Wandler. Er ermöglicht es, mit nur einer Elektrode das vorgegebene Potential durch Strominjektion konstant zu halten und diesen Kompensationsstrom zu messen. Hierzu werden im Operationsverstärker Sollspannung und Pipettenspannung verglichen, Differenzen werden durch einen kompensierenden Stromfluss, dessen Größe ausgelesen werden kann, ausgeglichen [48].

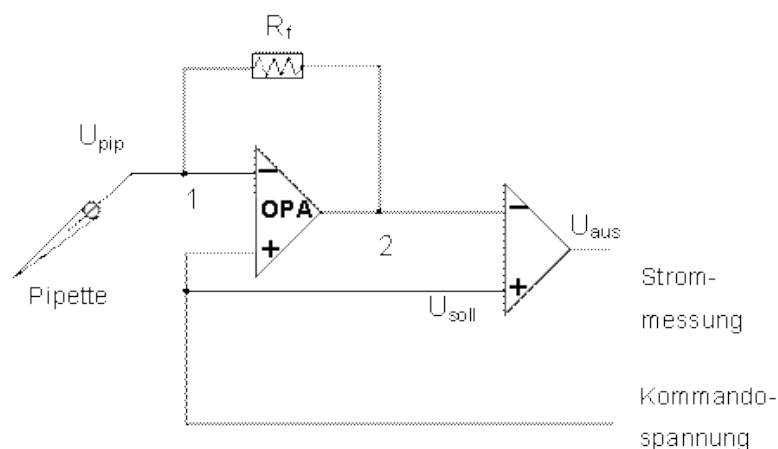


Abbildung 2: Schaltbild eines Patch-Clamp-Vorverstärkers

Wichtigstes Element des Vorverstärkers ist der Operationsverstärker (OPA), der die angelegte Sollspannung U_{soll} mit der Pipettenspannung U_{pip} vergleicht. Kommt es zur Spannungsdifferenz, entsteht am Ausgang des OPA eine hierzu proportionale Spannung, die zur Spannungsdifferenz zwischen Punkt 1 und Punkt 2 führt. Als Folge fließt Strom über den Rückkopplungswiderstand R_f . Aufgrund des sehr hohen Eingangswiderstandes des OPA kann der Strom nur über die Pipette fließen und zwar so lange, bis keine Differenz mehr zwischen U_{soll} und U_{pip} besteht. Die Ausgangsspannung U_{aus} kann über die Steuereinheit ausgelesen werden. (Quelle: Numberger und Draguhn, Patch-Clamp-Technik, Spektrum, Akad. Verl., 1996)

2.2.2 PRAKTISCHE DURCHFÜHRUNG

2.2.2.1 Substanzen, Verbrauchsmaterialien und Geräte zur Patch-Clamp-Messung

NaCl	Roth, Deutschland
KCl	Roth, Deutschland
Glucose	Roth, Deutschland
HEPES	Roth, Deutschland
CaCl ₂	Roth, Deutschland
MgCl ₂	Roth, Deutschland
NaOH	Roth, Deutschland
Saccharose	Roth, Deutschland
TEA-Chlorid	Sigma-Aldrich, USA
Kaliumgluconat	Sigma-Aldrich, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, USA
MgCl ₂ *6H ₂ O	Roth, Deutschland
Na ₂ -ATP	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	Roth, Deutschland
KOH	Roth, Deutschland
CsCl	Sigma-Aldrich, USA
CsOH	Sigma-Aldrich, USA
TTX-Citrat	Tocris Bioscience, UK
NMDG	Sigma-Aldrich, USA
Nifedipin	Sigma-Aldrich, USA
Lidocainhydrochloridmonohydrat	Sigma-Aldrich, USA
CdCl ₂ *2.5H ₂ O	Sigma-Aldrich, USA
BaCl ₂ *2H ₂ O	Sigma-Aldrich, USA
ProTx II	Alomone Labs, Israel
Ranolazin	Alomone Labs, Israel

Tabelle 9: Substanzen zur Patch-Clamp-Messung

Glaspipetten GB150TF-10	Science Products, Deutschland
Omnifix F 1ml Spritzen	B. Braun, Deutschland
Sterilfilter Cameo 3N syringe filter	GE, USA

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien zur Patch-Clamp-Messung

Pipettenzieher Flaming Micropipette Puller, Model P-97	Sutter, USA
Vibrationsisolator Accurion Halcyonics micro	Accurion, Deutschland
Mikroskop Axiovert 135 TV	Carl Zeiss, Deutschland
Kamera AVT Horn B/W-Camera BC-1	H.-P. Horn, Deutschland
Heavy Duty Differential Pressure Manometer (29psi)	EXTECH Instruments, USA
Mikromanipulator Patch Star	Scientifica, UK

EPC-10 USB Patch Clamp Verstärker	HEKA, Deutschland
Osmometer Osmomat 030	Gonotec, Deutschland
Waage CP 153 + CP 225 D	Sartorius, Deutschland
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Deutschland
Wasseraufbereitung Milli-Q Advantage A10	Merck-Millipore, Deutschland

Tabelle 11: Geräte zur Patch-Clamp-Messung

2.2.2.2 Lösungen zur Patch-Clamp-Messung

Extrazellulärlösungen

Die verwendeten Extrazellulärlösungen wurden in Osmolarität und pH-Wert an das Kulturmedium angepasst. Für MSC wurde eine Osmolarität von 325mOsm/l gewählt, für SMC 300mOsm/l. Eine Einstellung erfolgte, falls nötig, mittels Saccharose. Für die pH-Einstellung wurden NaOH und HCl verwendet, der Ziel-pH für MSC lag bei 7,38, für SMC bei 7,35.

Die Lösungen wurden im Kühlschrank gelagert und vor den Messungen auf Zimmertemperatur erwärmt.

NaCl	150mM (MSC) 135mM (SMC)
KCl	2,5mM
Glucose	10mM
HEPES	10mM
CaCl ₂	2mM
MgCl ₂	1mM

Tabelle 12: Extrazellulärlösung für MSC und SMC zur Messung von Kaliumströmen

Zur Messung von Natrium- und Calciumströmen war eine weitestgehende Inhibition von Kaliumströmen nötig, was durch eine Zugabe von Tetraethylammoniumchlorid und BaCl₂ in einer Konzentration von jeweils 10mM erreicht wurde. Um gleichbleibende Osmolaritäten im Bezug auf die Ausgangslösungen zu erreichen, wurde die Konzentration von NaCl entsprechend reduziert. Da die Permeabilität von Calciumkanälen für Ba²⁺

größer als für Ca^{2+} ist, wurde durch den Austausch von Ca^{2+} durch Ba^{2+} in der Extrazellulärlösung gleichzeitig die Detektionswahrscheinlichkeit für Ströme über Calciumkanäle erhöht.

NaCl	130mM (MSC) 120mM (SMC)
KCl	2,5mM
Glucose	10mM
HEPES	10mM
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10mM
MgCl_2	1mM
TEA-Cl	10mM

Tabelle 13: Extrazellulärlösung für MSC und SMC zur Messung von Natrium- und Calciumströmen

Zur Bestimmung der Natriumselektivität eines Kanals wurde NaCl in der Extrazellulärlösung teilweise oder ganz durch N-Methyl-D-glucamin (NMDG) ersetzt. Eine pH-Einstellung erfolgte mit KOH und HCl. Da gleichzeitig Kaliumströme inhibiert werden sollten, war die Grundlage dieser Lösung die Extrazellulärlösung zur Messung von Natrium- und Calciumströmen.

Prozentualer Anteil an Na-Ionen im Vergleich zur Ausgangslösung	Konzentration NaCl	Konzentration NMDG
100%	120mM	0mM
50%	60mM	60mM
25%	30mM	90mM
0%	0mM	120mM

Tabelle 14: NaCl- und NMDG-Konzentrationen zur Substitution von Na^+ in der Extrazellulärlösung

Intrazellulärlösung

Beim Ansetzen der Intrazellulärlösungen wurde eine 5-10mOsm/l geringere Osmolarität als die der Extrazellulärlösung angestrebt, das bedeutet 315mOsm/l für MSC und 290mOsm/l für SMC. Zur Einstellung der Osmolarität

wurde, falls nötig, Saccharose verwendet. Zur pH-Einstellung wurden KOH und HCl verwendet.

Intrazellulärlösungen wurden zu je 1,5ml aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt. Sie wurden erst unmittelbar vor Versuchsbeginn aufgetaut.

KCl	20mM
Kaliumgluconat	125mM
EGTA	10mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2mM
Na ₂ -ATP	2mM
HEPES	10mM

Tabelle 15: Intrazellulärlösung für MSC zur Messung von Kaliumströmen

KCl	145mM
EGTA	0,1mM
MgCl ₂	2mM
HEPES	10mM
Na ₂ -ATP	2mM

Tabelle 16: Intrazellulärlösung für SMC zur Messung von Kaliumströmen

Zur Untersuchung von Natrium- und Calciumströmen wurde zur Inhibition von Kaliumströmen KCl durch CsCl ersetzt. Zur pH-Einstellung wurden CsOH und HCl verwendet.

CsCl	160mM (MSC) 145mM (SMC)
EGTA	0,1mM
MgCl ₂	2mM
HEPES	10mM
Na ₂ -ATP	2mM

Tabelle 17: Intrazellulärlösung für MSC und SMC zur Messung von Natrium- und Calciumströmen

Präparation von Pharmaka und Toxinen

Zur spezifischen Inhibition von Ionenkanälen wurden verschiedene Substanzen in teilweise sehr geringer Konzentration eingesetzt. Um Ungenauigkeiten beim Herstellen der Lösungen zu vermeiden, wurde mit Stammlösungen mit bidestilliertem Wasser als Lösungsmittel gearbeitet, aus denen die gewünschte Menge Wirkstoff entnommen wurde. Die hydrophoben Substanzen Nifedipin und Ranolazin wurden in DMSO gelöst, auf eine Endkonzentration von DMSO kleiner 0,1% in der Messlösung wurde geachtet.

2.2.2.3 Pipetten und Elektroden

Als Patchpipetten dienten Kapillaren aus Borosilikatglas mit einem Außendurchmesser von 1,5mm. Zur Gewährleistung einer blasenfreien Füllung wurden Kapillaren mit Filament verwendet. Die Pipetten wurden am Tag des Experiments mit dem Elektrodenziehgerät, welches in mehreren Zyklen das Glas mittels eines Filaments erhitzt und durch dosierten Zug in Längsrichtung zur Formung einer feinen Öffnung führt, hergestellt. Zur Erhöhung des Abdichtwiderstandes zwischen Pipette und Zellmembran wurde die Pipettenspitze feuerpoliert, im Anschluss wurden die fertigen Pipetten zum Schutz vor Verschmutzung in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrt.

Die Pipetten wurden unmittelbar vor dem Experiment mittels *backfill*-Technik durch eine feine Kapillare soweit mit Intrazellulärlösung gefüllt, dass der Elektrodendraht nach Einspannen in den Pipettenhalter gerade in die Lösung eintauchte. Die verwendeten Pipetten wiesen nach Eintauchen in die Badlösung einen Widerstand von 1,5-3,8M Ω auf.

Als intrazelluläre Elektrode diente ein chlorierter Silberdraht, welcher regelmäßig mit Kaliumchloridlösung nachchloriert wurde. Die Badelektrode bestand aus einem Silberchlorid-Pellet.

2.2.2.4 Zellpräparation

Einfluss von Wachstumseigenschaften und Space-Clamp-Artefakt

Sowohl MSC, als auch SMC imponierten in Kultur durch ihre spindelförmigen, teils verzweigten Wachstumseigenschaften, die Patch-Clamp-Messungen an

adhärenten Zellen erschwerten. Zum einen traten aufgrund des flachen Wachstums räumliche Schwierigkeiten bei der Annäherung der Patchpipette auf, weiterhin war die isolierte Messung einer Einzelzelle bei engen Kontakten zu benachbarten Zellen problematisch. Insbesondere bei Zellen mit langen, dünnen Zytoplasma-Ausläufern wurden sogenannte *Space-clamp*-Artefakte beobachtet. Während in kugelförmigen Zellen der intrazelluläre Widerstand im Vergleich zum Membranwiderstand vernachlässigt werden kann, agiert das Zytoplasma in dünnen Zellfortsätzen wie in Reihe geschaltete Serienwiderstände, welche sich mit der Länge des Ausläufers addieren und somit zu ungenügender Kontrolle des Membranpotentials und verzögerten Stromantworten führen [50].

Sämtliche Messungen wurden deshalb an abgelösten Zellen durchgeführt, was bedeutete, dass sie nicht unter ihren natürlichen Wachstumseigenschaften untersucht werden konnten. Eine Vorarbeit konnte jedoch beweisen, dass sich für MSC die Messergebnisse zwischen adhärenten und abgelösten Zellen nicht unterscheiden [51].

Ablösen der Zellen

Nach Entfernung des Kulturmediums und Waschen der Zellen mit PBS erfolgte eine enzymatische Ablösung mit Detachin unter Inkubation bei 37°C für 2 min. Dieses protease- und kollagenasehaltige Agens erwies sich vergleichsweise schonend im Bezug auf die Integrität der Zellmembran und verlängerte damit das Zeitintervall für die Durchführung von Patch-Clamp-Messungen im Vergleich zur zuvor eingesetzten Accutase erheblich. Die abgelösten Zellen wurden in Extrazellulärlösung verdünnt, bei 181g für 5 min zentrifugiert und das entstandene Zellpellet erneut in Extrazellulärlösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde maximal 3h bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.2.5 Patch-Clamp-Messstand

Patch-Clamp-Messungen sind sehr anfällig für Störungen von außen, was zum einen durch die Größe einer Einzelzelle, zum anderen durch die gemessenen transmembranären Ströme im Pico- bis Nanoamperebereich bedingt ist. Daher wurde das Mikroskop als Mittelpunkt des Messstandes zur Abschirmung von

mechanischen Störungen auf einem Vibrationsisolator gelagert. Fest mit dem Mikroskop verbunden waren der Pipettenhalter, der über einen zweistufig verstellbaren Mikromanipulator ein zielgenaues Steuern der Pipette ermöglichte, sowie der Vorverstärker. Auf einen Faraday-Käfig wurde zugunsten einer sorgfältigen Erdung aller elektrisch leitenden Teile auf einen Massepunkt verzichtet, um eine elektromagnetische Abschirmung des Messstandes zu erreichen.

Durch Einsatz eines inversen Mikroskops wurde der Arbeitsraum über dem Zellbad maximiert, über eine Kamera wurde der zentrale Bildausschnitt zusätzlich auf einem Monitor wiedergegeben. Auf einem weiteren Monitor wurde das Messsignal mithilfe eines digitalen Oszilloskops dargestellt.

Weiterhin ermöglichte eine mit dem Pipettenhalter und einem Manometer verbundene Schlauchkonstruktion die dosierte Applikation von Über- und Unterdruck auf die Pipette. Die Perfusion erfolgte gravitationsabhängig, eine Absaugpumpe sorgte für eine gleichbleibende Flüssigkeitsmenge im Zellbad.

2.2.2.6 Durchführung der Messungen

Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Zunächst wurde das Perfusionssystem mit Extrazellulärlösung gespült und ein frisches Deckglas in die Messkammer eingebracht. Ein Teil der Zellsuspension wurde in die Messkammer pipettiert, nach 5 min (SMC) bis 10 min (MSC) waren die Zellen ausreichend adhärent am Boden der Kammer, um die Perfusion zu installieren und mit den Messungen beginnen zu können.

An die mit Intrazellulärlösung gefüllte, in den Pipettenhalter eingespannte Pipette wurde ein Überdruck von 20-30mbar angelegt, um beim Eintauchen in das Zellbad ein Verschmutzen der feinen Pipettenöffnung zu vermeiden. Bei Kontakt der Pipettenspitze mit dem Zellbad wurde der Pipettenwiderstand ermittelt und es erfolgte der Abgleich des Pipetten-*offset*. Unter einem intermittierenden Testimpuls von +5mV alle 5ms wurde die Pipette vorsichtig der zuvor ausgewählten Zelle angenähert. Unter optischer Kontrolle über das Mikroskop wurde bei Annäherung der Pipette an die Zellmembran eine

Verformung sichtbar, gleichzeitig verringerte sich im Oszilloskop die Stromamplitude als Zeichen der Erhöhung des Pipettenwiderstandes, woraufhin der Überdruck entfernt und unverzüglich ein Unterdruck von -30mbar angelegt wurde. Um den Abdichtungsprozess zwischen Pipettenöffnung und Zellmembran zu beschleunigen, wurde in mehreren Schritten das Haltepotential von -60mV (MSC) bzw. -70mV (SMC) eingestellt. Ein Widerstand $>1\text{G}\Omega$ zeigte das Erreichen eines Gigaseals und damit der Cell-attached-Konfiguration an. Nach Abgleich der Pipettenkapazität wurde durch wiederholtes Anlegen eines Unterdrucks die Zellmembran durchbrochen, die Whole-cell-Konfiguration war erreicht. Serienwiderstand und Zellkapazität wurden ermittelt, der Serienwiderstand zu 40-60% kompensiert. Das Liquid junction potential wurde nicht berücksichtigt.

Generell wurde als Vorzeichenkonvention der Ausstrom von Kationen als positiver, der Einstrom von Kationen als negativer Strom definiert.



Abbildung 3: Patch-Clamp-Messung an einer mesenchymalen Stammzelle

Die Zellen wurden für die Messung enzymatisch abgelöst, was die Kugelform erklärt. Es wurde kurze Zeit gewartet, bis sie am Boden der Messkammer adhären waren, bevor vorsichtig die Pipette (links im Bild) angenähert wurde. Nach Erreichen eines Abdichtwiderstandes zwischen Pipettenöffnung und Zellmembran im Gigaohm-Bereich wurde durch wiederholte Anlage eines leichten Unterdrucks der Membranfleck innerhalb der Pipettenöffnung rupturiert und die dargestellte Whole-cell-Konfiguration erreicht.

2.2.2.7 Verwendete Protokolle

Gesamtprotokoll

Zur allgemeinen Charakterisierung der spannungsgesteuerten Ionenkanäle wurde bei allen Zelltypen ein Sprungprotokoll, ansteigend in 10mV-Schritten von -120mV bis +70mV verwendet, welches als „Gesamtprotokoll“ bezeichnet wurde.

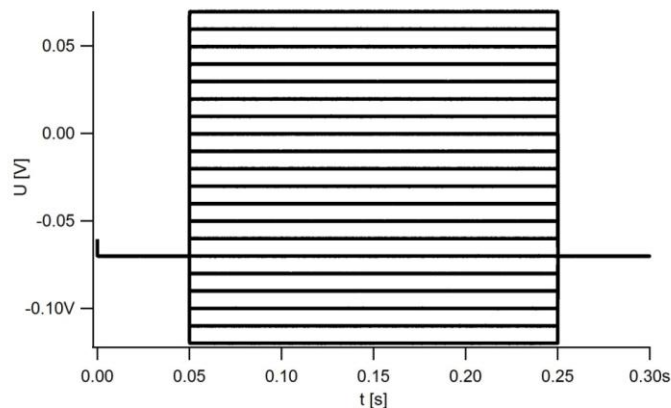


Abbildung 4: Gesamtprotokoll zur allgemeinen Charakterisierung der auf einer Zelle vorhandenen Ströme.

Ausgehend vom Haltepotential -60mV (MSC, MSC in myogener Differenzierung) bzw. -70mV (SMC) erfolgte eine Hyperpolarisation der Zellmembran auf -120mV für 200ms, anschließend wurde zum Haltepotential zurückgekehrt. Diese Schritte wurden insgesamt 20mal durchgeführt, dabei erfolgte jeweils ein Spannungssprung von +10mV im Vergleich zum vorhergehenden Schritt, es resultierte ein Sprungprotokoll mit 20 Pulsen von -120mV auf +70mV.

Natriumprotokoll

Zur Untersuchung von Natriumströmen wurde die Zelle zunächst auf -100mV hyperpolarisiert, um alle Natriumkanäle in den geschlossen aktivierbaren Zustand zu überführen. Es folgte eine Depolarisation auf +10mV für 10ms, was zur Öffnung von Natriumkanälen führte. Eine erneute Hyperpolarisation auf -100mV diente zur Erkennung von kapazitiven Artefakten infolge des schnellen Potentialwechsels. Dieses Protokoll wurde als „Natriumprotokoll“ bezeichnet.

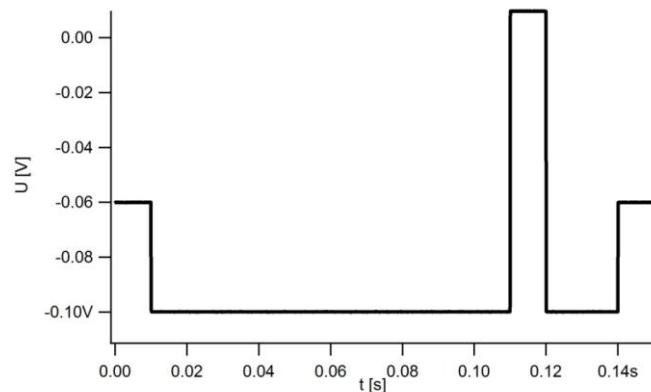


Abbildung 5: Natriumprotokoll zur Messung von Natriumströmen.

Ausgehend vom Haltepotential erfolgte zunächst eine Hyperpolarisation auf -100mV für 100ms , gefolgt von einer Depolarisation auf $+10\text{mV}$ für 10ms . Nach einer erneuten Hyperpolarisation auf -100mV wurde zum Haltepotential zurückgekehrt. Dieses Protokoll wurde im 5s -Intervall wiederholt.

Calciumprotokoll

Wurde ein Calciumstrom bei einer Zelle vermutet, wurde das „Calciumprotokoll“ eingesetzt, das durch eine Hyperpolarisation auf -120mV spannungsabhängige Calciumkanäle in den geschlossenen aktivierbaren Zustand überführte und durch einen anschließenden Sprung auf $+10\text{mV}$ für 50ms zur Öffnung dieser Kanäle führte.

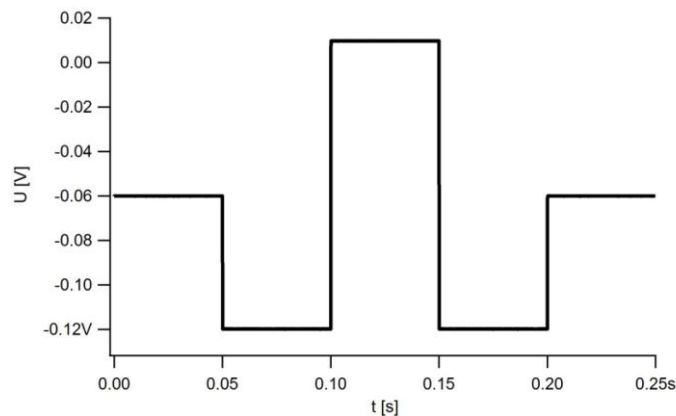


Abbildung 6: Calciumprotokoll zur Messung von Calciumströmen.

Ausgehend vom Haltepotential erfolgte eine Hyperpolarisation der Zelle auf -120mV , gefolgt von einem Potentialsprung auf $+10\text{mV}$, um vorhandene Calciumkanäle zu öffnen. Vor Rückkehr zum Haltepotential wurde die Zelle erneut auf -120mV hyperpolarisiert. Jede dieser Spannungsänderungen wurde für 50ms gehalten, das Protokoll-Intervall betrug 3s .

Protokoll Test 30mV

Zur Überprüfung der Stromstabilität von Kaliumströmen bei MSC wurde, ausgehend vom Haltepotential, ein Impuls von +30mV für 50ms angelegt, bevor zum Haltepotential zurückgekehrt wurde. Das Intervall betrug 30s. Das Protokoll wurde als „Test 30mV“ bezeichnet.

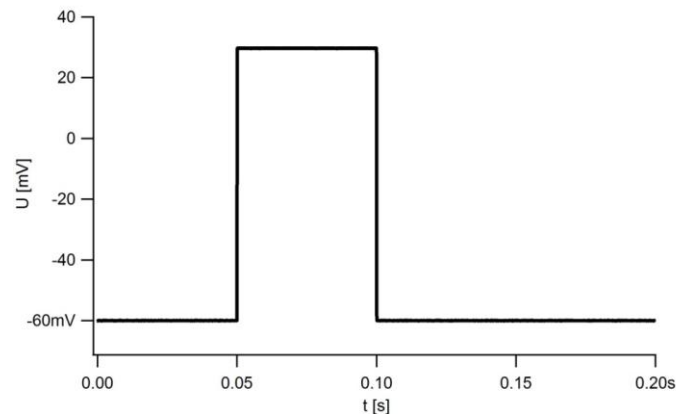


Abbildung 7: Protokoll Test 30mV zur Überprüfung der Stromstabilität von Kaliumströmen bei MSC.

In einem Intervall von 30s wurde, ausgehend vom Haltepotential, ein Puls von +30mV über 50ms angelegt.

P/n-Protokolle

Zur Minimierung von rein durch kapazitative Artefakte bedingten Offsetströmen wurden, falls möglich, P/4-Protokolle verwendet. Vor dem eigentlichen Potentialsprung, der zur Öffnung der Ionenkanäle führte, wurden vier Vorpulse appliziert, von denen jeder $\frac{1}{4}$ der Größe des eigentlichen Spannungssprungs besaß. Durch Addition der Ströme dieser Vorpulse, die allein genommen zu gering waren, um Ionenkanäle zu öffnen, konnte auf die passive Antwort der Membran auf das eigentliche Experiment geschlossen und diese später von der erhaltenen Stromantwort subtrahiert werden. Übrig blieben spezifische Ströme [48].

2.2.3 DATENAUSWERTUNG

2.2.3.1 Einschlusskriterien bei der Auswertung

Voraussetzung für den Einschluss des Experiments in die Auswertung war zunächst das Erreichen eines Abdichtwiderstandes von $1\text{G}\Omega$ in der Cell-attached-Konfiguration, in der Whole-cell-Konfiguration wurden nur Messungen mit einem Serienwiderstand unter $15\text{M}\Omega$ bei einer minimalen Serienwiderstandskompensation von 40% und einem initialen Leckstrom kleiner 150pA berücksichtigt.

2.2.3.2 Datenverarbeitung

Die mit der PatchMaster-Software (v. 2x35, Heka, Deutschland) generierten Daten wurden mit dem Datenverarbeitungsprogramm Igor Pro (v. 6.34, Wavemetrics, USA) unter Zuhilfenahme selbstprogrammierter Skripte („PAT“, J. Bergsman, www.bergsman.org) ausgewertet und grafisch dargestellt. Berechnungen wurden in Excel (v. 2003, Microsoft, USA) durchgeführt. Soweit nicht anders angeführt stellen alle angegebenen Werte Mittelwerte dar, die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts ($\pm \text{SEM}$).

Innerhalb der betrachteten Zellpopulationen wurden große Schwankungen in der Stromgröße von Einzelzellen registriert und in Zusammenhang mit der Membrankapazität gebracht. Zur Veranschaulichung wurde die Stromgröße jeder Einzelzelle auf ihre Membrankapazität normalisiert, der erhaltene Wert drückt die Stromdichte (pA/pF) aus. Dadurch wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass kleine Zellen oft über kleine Ströme verfügten, diese jedoch in Relation zu ihrer Größe denen von großen Zellen meist entsprachen.

Aufgrund des starken Rauschens in der Darstellung sehr kleiner Ströme wurden manche Kurven mit einem *sliding average* in einem Umfang von 8 Datenpunkten entstört. Dies erfolgte lediglich zu Darstellungszwecken, zur Auswertung wurden stets die Rohdaten herangezogen.

2.2.3.3 Statistische Auswertung

Zur Feststellung des statistisch signifikanten Unterschieds zwischen zwei Datenmengen wurde der Wilcoxon- Test herangezogen. Die

Wahrscheinlichkeit, dass die beiden verglichenen Datenmengen der gleichen Grundgesamtheit angehören, also statistisch nicht verschieden sind, wird durch eine Wahrscheinlichkeit von $p > 0,05$ zum Ausdruck gebracht. Die Berechnung erfolgte mit Igor Pro.

Zur Beschreibung der TTX-Dosis-Wirkungskurven wurden die Rohdaten einer nicht-linearen Regression auf Basis der Hill-Gleichung unterzogen, was ebenfalls mithilfe von Igor Pro erfolgte.

3. ERGEBNISSE

3.1 GLATTE MUSKELZELLEN

3.1.1 KULTUREIGENSCHAFTEN GLATTER MUSKELZELLEN

Glatte Muskelzellen aus dem humanen M. detrusor vesicae wurden von Passage 2 bis Passage 18 für insgesamt maximal 63 Tage kultiviert. Bis Passage 10, entsprechend etwa Kulturtag 30, erfolgte eine exzessive Proliferation der Zellen mit einer Verdopplungszeit von 1-2 Tagen, die abrupt nachließ, was mehrfach beobachtet wurde. In der Folge wurde hauptsächlich ein Größenwachstum der Zellen festgestellt bei nur noch sehr geringer Proliferationstendenz.

Morphologisch stellten sich die Zellen in Kultur inhomogen, teils spindelförmig, teils verzweigt dar.

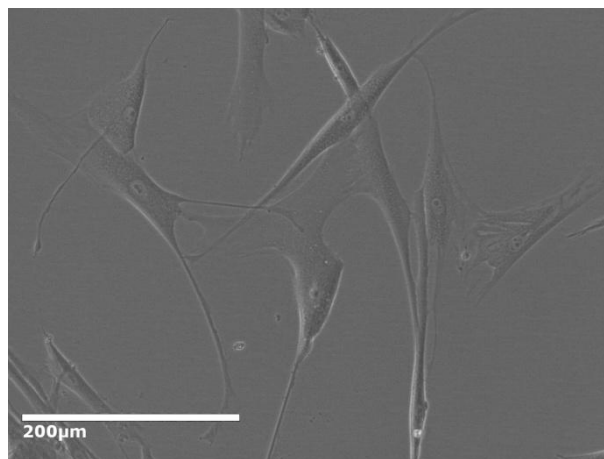


Abbildung 8: Zellkultur glatter Muskelzellen.

Kultur glatter Muskelzellen in Passage 12 mit uneinheitlichem, teils spindelförmigem, teils verzweigtem Wachstum.

3.1.2 ALLGEMEINE ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN GLATTER MUSKELZELLEN

SMC in P4-P10 hatten eine durchschnittliche Membrankapazität von 71pF ($\pm 5,1$ pF, n=69), die in P11-P18 auf 134pF ($\pm 6,5$ pF, n=82) anstieg. Wird von

einer spezifischen Kapazität von $1\text{pF}/100\mu\text{m}^2$ ausgegangen [48], so entspricht die durchschnittliche Membranfläche etwa $7100\mu\text{m}^2$ bzw. $13400\mu\text{m}^2$.

Das Ruhemembranpotential betrug im Mittel $-22,3\text{mV}$ ($\pm 3,8\text{mV}$, $n=6$, gemessen in P14).

3.1.3 AUSWÄRTSSTRÖME GLATTER MUSKELZELLEN

Um eine generelle Vorstellung der spannungsabhängigen Ströme auf SMC zu erhalten, erfolgte zunächst eine Untersuchung der Zellen mit dem Gesamtprotokoll. Hierbei fielen spannungsabhängige Auswärtsströme auf, die aufgrund ihrer typischen Kinetik am ehesten über Kaliumkanäle vermittelt wurden. Es wurde überwiegend ein schnell aktivierender, nicht inaktivierender Auswärtsstrom beobachtet, der ab einem Membranpotential positiv von 0mV aktivierte und mit steigender Depolarisation ein zunehmendes Rauschen entwickelte. Dieser Auswärtsstrom wurde als schneller Strom I_{KS} bezeichnet.

Da eine pharmakologische Charakterisierung der Kaliumkanäle auf MSC nicht möglich war (*Kapitel 3.2.3.1 Stromverhalten mesenchymaler Stammzellen*) und das Ziel der Arbeit ein elektrophysiologischer Vergleich der verschiedenen untersuchten Zelltypen darstellte, erfolgte die Analyse der Kaliumkanäle auf SMC auf rein deskriptiver Ebene.

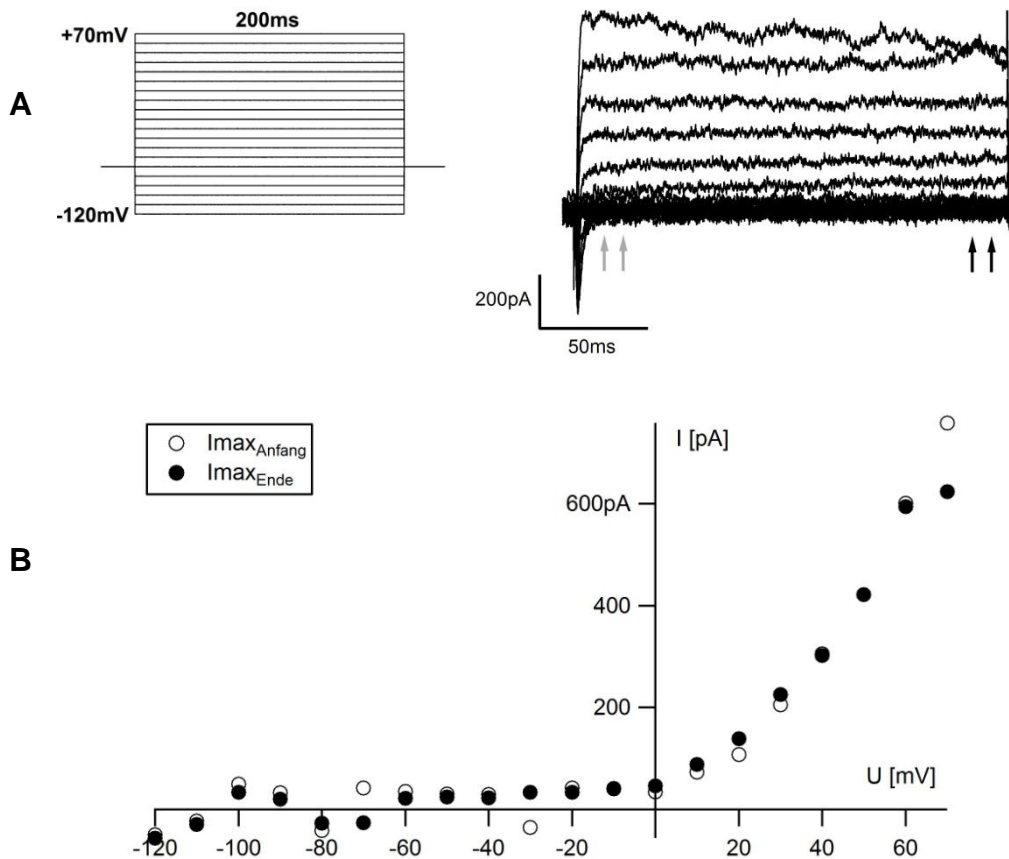


Abbildung 9: Schneller Auswärtsstrom I_{Ks} auf einer glatten Muskelzelle.

A: Strom-Zeit-Kurve eines schnell aktivierenden, auswärts gleichrichtenden Stroms I_{Ks} einer glatten Muskelzelle, registriert mit dem Gesamtprotokoll. Zunächst unberücksichtigt bleibt der initiale Einwärtsstrom.

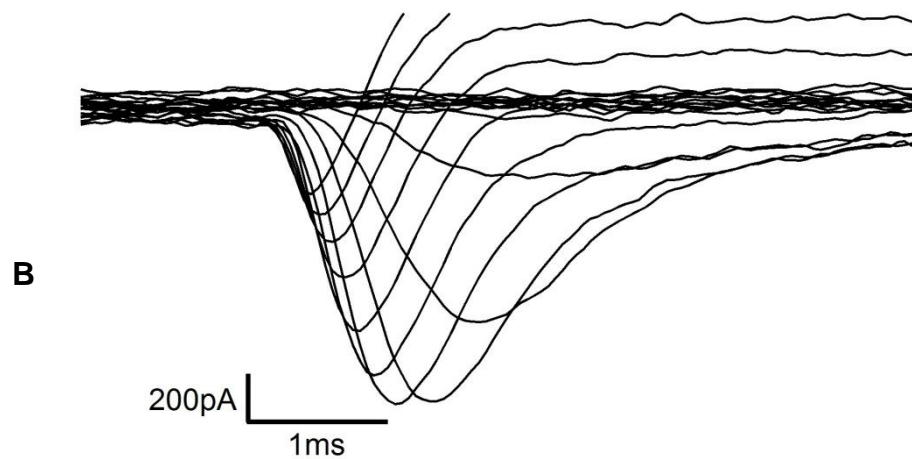
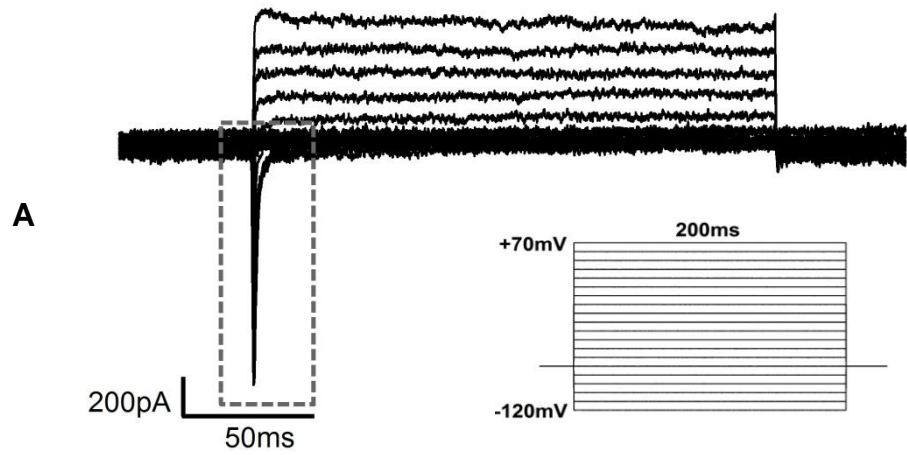
B: Strom-Spannungs-Kurve des schnellen Auswärtsstroms I_{Ks} einer glatten Muskelzelle. Aufgetragen sind jeweils die Strommaxima (I_{max}) zwischen den in **A** mit Pfeilen gekennzeichneten Bereichen zu Beginn (\circ) und Ende (\bullet) jeder Stromspur. Da sich beide Kurven praktisch entsprechen, kann von einem schnell aktivierenden, nicht inaktivierenden Kanal ausgegangen werden, der ab einem Membranpotential von +10mV aktiviert.

3.1.4 NATRIUMSTRÖME GLATTER MUSKELZELLEN

3.1.4.1 Identifikation eines Einwärtsstroms glatter Muskelzellen

Über alle Passagen wurde auf einem Teil der Zellen neben dem beschriebenen Auswärtsstrom ein spannungsabhängiger Einwärtsstrom beobachtet. Er aktivierte ab Potentialen von -30mV, erreichte sein Maximum bei +10mV und einen maximalen Stromfluss innerhalb 1-2ms nach Depolarisation. Dieser Strom konnte zunächst nicht adressiert werden.

Um eine Überlagerung durch Auswärtsströme zu minimieren, wurden Intra- und Extrazellulärlösung optimiert zur Messung von Natrium- und Calciumströmen verwendet.



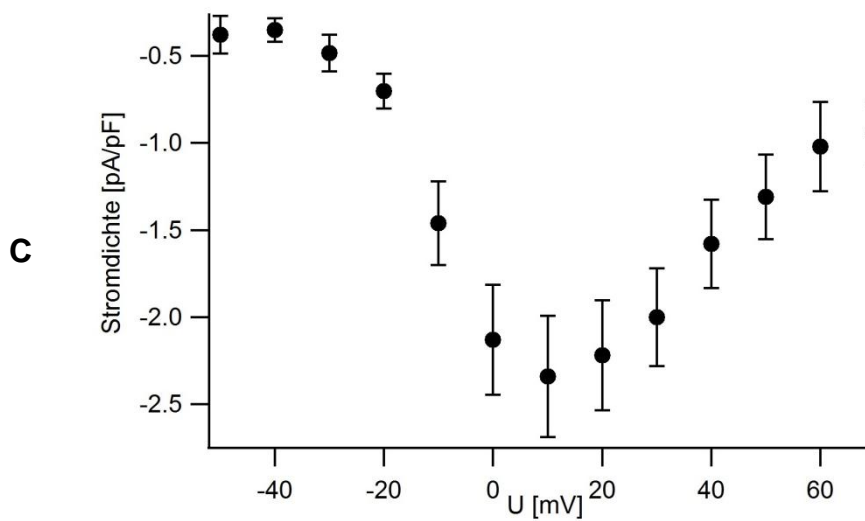


Abbildung 10: Einwärtsströme glatter Muskelzellen

A: Strom-Zeit-Kurve eines schnellen Einwärtsstroms einer glatten Muskelzelle (gestrichelter Kasten) mit einer Größe von $>1\text{ nA}$, gefolgt von einem Auswärtsstrom, registriert mit dem Gesamtprotokoll.

B: Vergrößerung des Einwärtsstroms aus **A**. Gut ersichtlich sind die schnelle Aktivierung innerhalb 1ms und die anschließend schnelle Inaktivierung.

C: Strom-Spannungskurve des Einwärtsstroms, die Stromdichte wurde gegen das Membranpotential aufgetragen. Berücksichtigt wurden Zellen von Passage 5 bis 18. Die Werte entsprechen Mittelwerten $\pm\text{SEM}$, $n=20$.

3.1.4.2 Verhalten des Einwärtsstroms glatter Muskelzellen unter Nifedipin

In der Literatur sind L-Typ Calciumkanäle für diesen Zelltyp beschrieben. Um zu untersuchen, ob ein Teil der beschriebenen Einwärtsströme über L-Typ Calciumkanäle vermittelt wurde, erfolgte die Applikation des spezifischen Inhibitors Nifedipin in einer Dosierung von $50\mu\text{M}$.

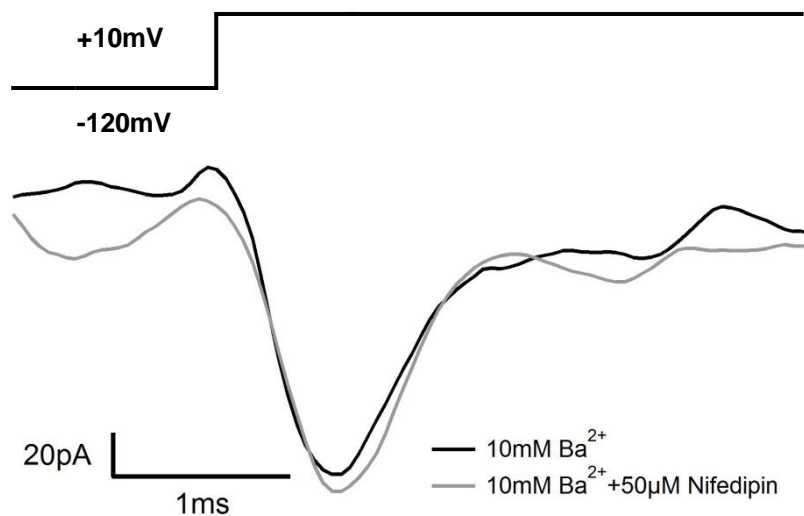


Abbildung 11: Einwärtsstrom einer glatten Muskelzelle unter Zugabe von 50µM Nifedipin
 Unter einem Potentialsprung von -120mV auf +10mV stellte sich ein schneller Einwärtsstrom auf einer glatten Muskelzelle in Passage 10 dar. Dieser Strom blieb auch nach Zugabe des L-Typ Calciumkanalinhibitors Nifedipin in einer Konzentration von 50µM unverändert.

Die zu erwartende Reduktion der Stromamplitude unter Nifedipin 50µM blieb aus. Mit einer IC₅₀ im nanomolaren Bereich für L-Typ Calciumkanäle konnte ein Vorhandensein dieser Kanäle auf den untersuchten glatten Muskelzellen somit ausgeschlossen werden.

3.1.4.3 Verhalten des Einwärtsstroms glatter Muskelzellen unter variierender extrazellulärer Natriumkonzentration

Nachdem L-Typ Calciumkanäle als Vermittler des Einwärtsstroms ausgeschlossen werden konnten, rückten aufgrund der Stromkinetik Natrium- und nichtselektive Kationenkanäle in den Fokus der Fragestellung.

Die extrazelluläre Na⁺-Konzentration wurde variiert, indem Na⁺ teilweise oder vollständig durch NMDG ersetzt wurde. Diese Substanz liegt in wässriger Lösung als Kation vor, das aufgrund seiner Molekülgröße Ionenkanäle nicht passieren kann, was zur Bestimmung der Ionenselektivität des gefundenen Kanals eingesetzt wurde.

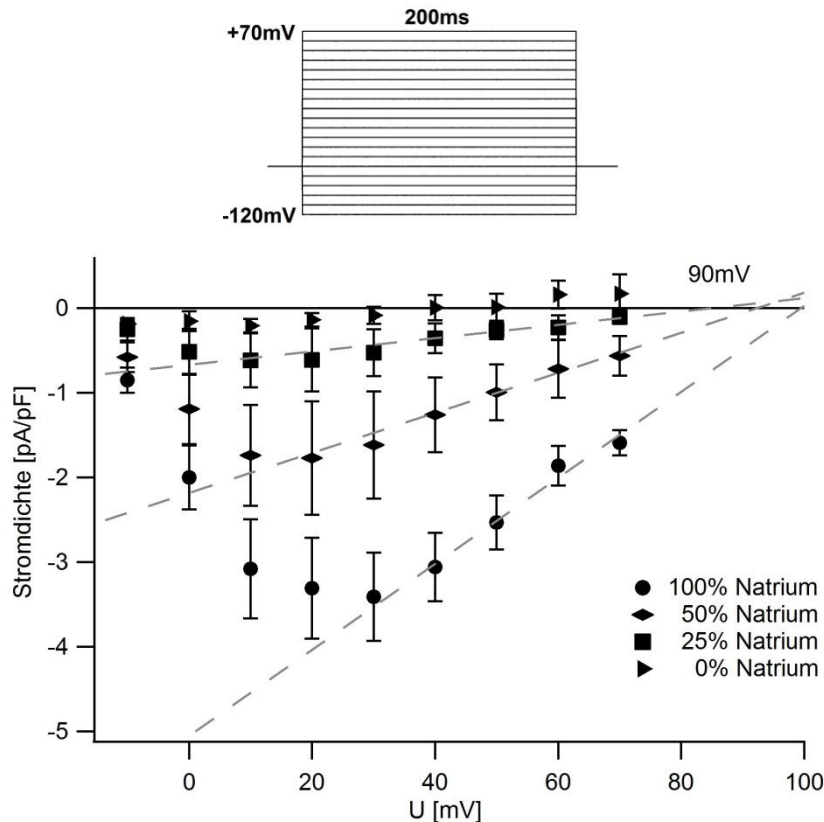


Abbildung 12: Verhalten des Einwärtsstroms unter Veränderung der extrazellulären Natriumkonzentration.

Abgebildet ist die Strom-Spannungskurve der Stromdichte gegen das Membranpotential, registriert mit dem Gesamtprotokoll. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM dar, $n=5$. Die unterste Kurve (●) stellt den Einwärtsstrom einer glatten Muskelzelle unter einer Natriumkonzentration dar, die der normalerweise verwendeten Extrazellulärlösung entspricht. Für die weiteren Kurven entsprach die Natriumkonzentration 50% (◆), 25% (■) und 0% (▶) der Ausgangskonzentration. Deutlich erkennbar ist die Reduktion der Stromamplitude mit sinkender Natriumkonzentration. Bei einem Natriumanteil von 0% kam es zum Ausstrom von intrazellulärem Na^+ . Es war damit bewiesen, dass der Strom über einen ionenselektiven Natriumkanal geleitet wurde. Die eingezeichneten Geraden bezeichnen an ihrem Schnittpunkt mit der x-Achse bei 0pA/pF das durch Extrapolation bestimmte Gleichgewichtspotential.

Aus der Abhängigkeit des beschriebenen Stroms von der extrazellulären Natriumkonzentration konnte abgeleitet werden, dass es sich um einen über Natriumkanäle vermittelten Strom handelte. Da bei einer Natriumkonzentration von 0mM kein Einwärtsstrom mehr registriert wurde, konnte von einem Natriumselektiven Kanal ausgegangen werden. Vielmehr wurde ab einer Depolarisation von $+40\text{mV}$ ein Ausstrom positiver Ionen, möglicherweise Na^+ , beobachtet. Das lässt sich mit Verschiebung des Gleichgewichtspotentials für Natrium erklären, die Triebkraft für den Natriumeinstrom wird mit sinkender extrazellulärer Natriumkonzentration geringer. Das Umkehrpotential wurde anhand der Nernst-

Gleichung (Kapitel 2.2.1.1) errechnet, durch Extrapolation wurden die experimentell bestimmten Werte aus der Grafik abgelesen.

Anteil an Natrium in der Extrazellulärlösung im Vergleich zur normalen Extrazellulärlösung	Gleichgewichtspotential E_{Na} aus Grafik ermittelt (mV)	Gleichgewichtspotential E_{Na} mit Nernst-Gleichung errechnet (mV)
100%	99,5	87,4
50%	92,4	69,6
25%	85,3	51,8
0%	40	-

Tabelle 18: Darstellung des extrapolierten und errechneten Gleichgewichtspotentials für Na^+ in Abhängigkeit der extrazellulären Na^+ -Konzentration

3.1.4.4 Verhalten des Natriumstroms glatter Muskelzellen unter TTX

In der Literatur finden sich keine Angaben zu spannungsabhängigen Natriumströme auf glatten Muskelzellen des Detrusors. Daher wurde der identifizierte Natriumstrom im Folgenden einer pharmakologischen Charakterisierung zur Identifikation seines Na_v -Subtyps unterzogen. Natriumkanäle können nach ihrer Empfindlichkeit gegenüber Tetrodotoxin (TTX), dem Neurotoxin des Kugelfischs, in TTX-sensitive und TTX-resistente Natriumkanäle eingeteilt werden. Erster Schritt bei der Untersuchung des gefundenen Natriumstroms war damit seine Inhibition mit verschiedenen TTX-Dosierungen. Mit den erhaltenen Daten wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt.

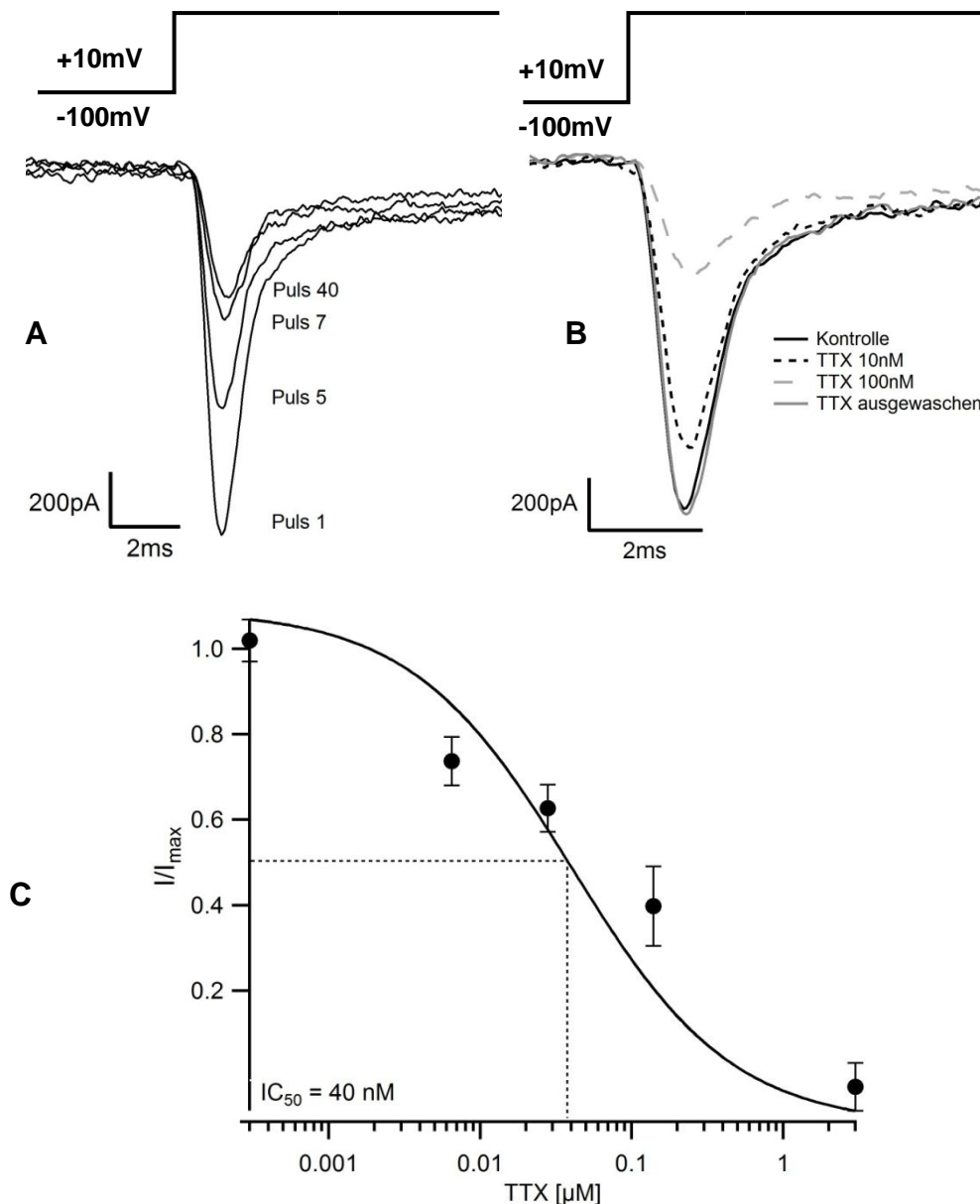


Abbildung 13: Inhibition des Natriumstroms glatter Muskelzellen durch TTX

A: Darstellung des Natriumstroms einer glatten Muskelzelle unter wiederholter Depolarisation auf +10mV gemäß dem Natriumprotokoll. Ab Puls 3 wurde eine Perfusion mit 100nM TTX installiert. Die Stromstärke nahm mit jedem Puls ab, was für einen Inhibitionsmechanismus spricht, der nur Kanäle im offenen Zustand angreift (*use dependent*).

B: Darstellung des Natriumstroms einer glatten Muskelzelle unter wiederholter Depolarisation auf +10mV gemäß dem Natriumprotokoll (schwarz). Durch Zugabe von TTX 10nM (schwarz gestrichelt) wurde der Strom teilweise inhibiert, eine stärkere Inhibition erfolgte unter TTX 100nM (grau gestrichelt), wodurch eine konzentrationsabhängige Inhibition bestätigt wurde. Nach dem Auswaschen (grau) war die Stromamplitude vergleichbar mit der Stromamplitude zu Beginn.

C: Dosis-Wirkungs-Kurve mit TTX. Die Stromamplitude unter TTX wurde auf die maximale Stromamplitude normalisiert (I/I_{max}) und gegen die TTX-Konzentration aufgetragen. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM dar. Pro Konzentration $n=5$, es wurden maximal zwei Konzentrationen pro Zelle appliziert. Die Kurve wurde, ausgehend von den Einzelwerten, anhand der Hill-Gleichung angeglichen. Die inhibitorische TTX-Konzentration, bei der noch 50% der Ausgangs-Stromamplitude vorhanden waren (IC_{50}), lag bei 40nM.

Der gefundene Natriumkanal zeigte eine dosis- und aktivierungsabhängige Inhibition durch TTX. Die durch die Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelte IC_{50} lag bei etwa 40nM, demnach handelte es sich um einen TTX-sensitiven Natriumkanal. Die TTX-resistenten Natriumkanäle $Na_v1.5$, $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$ mit einer IC_{50} im millimolaren Bereich konnten somit bereits ausgeschlossen werden.

3.1.4.5 Verhalten des Natriumstroms glatter Muskelzellen unter Ranolazin

Um den Na_v -Subtyp weiter eingrenzen zu können, erfolgte die Applikation von Ranolazin. Dieses in der Klinik bei therapieresistenter stabiler Angina pectoris verwendete Pharmakon inhibiert spezifisch Natriumkanäle vom Typ $Na_v1.4$, $Na_v1.5$, $Na_v1.7$ und $Na_v1.8$.

Durch Zugabe von Ranolazin 100 μ M konnte der Natriumstrom im Mittel auf 53% ($\pm 5,4\%$, $n=4$) des Ausgangswertes reduziert werden (*Abbildung 34*), was als Sensitivität gegenüber Ranolazin gewertet wurde. Bei dem gesuchten Natriumkanal musste es sich demnach entweder um $Na_v1.4$ oder $Na_v1.7$ handeln.

3.1.4.6 Verhalten des Natriumstroms glatter Muskelzellen unter ProToxin-II

Zur Differenzierung zwischen $Na_v1.4$ und $Na_v1.7$ wurde ProToxin-II, das Neurotoxin der peruanischen Tarantel, eingesetzt. Mit einer IC_{50} von 0,3nM besitzt diese Substanz eine hohe Selektivität für $Na_v1.7$. Die IC_{50} für $Na_v1.4$ liegt mit 39nM vergleichsweise hoch.

ProToxin-II wurde in den Konzentrationen von 2nM und 100nM verwendet.

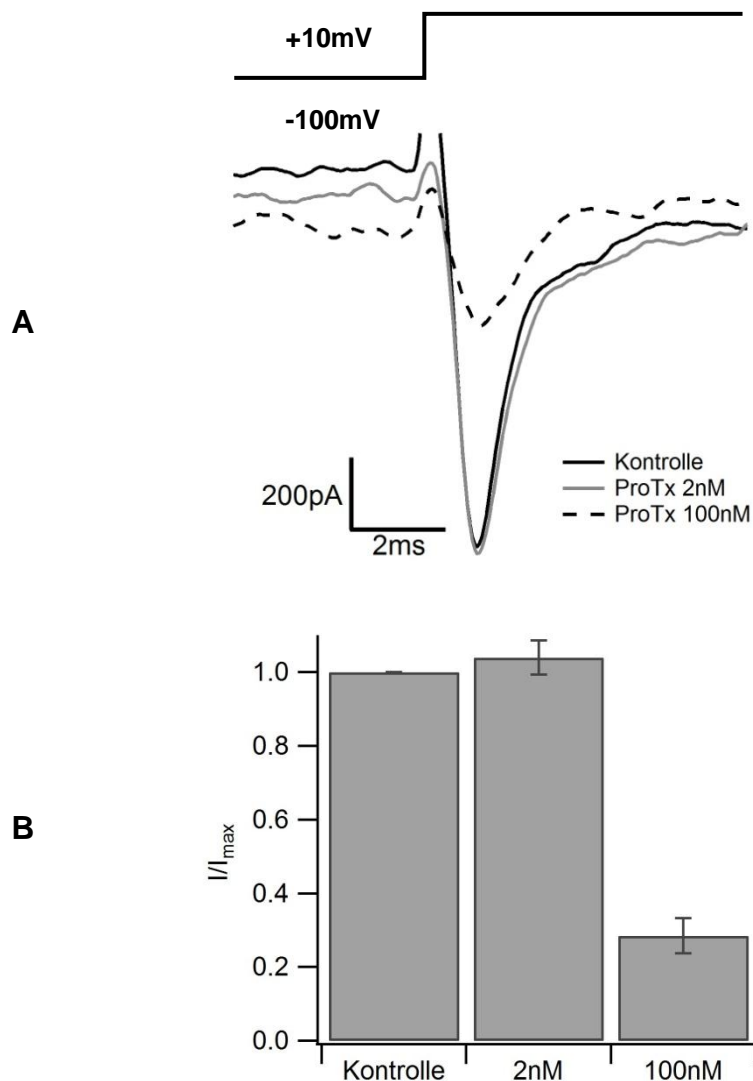


Abbildung 14: Inhibition von Natriumströmen glatter Muskelzellen durch ProToxin-II

A: Darstellung des Natriumstroms einer glatten Muskelzelle bei einem Potentialsprung von -100mV auf +10mV entsprechend dem Natriumprotokoll (schwarze Kurve). Unter Zugabe von ProToxin-II in einer Konzentration von 2nM (graue Kurve) veränderte sich die Stromamplitude nicht, unter Zugabe von 100nM ProToxin-II (gestrichelte Kurve) wurde der Strom partiell inhibiert.

B: Grafische Darstellung der Wirkung von ProToxin-II auf Natriumströme glatter Muskelzellen. Die Stromamplitude unter ProToxin-II wurde auf die maximale Stromamplitude normalisiert (I/I_{max}). Eine Dosis von 2nM inhibierte den Natriumstrom nicht, unter 100nM ProToxin-II verblieben noch 29% des Natriumstroms im Vergleich zum Ausgangswert. Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm SEM, n=4.

Eine ProToxin-II-Konzentration von 2nM zeigte keine Reduktion des Natriumstroms, mit einer Konzentration von 100nM ließ sich der Natriumstrom im Mittel auf 29% des Ausgangswertes reduzieren. Die geringe Reduktion des Stroms selbst bei hohen ProToxin-II-Konzentrationen schloss also Nav1.7 aus

und verstärkte die Hypothese, dass es sich bei dem Kanal um den Subtyp $\text{Na}_v1.4$ handelte.

3.1.4.7 Stromdichte und Häufigkeit von Natriumströmen glatter Muskelzellen über die Kulturdauer

Der prozentuale Anteil an SMC, bei denen Natriumströme detektiert werden konnten, blieb über die Kulturdauer mit 55% im Mittel relativ konstant. Im Vergleich war die Stromdichte der Natriumströme bei +20mV in der proliferativen Phase bis Passage 10 statistisch nicht signifikant verschieden zur gemessenen Natriumstromdichte in der Phase der Zellhyperplasie ab Passage 11 ($p=0,208$). Die Daten wurden daher zusammengefasst und die SMC im Weiteren bezüglich ihrer Natriumströme als homogene Population betrachtet.

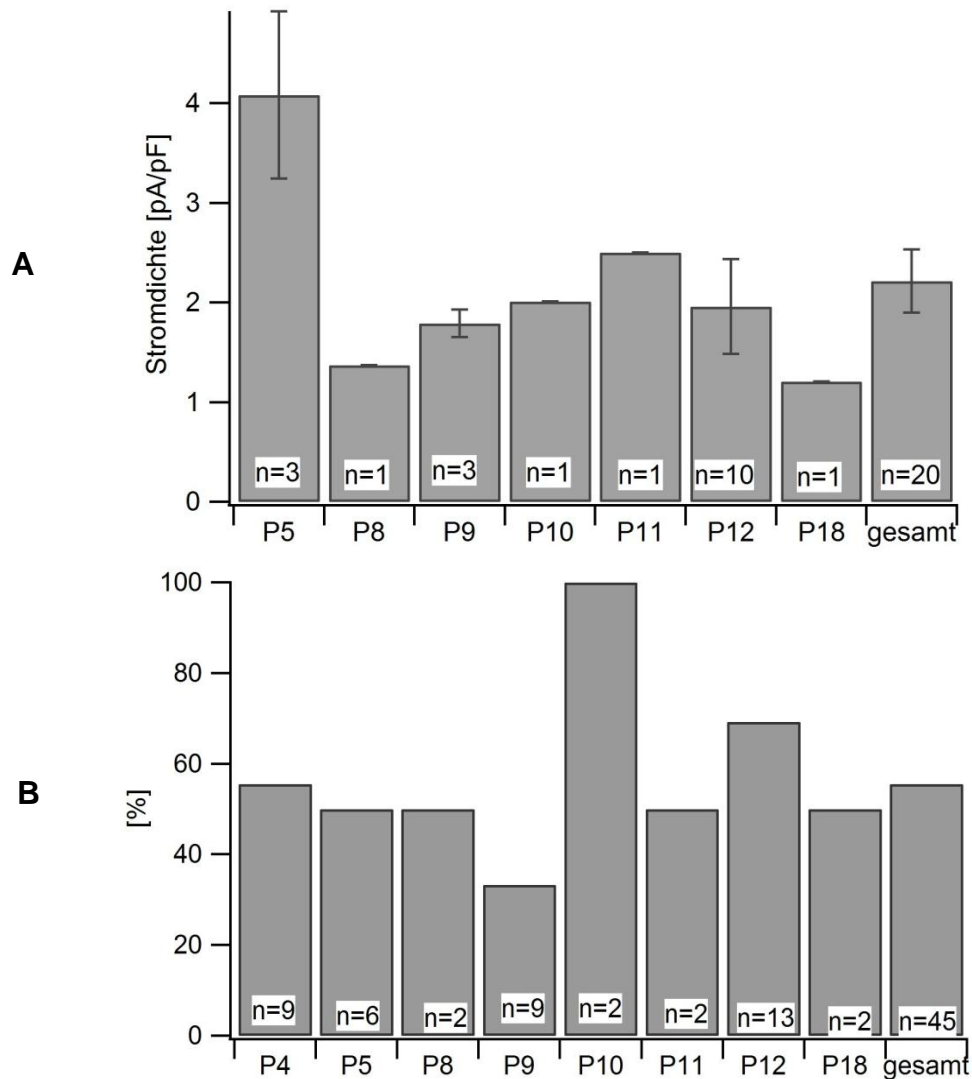


Abbildung 15: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen glatter Muskelzellen über die Kulturdauer

A: Darstellung der Stromdichte von Natriumströmen glatter Muskelzellen in Abhängigkeit von der Passage (P), die Werte entsprechen Mittelwerten bei +20mV \pm SEM. Zwischen den Einzelwerten von Passage 5 bis Passage 10 ergaben sich statistisch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Passage 11 bis 18, weshalb die Daten zusammengefasst wurden („gesamt“).

B: Darstellung des prozentualen Anteils an glatten Muskelzellen mit Natriumstrom über die Passagen (P). Der Anteil an Zellen mit Natriumstrom blieb über die Kulturdauer relativ konstant, weshalb die Daten zusammengefasst wurden. Es resultierte ein Anteil von Zellen mit Natriumstrom von 55%.

3.1.5 CALCIUMSTRÖME GLATTER MUSKELZELLEN

In allen Experimenten, die unter Inhibition von Kaliumströmen und einer extrazellulären Ba^{2+} -Konzentration von 10mM durchgeführt wurden (n=45), wurde lediglich bei einer Zelle ein Strommuster gefunden, das einem spannungsgesteuerten Calciumstrom entsprechen könnte.

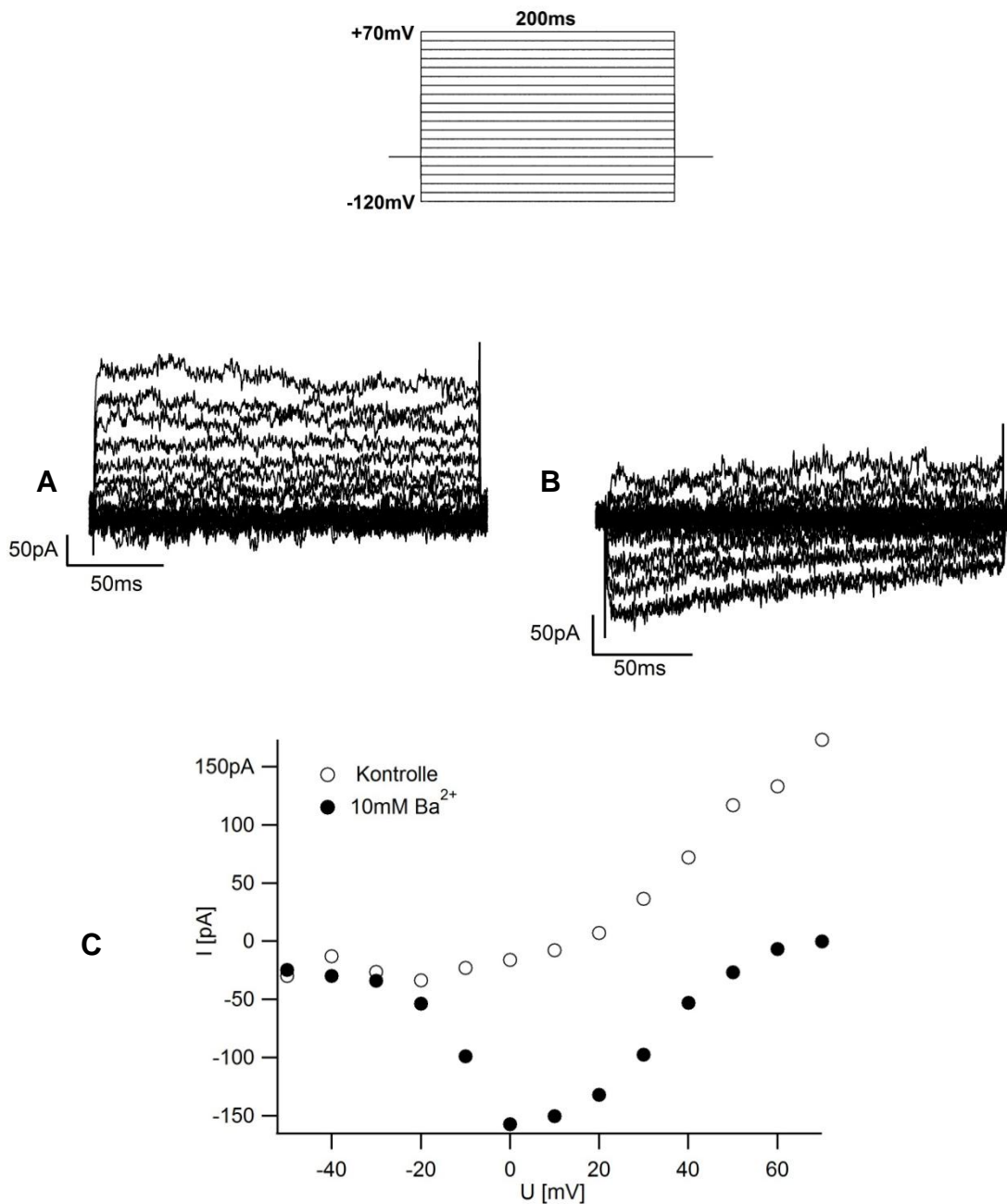


Abbildung 16: Möglicher Calciumstrom einer glatten Muskelzelle

A+B: Strom-Zeit-Kurve eines Stroms einer glatten Muskelzelle, registriert mit dem Gesamtprotokoll.

A wurde mit der Extrazellulärlösung zur Messung von Kaliumströmen registriert, **B** wurde unter der Extrazellulärlösung zur Messung von Natrium- und Calciumströmen, das bedeutet unter Zugabe von Ba²⁺ und TEA 10mM aufgezeichnet. Hierunter wurde der Kaliumstrom kleiner, es stellte sich ein Einwärtsstrom mit langsamer Inaktivierung dar.

C: Strom-Spannungs-Kurve des Stromminimums des Einwärtsstroms vor (○) und nach (●) Zugabe von Ba²⁺ 10mM. Deutlich wird eine Aktivierung des Stroms um -20mV mit einer maximalen Stromamplitude bei 0mV, ab +50mV war der Kanal nicht mehr aktivierbar.

Aufgrund seiner Kinetik mit einer Aktivierung um -20mV und einem maximalen Stromfluss um 0mV ähnelte der dargestellte Strom in der Literatur beschriebenen Calciumströmen. Hinzu kam eine Zunahme der Stromamplitude unter extrazellulärem Ba^{2+} . Aufgrund des geringen Vorkommens dieser Stromkomponente wurden keine weiteren Versuche zur Beschreibung dieses Kanaltyps durchgeführt.

3.2 MESENCHYMALE STAMMZELLEN

3.2.1 KULTUREIGENSCHAFTEN MESENCHYMALER STAMMZELLEN

Mesenchymale Stammzellen wurden von Passage 1 bis Passage 12, entsprechend 65 Tagen, kultiviert. Bis Passage 6 ließ sich eine extensive Proliferation mit einer Verdopplungszeit von 2-3 Tagen beobachten, danach ließ die Proliferation deutlich nach. Zwischen Passage 6 und 8 kam es mehrfach zu einem Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche, was als subtotales Absterben der Kultur interpretiert wurde. Die verbliebenen Zellen wurden weiter kultiviert, unterschieden sich aber in ihrer Morphologie von MSC in frühen Passagen durch Wachstum in Nestern und ungleichmäßige, gezackte Zellausläufer.

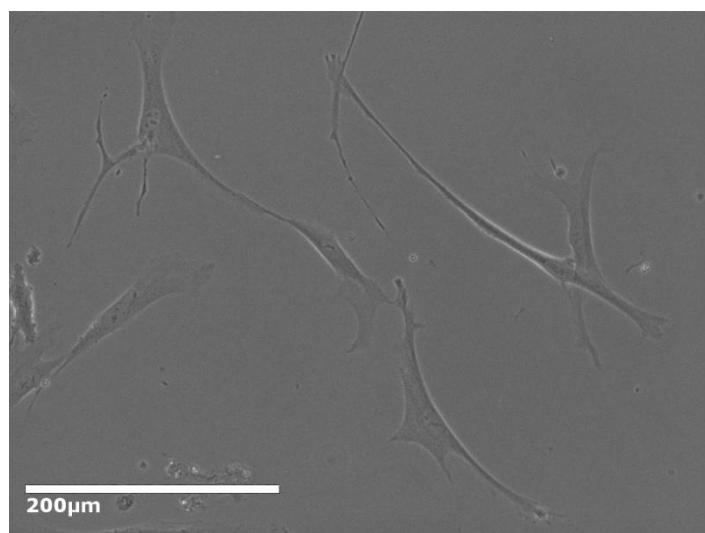


Abbildung 17: Zellkultur mesenchymaler Stammzellen.

Kultur von mesenchymalen Stammzellen in Passage 1 mit typischem spindelförmig-verzweigtem Wachstum

3.2.2 ALLGEMEINE ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN MESENCHYMALER STAMMZELLEN

MSC zeigten eine durchschnittliche Membrankapazität von 61,7pF ($\pm 2,4$ pF, n=351). Zwischen P2 und P7 blieb die Membrankapazität stabil um diesen Wert, in späteren Passagen sank sie im Schnitt auf 47,2pF ($\pm 6,9$ pF, n=25). Das entspricht einer Membranoberfläche von 6170 μm^2 bzw. 4720 μm^2 .

Das mit der Stromklemme bestimmte Membranpotential variierte stark, es wurden Werte zwischen -17mV und -73mV gemessen, das Mittel war bei $-38,2\text{mV}$ (n=6, gemessen in P2).

3.2.3 AUSWÄRTSSTRÖME MESENCHYMALER STAMMZELLEN

3.2.3.1 Stromverhalten mesenchymaler Stammzellen unter repetitiver Depolarisation

Da aufgrund der Vorarbeiten von Heubach et. al. [30] und Li et. al. [29] davon ausgegangen werden konnte, dass mehr als 90% der untersuchten MSC über Kaliumströme, die sich im Allgemeinen als Auswärtsströme darstellen, verfügten, wurde zunächst mit einer Untersuchung dieser Ströme begonnen. Um die allgemeine Stromstabilität zu untersuchen, wurde unter konstanten Versuchsbedingungen wiederholt ein Impuls von $+30\text{mV}$ angelegt und so das Verhalten der Stromamplitude unter repetitiver Reizung betrachtet. Es zeigte sich eine große Variabilität in der Amplitude der detektierten Auswärtsströme. Meist stieg die Stromstärke nach einer initial stabilen Phase mit wiederholter Reizung an, eine Voraussage über die Dauer der Stromstabilität oder den Anstieg der Stromamplitude im Verhältnis zum Ausgangswert konnte nicht getroffen werden.

Beispielhaft ist ein Experiment angeführt, bei dem sich die Stromamplitude einer Einzelzelle innerhalb von 40 Strompulsen von 100pA auf 500pA steigert und spontan wieder sinkt. Der Leckstrom kann als konstant betrachtet werden.

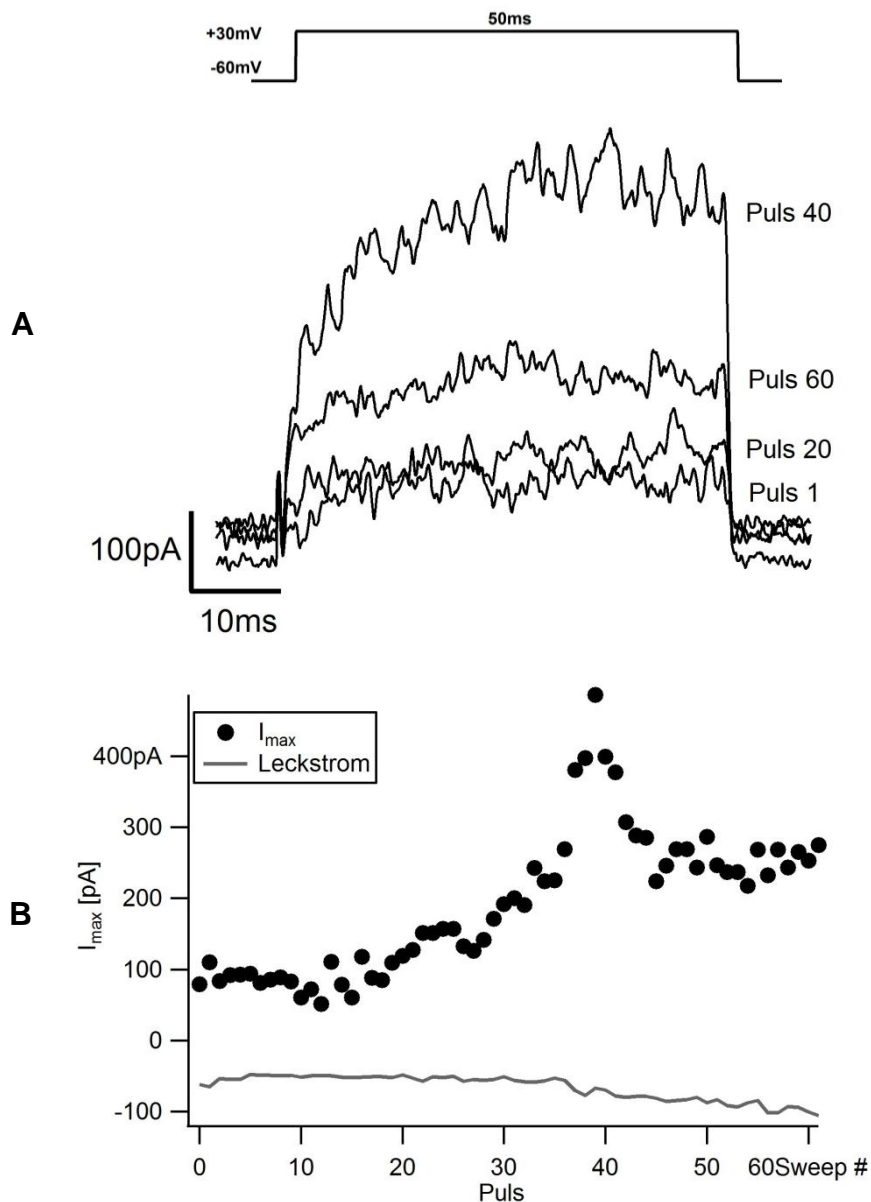


Abbildung 18: Stromantworten einer mesenchymalen Stammzelle auf repetitive Depolarisation

A: Darstellung der Strom-Zeit-Kurve verschiedener ausgewählter Stromantworten einer mesenchymalen Stammzelle auf einen alle 30s wiederholten Reiz von +30mV über 50ms gemäß dem Test 30mV-Protokoll. Die Versuchsbedingungen waren konstant. Puls 1 stellte die erste Stromantwort dar, die bei Puls 20 noch relativ konstant war, bei Puls 40 stieg die Stromamplitude deutlich an, um bei Puls 60 wieder zu sinken.

B: Das Strommaximum (I_{max}) jeder Stromkurve wurde ermittelt und in Abhängigkeit der Puls-Nummer (Sweep) aufgetragen. Der Leckstrom (graue Kurve) war mit -80pA bis -100pA nahezu konstant. Deutlich wird der spontane Anstieg der Stromamplitude auf das 5-fache des Ausgangswertes und anschließend das langsame Absinken und Einpendeln oberhalb des Ausgangswertes.

Dieses Phänomen wurde nur bei Auswärtsströmen beobachtet, andere untersuchte Ströme waren davon nicht betroffen.

Der Einsatz verschiedener Intrazellulärlösungen, perforierter Patch mit dem Perforans Beta-Aescin und die Installation einer kontinuierlichen Perfusion führte zu keiner Stabilisierung der Stromamplitude, was eine pharmakologische Untersuchung der Auswärtsströme nativer MSC unmöglich machte. Daher erfolgte eine rein deskriptive Charakterisierung der beobachteten Auswärtsstrommuster.

3.2.3.2 Schneller Auswärtsstrom I_{Ks} der mesenchymalen Stammzellen

Mithilfe des Gesamtprotokolls wurde auf einem Großteil der MSC ein spannungsabhängiger Auswärtsstrom identifiziert, der aufgrund seines Hauptmerkmals, der sehr schnellen Aktivierung, dem schnellen Kaliumstrom I_{Ks} ähnelte und im folgenden so bezeichnet wurde. Der Kanal aktivierte ab einem Membranpotential von etwa -20mV, über die Dauer der Membrandepolarisation kam es zu keiner Inaktivierung, jedoch nahm mit zunehmend positiverem Membranpotential das Rauschen stark zu.

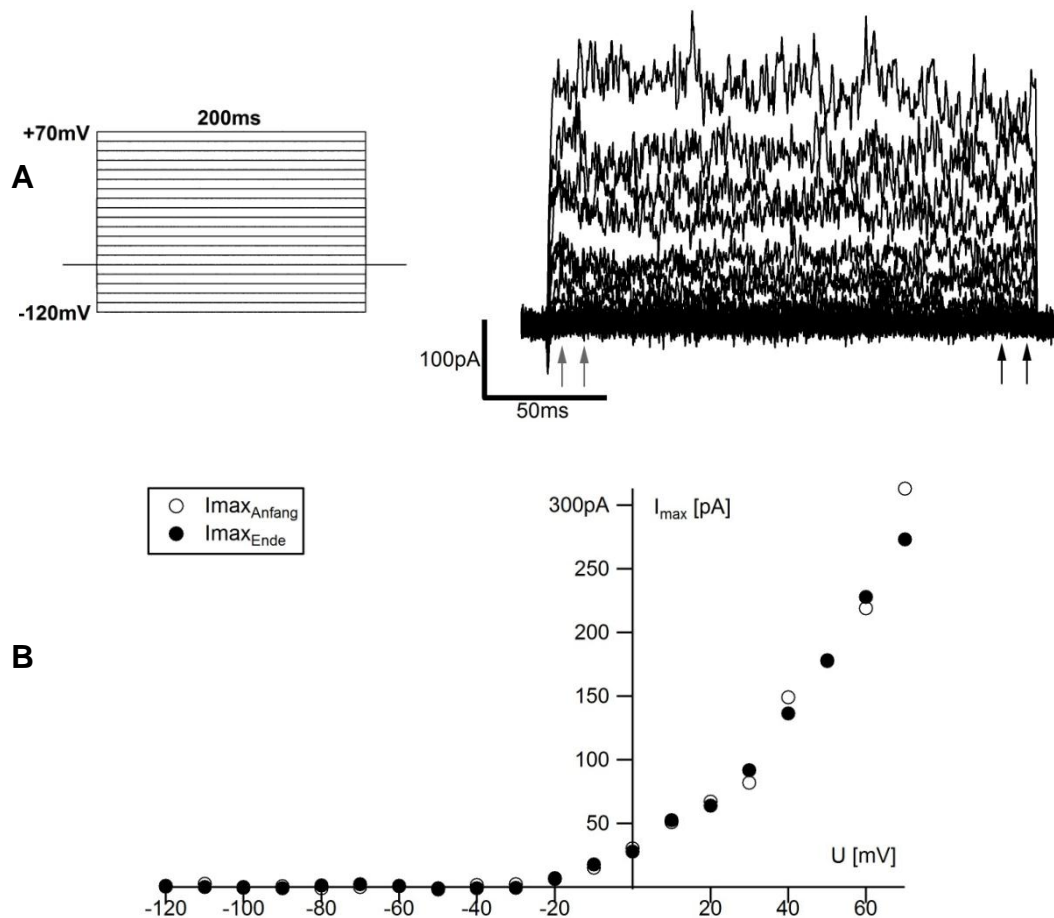


Abbildung 19: Schneller Auswärtsstrom I_{Ks} einer mesenchymalen Stammzelle

A: Strom-Zeit-Kurve eines schnell aktivierenden Auswärtsstroms einer mesenchymalen Stammzelle in Passage 2, registriert mit dem Gesamtprotokoll. Auffallend war das zunehmende Rauschen der Stromspur bei steigender Depolarisation.

B: Strom-Spannungs-Kurve des schnellen Auswärtsstroms I_{Ks} . Es wurden jeweils die Mittelwerte der durch die Pfeile in **A** definierten Abschnitte zu Beginn ($I_{max_{Anfang}}$, \circ) und Ende ($I_{max_{Ende}}$, \bullet) jedes Pulses gegen das Membranpotential aufgetragen. Aus den beiden fast deckungsgleichen Kurven ging hervor, dass das Strommittel zu Beginn und Ende jedes Strompulses praktisch gleich groß war, damit lag ein spannungsabhängig schnell aktivierender, nicht inaktivierender Strom vor.

3.2.3.3 Langsamer Auswärtsstrom I_{Kl} der mesenchymalen Stammzellen

Ein kleinerer Teil der Zellen wies einen verzögert aktivierenden, spannungsgesteuerten Auswärtsstrom auf, der ab einem Potential von -10 mV aktivierte und ebenfalls nicht inaktivierte. Dieser ähnelte dem langsamen Kaliumstrom I_{Kl} , weshalb er im Weiteren so bezeichnet wurde.

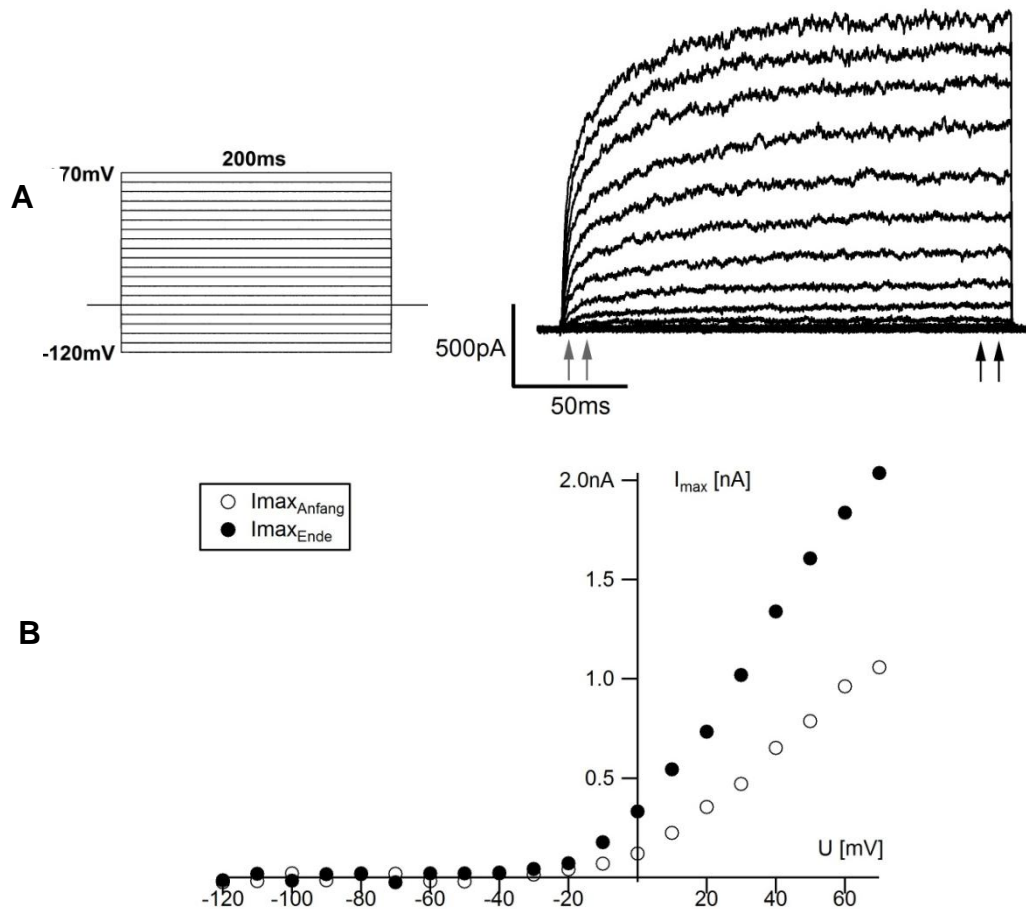


Abbildung 20: Langsamer Auswärtsstrom I_{Kl} einer mesenchymalen Stammzelle

A: Strom-Zeit-Kurve eines langsam aktivierenden Auswärtsstroms I_{Kl} einer mesenchymalen Stammzelle in Passage 2, registriert mit dem Gesamtprotokoll. Der Strom aktivierte verzögert und inaktivierte nicht.

B: Strom-Spannungs-Kurve des langsamen Auswärtsstroms I_{Kl} . Es wurden jeweils die Maxima der durch die Pfeile in **A** definierten Abschnitte zu Beginn ($I_{\max_{\text{Anfang}}}$, ○) und Ende ($I_{\max_{\text{Ende}}}$, ●) jedes Pulses gegen das Membranpotential aufgetragen. Der Strom aktivierte spannungsabhängig ab -10mV, das Strommaximum zu Beginn der Kurve lag unter dem Maximum am Ende der Kurve, was für eine verzögerte Aktivierung sprach.

3.2.3.4 Überschießender Auswärtsstrom I_{Ku} der mesenchymalen Stammzellen

Mit zunehmender Kulturdauer wurde wiederholt ein spannungsaktivierter Auswärtsstrom beobachtet, der durch seine Kinetik mit einer schnellen Aktivierung, gefolgt von einer partiellen Inaktivierung imponierte. Dieser Auswärtsstrom ähnelte dem überschießenden Kaliumstrom I_{Ku} und wurde infolge so bezeichnet. Er setzte sich aus zwei Komponenten zusammen. Bis zu einem Membranpotential von +10mV wurde lediglich ein schnell aktivierender, nicht inaktivierender Auswärtsstrom, ähnlich I_{Ks} , registriert. Ab einer

Depolarisation von +20mV trat eine transiente Komponente hinzu, die ihr Strommaximum nach 10ms erreichte. Die überschießende Komponente erfuhr auch bei größerer Depolarisation keine Sättigung, während die konstante Komponente ab einem Potential von +60mV eher rückläufig war.

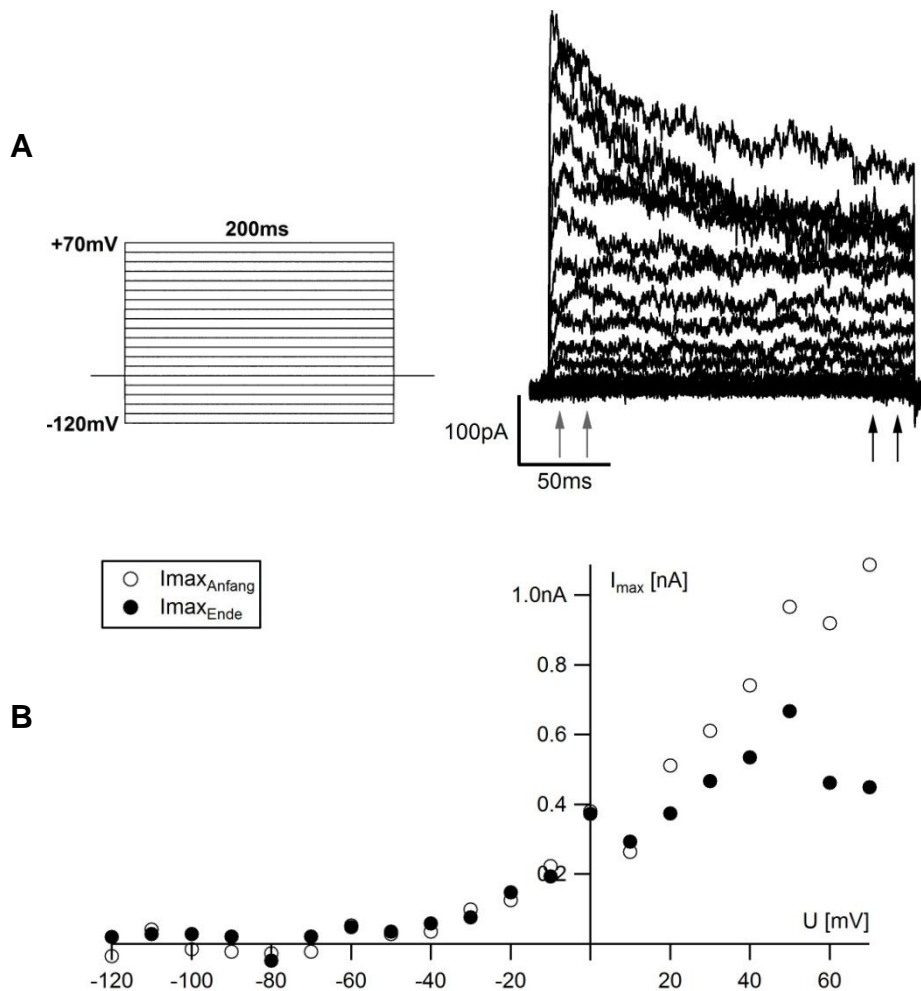


Abbildung 21: Überschießender Auswärtsstrom I_{Ku} einer mesenchymalen Stammzelle

A: Strom-Zeit-Kurve eines schnell aktivierenden, transienten Auswärtsstroms I_{Ku} einer mesenchymalen Stammzelle in Passage 2, registriert mit dem Gesamtprotokoll. Der Strom aktivierte schnell und überschießend, bevor er sich auf einem Plateau einpendelte.

B: Strom-Spannungs-Kurve des überschießenden Auswärtsstroms I_{Ku} . Es wurden jeweils die Maxima der durch die Pfeile in **A** definierten Abschnitte zu Beginn (I_{max_Anfang} , \circ) und Ende (I_{max_Ende} , \bullet) jedes Pulses gegen das Membranpotential aufgetragen. Der Strom setzte sich aus einer schnell aktivierenden spannungsgesteuerten Komponente ähnlich I_{Ks} zusammen, zu der ab Membranpotentialen positiv von +10mV eine transiente überschießende Komponente I_{Ku} hinzutrat.

3.2.3.5 Grafischer Vergleich der Auswärtsströme I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} mesenchymaler Stammzellen

Die beschriebenen Profile für Auswärtsströme unterschieden sich maßgeblich im Verhältnis der Stromamplituden zu Beginn und Ende ihrer Stromspur. Um diese Unterschiede zu verdeutlichen, wurde aus den bereits ermittelten Strommaxima zu Beginn und Ende jeder Stromkurve ein Quotient gebildet ($I_{\max_{\text{Ende}}}/I_{\max_{\text{Anfang}}}$). Die Werte bei maximaler Membrandepolarisation von +70mV wurden gemittelt und in Form eines Balkendiagramms aufgetragen.

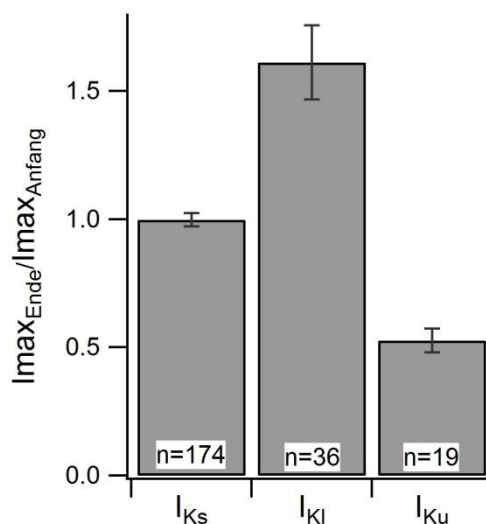


Abbildung 22: Grafischer Vergleich der Auswärtsstrommuster I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} mesenchymaler Stammzellen

Dargestellt ist der Quotient des Strommaximums am Ende und Anfang jeder Kurve bei +70mV ($I_{\max_{\text{Ende}}}/I_{\max_{\text{Anfang}}}$) gemittelt für alle gemessenen mesenchymalen Stammzellen \pm SEM. Den Messungen liegen keine P/n-Protokolle zugrunde. Der Quotient von 1 für schnelle Auswärtsströme (I_{Ks}) drückt gleiche Stromamplituden zu Beginn und Ende jeder Depolarisation, entsprechend einer schnellen Aktivierung ohne anschließende Inaktivierung, aus. Bei langsamen Auswärtsströmen (I_{Kl}) war der Strom zum Ende des Pulses etwa 1/3 größer als zu Beginn, entsprechend betrug der Quotient 1,5. Für die als überschießend bezeichneten Auswärtsströme (I_{Ku}) verhielt es sich genau umgekehrt, der Quotient lag um 0,5.

3.2.3.6 Verteilung der Auswärtsstrommuster I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} mesenchymaler Stammzellen über die Kulturdauer

MSC wurden für maximal 65 Tage kultiviert, in jeder Passage erfolgten Messungen zur Bestimmung des Auswärtsstromprofils. Bereits während den Messungen fiel eine Zunahme des transienten Auswärtsstroms I_{Ku} , welcher zu

frühen Passagen praktisch nicht beobachtet wurde, auf. Dies wurde insbesondere im Zusammenhang mit dem großflächigen Ablösen der Zellen in Kultur und der damit einhergehenden Veränderung der morphologischen Eigenschaften der MSC beobachtet. Die Veränderungen in der Häufigkeit der ermittelten Auswärtsströme über die Kulturdauer wurden grafisch aufgearbeitet, wobei sich ein relativ konstanter Anteil des schnellen Auswärtsstroms I_{KS} darstellte mit einer über die Kulturdauer zu beobachtenden Abnahme des langsamen Auswärtsstroms I_{KI} zugunsten des transienten Auswärtsstroms I_{Ku} .

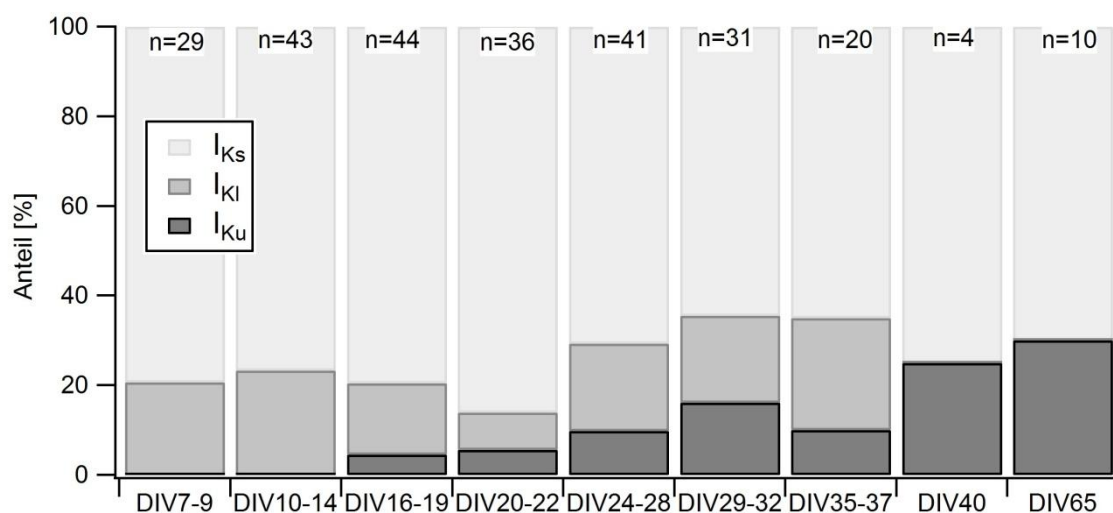


Abbildung 23: Prozentualer Anteil der Auswärtsströme I_{KS} , I_{KI} und I_{Ku} mesenchymaler Stammzellen über die Kulturdauer.

Die prozentualen Anteile an Zellen mit schnellen (I_{KS}), langsamen (I_{KI}) und überschießenden (I_{Ku}) Auswärtsströmen an der Gesamtpopulation mesenchymaler Stammzellen zu verschiedenen Kulturzeitpunkten wurden bestimmt und nach Kulturtagen (DIV = *days in vitro*) zusammengefasst dargestellt. Während der Anteil des schnellen Auswärtsstroms I_{KS} über die gesamte Kulturdauer relativ konstant blieb, wurde der zu Beginn der Kultur häufig registrierte langsame Auswärtsstrom I_{KI} zunehmend durch den überschießenden Auswärtsstrom I_{Ku} abgelöst.

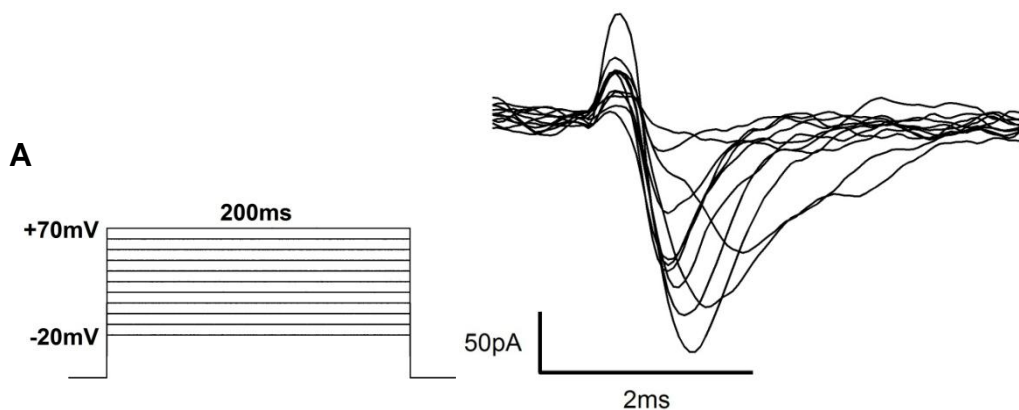
3.2.4 NATRIUMSTRÖME MESENCHYMALER STAMMZELLEN

3.2.4.1 Identifikation eines Einwärtsstroms mesenchymaler Stammzellen

Zunächst konnten auf den MSC nur Auswärtsströme nachgewiesen werden. Erst mit der Durchführung von Messungen mit Intra- und Extrazellulärlösungen, die zur Messung von Natrium- und Calciumströmen optimiert waren, wurden kleinere spannungsabhängige Einwärtsströme demaskiert.

Für die gezielte Suche nach den teilweise sehr kleinen Einwärtsströmen wurden nur MSC in Passage 2, entsprechend einer Kulturdauer von 7-9 Tagen, verwendet. Hintergrund war der Beginn der myogenen Differenzierung in Passage 2, vor dem die nativen MSC ausführlich charakterisiert werden sollten, um Veränderungen über die Differenzierungsdauer registrieren und deuten zu können.

Es konnte wiederholt ein Einwärtsstrom aufgezeichnet werden, der ab einer Depolarisation von -20mV aktiviert und sein Strommaximum um +10mV erreichte. Ein geringer Stromfluss konnte bis +70mV registriert werden. Bei Depolarisation aktivierte der Einwärtsstrom schnell und zeigte ein Strommaximum bereits nach 1ms, bevor er nach 2-3ms inaktivierte.



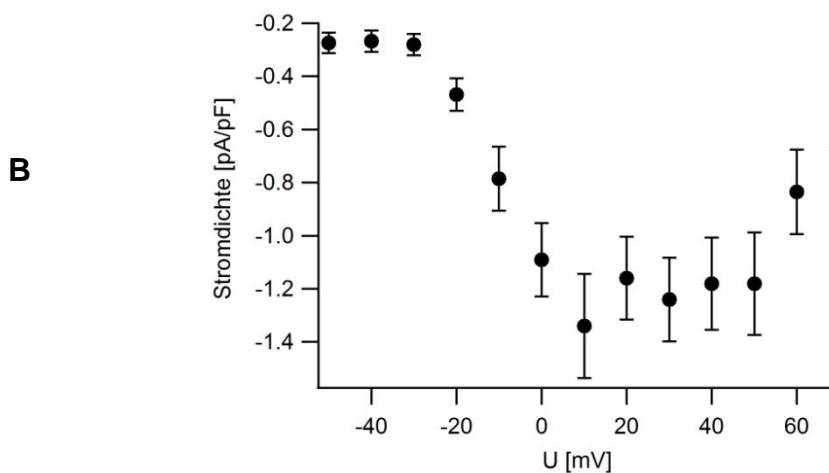


Abbildung 24: Einwärtsströme mesenchymaler Stammzellen.

A: Strom-Zeit-Kurve eines Einwärtsstroms einer mesenchymalen Stammzelle in Passage 2, registriert mit einer reduzierten Form des Gesamtprotokolls mit Stufen von -20mV bis +70mV.

B: Strom-Spannungskurve der Stromdichte des Einwärtsstroms mesenchymaler Stammzellen in Passage 2 gegen das Membranpotential. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM dar, n=19. Der spannungsabhängige Einwärtsstrom aktivierte ab einem Membranpotential von -20mV, erreichte sein Strommaximum bei +10mV und war bei einer Depolarisation auf +70mV noch nicht vollständig inaktiviert.

3.2.4.2 Verhalten des Einwärtsstroms mesenchymaler Stammzellen unter Ranolazin

Aufgrund seiner typischen Kinetik wurde von einem spannungsabhängigen Natriumkanal ausgegangen, wie er in der Literatur auf MSC beschrieben ist. Zur Bestätigung erfolgte die spezifische Inhibition mit 100 μ M Ranolazin. Hierunter wurde eine Reduktion der Stromamplitude auf 70% (\pm 1,96%, n=3) des Ausgangswertes erreicht, was bedeutete, dass der gefundene Strom zumindest teilweise über spannungsabhängige Natriumkanäle vermittelt wurde.

3.2.4.3 Häufigkeit von Natriumströmen mesenchymaler Stammzellen in Passage 2

Der prozentuale Anteil an Zellen mit Natriumstrom in Passage 2 schwankte stark zwischen den MSC-Populationen verschiedener Spender und erstreckte sich von 0% bis 57%, im Schnitt wiesen 42% der in P2 gemessenen Zellen einen Natriumstrom auf (n=48). Die mittlere Zellkapazität von Zellen mit Natriumstrom betrug mit 88,4pF (\pm 14,2pF, n=41) deutlich mehr als die normalerweise in P2 gemessenen 66,7pF (\pm 6,2pF, n=104), was bedeutete, dass größere Zellen häufiger einen Natriumstrom besaßen. Es ließ sich kein

Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines Natriumstroms und dem Strommuster der registrierten Auswärtsströme erkennen.

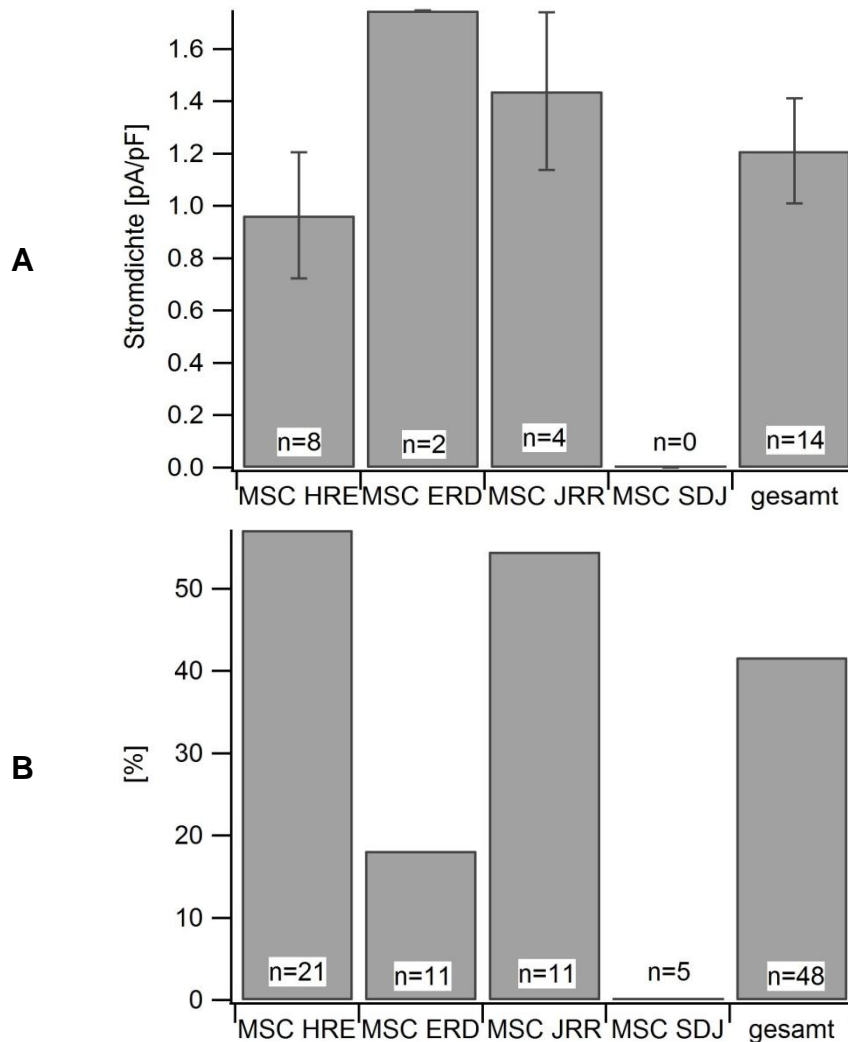


Abbildung 25: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen mesenchymaler Stammzellen in Passage 2 bei Zelllinien verschiedener Spender

A: Darstellung der Stromdichte von Natriumströmen mesenchymaler Stammzellen in Passage 2 von verschiedenen Spendern. Die Werte entsprechen Mittelwerten bei +20mV \pm SEM. Wegen nicht aussagekräftiger Einzelwerte wurden alle Werte unter „gesamt“ zusammengefasst.

B: Darstellung des prozentualen Anteils an mesenchymalen Stammzellen verschiedener Spendern mit Natriumstrom. Der prozentuale Anteil an Zellen mit Natriumstrom schwankte zwischen 0% (MSC SDJ) und 57% (MSC HRE), er lag im Mittel („gesamt“) bei 42%.

Anmerkung: Die Differenzen in der Anzahl der gesamt gemessenen Zellen resultieren aus dem Einsatz verschiedener Messlösungen. Lösungen ohne Kaliumkanalinhibitoren ließen eine Aussage über den Kaliumkanaltyp und das Vorhandensein eines Natriumstroms zu. Um Messungen an Natriumkanälen zu vereinheitlichen, wurde die Größe von Natriumströmen nur unter Inhibition von Kaliumströmen bestimmt, woraus eine geringere Anzahl gemessener Zellen resultierte.

3.2.5 CALCIUMSTRÖME MESENCHYMALER STAMMZELLEN

Neben den rasch inaktivierenden Natriumströmen wurden ab einem Membranpotential von -30mV bei einem kleinen Teil der Zellen schnell aktivierende, jedoch nur langsam inaktivierende Ströme registriert. Sie wurden erst unter Blockade der Auswärtsströme sichtbar, weshalb sie ebenfalls unter Verwendung von Extra- und Intrazellulärlösungen, die zur Messung von Natrium- und Calciumströmen optimiert war, untersucht wurden.

Diese spannungsabhängigen Kanäle aktivierten ab einem Membranpotential von -30mV , erreichten ein Strommaximum bei $+10\text{mV}$ und waren ab einer Depolarisation von $+50\text{mV}$ nicht mehr aktivierbar. Sie erreichten ihren maximalen Stromfluss innerhalb der ersten 5ms nach Depolarisation und inaktivierten während der Dauer der Depolarisation von 200ms langsam, jedoch nicht vollständig.

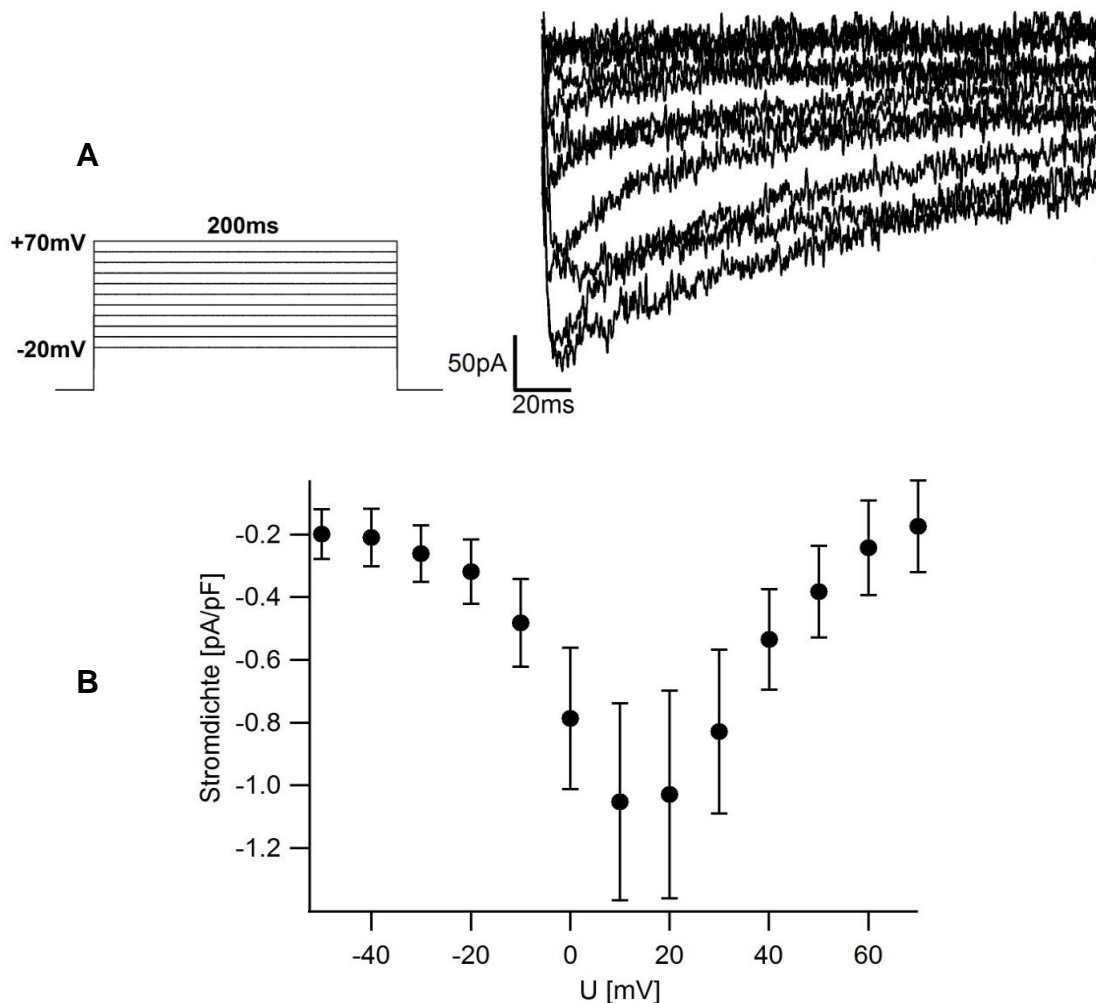


Abbildung 26: Weiterer Einwärtsstrom einer mesenchymalen Stammzellen

A: Strom-Zeit-Kurve eines weiteren Einwärtsstroms einer mesenchymalen Stammzelle in Passage 2, registriert mit dem Gesamtprotokoll. Deutlich werden die schnelle Aktivierung und der über die Dauer der Depolarisation nur langsam abnehmende Stromfluss. Der Übersichtlichkeit halber wurden nur die Stromspuren von -20mV bis +70mV dargestellt.

B: Strom-Spannungs-Kurve der Stromdichte des registrierten Einwärtsstroms mesenchymaler Stammzellen in Passage 2, aufgetragen gegen das Membranpotential. Die Werte stellen Mittelwerte bei +10mV \pm SEM dar, n=5. Der Strom aktivierte ab einer Spannung von -30mV, erreichte sein Maximum bei +10mV und waren ab einer Depolarisation über +50mV nicht mehr aktivierbar.

Typische Kinetik, Zunahme der Stromamplitude unter Zugabe von Ba²⁺ zur Extrazellulärlösung, sowie die Übereinstimmung mit Literaturangaben legten nahe, dass es sich um einen Calciumstrom handelte.

Mit Zugabe von 200 μ M Cd²⁺, einem Calciumkanalinhibitor, ließ sich der dargestellte Strom fast vollständig inhibieren. Der beschriebene Strom wurde demnach über Calciumkanäle vermittelt.

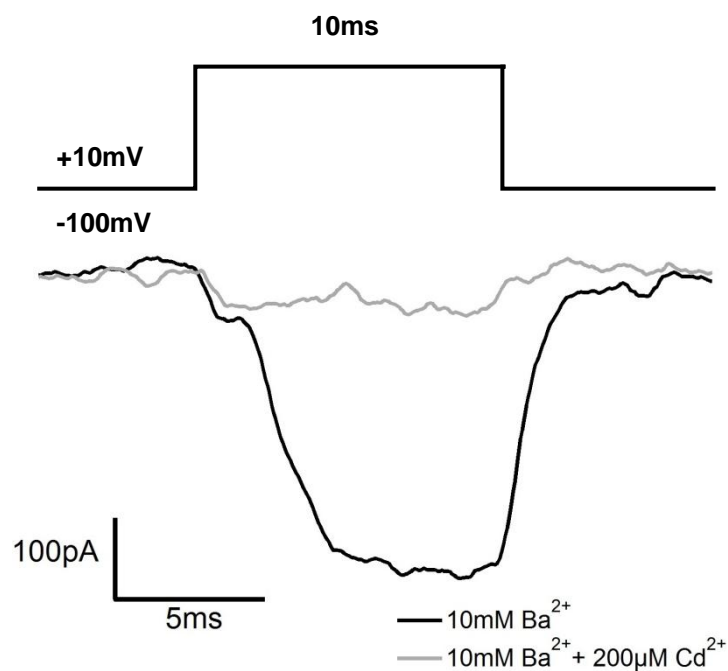


Abbildung 27: Inhibition eines Calciumstroms auf einer mesenchymalen Stammzelle durch 200 μ M Cd²⁺.

Unter einem Potentialsprung von -100mV auf +10mV wird bei einer mesenchymalen Stammzelle in Passage 2 ein Calciumstrom sichtbar (schwarze Kurve). Unter Zugabe von Cd²⁺ 200 μ M (graue Kurve) wurde der Strom fast vollständig inhibiert, was für einen über Calciumkanäle vermittelten Strom sprach.

Calciumströme konnten nur auf sehr großen Zellen nachgewiesen werden. Die mittlere Membrankapazität der Zellen mit Calciumstrom lag bei 228pF ($\pm 78,9$ pF, n=5). Von den regulär in Passage 2 gemessenen MSC besaßen 6% der Zellen einen Calciumstrom (n=33).

Zur Untersuchung von Calciumkanälen wurden aus einer großen Anzahl an MSC gezielt Zellen mit einer Membrankapazität über 250pF ausgewählt. Da versucht wurde, einen möglichst repräsentativen Anteil der Zellpopulation darzustellen und das durch gezielte Wahl hochkapazitiver Zellen nicht gewährleistet wurde, wurden diese Zellen (n=3) nicht in der Statistik über die Häufigkeiten von Calciumströmen berücksichtigt.

3.3 MYOGEN DIFFERENZIERENDE MESENCHYMALE STAMMZELLEN IM VERGLEICH ZU NATIVEN MESENCHYMALEN STAMMZELLEN UND GLATTEN MUSKELZELLEN

3.3.1 KULTUREIGENSCHAFTEN MESENCHYMALER STAMMZELLEN IN MYOGENER DIFFERENZIERUNG

Die in Passage 2 ausgesäten Zellen wurden zunächst mit Kulturmedium kultiviert. Mit Erreichen einer Konfluenz von 60% wurde auf Differenzierungsmedium gewechselt, um die Induktion einer glattmuskulären Differenzierung durch die dem Medium zugesetzten Wachstumsfaktoren zu erreichen. Unter dem Differenzierungsmedium wurde eine weitere Proliferation der Zellen beobachtet, wobei bereits an Tag 7 eine subtotale Konfluenz der spindelförmigen Zellen mit pallisadenartiger Ausrichtung verzeichnet wurde und sich bis zum Tag 10 ein dichter Zellrasen gebildet hatte, der die Beurteilung von Einzelzellen unmöglich machte.

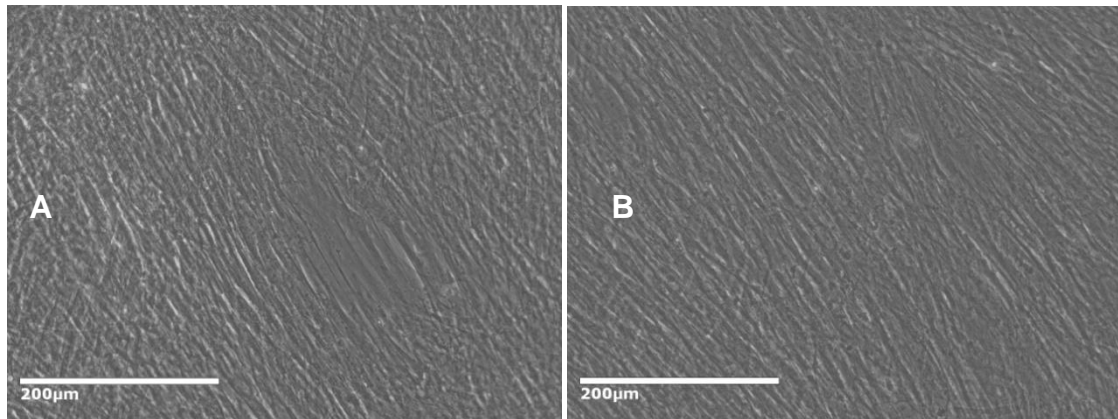


Abbildung 28: Zellkultur mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung

A: Zellkultur an Differenzierungstag 7. Die Zellen waren subkonfluent mit pallisadenartiger Anordnung.
B: Zellkultur an Differenzierungstag 14. Mit Bildung eines dichten Zellrasens war die Beurteilung von Einzelzellen unmöglich.

3.3.2 BESONDERHEITEN VON PATCH-CLAMP-MESSUNGEN AN IN DIFFERENZIERUNG BEFINDLICHEN MSC

3.3.2.1 Festlegung der Messtage und Erläuterungen zu abweichenden Zellzahlen

Mit der Durchführung von Patch-Clamp-Messungen an den Differenzierungstagen 7 (d7) und 14 (d14), analog zu den Versuchstagen der angeschlossenen Arbeitsgruppen, wurden Vergleiche des Differenzierungsfortschritts auf biochemischer und elektrophysiologischer Ebene möglich. Von den fünf in die Differenzierung eingehenden Zelllinien wurde ein Großteil zusätzlich am Differenzierungstag 0 gemessen, sie entsprechen nativen mesenchymalen Stammzellen in Passage 2. Diese als Referenz dienenden Zellen wurden bereits in *Kapitel 3.2 Mesenchymale Stammzellen* beschrieben. Ein geringerer Teil der Zellen wurde zusätzlich an Tag 21 (d21) Patch-Clamp-Messungen unterzogen.

Da einerseits das Stromprofil der Auswärtsströme, andererseits die Größe von Natriumströmen untersucht wurde, mussten verschiedene Lösungen eingesetzt werden. Bei Betrachtung der Auswärtsströme konnte eine Aussage über das gleichzeitige Auftreten von Natriumströmen getroffen werden, jedoch nicht über die Stromgröße von Natriumströmen, da diese durch Überlagerung durch Auswärtsströme nicht zuverlässig ermittelt werden konnte. Aussagen über die

Stromgröße von Natriumströmen wurden nur unter Kaliumkanal-Inhibition getroffen, weshalb die gemessenen Zellzahlen hier geringer ausfallen.

3.3.2.2 Einfluss von Wachstumseigenschaften auf die Patch-Clamp-Messungen

Mit Dauer der Differenzierung bereitete das Ablösen der adhären Zellen vor den Messungen zunehmende Probleme. Zunächst musste die Inkubationszeit mit Detachin von 2 min auf 6 min erhöht werden, wodurch die Vitalität der Zellen herabgesetzt und die Integrität der Zellmembran sichtlich beeinflusst wurde. Oft löste sich der Zellrasen in seiner Gesamtheit ab und die Zellen konnten auch unter Einsatz einer Pipette nicht vereinzelt werden, wodurch Einzelzellmessungen unmöglich wurden.

Ein weiteres Problem war das häufig beobachtete spontane Ablösen des Zellrasens mit Bildung dichter Zellpellets am Rande der Kulturschale, was insbesondere Messungen an den Differenzierungstagen 14 und 21 erheblich erschwerte. Der Boden der Kulturschale wurde von teilweise sehr großen Einzelzellen neu besiedelt, deren Differenzierungszustand unklar war. Diese Zellen gingen teilweise in die Messungen mit ein.

3.3.3 VERGLEICH DER ALLGEMEINEN ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN

Bezüglich ihrer Membrankapazität unterschieden sich native MSC, SMC bis Kulturtag 30 und in Differenzierung befindliche MSC unabhängig vom Differenzierungstag nur gering. Deutlich hervor hoben sich SMC nach Kulturtag 30, deren Membrankapazität fast doppelt so groß war im Vergleich zu den anderen Zellpopulationen.

Das Ruhemembranpotential undifferenzierter MSC lag im Mittel bei -38,5mV, im Verlauf der Differenzierung wurde eine statistisch nicht signifikante Hyperpolarisation auf im Mittel -51mV an d7 und -44mV an d14 beobachtet. Das Ruhemembranpotential von SMC war mit -22mV jedoch statistisch signifikant geringer als das von MSC in myogener Differenzierung an d7 und d14. Eine Messung an d21 erfolgte nicht.

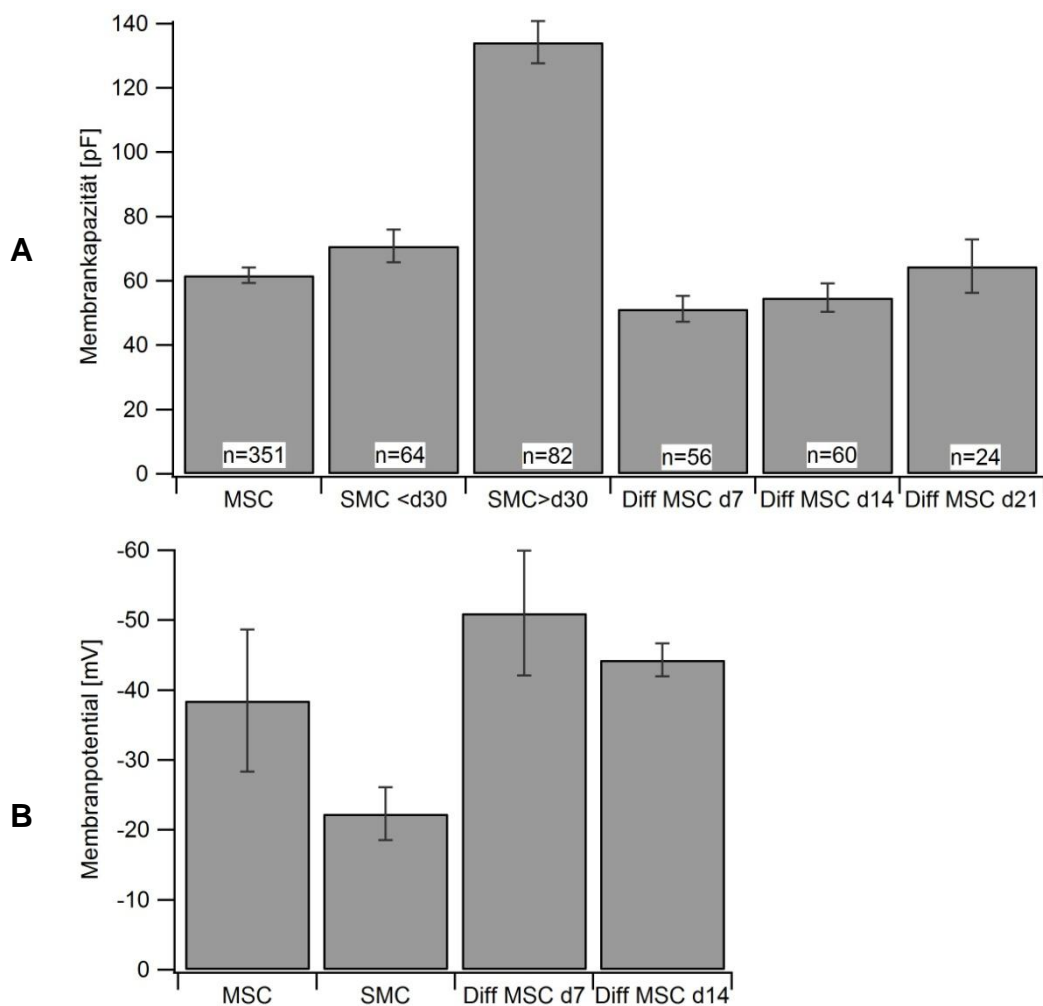


Abbildung 29: Vergleich der Membrankapazitäten und des Ruhemembranpotentials

A: Vergleich der Membrankapazitäten nativer mesenchymaler Stammzellen (MSC), glatter Muskelzellen (SMC) vor und nach Kulturtag 30 und mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung an Differenzierungstag 7, 14 und 21 (Dif MSC d7, d14, d21). Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm SEM. Abgesehen von glatten Muskelzellen jenseits von Kulturtag 30, die eine doppelt so hohe Membrankapazität besaßen als die anderen aufgeführten Zellen, unterschieden sich die verschiedenen Zelltypen nicht wesentlich in ihrer Membrankapazität.

B: Ruhemembranpotentiale nativer mesenchymaler Stammzellen (MSC), glatter Muskelzellen (SMC) nach Kulturtag 30 und mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung an Differenzierungstag 7 und 14 (Dif MSC d7, d14). Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm SEM, n=6. Mit der Differenzierung wurde das Ruhemembranpotential der MSC tendenziell negativer, jedoch nicht statistisch signifikant. SMC besaßen im Vergleich zu den anderen Zelltypen ein statistisch signifikant positiveres Membranpotential.

3.3.4 VERGLEICH DER AUSWÄRTSSTRÖME

Auch MSC in myogener Differenzierung wiesen verschiedene Auswärtsströme auf, die den in Kapitel 3.2.3 bei nativen MSC beschriebenen Strömen I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} zugeordnet werden konnten. Da sie sich in ihrem Verhalten nicht von den

bei nativen MSC identifizierten Strömen unterschieden, erfolgt keine separate Darstellung.

In Differenzierung befindliche MSC zeigten im Vergleich zu undifferenzierten MSC hauptsächlich den langsamen Auswärtsstrom I_{Kl} . Der prozentuale Anteil blieb über die Differenzierungsdauer konstant. Im Gegensatz hierzu verfügten SMC überwiegend über den schnellen Auswärtsstrom I_{Ks} .

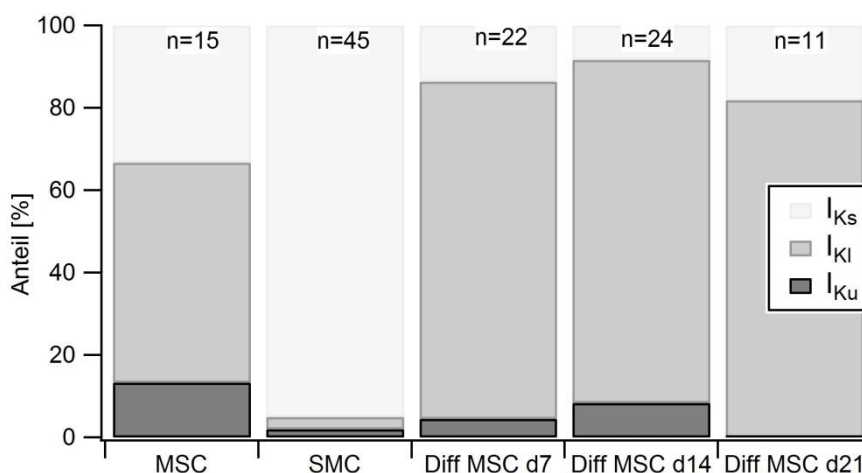


Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Auswärtsströme I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} im Vergleich

Die prozentualen Anteile an Zellen mit schnellen (I_{Ks}), langsamen (I_{Kl}) und überschießenden (I_{Ku}) Auswärtsströmen bei mesenchymalen Stammzellen in Passage 2 (MSC), glatten Muskelzellen (SMC) und mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung an den Differenzierungstagen 7, 14 und 21 (Diff MSC d7, d14, d21) wurde bestimmt und grafisch dargestellt. Die der Differenzierung zugrunde liegenden nativen MSC zeigten überwiegend einen langsamen Auswärtsstrom I_{Kl} , dessen Anteil mit Beginn der Differenzierung weiter zunahm und über die Differenzierungsdauer weitgehend konstant blieb. Glatte Muskelzellen besaßen hierzu gegensätzlich praktisch nur einen schnellen Auswärtsstrom I_{Ks} .

3.3.5 VERGLEICH DER NATRIUMSTRÖME

3.3.5.1 Allgemeine Eigenschaften von Natriumströmen im Vergleich

MSC in Differenzierung wiesen regelmäßig Natriumströme auf. Ihre Kinetik glich denen von nativen MSC und SMC mit einer Aktivierung um -20mV und einem Strommaximum bei +10mV bis +20mV. Die größte Natriumstromdichte wurde an d7 beobachtet, es folgte eine Abnahme um d14 auf Werte ähnlich denen

undifferenzierter MSC. An d21 wurden erneut größere Natriumströme registriert, die in ihrer Stromdichte vergleichbar waren mit denen von SMC.

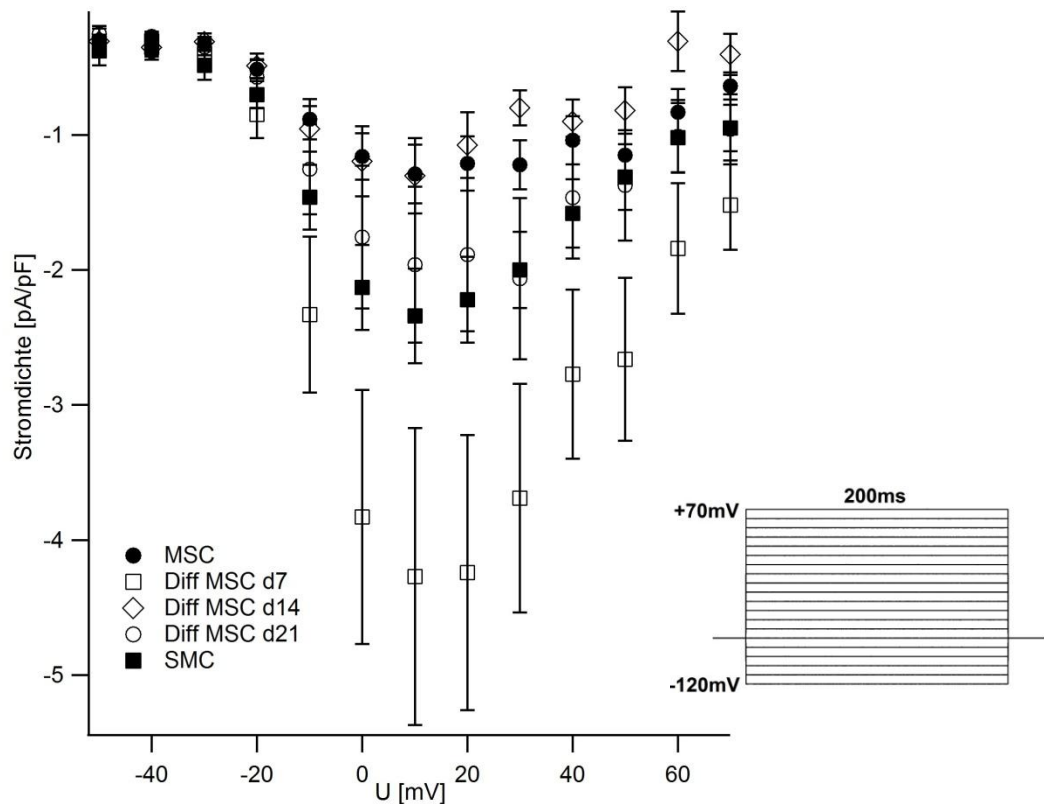


Abbildung 31: Strom-Spannungs-Kurve der Natriumstromdichten der verschiedenen Zellpopulationen im Vergleich.

Mit dem Gesamtprotokoll wurden die Natriumströme von nativen mesenchymalen Stammzellen (MSC, ●, n=14), glatten Muskelzellen (SMC, ■, n=20) und mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung (Diff MSC) an Differenzierungstag 7 (□, n=10), 14 (◊, n=11) und 21 (○, n=10) aufgezeichnet, die jeweiligen Stromdichten wurden als Mittelwerte ±SEM gegen das Membranpotential aufgetragen. Natriumströme auf MSC in myogener Differenzierung entsprachen in ihrer Kinetik mit einer Aktivierung um -20mV und einem Strommaximum bei +10mV den zuvor bei nativen MSC und SMC beschriebenen Natriumströmen. Die kleinsten Stromdichten für Natriumströme besaßen native MSC und MSC an Differenzierungstag 14. Die Stromdichten von SMC und MSC an Differenzierungstag 21 waren vergleichbar. An Differenzierungstag 7 wurden die größten Stromdichten gemessen, diese waren jedoch auch der größten Streuung unterlegen.

3.3.5.2 Vergleich der Natriumstromgröße in Abhängigkeit von der Membrankapazität

Bei allen untersuchten Zellpopulationen war auffallend, dass das Vorhandensein von Natriumströmen eng an die Membrankapazität gekoppelt war, was durch die im Schnitt größere Membrankapazität von Zellen mit

Natriumstrom im Vergleich zu Zellen ohne Natriumstrom bestätigt wurde. Um die Frage nach einer Verbindung zwischen der Größe des Natriumstroms und der Membrankapazität zu beantworten, wurde für jede Einzelzelle die Natriumstromgröße, gemessen bei +20mV, gegen die Membrankapazität aufgetragen.

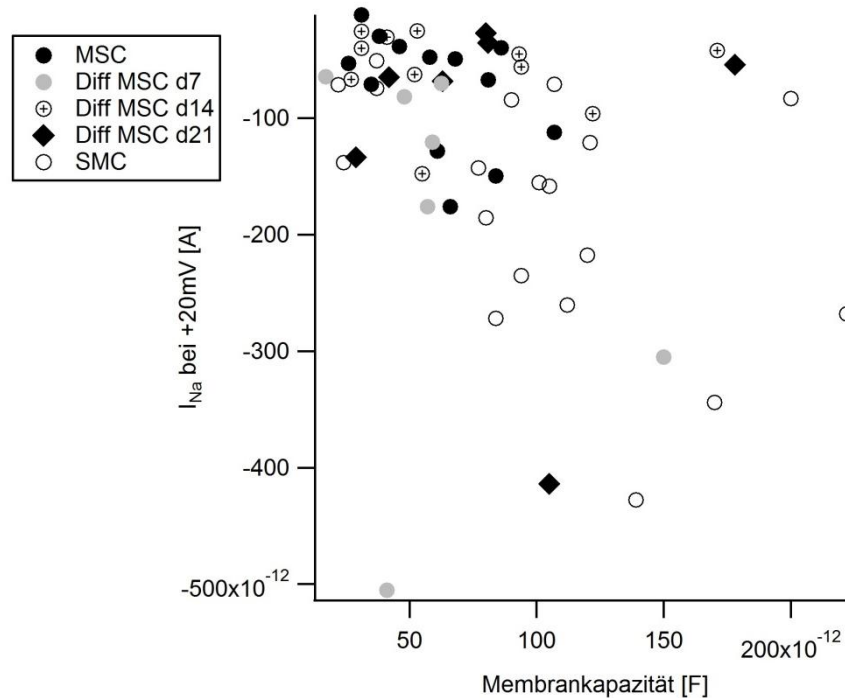


Abbildung 32: Vergleich der Natriumstromgrößen bei +20mV in Abhängigkeit von der Membrankapazität.

Das aus dem Gesamtprotokoll ermittelte Strommaximum des Natriumstroms bei +20mV wurde gegen die Membrankapazität als Ausdruck der Zellgröße für jede Einzelzelle aufgetragen. Es konnte dadurch veranschaulicht werden, dass insbesondere große SMC über große Natriumströme verfügten. Abkürzungen: I_{Na} =Natriumstrom, MSC=mesenchymale Stammzelle, Diff MSC d7-21= MSC in myogener Differenzierung Tag 7-21, SMC=glatte Muskelzelle.

Aus der Grafik geht hervor, dass insbesondere bei SMC große Natriumströme mit einer großen Membrankapazität assoziiert waren. Native MSC und MSC in Differenzierung wiesen insgesamt kleinere Natriumströme und Membrankapazitäten auf. Die Tendenz, dass Zellen mit großer Membrankapazität über größere Natriumströme verfügten, war jedoch auch hier gegeben.

3.3.5.3 Verhalten des Natriumstroms mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung unter TTX

Um die Natriumströme von MSC in Differenzierung mit denen von SMC vergleichen zu können, wurde zunächst ihre Empfindlichkeit gegenüber TTX betrachtet. Aus den erhaltenen Daten wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt.

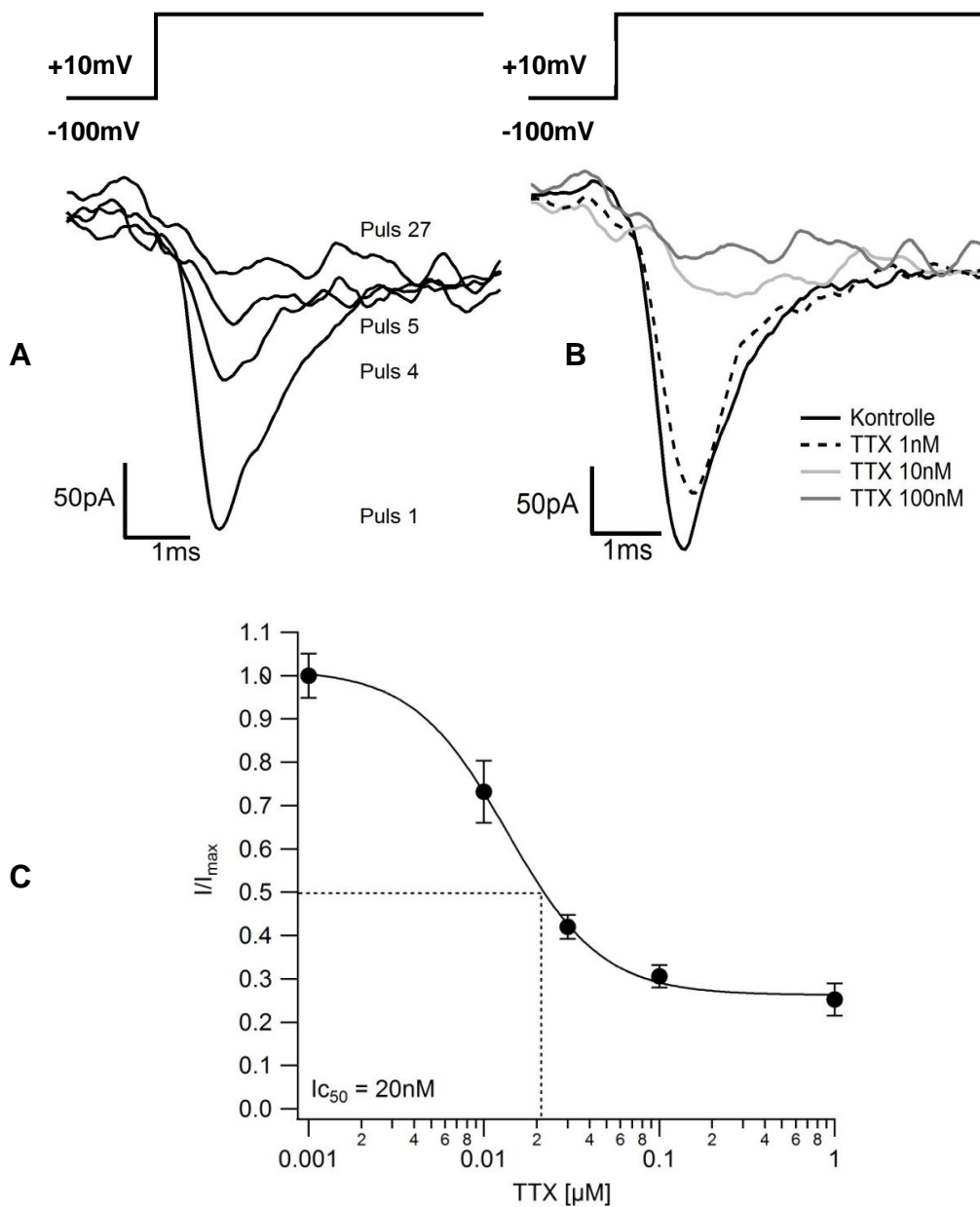


Abbildung 33: Inhibition des Natriumstroms mesenchymaler Stammzellen an Tag 7 der myogenen Differenzierung durch TTX

A: Darstellung des Natriumstroms einer mesenchymalen Stammzelle an Differenzierungstag 7 der myogenen Differenzierung unter wiederholter Depolarisation auf +10mV gemäß dem Natriumprotokoll. Ab Puls 2 wurde eine Perfusion mit 100nM TTX installiert. Wie bei den SMC nahm die Stromstärke mit jedem Puls ab, entsprechend einer Inhibition von Kanälen im offenen Zustand.

B: Darstellung des Natriumstroms einer mesenchymalen Stammzelle an Differenzierungstag 7 der myogenen Differenzierung unter wiederholter Depolarisation auf +10mV gemäß dem Natriumprotokoll (schwarz). Durch Zugabe von TTX 1nM (schwarz gestrichelt) wurde der Strom teilweise inhibiert, eine stärkere Inhibition erfolgte unter TTX 10nM (hellgrau) und 100nM (dunkelgrau), wodurch eine konzentrationsabhängige Inhibition bestätigt wurde.

C: Dosis-Wirkungs-Kurve mit TTX, die Stromamplitude unter TTX wurde auf die maximale Stromamplitude normalisiert (I/I_{max}) und gegen die TTX-Konzentration aufgetragen. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM dar. Pro Konzentration gilt $n=5$, es wurden maximal drei Konzentrationen pro Zelle appliziert. Die Kurve wurde, ausgehend von den Einzelwerten, anhand der Hill-Gleichung angeglichen. Der Natriumstrom konnte mit einer TTX-Konzentration von $1\mu\text{M}$ nur auf 25% seines Ausgangswertes reduziert werden. Die inhibitorische TTX-Konzentration, bei der noch 50% der Ausgangs-Stromamplitude vorhanden waren (IC_{50}), lag bei 20nM.

Unter Zugabe von TTX $1\mu\text{M}$ konnte der Natriumstrom nur auf 25% seines Ausgangswertes inhibiert werden. Da eine Koexistenz von Natrium- und Calciumströmen beobachtet wurde, wurden alle Versuche unter einer extrazellulären Cd^{2+} -Konzentration von $200\mu\text{M}$ durchgeführt. Unter Lidocain 1mM und 3mM wurde keine Inhibition des Reststroms erreicht (Daten nicht dargestellt). Geht man von einer kompletten Inhibition des Natriumstroms durch TTX $1\mu\text{M}$ aus, lag die IC_{50} bei 20nM, unter Einbeziehung des Reststroms bestand eine IC_{50} für TTX von 12nM.

3.3.5.4 Verhalten des Natriumstroms unter Ranolazin im Vergleich

Von Differenzierungstag 1 bis 21 wurden wiederholt Natriumströme der MSC in Differenzierung mit Ranolazin inhibiert. Zwischen den einzelnen Differenzierungstagen zeigte sich kein Unterschied im Effekt von Ranolazin, weshalb die Daten zusammengefasst wurden. Im statistischen Vergleich der Zellpopulationen ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Größe des Reststroms unter Ranolazin $100\mu\text{M}$.

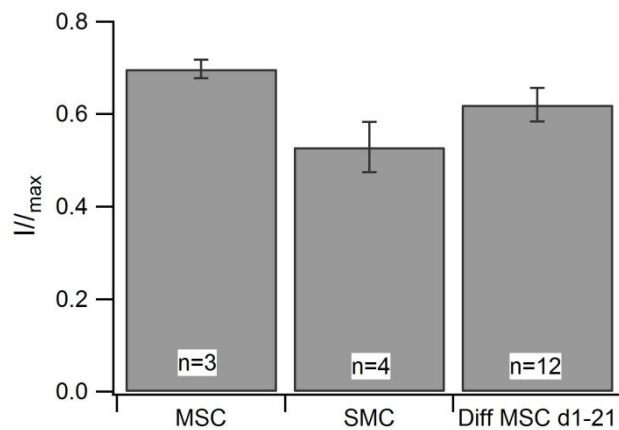


Abbildung 34: Vergleich der Natriumstrominhibition durch Ranolazin 100µM

Unter wiederholter Depolarisation auf +10mV gemäß dem Natriumprotokoll wurde die Inhibition des Natriumstroms von mesenchymalen Stammzellen (MSC), glatten Muskelzellen (SMC) und mesenchymalen Stammzellen an den Differenzierungstagen 1-21 (Diff MSC d1-21) gemessen. Die Stromamplitude nach Zugabe von Ranolazin 100µM wurde auf die maximale Stromamplitude normalisiert (I/I_{max}), die Werte stellen Mittelwerte ±SEM dar. Es wurde eine Abnahme der Stromamplitude bei MSC im Mittel auf 70%, bei SMC auf 53% und bei MSC in myogener Differenzierung auf 63% im Vergleich zur Ausgangs-Stromamplitude beobachtet. Vergleich man die zugrunde gelegten Einzelwerte miteinander, bestand statistisch kein signifikanter Unterschied in der Inhibition von Natriumströmen durch Ranolazin 100µM zwischen den Zelltypen.

3.3.5.5 Verhalten des Natriumstroms unter ProToxin-II im Vergleich

Analog zur Inhibition von Natriumströmen bei SMC durch ProToxin-II in einer Konzentration von 2nM und 100nM wurden diese Versuche auch mit MSC in Differenzierung an d7 und d10 durchgeführt, die Daten wurden zusammengefasst. Die Experimente erfolgten unter Calciumkanalinhibition durch 200µM Cd²⁺. Während ProToxin-II in einer Konzentration von 2nM keinen Effekt auf den Natriumstrom zeigte, reduzierte sich die Stromamplitude unter 100nM ProToxin-II auf im Mittel 37% des Ausgangswertes. Im Vergleich hierzu fand bei SMC unter ProToxin-II eine Stromreduktion auf durchschnittlich 29% statt. Im statistischen Vergleich der Einzelwerte bestand kein signifikanter Unterschied in der Inhibition des Natriumstroms durch ProToxin-II zwischen beiden Populationen. Ein Einbezug von nativen MSC in den Vergleich war aufgrund der geringen Stromdichte von Natriumströmen nicht möglich.

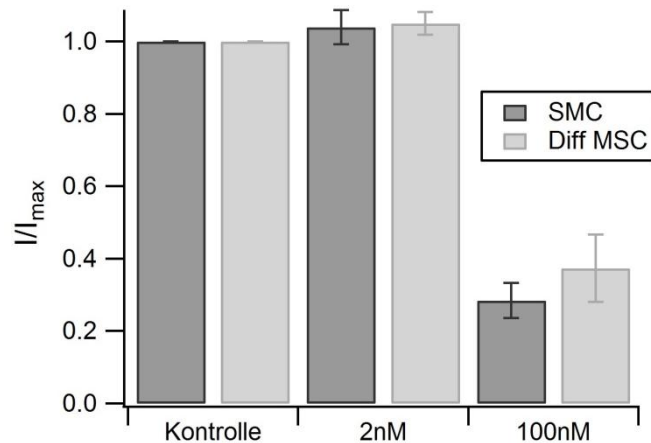


Abbildung 35: Vergleich der Natriumstrominhibition durch ProToxin-II 2nM und 100nM

Unter wiederholter Depolarisation auf +10mV gemäß dem Natriumprotokoll wurde die Inhibition des Natriumstroms glatter Muskelzellen (SMC) und mesenchymaler Stammzellen an den Differenzierungstagen 7 und 10 (Diff MSC) gemessen. Die Stromamplitude nach Zugabe von ProToxin-II wurde auf die maximale Stromamplitude normalisiert (I/I_{max}), die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM dar ($n=4$). Überwiegend wurden beide ProToxin-II-Konzentrationen an einer Zelle appliziert. Während eine ProToxin-II-Konzentration von 2nM bei beiden Zellpopulationen ohne Effekt war, wurde unter 100nM ProToxin-II eine Abnahme der Stromamplitude bei SMC auf 29%, bei MSC in Differenzierung auf 37% beobachtet. Im statistischen Vergleich der Einzelwerte bestand kein signifikanter Unterschied in der Größe des Reststroms bei SMC und MSC in myogener Differenzierung unter ProToxin-II 100nM.

3.3.5.6 Entwicklung von Stromdichte und Häufigkeit von Natriumströmen innerhalb einer Zelllinie mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung

Die Zelllinie eines Spenders, die die myogene Differenzierung durchlief, wurde besonders explizit betrachtet, um Veränderungen in Häufigkeit und Dichte von Natriumströmen insbesondere in der ersten Woche der myogenen Differenzierung besser deuten zu können.

Über die ersten Tage der Differenzierung wurde ein stetiger Anstieg der Stromdichte für Natrium verzeichnet, die an Tag 6 gipfelte und anschließend deutlich rückläufig war.

Ein ähnliches Verhalten wurde für den Anteil an Zellen mit Natriumstrom beobachtet. Ausgehend von einem Anteil von 57% bei undifferenzierten MSC wurde bis zu d5 ein Anstieg im prozentualen Anteil der Zellen mit Natriumstrom auf maximal 93% beobachtet, ab d6 pendelte sich der Wert um 60-70% ein.

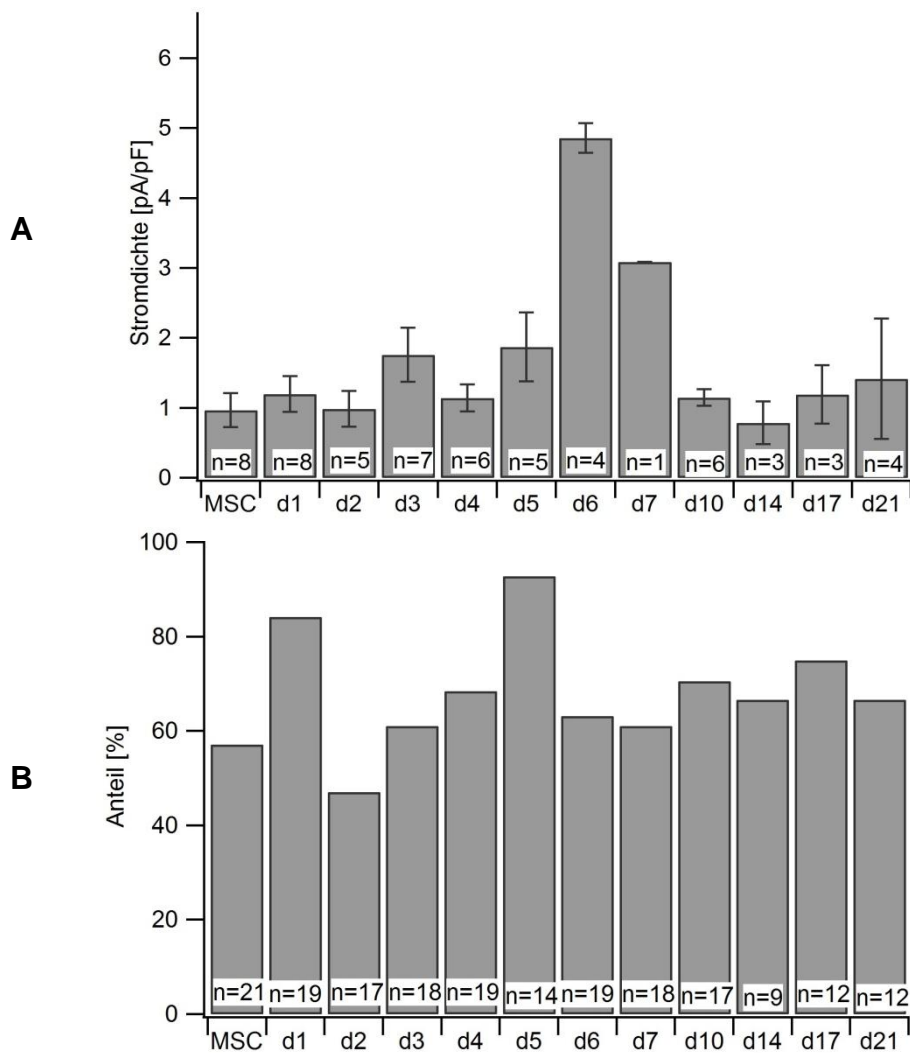


Abbildung 36: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen innerhalb einer Zelllinie von mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung über die Differenzierungsdauer
A: Darstellung der Stromdichte von Natriumströmen der mesenchymalen Stammzelllinie MSC HRE über die Dauer der Differenzierung. Die Werte entsprechen Mittelwerten bei +20mV ±SEM. Bis Differenzierungstag 6 (d6) wurde eine Zunahme der Stromdichte für Natrium beobachtet, die im Verlauf der weiteren Differenzierung rückläufig war.
B: Darstellung des prozentualen Anteils an Zellen mit Natriumstrom über die Differenzierungsdauer der mesenchymalen Stammzelllinie MSC HRE. Der prozentuale Anteil an Zellen mit Natriumstrom gipfelte an Differenzierungstag 5 (d5) mit 94% und pendelte sich dann um 70% ein.

3.3.5.7 Entwicklung von Stromdichte und Häufigkeit von Natriumströmen verschiedener Zelllinien mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung im Vergleich

Bei den übrigen Zelllinien in myogener Differenzierung erfolgten Messungen an d0 (MSC), d7 und d14, sowie teilweise an d21. Zunächst wurde versucht, die Zelllinien verschiedener Spender separat voneinander zu betrachten und

untereinander zu vergleichen. Da methodenbedingt nur Einzelzellmessungen möglich waren, waren die gemessenen Zellzahlen jedoch nicht aussagekräftig. Gleichzeitig schwankte der Anteil an Zellen mit Natriumstrom zwischen den einzelnen Zelllinien stark. Insgesamt machte es diese Problematik äußerst schwierig, Vergleiche zwischen einzelnen Zelllinien bezüglich der Stromdichte und des prozentualen Anteils an Natriumströmen zu ziehen. Zur Veranschaulichung wurden die Daten nach Zelllinien getrennt dargestellt.

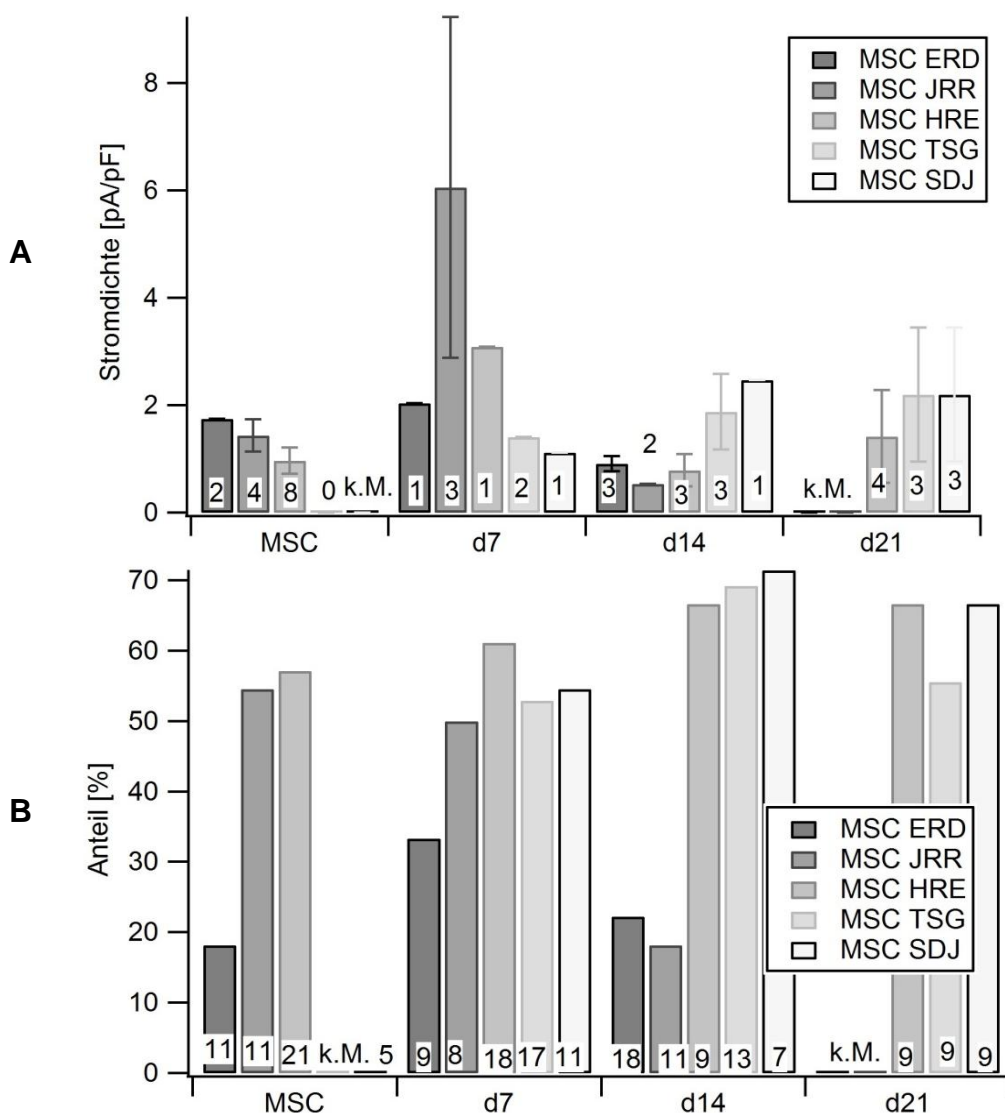


Abbildung 37: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen verschiedener Zelllinien mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung über die Differenzierungsdauer
 Die angegebenen Zahlen entsprechen den gemessenen Zellzahlen, k.M. = keine Messung erfolgt.
A: Darstellung der Stromdichte von Natriumströmen verschiedener mesenchymaler Stammzelllinien (ERD, JRR, HRE, TSG, SDJ), ausgehend von der nativen mesenchymalen Stammzelle (MSC), über

Differenzierungstag 7 (d7) bis 21 (d21). Die Werte entsprechen Mittelwerten bei +20mV \pm SEM. Aufgrund der nur geringen Zellzahlen war das Treffen einer Aussage zur Tendenz in der Entwicklung der Natriumstromdichten nicht möglich.

B: Darstellung des prozentualen Anteils an Zellen mit Natriumstrom verschiedener mesenchymalen Stammzelllinien (ERD, JRR, HRE, TSG, SDJ) über die Differenzierungsdauer. Auch hier war eine Aussage über die Entwicklung aufgrund der teilweise nur geringen Zellzahlen nicht möglich.

3.3.5.8 Stromdichte und Häufigkeit von Natriumströmen im Vergleich

Um Vergleiche zwischen MSC, SMC und in Differenzierung befindlichen MSC treffen zu können, wurden die Daten aller in die Differenzierung eingehenden Zelllinien zusammengefasst.

Während native MSC nur über eine sehr geringe Stromdichte für Natriumströme verfügten, wurde bereits an d7 der Differenzierung eine deutliche Zunahme der Natriumstromdichte verzeichnet. An d14 sank diese bereits wieder unter den Ausgangswert, an d21 wurde eine erneute Zunahme beobachtet. Die Natriumstromdichte für SMC lag zwischen der von nativen MSC und d7.

Bezüglich der Häufigkeit von Natriumströmen innerhalb der verschiedenen Zellpopulationen ließ sich eine Zunahme von Zellen mit Natriumstrom von 42% auf 51% zwischen undifferenzierten MSC und d7 verzeichnen. Ähnlich wie die Stromdichte nahm auch der prozentuale Anteil an Zellen mit Natriumstrom an d14 mit 41% ab und an d21 mit 64% nochmals zu. SMC verfügten im Vergleich zu 56% über Natriumströme.

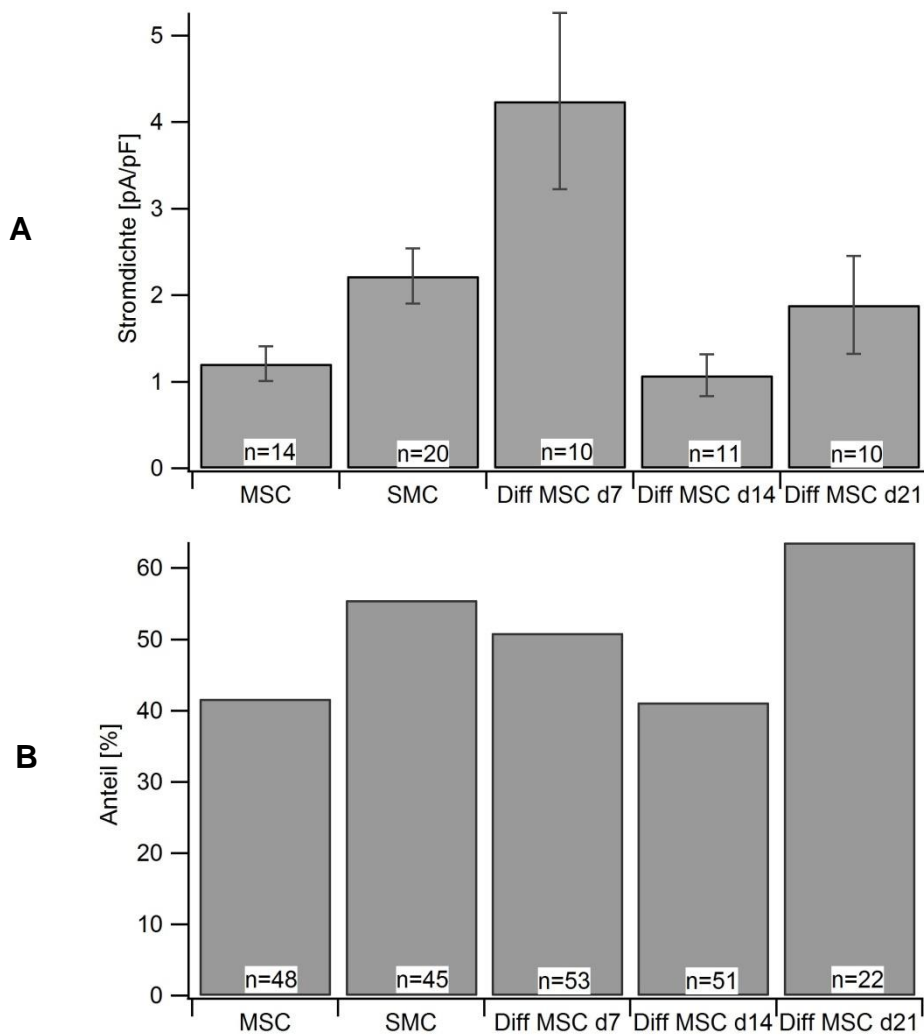


Abbildung 38: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen im Vergleich

A: Darstellung der Stromdichte von Natriumströmen mesenchymaler Stammzellen (MSC), glatter Muskelzellen (SMC) und mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung (Diff MSC) an Differenzierungstag 7 bis 21 (d7-d21). Die Werte entsprechen Mittelwerten bei +20mV \pm SEM. Größte Natriumstromdichten wurden bei MSC an Differenzierungstag 7 beobachtet, gefolgt von d21 und SMC. Die geringste Natriumstromdichte besaßen native MSC und MSC in Differenzierung an d14.

B: Darstellung des prozentualen Anteils von Zellen mit Natriumstrom bei mesenchymalen Stammzellen (MSC), glatten Muskelzellen (SMC) und mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung (Diff MSC) an Differenzierungstag 7 bis 21 (d7-d21). Auch hier war eine Zunahme am Anteil von Zellen mit Natriumstrom zwischen nativen MSC und d7 zu verzeichnen, die allerdings den Wert der SMC nicht erreichte. An d14 nahm der prozentuale Anteil an Zellen mit Natriumstrom wieder ab.

Ausgehend von den Einzelwerten jeder Zellpopulation für die Natriumstromdichte bei +20mV ergaben sich einige statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen, die der Übersichtlichkeit halber in tabellarischer Form dargestellt wurden.

	MSC	SMC	Diff d7	Diff d14	Diff d21
MSC	-	0,023*	0,044*	0,687	0,966
SMC	0,023*	-	0,044*	0,002*	0,302
Diff d7	0,044*	0,044*	-	0,001*	0,017*
Diff d14	0,687	0,002*	0,001*	-	0,86
Diff d21	0,966	0,302	0,017*	0,86	-

Tabelle 19: Statistischer Vergleich der Stromdichte für Natriumströme zwischen den einzelnen Zellpopulationen.

Angegeben sind p-Werte. $p < 0,05$ bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede (mit * gekennzeichnet).

Die Zunahme der Natriumstromdichte von nativen MSC zu d7 war statistisch signifikant, ebenso die Abnahme an d14. SMC unterschieden sich in ihrer Natriumstromdichte jedoch ebenfalls signifikant von MSC an d7. An d21 gemessene Natriumstromdichten unterschieden sich statistisch gesehen praktisch nicht von den übrigen gemessenen Werten, was wahrscheinlich auf der großen Streuung der Werte begründet ist.

Wie auch bei nativen MSC konnte bei MSC in Differenzierung kein Zusammenhang zwischen der Expression von Natriumströmen und einem bestimmten Strommuster für Auswärtsströme festgestellt werden, weshalb hierzu keine Daten angeführt wurden.

3.3.6 VERGLEICH DER CALCIUMSTRÖME

3.3.6.1 Allgemeine Eigenschaften von Calciumströmen im Vergleich

Wie bereits bei undifferenzierten MSC fanden sich auch bei MSC in myogener Differenzierung Calciumströme. Sie aktivierten um -30mV und erreichten ihr Maximum bei +10mV. Ähnlich den Natriumströmen wurden insbesondere bei großen Zellen Calciumströme beobachtet. Die mittlere Membrankapazität von MSC unter Differenzierung mit Calciumstrom lag bei 97,8pF ($\pm 27,8$ pF, $n=13$).

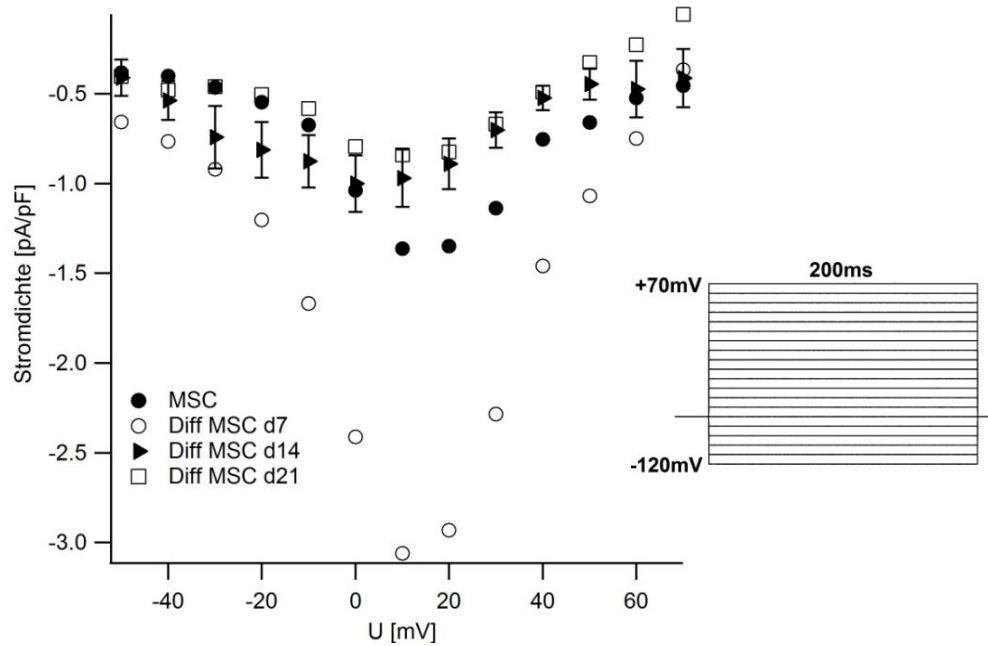


Abbildung 39: Strom-Spannungs-Kurve von Calciumströmen nativer mesenchymaler Stammzellen und mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung

Mit dem Gesamtprotokoll wurden die Calciumströme nativer mesenchymaler Stammzellen (MSC, ●, n=2) und mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung (Diff MSC) an Differenzierungstag 7 (○, n=2), 14 (▶, n=7) und 21 (□, n=2) aufgezeichnet, die jeweiligen Stromdichten wurden als Mittelwerte ±SEM gegen das Membranpotential aufgetragen.

Calciumströme aktivierten bei -30mV, erreichten ein Strommaximum bei +10mV und aktivieren ab Potentialen positiv von +40mV nicht mehr. Aufgrund der nur geringen Zellzahlen konnte keine Aussage über die Entwicklung der Calciumstromdichte über die Differenzierungsdauer getroffen werden.

3.3.6.2 Verhalten von Calciumströmen mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung unter Nifedipin und Cd^{2+}

Aufgrund der Seltenheit von Calciumströmen auf nativen MSC gelang der Nachweis, ob es sich um L-Typ Calciumkanäle handelte, durch spezifische Inhibition mit Nifedipin nicht. Da bei MSC in Differenzierung weitaus häufiger Calciumströme beobachtet wurden, konnte neben der Inhibition durch Cd^{2+} auch Nifedipin eingesetzt werden, um den vorliegenden Calciumkanaltyp zu bestimmen.

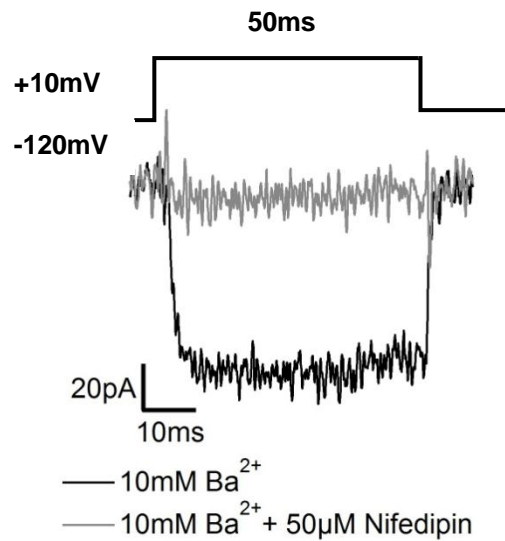


Abbildung 40: Inhibition eines Calciumstroms einer mesenchymalen Stammzelle in myogener Differenzierung durch Nifedipin 50µM

Durch wiederholte Depolarisation von -120mV auf +10mV gemäß dem Calciumprotokoll wird der Calciumstrom einer mesenchymalen Stammzelle an Differenzierungstag 14 dargestellt (schwarze Kurve). Unter Zugabe von 50µM Nifedipin wird der Strom fast vollständig inhibiert (graue Kurve), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass der Calciumstrom über L-Typ Calciumkanäle geleitet wird.

Durch die erfolgreiche Inhibition des Calciumstroms mit Nifedipin wurde bewiesen, dass es sich um einen L-Typ Calciumkanal handelte.

Sowohl durch Nifedipin 50µM, als auch durch Cd²⁺ 200µM ließen sich die Calciumströme von MSC in myogener Differenzierung jedoch nicht vollständig inhibieren.

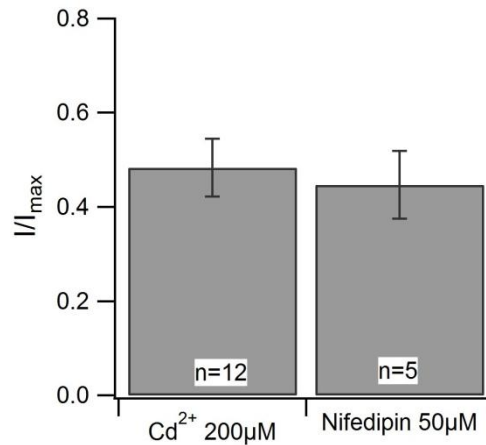


Abbildung 41: Inhibition von Calciumströmen mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung durch 200 μM Cd²⁺ und 50 μM Nifedipin

Calciumströme mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung wurden unter wiederholter Depolarisation auf +10mV gemäß dem Calciumprotokoll durch Zugabe von 200 μM Cd²⁺ oder 50 μM Nifedipin inhibiert. Es wurde das Verhältnis des Reststroms zur maximalen Stromamplitude gebildet (I/I_{max}), die Werte stellen Mittelwerte ±SEM dar. Unter Cd²⁺ wurde die Stromamplitude auf 49% des Ausgangswertes reduziert, bei Nifedipin verblieben 45%.

3.3.6.3 Stromdichte und Häufigkeit von Calciumströmen im Vergleich

Im Vergleich zu nativen MSC stieg der prozentuale Anteil von Zellen mit Calciumstrom von 6% auf 24% an d7, 25% an d14 und 18% an d21 an.

Da nicht die Stromgröße aller Calciumströme bestimmt wurde, waren die Zellzahlen zu gering, um eine Aussage über die Entwicklung der Stromgröße über die Differenzierungsdauer treffen zu können.

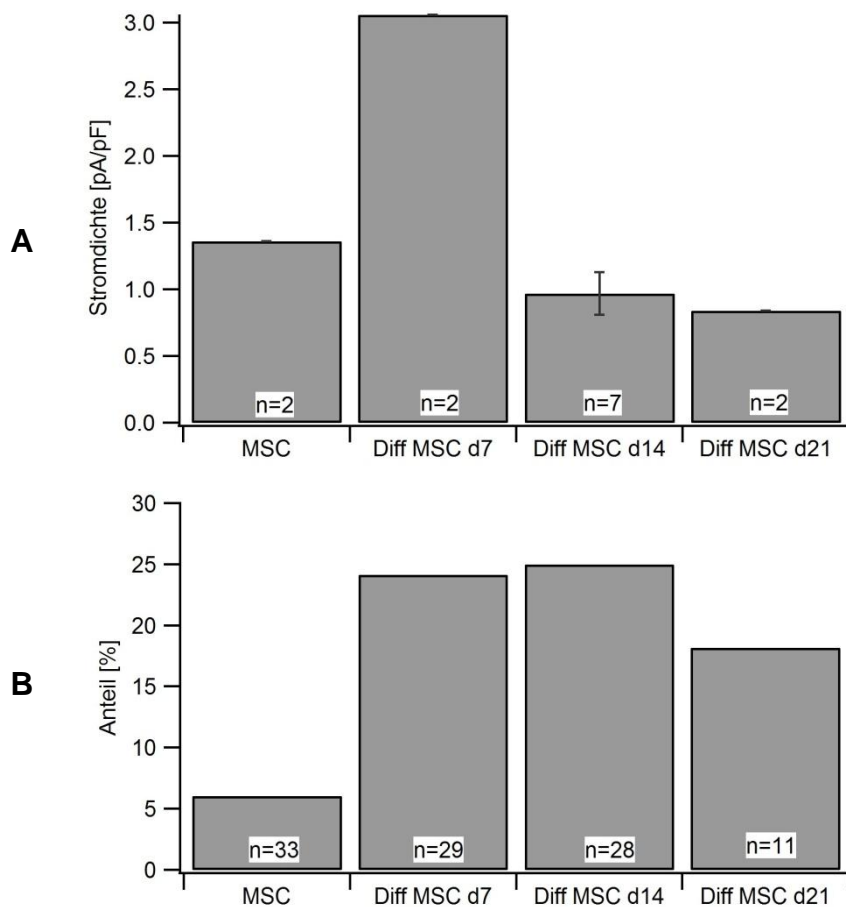


Abbildung 42: Stromdichte und prozentualer Anteil von Calciumströmen über die Differenzierungsdauer

A: Darstellung der Stromdichte von Calciumströmen nativer mesenchymalen Stammzellen (MSC) und mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung (Diff MSC) an Differenzierungstag 7-21 (d7-d21), die Werte entsprechen Mittelwerten bei +10mV \pm SEM. Aufgrund der geringen Zellzahlen konnte keine Aussage über die Entwicklung der Calciumstromdichte über die Differenzierungsdauer getroffen werden.

B: Darstellung des prozentualen Anteils von Zellen mit Calciumstrom bei nativen mesenchymalen Stammzellen (MSC) und mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung (Diff MSC) an Differenzierungstag 7 bis 21 (d7-d21). Der Anteil an Zellen mit Calciumstrom stieg mit Beginn der Differenzierung von anfänglich 6% bei nativen MSC auf 24 bzw. 25% an d7 und d14, an d21 besaßen noch 18% der Zellen einen Calciumstrom.

3.3.6.4 Koexistenz von Calcium- und Natriumströmen bei mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung

Mehrfach wurde bei der Inhibition von Calciumströmen ein Reststrom in Form einer schnellen Einwärtsstrom-Komponente beobachtet, die durch spezifische Natriumkanal-Inhibitoren in ihrer Amplitude reduziert werden konnte.

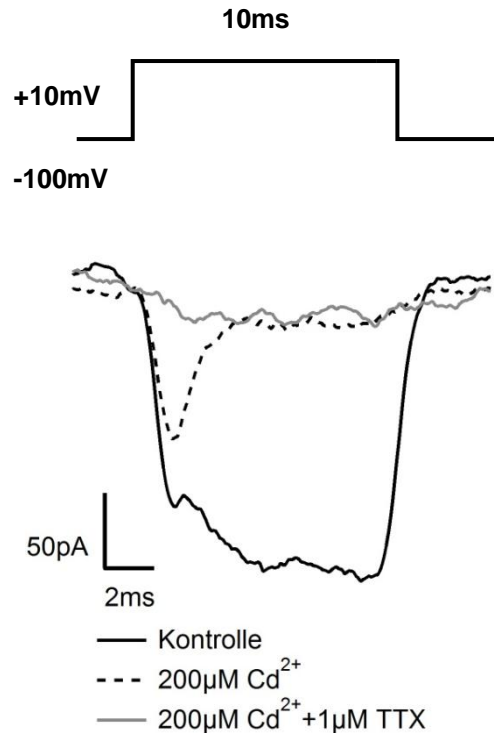


Abbildung 43: Koexistenz von Natrium- und Calciumkanälen bei einer mesenchymalen Stammzelle in myogener Differenzierung

Unter einem Membranpotential von +10mV wurde ein Einwärtsstrom einer mesenchymalen Stammzelle in myogener Differenzierung an Tag 14 dargestellt (schwarze Kurve), der durch Zugabe von Cd²⁺ 200µM in seiner langsamen Komponente inhibiert wurde (gestrichelte Kurve). Durch zusätzliche Zugabe von TTX 1µM konnte der Strom vollständig inhibiert werden (graue Kurve), was auf die Koexistenz von Natrium- und Calciumkanälen bei mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung schließen ließ.

Die Koexistenz von Natrium- und Calciumströmen bei einer Zelle wurde sporadisch beobachtet, bei gezielter Suche wiesen mehr als 80% aller mit Calciumstrom identifizierten MSC in Differenzierung einen kleinen Natriumstrom auf. Diese Zellen gingen sowohl in die Statistiken zum prozentualen Anteil von Zellen mit Natrium-, als auch mit Calciumstrom ein.

4. DISKUSSION

Mesenchymale Stammzellen entwickeln sich in der regenerativen Medizin als wichtiges Instrument zur Behandlung von Gewebeschädigungen. Sie zeichnen sich aus durch ihre einfache Gewinnung aus dem adulten Organismus [23] [24] [25], unkomplizierte Handhabung in Kultur mit hohem Proliferations- und Differenzierungspotential in verschiedene Formen des Bindegewebes [27] [31], sowie ihre große Sicherheit für den Empfänger durch fehlende Tendenz zu Abstoßungsreaktionen [28] oder maligner Entartung [36].

Das macht MSC auch für die Therapie der Belastungsurininkontinenz interessant, die sich insbesondere im fortgeschrittenen Lebensalter als Folge von Schädigung und Schwächung des urethralen Sphinktersystems manifestiert. Die Ansprüche, die bei der Regeneration des Sphinkterapparates an MSC gestellt werden, sind hoch. Neben einer morphologischen Differenzierung zur Muskelzelle durch Nachweis der Expression muskelspezifischer Proteine ist eine funktionelle Anpassung und Integration in das bestehende Gewebe essentiell für die Verbesserung der Kontraktilität des Schließmuskels. Ein vielversprechender Ansatz, um den Therapieerfolg zu verbessern, ist die der Implantation vorausgehende *in vitro*-Induktion einer myogenen Differenzierung. Vor Einbringung in den Empfänger ist es unabdingbar, das Transplantat nicht nur auf Transkriptions-, sondern auch auf funktioneller Ebene zu charakterisieren, um die Patientensicherheit gewährleisten und Schlüsse über den optimalen Differenzierungszeitpunkt für die Transplantation ziehen zu können.

Vor diesem Hintergrund soll die elektrophysiologische Charakterisierung von MSC zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung zu glatten Muskelzellen erfolgen. Als Referenz für den Differenzierungsfortschritt dienen zuvor erhobene Daten der elektrophysiologischen Untersuchung nativer MSC als Ausgangspunkt und glatter Muskelzellen des Urogenitalsystems als Endpunkt der Differenzierung, von denen jeweils nur die für den späteren Vergleich relevanten Punkte diskutiert werden.

4.1 CHARAKTERISIERUNG GLATTER MUSKELZELLEN DES M. DETUSOR VESICAE

4.1.1 BEURTEILUNG DER KULTUR- UND ALLGEMEINEN ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN GLATTER MUSKELZELLEN

Glatte Muskelzellen sind noch im adulten Organismus zur Plastizität befähigt. Abhängig von Beanspruchung und äußeren Einflüssen ist ein Wechsel vom kontraktile, funktionellen in den synthetischen und damit proliferativen Zustand möglich [6] [52], ohne dabei zur Entdifferenzierung der Zellen zu führen [53].

Die in Kultur gehaltenen glatten Muskelzellen aus dem humanen M. detrusor vesicae zeigten bis Kulturtag 30 eine extensive Proliferation, in späteren Passagen wurde nur noch eine Zellhyperplasie beobachtet, weshalb von einem Übergang von der synthetischen in die kontraktile Phase ausgegangen wurde.

Die Zunahme der Zellgröße in der kontraktile Phase spiegelte sich auf elektrophysiologischer Ebene durch eine Verdopplung der Membrankapazität wider. Das Ruhemenbranpotential erschien mit $-22,3\text{mV}$ nicht negativ genug für glatte Muskelzellen in der kontraktile Phase, in der Literatur werden Werte um -40mV bei frisch isolierten Zellen [16] angegeben mit einer Tendenz zu positiveren Werten unter Kulturbedingungen [54].

4.1.2 BEURTEILUNG DES AUSWÄRTSSTROMS I_{Ks} GLATTER MUSKELZELLEN

Bei Analyse der Auswärtsströme wurde überwiegend ein schnell aktivierender, nicht inaktivierender Auswärtsstrom I_{Ks} ab Potentialen positiv von 0mV und mit zunehmendem Rauschen unter steigender Depolarisation registriert (*Abbildung 9*). Aufgrund seiner Kinetik wurde dieser einem MaxiK-Kanal, der in Muskelzellen des Detrusors an der Modulation von Aktionspotentialen und der Repolarisation beteiligt ist [9], zugeordnet. Über die Kulturdauer wurde keine Veränderung dieses Stroms beobachtet.

4.1.3 BEURTEILUNG DES FEHLENDEN NACHWEISES VON CALCIUMSTRÖMEN AUF GLATTEN MUSKELZELLEN

Glatten Muskelzellen generieren Aktionspotentiale über spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle [14], die sowohl auf frisch isolierten [16] [54], als auch auf kultivierten [55] glatten Muskelzellen des Detrusors beschrieben sind. Ein spannungsabhängiger Einwärtsstrom (*Abbildung 10*) wurde daher zunächst als Calciumstrom missdeutet, konnte durch mangelnde Inhibition durch Nifedipin (*Abbildung 11*) und Abhängigkeit der Stromamplitude von der extrazellulären Na^+ -Konzentration (*Abbildung 12*) jedoch einem spannungsgesteuerten Natriumkanal zugeordnet werden.

Ein Großteil der Experimente ($n=45$) wurde unter Inhibition von potentiell maskierend wirkenden Kaliumströmen durchgeführt. Durch den Ersatz von extrazellulärem Ca^{2+} durch Ba^{2+} wurden optimale Bedingungen zur Detektion von Strömen durch Calciumkanäle geschaffen, da diese Kanäle eine bessere Permeabilität für Ba^{2+} als für Ca^{2+} aufweisen. Dennoch konnte kein sicherer Nachweis über das Vorhandensein von Calciumkanälen bei der untersuchten Zellpopulation erbracht werden. Unter allen Experimenten wurde lediglich einmalig ein Strommuster identifiziert (*Abbildung 16*), das aufgrund seiner Kinetik über Calciumkanäle vermittelt sein könnte.

Das Fehlen von Calciumkanälen bei den untersuchten glatten Muskelzellen wird durch eine vollständige Inhibition von Einwärtsströmen durch TTX $1\mu\text{M}$ untermauert (*Abbildung 13*), was für einen rein über Natriumkanäle vermittelten Strom spricht. Eine Koexistenz von Calcium- und Natriumkanälen auf einer Zelle ist somit ebenfalls unwahrscheinlich.

4.1.4 BEURTEILUNG DER NATRIUMSTRÖME GLATTER MUSKELZELLEN

In Ermangelung von Calciumströmen wurde im Hinblick auf die Suche nach einem geeigneten Indikatorstrom für die myogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen ein besonderes Augenmerk auf den gefundenen Natriumstrom gelegt. Anhand seiner typischen Kinetik wurde ein spannungsgesteuerter Natriumkanal identifiziert (*Abbildung 10*), dessen

Ionenselektivität für Na⁺ durch die Substitution mit NMDG bestätigt wurde (*Abbildung 12*).

Zur Klärung des Subtyps dieses spannungsabhängigen Natriumkanals innerhalb der Na_v-Familie erfolgte eine pharmakologische Charakterisierung. Aufgrund seiner hohen Affinität zu TTX (*Abbildung 13*) wurde von einem TTX-sensiblen Vertreter der Na_v-Familie ausgegangen [17]. Durch seine Sensitivität gegenüber Ranolazin (*Abbildung 34*), einem Natriumkanalinhibitor selektiv für Na_v1.4, Na_v1.5, Na_v1.7 und Na_v1.8 [56, 57], konnte der gesuchte Na_v-Subtyp weiter eingegrenzt werden, wobei Na_v1.5 und Na_v1.8 aufgrund ihrer Resistenz gegenüber TTX bei der weiteren Betrachtung ausschieden. Durch eine IC₅₀ für ProToxin-II im zweistelligen nanomolaren Bereich (*Abbildung 14*) wurde der gefundene Natriumkanal mit großer Wahrscheinlichkeit als Na_v1.4 identifiziert [58]. Dieser Subtyp wird normalerweise mit Skelettmuskulatur in Verbindung gebracht [56, 59, 60].

Der Anteil an Zellen mit Na_v1.4 blieb mit 55% über die Kulturdauer konstant, es wurde eine Zunahme der Stromgröße mit steigender Membrankapazität beobachtet, weshalb eine Darstellung der Stromgröße normalisiert auf die Membrankapazität als Stromdichte erfolgte (*Abbildung 15*).

4.1.5 BEURTEILUNG DER EIGNUNG DER ZELLINIE GLATTER MUSKELZELLEN ALS ELEKTROPHYSIOLOGISCHE REFERENZ FÜR DIE MYOGENE DIFFERENZIERUNG MESENCHYMALER STAMMZELLEN

Zusammenfassend ist die Wahl der Zellreihe glatter Muskelzellen aus dem humanen M. detrusor vesicae als elektrophysiologische Referenz nicht in jeder Hinsicht als optimal zu betrachten.

Vorteile stellen die einfache Handhabung der Zellen in Kultur und die starke Proliferationstendenz mit ständiger Verfügbarkeit von Zellen für Messungen dar.

Als Nachteil kann die Herkunft aus dem M. detrusor vesicae statt aus dem M. sphincter urethrae internus, den es eigentlich zu regenerieren gilt, betrachtet werden, da aus elektrophysiologischer Sicht durchaus Unterschiede zwischen den glatten Muskelzellen beider Strukturen bestehen [16].

Weiterhin ist die Qualität der Zelllinie unter Kultivierung über 60 Tage fraglich. Auch wenn kurzfristig keine Entdifferenzierung beim Übergang zwischen synthetischem und kontraktilem Zustand beobachtet wurde [53], ist es dennoch unklar, inwiefern es sich bei den Zellen in Kultur noch um glatte Muskelzellen, speziell mit den Eigenschaften des M. detrusor, handelte. Dies wird auch durch das für erregbare Zellen vergleichsweise positive Membranpotential von $-22,3\text{mV}$ bei erwarteten Werten um -40mV [16] untermauert.

Das Fehlen von Calciumströmen, deren Anwesenheit auch auf kultivierten glatten Muskelzellen des Detrusors beschrieben ist [55], wirft weitere Fragen über den Differenzierungszustand der untersuchten Zellen auf. Da die Qualität von Calciumströmen auf frisch isolierten glatten Muskelzellen des Detrusors besser zu sein scheint [16] [54], sollte vor einer weiteren Intensivierung der Suche auf den kultivierten Zellen die Untersuchung eines frischen oder nur kurzzeitig kultivierten Präparats erfolgen.

Die Funktion der spannungsgesteuerten Natriumkanäle, nachweisbar bei einem Großteil der kultivierten Zellen, ist unklar. Möglicherweise sind sie an der Generierung von Aktionspotentialen, einer Aufgabe, die in glatten Muskelzellen spannungsabhängigen Calciumkanälen zufällt, beteiligt. Daten speziell über Natriumkanäle glatter Muskelzellen des Detrusors sind rar. Es wird ein an der Aufrechterhaltung der Detrusorkontraktilität beteiligter, bei -40mV tonisch aktiver, für Na^+ und Ca^{2+} permeabler Kanal beschrieben [21]. Aufgrund dieser Eigenschaften kann eine Übereinstimmung mit dem hier gefundenen Kanal ausgeschlossen werden. In der Literatur werden die spannungsabhängigen Natriumkanäle $\text{Na}_v1.2$ und $\text{Na}_v1.3$ [61], $\text{Na}_v1.5$ [19] und $\text{Na}_v1.6$ [20] bei glatten Muskelzellen beschrieben. Vor diesem Hintergrund ist die Identität des gefundenen Na_v -Subtyps, nämlich $\text{Na}_v1.4$, unerwartet. $\text{Na}_v1.4$ wird normalerweise mit Rhabdomyozyten in Verbindung gebracht [56, 59, 60]. Zusammen mit dem fehlenden Nachweis von Calciumströmen ist somit eine Dedifferenzierung der glatten Muskelzellen in Kultur wahrscheinlich, auch eine Verunreinigung der Zellkultur durch andere Zelltypen kann nicht ausgeschlossen werden.

Die beschriebenen Beobachtungen zeigten sich konstant über die Kulturdauer. Abgesehen von einer signifikanten Zunahme der Membrankapazität kann von einer aus elektrophysiologischer Sicht homogenen Population von Zellen aus dem humanen M. detrusor vesicae ausgegangen werden. Als elektrophysiologische Referenz für die myogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen ist diese Zelllinie jedoch aufgrund ihrer von Beginn an bestehenden Eigenschaften nur bedingt geeignet.

4.2 CHARAKTERISIERUNG MESENCHYMALER STAMMZELLEN

4.2.1 BEURTEILUNG DER KULTUREIGENSCHAFTEN UND DER AUSWÄRTSSTRÖME MESENCHYMALER STAMMZELLEN

Mesenchymale Stammzellen sind als adulte im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen in ihrer Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung in verschiedene Gewebe eingeschränkt und unterliegen, wie alle adulten Gewebe, einem physiologischen Alterungsprozess, der auch unter Kulturbedingungen zum Tragen kommt [62]. Doch nicht nur über die Kulturdauer wurden Veränderungen registriert, vielmehr gibt es Hinweise darauf, dass MSC bereits bei Entnahme präterminiert sind, sich in spezifische Gewebe zu differenzieren [63]. Damit stellt eine MSC-Kultur eine von Beginn an inhomogene Population dar, die durch die Kultivierung eine zusätzliche Dynamik erfährt. Hinzu kommen spenderabhängige Differenzen zwischen einzelnen MSC-Populationen trotz gleicher Gewinnungsmethode [64], sowie allein durch die Handhabung der Zellkultivierung bedingte Einflüsse auf die weitere Entwicklung der Zellen [65]. Diese Voraussetzungen machen es schwierig, eine Zellpopulation unter statischen Bedingungen mithilfe von Einzelzellmessungen zu charakterisieren. Noch schwieriger wird es, eine Aussage über die Veränderungen im Laufe der Kultur zu treffen.

Die für diese Arbeit verwendeten MSC wurden für maximal 65 Tage kultiviert, wobei nach den ersten 2-3 Wochen eine Verlängerung der Verdopplungszeit und nach 4-6 Wochen in Kultur mehrfach ein subtotaales Ablösen der Zellen beobachtet wurde. Die weiterkultivierten Zellen zeigten morphologisch ein

verändertes Erscheinungsbild. Vor diesem Hintergrund ist es wahrscheinlich, dass auch die elektrophysiologischen Eigenschaften von MSC über die Kulturdauer Änderungen unterworfen waren. Dahingehende Studien beschäftigten sich intensiv mit der Kaliumkanalexpression humaner MSC und konnten drei verschiedene Strommuster für Kaliumströme identifizieren, für die sie eine homogene Expression über die Kulturdauer beschrieben [29, 30]. Die verschiedenen Kaliumstrommuster konnten auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, allerdings war ihre Häufigkeit über die Dauer der Kultur Veränderungen unterworfen.

Eine pharmakologische Charakterisierung der Kaliumkanäle musste aufgrund von spontanen Instabilitäten in der Stromamplitude unter repetitiver Reizung unterbleiben (*Abbildung 18*). Dieses Verhalten ist zuvor nicht beschrieben. Ursächlich kann ein *run-up* infolge des Auswaschens intrazellulärer Substanzen durch Diffusion zwischen Zytoplasma und Pipettenlösung sein. Um dem entgegenzuwirken, wurde zur Erhöhung der Viskosität der Intrazellulärlösung Kaliumchlorid durch Kaliumgluconat ersetzt. Um einen möglichen Substratmangel von an der Kanalregulation beteiligten Second-messenger-Systemen auszugleichen, wurde die Intrazellulärlösung zudem energetisch durch Zugabe von GTP, Kreatinphosphat und Kreatinkinase angereichert. Weiterhin kam perforierter Patch mit dem Perforans Beta-Aescin zum Einsatz. Um auch das extrazelluläre Milieu konstant zu halten, wurde eine kontinuierliche Perfusion installiert. Durch alle diese Maßnahmen konnte keine ausreichende Stabilisierung der Stromamplitude erreicht werden.

Dennoch konnten drei in ihren Strommustern verschiedene Auswärtsströme, nämlich der schnelle Auswärtsstrom I_{Ks} , der langsame Auswärtsstrom I_{Kl} und transiente Auswärtsstrom I_{Ku} unterschieden werden, die aufgrund der bisherigen Studienlage mit großer Wahrscheinlichkeit den bereits identifizierten Kaliumkanälen auf nativen MSC zugeordnet werden können. Demnach entspricht der schnelle Auswärtsstrom I_{Ks} (*Abbildung 19*) einem durch MaxiK-Kanäle vermittelten Strom, für den die Zunahme des Rauschens der Stromspur mit fortschreitender Depolarisation aufgrund seiner vergleichsweise

großen Einzelkanal-Leitfähigkeit bezeichnend ist [29, 30]. Der langsame Auswärtsstrom I_{KI} (*Abbildung 20*) ist durch einen verzögert gleichrichtenden, nicht inaktivierenden Kaliumstrom definiert, der in seinem Muster einem über $eag-K^+$ -Kanäle vermittelten Strom gleicht [29]. Als letzter Strom wurde der transiente Auswärtsstrom I_{Ku} (*Abbildung 21*) identifiziert, der aus einer spannungsabhängigen transienten und einer nicht inaktivierenden Komponente besteht. Der schnelle Aufstrich konnte einem K_V -Kanal zugeordnet werden, die nicht inaktivierende Komponente wurde einem koexprimierten MaxiK-Kanal, I_{KS} entsprechend, zugeschrieben [29].

Warum MSC als nicht erregbare Zellen über eine derart große Vielfalt an teils sehr spezifischen Kaliumkanälen verfügen, ist nicht klar. Durch die Veränderung der Häufigkeit der einzelnen Kaliumströme über die Kulturdauer ist von einem Wechsel des Kaliumstromprofils auszugehen. Die zeitliche Veränderung in der Kaliumkanalexpression über die Kulturdauer wird als in Zusammenhang mit der Proliferation von MSC stehend betrachtet [66]. Desweiteren sind Kaliumkanäle wesentlich an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligt, dessen Änderung ebenfalls in Verbindung mit Proliferation, Progression im Zellzyklus und Differenzierung gebracht wird [67]. Möglicherweise repräsentieren Zellen mit gleichem Kaliumstrommuster Subpopulationen innerhalb der MSC-Population, die eine bestimmte Differenzierung oder dieselbe Phase im Zellzyklus durchlaufen. Eine Koexistenz mehrerer Kaliumkanäle auf einer Zelle konnte aufgrund der fehlenden Möglichkeit der pharmakologischen Inhibition einzelner Kanaltypen nicht ermittelt werden, weshalb die beschriebenen Zellpopulationen anhand ihres prädominanten Kaliumstrommusters klassifiziert wurden.

Wie in *Abbildung 23* ersichtlich, verfügte über die gesamte Kulturdauer hinweg ein Großteil der MSC über den schnellen Auswärtsstrom I_{KS} . Ebenfalls von Beginn an konnte bei einem kleinen Teil der Zellen der verzögert gleichrichtende Strom I_{KI} nachgewiesen werden. Nach 14 Tagen wurde erstmalig der transient auftretende Strom I_{Ku} beobachtet, dessen Anteil mit Dauer der Kultur stetig zunahm und der mit Beendigung der Versuche an Tag

65 bereits bei einem Drittel der Zellen zu finden war. Mit Steigerung des Anteils an I_{Ku} wurde eine Abnahme von I_{Kl} registriert.

Diese Entwicklung soll vor dem Hintergrund der spezifischen Eigenschaften der einzelnen Kaliumkanäle und ihrer physiologischen Expression auf verschiedenen Gewebetypen genauer beleuchtet werden. I_{Ks} steht für einen über MaxiK-Kanäle vermittelten Strom, der aufgrund seiner Aktivierung durch Depolarisation und Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration insbesondere auf erregbaren Zellen gefunden wird, wo er an der Repolarisation nach Aktionspotentialen beteiligt ist [68]. Da ein Großteil der Zellen von Beginn der Kultur an über I_{Ks} verfügte, ist es möglich, dass die Expression dieses Kanals typisch ist für native, undifferenzierte MSC.

Der langsame Strom I_{Kl} wurde einem $eag-K^+$ -Kanal zugeordnet, der auf Myoblasten im Rahmen der Induktion zur Differenzierung beobachtet wurde, was mit einer Hyperpolarisation des Membranpotentials einhergeht. Es ist daher möglich, dass dieser Strom in Verbindung mit dem Zellzyklus steht [69]. Der transient auftretende Strom I_{Ku} entspricht einem Vertreter der K_v -Familie, wie er bei glatten Muskelzellen, Neuronen und Kardiomyozyten beschrieben ist [68]. Durch die offensichtliche Dynamik in der Expression von I_{Kl} und I_{Ku} ist es denkbar, dass sich Zellen mit $eag-K^+$ -Kanal in einer Differenzierungsphase befinden, was durch die in Vorarbeiten beschriebene Hyperpolarisation des Membranpotentials zum Ausdruck gebracht wird [29, 30]. Im Laufe der Kulturdauer verlieren die Zellen den $eag-K^+$ -Kanal und reifen zu Zellen mit K_v -Kanal aus, wobei der Gewebetyp dieser reifen Zelle unklar ist.

4.2.2 BEURTEILUNG DER NATRIUM- UND CALCIUMSTRÖME MESENCHYMALER STAMMZELLEN

Neben Auswärtsströmen konnten bei einem Teil der Zellen Natrium- und Calciumströme nachgewiesen werden. Insbesondere letztere wurden bei eher großen MSC angetroffen. Der Anteil an Zellen mit Natriumstrom war stark spenderabhängig, je nach Zelllinie wiesen 0% bis 57% der Zellen in Passage 2 Natriumströme auf (*Abbildung 25*). Zellen mit Calciumstrom stellten mit 6% einen vergleichsweise geringen Anteil der Zellen in Passage 2 dar (*Abbildung*

42). Die weitergehende Entwicklung des Anteils an MSC mit Natrium- und Calciumströmen, sowie deren Stromdichte über die Kulturdauer, wurde nicht verfolgt, da das eigentliche Ziel der Arbeit die Charakterisierung von MSC in myogener Differenzierung darstellte, welche in Passage 2 eingeleitet wurde. Die Natrium- und Calciumströme der MSC in Passage 2 werden bei der Beurteilung des Differenzierungserfolges von MSC zu glatten Muskelzellen im Kontext ihrer Veränderungen über die Differenzierungsdauer näher beschrieben.

4.3 ELEKTROPHYSIOLOGISCHER VERGLEICH MESENCHYMALER STAMMZELLEN IN MYOGENER DIFFERENZIERUNG, NATIVER MESENCHYMALER STAMMZELLEN UND GLATTER MUSKELZELLEN DES DETRUSORS

4.3.1 VERGLEICH DER AUSWÄRTSSTRÖME I_{KS} , I_{KL} UND I_{KU} UND DES MEMBRANPOTENTIALS

Auf die wichtige Rolle der Kaliumkanalexpression und des Membranpotentials im Zellzyklus, sowie die beobachteten spontanen Veränderungen im Expressionsmusters von Kaliumströmen bei MSC über die Kulturdauer wurde bereits eingegangen. In diesem Abschnitt werden im Gegensatz zu diesen spontanen Veränderungen von Kaliumstrommustern unter gleichbleibenden Kulturbedingungen die Veränderungen von Kaliumstrommustern in Abhängigkeit der Differenzierungsdauer betrachtet. Zunächst ist anzumerken, dass MSC in myogener Differenzierung über dieselben Strommuster für Kaliumströme verfügten wie native MSC und deshalb auf eine nochmalige Beschreibung verzichtet wird.

Als Ausgangspunkt für die Betrachtung dienten MSC in Passage 2, entsprechend Kulturtag 7-8. Bereits hier fiel im Vergleich von *Abbildung 23* und *Abbildung 30* auf, dass die in die myogene Differenzierung eingegangenen Zellen über eine andere Verteilung an Kaliumströmen als die zuvor beschriebenen nativen MSC verfügten. Über die Hälfte der gemessenen Zellen besaß den verzögert gleichrichtenden langsamen Auswärtsstrom I_{KI} und ein kleiner Teil der Zellen bereits den transienten Auswärtsstrom I_{KU} . Wo diese

Differenzen herrühren, bleibt ungeklärt. Infrage kommen Unterschiede im Zeitpunkt des Transports der Zellen (normalerweise wurden Zellen in Passage 1 bezogen, die Zellen für die Differenzierung wurden erst in Passage 2 transportiert), der Kultivierung (Zellen zur Differenzierung wurden nicht in Kulturflaschen, sondern in 6-well-Platten kultiviert), die anfängliche Nichtverwendung von P/n-Protokollen für die Durchführung von Messungen, aber auch zufällige spenderspezifische Unterschiede, auf die von außen kein Einfluss genommen werden kann. Mit Verwendung nur der Messdaten von Zellen in Passage 2, die später in die myogene Differenzierung Eingang fanden, wurde zwar die Zahl an Referenzdaten deutlich reduziert, gleichzeitig wurden jedoch mögliche Störfaktoren wie Unterschiede in Transport, Kultur oder patientenspezifische Besonderheiten minimiert.

Bei Betrachtung der Entwicklung der Kaliumstrommuster von Differenzierungstag 7 bis 21 zeigten sich diese relativ homogen. Im Vergleich zu nativen MSC fiel eine deutliche Zunahme des Anteils an Zellen mit dem langsamen Auswärtsstrom I_{Kl} auf, was ein Hinweis auf die Induktion einer Differenzierung sein könnte. Weiterhin wurde zwischen nativen MSC, d7 und d14 eine Tendenz zur Hyperpolarisation des Membranpotentials (*Abbildung 29*) festgestellt, was diese These weiter untermauert. Im Gegensatz hierzu wiesen SMC über die gesamte Kulturdauer ein durch den schnellen Auswärtsstrom I_{Ks} dominiertes Strommuster auf. Der sich vermutlich dahinter verbergende MaxiK-Kanal ist typisch für reife Myozyten, wurde aber auch bei nativen MSC gefunden. In einer ähnlichen Studie zur glattmuskulären Differenzierung von MSC wurde der Wechsel vom langsamen I_{Kl} zum schnellen I_{Ks} nach 21 Tagen als Differenzierungsmerkmal und damit elektrophysiologische Annäherung der differenzierten MSC an glatte Muskelzellen betrachtet [70]. Unsere genau gegensätzliche Beobachtung mit Zunahme von I_{Kl} und Abnahme von I_{Ks} kann Ausdruck der Induktion einer myogenen Differenzierung sein, die jedoch bis Tag 21 noch nicht abgeschlossen war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Laufe der myogenen Differenzierung Veränderungen im Kaliumstrommuster und konsekutiv im

Membranpotential von MSC registriert wurden, die analog im Zuge der Ausdifferenzierung von myogenen Progenitorzellen beschrieben worden sind [69]. Der Anteil an MSC mit Kaliumkanälen, wie sie auf reifen SMC gefunden werden, nahm unter der Differenzierung ab, über die Ursache kann nur spekuliert werden.

4.3.2 VERGLEICH DER NATRIUMKANÄLE

Der Vergleich der Natriumkanäle zwischen nativen MSC, MSC in myogener Differenzierung und reifen SMC ist insofern besonders wichtig, als dass Natriumströme auf nativen MSC nur in kleiner Stromdichte angetroffen wurden, während die Referenzkultur glatter Muskelzellen über eine statistisch signifikant größere Natriumstromdichte verfügte (*Abbildung 38*). Aus diesem Grund konnte der Natriumkanal als Bindeglied zwischen beiden Zellpopulationen betrachtet werden und war damit potentieller Indikatorstrom für die Evaluation des Differenzierungsfortschrittes von MSC zu glatten Muskelzellen.

Voraussetzung für die Eignung des Natriumstroms als Indikatorstrom war ein vergleichbares pharmakologisches Profil der Natriumkanäle auf nativen MSC, SMC und MSC in Differenzierung, bestenfalls konnte vom selben Na_v -Subtypen ausgegangen werden. Eine ausführliche Charakterisierung des Natriumkanals auf SMC erfolgte bereits mit dem Schluss, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um $\text{Na}_v1.4$ handelte. Auf MSC gestaltete sich die Identifikation des Na_v -Subtyps schwieriger. In der Literatur sind zwar spannungsabhängige Natriumströme auf MSC beschrieben [29], jedoch liegen keine Informationen über den exprimierten Na_v -Subtypen vor. Durch die geringe Stromdichte für Natriumströme auf nativen MSC wurden Messungen oft von kapazitiven Artefakten überlagert. Deshalb wurde sich auf eine Inhibition des Natriumstroms mit Ranolazin beschränkt, da diese als am aussagekräftigsten eingeschätzt wurde. MSC in Differenzierung verfügten über eine größere Natriumstromdichte, weshalb hier eine detailliertere Untersuchung nach der bei SMC beschriebenen Vorgehensweise möglich war. Das machte den direkten Vergleich mit den bei SMC erhobenen Daten möglich.

Für die Versuche mit TTX wurden Zellen an Differenzierungstag 7 verwendet, deren Natriumströme eine typische konzentrations- und aktivierungsabhängige Inhibition präsentierten (*Abbildung 33*). Unter $1\mu\text{M}$ TTX konnte lediglich eine Reduktion der Stromamplitude auf 25% des Ausgangswertes erreicht werden. Ein Beitrag TTX-insensitiver Natriumkanäle konnte durch die zusätzliche Verwendung von Lidocain ausgeschlossen werden. Einer Kontamination durch Calciumströme wurde durch die Präsenz von Cd^{2+} $200\mu\text{M}$ entgegengewirkt. Der verbliebene Reststrom kann somit höchstwahrscheinlich als kapazitives Artefakt betrachtet werden, trotz des Einsatzes von P/n-Protokollen. Die Tatsache, dass die ermittelte IC_{50} für TTX in ihrer Größenordnung nahe dem für SMC publizierten und bestimmten Wert lag, weist auf eine Übereinstimmung des Natriumkanaltyps auf MSC in Differenzierung und SMC hin. Ein ähnliches Verhalten der Natriumströme wurde weiterhin unter Ranolazin (*Abbildung 34*) und ProToxin-II (*Abbildung 35*) beobachtet. Entsprechend der in *Kapitel 4.1.4 Beurteilung der Natriumströme* dargestellten Überlegungen kann somit von einer Übereinstimmung der Na_v -Subtypen auf MSC in myogener Differenzierung und SMC des Detrusors ausgegangen werden. Das bedeutet konkret, dass MSC in myogener Differenzierung mit großer Wahrscheinlichkeit den spannungsabhängigen Natriumkanal $\text{Na}_v1.4$ funktionell exprimieren. Für native MSC ist dieser Schluss zu weit gegriffen, es kann aufgrund des Verhaltens gegenüber Ranolazin als spezifischem Inhibitor für $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.7$ und $\text{Na}_v1.8$ nur davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem beschriebenen Natriumkanal um einen dieser Subtypen handelt, für weitere Aussagen müsste die pharmakologische Charakterisierung ausgeweitet werden.

Die drei untersuchten Zellpopulationen unterschieden sich sowohl statistisch signifikant in ihrer Stromdichte für Natriumströme, als auch in der Häufigkeit des Auftretens dieser Ströme. Das macht die Expressionsdynamik der Natriumströme zu einem geeigneten Indikator für die Beurteilung des Fortschritts der myogenen Differenzierung.

Während der Endpunkt der Differenzierung mit einer weitgehend homogenen Expression von Natriumströmen auf SMC über die Kulturdauer relativ einfach definiert werden konnte (*Abbildung 15*), stellten native MSC eine weitaus größere Herausforderung dar. Von den fünf in die Differenzierung eingehenden Zelllinien wurden vier in Passage 2 untersucht. Der Anteil Zellen mit Natriumstrom schwankte zwischen 0% und 57% und lag im Mittel bei 42%, auch für die Stromdichte differierten die Einzelwerte stark (*Abbildung 25*). Ähnliches gilt für MSC in Differenzierung, die zusätzlich Messausfällen unterworfen waren, für die zunehmende Schwierigkeiten beim Ablösen der Zellen mit Dauer der Differenzierung verantwortlich waren. Einzelwerte mussten daher zusammengefasst werden, um aussagekräftige Zellzahlen zu erreichen (*Abbildung 38*). Es ließ sich dadurch ein Trend bezüglich Stromdichte und Häufigkeit von Natriumströmen über die Dauer der Differenzierung ablesen.

Zwischen nativen MSC und d7 ergab sich eine statistisch signifikante Zunahme der Natriumstromdichte, die im Verlauf der weiteren Differenzierung wieder rückläufig war. Auch der Anteil an Zellen mit Natriumstrom zeigte eine ähnliche Tendenz und gipfelte an d7.

An d21 erhobene Werte sind grundsätzlich als kritisch zu betrachten, da aufgrund des großflächigen Ablösens der Zellen keine vergleichbaren Kultur- und Differenzierungsbedingungen gewährleistet werden konnten. Weiterhin unterschieden sich die erhobenen Natriumstromgrößen statistisch nicht signifikant von denen der übrigen Tage, was als Folge einer großen Streuung der Messwerte interpretiert wurde.

Die Dynamik der Natriumkanalexpression über die ersten sieben Tage der Differenzierung wurde nochmals eingehend beleuchtet (*Abbildung 36*). Die maximale Dichte an Natriumströmen fand sich nach einem kontinuierlichen Anstieg an d6. Anteilsmäßig wurden die meisten Zellen mit Natriumstrom an d5 nachgewiesen. Damit schien nach einer Differenzierungsdauer von 5-7 Tagen ein Optimum bezüglich der Stromdichte und der Häufigkeit von Natriumströmen erreicht zu sein.

4.3.3 VERGLEICH DER CALCIUMKANÄLE

Auf nativen MSC wurden L-Typ Calciumkanäle insbesondere auf Zellen mit großer Membrankapazität beschrieben [29, 30]. Da Calciumströme lediglich auf 6% der nativen MSC nachgewiesen werden konnten, war nur eine Inhibition mit Cd^{2+} möglich (*Abbildung 26*). Calciumkanäle der in Differenzierung befindlichen MSC konnten durch Nifedipin partiell inhibiert werden, es handelte sich demnach um L-Typ Calciumkanäle (*Abbildung 41*). Ein verbleibender Reststrom kann durch die Überlagerung koexistenter Natriumkanäle erklärt werden (*Abbildung 43*).

Im Vergleich zu nativen MSC stieg der Anteil an Zellen mit Calciumstrom von 6% auf maximal 25% an d14, um an d21 bei 18% zu stagnieren (*Abbildung 42*). Über die Entwicklung der Stromdichte von Calciumströmen eine Aussage zu treffen, war aufgrund der geringen Zahl gemessener Zellen schwierig.

Wie bereits beschrieben, gelang der Nachweis von Calciumströmen auf SMC nicht. Allerdings konnten im Calciumimaging (durchgeführt von Dr. U. Kraushaar, Daten nicht dargestellt) Calciumströme bei SMC dargestellt werden, die möglicherweise methodenbedingt zu klein waren, um mittels Patch-Clamp-Technik detektiert zu werden.

In jedem Fall ist der Nachweis von L-Typ Calciumkanälen und die Zunahme des Anteils an Zellen mit Calciumstrom unter Differenzierung als positiv zu werten. Diese wesentlich an der Generierung von Aktionspotentialen in glatten Muskelzellen beteiligten Kanäle können als Ausdruck einer funktionellen Annäherung der MSC in Differenzierung an glatte Muskelzellen betrachtet werden.

4.3.4 BESTIMMUNG DES OPTIMALEN DIFFERENZIERUNGSZEITPUNKTS AUS ELEKTROPHYSIOLOGISCHER SICHT

Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts in der myogenen Differenzierung von MSC zu glatten Muskelzellen müssen die zuvor ausgearbeiteten Punkte unterschiedlich gewichtet werden.

Bezüglich des Strommusters der als Kaliumströme interpretierten Auswärtsströme verfügten native MSC und SMC über große Ähnlichkeiten. Mit Beginn der myogenen Differenzierung entfernten sie sich in ihrem Kaliumstrommuster von dem reifer SMC. Diese Beobachtung hielt sich über die Dauer der Differenzierung konstant, das Kaliumstromprofil ist somit kein geeigneter Parameter zur Bestimmung des optimalen Differenzierungszeitpunktes.

Der Vergleich des Membranpotentials zeigte eine maximale Hyperpolarisation an d7, wie sie bei reifen glatten Muskelzellen beschrieben ist. Diese Aussage kann nicht durch eine statistische Signifikanz untermauert werden, zudem wiesen die als Referenz dienenden glatten Muskelzellen im Vergleich zu Literaturwerten eine zu geringe Hyperpolarisation auf, weshalb dieser Punkt nur als Tendenz in die Betrachtung eingehen kann.

Weiterhin wurde eine Dynamik in der Expression von Calciumkanälen aufgedeckt, wobei der größte Anteil an Zellen mit Calciumstrom an d7 und d14 beobachtet wurde und ein wichtiges Merkmal in der Evaluation des Differenzierungserfolgs darstellt.

Der Natriumstrom, vermittelt über $Na_v1.4$ und Bindeglied zwischen den untersuchten Zelllinien, wurde als Indikatorstrom für den Fortschritt der myogenen Differenzierung gewählt und fällt für die Evaluation der Differenzierung am stärksten ins Gewicht. Er zeigte eine maximale Stromdichte an d6, der prozentual größte Anteil an Zellen mit Natriumstrom fand sich an d5.

Insgesamt scheint demnach um Differenzierungstag 7 ein optimaler Zeitpunkt in der Differenzierung erreicht zu sein, bei dem MSC in myogener Differenzierung glatten Muskelzellen am ähnlichsten sind.

4.3.5 KRITISCHE BETRACHTUNG DES DIFFERENZIERUNGSERFOLGS

Zunächst ist festzustellen, dass MSC unter myogener Differenzierung verschiedene elektrophysiologische Merkmale entwickelten, die sie von nativen MSC abheben. In vielerlei Hinsicht wurde dadurch eine Annäherung an glatte

Muskelzellen beobachtet, dies gilt insbesondere für die Expression von Natrium- und Calciumkanälen. Bezüglich ihres Kaliumstromprofils wurde eine Dynamik registriert, die für den Anstoß einer Differenzierung spricht, gleiches gilt für die Veränderungen des Ruhemembranpotentials.

Trotz dieser elektrophysiologischen Annäherungen dürfen die untersuchten Zellen weder an d7, noch an einem anderen Differenzierungstag, als glatte Muskelzellen bezeichnet werden. Bezüglich ihrer mit der manuellen Patch-Clamp-Technik bestimmbaren Eigenschaften kann allenfalls von *muskelähnlichen* Zellen die Rede sein. Ihrer Eignung zur Regeneration des geschädigten Sphinkters muss dies jedoch keinen Abbruch tun. Die Unreife der myogen „andifferenzierten“ MSC kann vielmehr von Nutzen sein, da mit Einbringung in den geschädigten urethralen Sphinkter eine weitere Ausdifferenzierung und bessere funktionelle Integration in das bestehende Synzytium möglich ist, was wiederum größere Erfolge in der zellbasierten Regeneration des urethralen Sphinktersystems verspricht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die stammzellbasierte Regeneration des urethralen Sphinktersystems stellt eine vielversprechende Therapieoption der Belastungsinkontinenz dar. Die hierfür gewählten mesenchymalen Stammzellen wurden zunächst einer *in vitro*-Differenzierung zu glatten Muskelzellen unterzogen, deren Erfolg neben dem Nachweis muskelspezifischer Proteine auch auf funktioneller Ebene evaluiert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die elektrophysiologische Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung mithilfe der manuellen Patch-Clamp-Technik mit dem Ziel der Findung des optimalen Differenzierungszeitpunktes. Die über maximal 21 Tage in Differenzierung befindlichen mesenchymalen Stammzellen wurden im Hinblick auf ihre Expression von Natrium-, Kalium- und Calciumkanälen, sowie ihres Membranpotentials untersucht und mit zuvor erhobenen Daten von nativen mesenchymalen Stammzellen und glatten Muskelzellen des humanen M. detrusor vesicae verglichen. Bereits nach sieben Tagen in Differenzierung wiesen sie eine signifikante Zunahme ihrer Natriumstromdichte auf, die im Verlauf der weiteren Differenzierung rückläufig war. Calciumströme wurden ab Differenzierungstag 7 viermal häufiger beobachtet als bei nativen mesenchymalen Stammzellen. Die Veränderungen im Kaliumstromprofil im Vergleich zu nativen mesenchymalen Stammzellen blieben über die Dauer der Differenzierung konstant, unterschieden sich jedoch stark vom Kaliumstromprofil von reifen glatten Muskelzellen, was als Hinweis für einen noch ablaufenden Differenzierungsvorgang gewertet wurde. Eine Hyperpolarisation des Membranpotentials gipfelte an Differenzierungstag 7, war statistisch jedoch nicht signifikant.

Aus elektrophysiologischer Sicht kann zwar nicht von einer Ausreifung, jedoch zumindest von einer *Andifferenzierung* der mesenchymalen Stammzellen zu glatten Muskelzellen ausgegangen werden, die um Differenzierungstag 7 ihr Optimum erreicht. Um die funktionelle Untersuchung zu vervollständigen, sollten zusätzlich Methoden zur Überprüfung der Kontraktilität und elektro- und pharmakomechanischen Kopplung der in Differenzierung befindlichen mesenchymalen Stammzellen zum Einsatz kommen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABRAMS, P., ET AL., *THE STANDARDISATION OF TERMINOLOGY OF LOWER URINARY TRACT FUNCTION: REPORT FROM THE STANDARDISATION SUB-COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL CONTINENCE SOCIETY*. AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, 2002. **187**(1): P. 116-26.
2. BEUTEL, M.E., ET AL., [*PREVALENCE OF URINARY INCONTINENCE IN THE GERMAN POPULATION*]. DER UROLOGE. AUSG. A, 2005. **44**(3): P. 232-8.
3. PERABO, F., *INKONTINENZ, FRAGEN UND ANTWORTEN*, ED. S. MÜLLER. VOL. 1. 2009, KÖLN: DEUTSCHER ARZTEVERLAG GMBH.
4. BEUTEL, M.E., ET AL., [*PREVALENCE OF URINARY INCONTINENCE IN THE GERMAN POPULATION*]. UROLOGE A, 2005. **44**(3): P. 232-8.
5. PAPANICOLAOU, S., ET AL., *MEDICAL RESOURCE UTILISATION AND COST OF CARE FOR WOMEN SEEKING TREATMENT FOR URINARY INCONTINENCE IN AN OUTPATIENT SETTING. EXAMPLES FROM THREE COUNTRIES PARTICIPATING IN THE PURE STUDY*. MATURITAS, 2005. **52 SUPPL 2**: P. S35-47.
6. SCHULTE, E.E.A., *ANATOMIE. DUALE REIHE*, ED. A. BOB AND K. BOB. VOL. 1. 2007, STUTTGART: GEORG THIEME VERLAG.
7. JUNG, J., H.K. AHN, AND Y. HUH, *CLINICAL AND FUNCTIONAL ANATOMY OF THE URETHRAL SPHINCTER*. INTERNATIONAL NEUROUROLOGY JOURNAL, 2012. **16**(3): P. 102-6.
8. *BLADDER ANATOMY*. ZUGRIFF 26.08.2014]; AVAILABLE FROM: [HTTP://DROUALB.FACULTY.MJC.EDU/COURSE%20MATERIALS/PHYSIOLOGY%20101/CHAPTER%20NOTES/FALL%202007/FIGURE_18_21_LABELED.JPG](http://droualb.faculty.mjc.edu/course%20materials/physiology%20101/chapter%20notes/fall%202007/figure_18_21_labeled.jpg)).
9. ANDERSSON, K.E. AND A. ARNER, *URINARY BLADDER CONTRACTION AND RELAXATION: PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY*. PHYSIOLOGICAL REVIEWS, 2004. **84**(3): P. 935-86.
10. MONZ, B., ET AL., *PATIENT CHARACTERISTICS ASSOCIATED WITH QUALITY OF LIFE IN EUROPEAN WOMEN SEEKING TREATMENT FOR URINARY INCONTINENCE: RESULTS FROM PURE*. EUROPEAN UROLOGY, 2007. **51**(4): P. 1073-81; DISCUSSION 1081-2.
11. STRASSER, H., ET AL., *AGE DEPENDENT APOPTOSIS AND LOSS OF RHABDOSPHINCTER CELLS*. THE JOURNAL OF UROLOGY, 2000. **164**(5): P. 1781-5.
12. VAEGLER, M., ET AL., [*CELL-BASED THERAPY TO TREAT STRESS URINARY INCONTINENCE: WHICH CELL TYPE AT WHAT COST?*]. DER UROLOGE. AUSG. A, 2014. **53**(3): P. 354-61.
13. GRAF, P. AND S. WIRSCHING, *REGENERATIVE MEDIZIN - SELBSTTHEILUNGSKRAFT DES KÖRPERS VERSTEHEN UND NUTZEN*, R.G. BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG (BMBF), EDITOR 2013, BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG (BMBF), REFERAT GESUNDHEITSWIRTSCHAFT: BERLIN.
14. KLINKE, R., H.-C. PAPE, AND S. SILBERNAGEL, *PHYSIOLOGIE, 5. KOMPLETT ÜBERARBEITETE AUFLAGE*, ED. R. KLINKE, H.-C. PAPE, AND S. SILBERNAGEL 2005, STUTTGART, GERMANY: GEORG THIEME VERLAG KG.
15. DEETJEN, P., E.-J. SPECKMANN, AND J. HESCHELER, *PHYSIOLOGIE, 4. VOLLSTÄNDIG ÜBERARBEITETE AUFLAGE*. VOL. 1. 2005, MÜNCHEN: ELSEVIER GMBH, MÜNCHEN.
16. BRADING, A.F., *SPONTANEOUS ACTIVITY OF LOWER URINARY TRACT SMOOTH MUSCLES: CORRELATION BETWEEN ION CHANNELS AND TISSUE FUNCTION*. THE JOURNAL OF PHYSIOLOGY, 2006. **570**(PT 1): P. 13-22.

17. THEILE, J.W. AND T.R. CUMMINS, *RECENT DEVELOPMENTS REGARDING VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL BLOCKERS FOR THE TREATMENT OF INHERITED AND ACQUIRED NEUROPATHIC PAIN SYNDROMES*. FRONTIERS IN PHARMACOLOGY, 2011. **2**: P. 54.
18. XIONG, Z., ET AL., *FAST Na⁺ CURRENT IN CIRCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE LARGE INTESTINE*. PFLUGERS ARCHIV : EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, 1993. **423**(5-6): P. 485-91.
19. BRADLEY, E., ET AL., *THE CARDIAC SODIUM CURRENT Na^v1.5 IS FUNCTIONALLY EXPRESSED IN RABBIT BRONCHIAL SMOOTH MUSCLE CELLS*. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. CELL PHYSIOLOGY, 2013. **305**(4): P. C427-35.
20. ZHU, H.L., ET AL., *CHARACTERIZATION OF NAV1.6-MEDIATED Na⁺ CURRENTS IN SMOOTH MUSCLE CELLS ISOLATED FROM MOUSE VAS DEFERENS*. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, 2010. **223**(1): P. 234-43.
21. THORNELOE, K.S. AND M.T. NELSON, *PROPERTIES OF A TONICALLY ACTIVE, SODIUM-PERMEABLE CURRENT IN MOUSE URINARY BLADDER SMOOTH MUSCLE*. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. CELL PHYSIOLOGY, 2004. **286**(6): P. C1246-57.
22. PANFILI, M., ET AL., *RANOLAZINE-INDUCED SEVERE BLADDER HYPOTONIA*. THE ANNALS OF PHARMACOTHERAPY, 2012. **46**(9): P. E24.
23. PITTENGER, M.F., *MULTILINEAGE POTENTIAL OF ADULT HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS*. SCIENCE, 1999. **284**(5411): P. 143-147.
24. ZUK, P.A., ET AL., *HUMAN ADIPOSE TISSUE IS A SOURCE OF MULTIPOTENT STEM CELLS*. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 2002. **13**(12): P. 4279-95.
25. FUKUCHI, Y., ET AL., *HUMAN PLACENTA-DERIVED CELLS HAVE MESENCHYMAL STEM/PROGENITOR CELL POTENTIAL*. STEM CELLS, 2004. **22**(5): P. 649-58.
26. DOMINICI, M., ET AL., *MINIMAL CRITERIA FOR DEFINING MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS*. THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY POSITION STATEMENT. CYTOTHERAPY, 2006. **8**(4): P. 315-7.
27. LI, X., ET AL., *COMPREHENSIVE CHARACTERIZATION OF FOUR DIFFERENT POPULATIONS OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AS REGARDS THEIR IMMUNE PROPERTIES, PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION*. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, 2014.
28. TOMIC, S., ET AL., *IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM DENTAL PULP AND DENTAL FOLLICLE ARE SUSCEPTIBLE TO ACTIVATION BY TOLL-LIKE RECEPTOR AGONISTS*. STEM CELLS AND DEVELOPMENT, 2011. **20**(4): P. 695-708.
29. LI, G.R., ET AL., *CHARACTERIZATION OF IONIC CURRENTS IN HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS FROM BONE MARROW*. STEM CELLS, 2005. **23**(3): P. 371-82.
30. HEUBACH, J.F., ET AL., *ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS*. THE JOURNAL OF PHYSIOLOGY, 2004. **554**(PT 3): P. 659-72.
31. AREF-ADIB, M., ET AL., *STEM CELL THERAPY FOR STRESS URINARY INCONTINENCE: A SYSTEMATIC REVIEW IN HUMAN SUBJECTS*. ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, 2013. **288**(6): P. 1213-21.
32. HART, M.L., ET AL., *CELL-BASED THERAPY FOR THE DEFICIENT URINARY SPHINCTER*. CURRENT UROLOGY REPORTS, 2013. **14**(5): P. 476-87.
33. SMALDONE, M.C. AND M.B. CHANCELLOR, *MUSCLE DERIVED STEM CELL THERAPY FOR STRESS URINARY INCONTINENCE*. WORLD JOURNAL OF UROLOGY, 2008. **26**(4): P. 327-32.
34. KLEINERT, S. AND R. HORTON, *RETRACTION--AUTOLOGOUS MYOBLASTS AND FIBROBLASTS VERSUS COLLAGEN [CORRECTED] FOR TREATMENT OF STRESS*

- URINARY INCONTINENCE IN WOMEN: A [CORRECTED] RANDOMISED CONTROLLED TRIAL. LANCET, 2008. **372**(9641): P. 789-90.
35. JIANG, Y., ET AL., *PLURIPOTENCY OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM ADULT MARROW*. NATURE, 2002. **418**(6893): P. 41-9.
 36. GUNETTI, M., ET AL., *MYOGENIC POTENTIAL OF WHOLE BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS IN VITRO AND IN VIVO FOR USAGE IN URINARY INCONTINENCE*. PLOS ONE, 2012. **7**(9): P. E45538.
 37. YAMAMOTO, T., ET AL., *PERIURETHRAL INJECTION OF AUTOLOGOUS ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS FOR THE TREATMENT OF STRESS URINARY INCONTINENCE IN PATIENTS UNDERGOING RADICAL PROSTATECTOMY: REPORT OF TWO INITIAL CASES*. INTERNATIONAL JOURNAL OF UROLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE JAPANESE UROLOGICAL ASSOCIATION, 2010. **17**(1): P. 75-82.
 38. KIM, S.O., ET AL., *BONE-MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION ENHANCES CLOSING PRESSURE AND LEAK POINT PRESSURE IN A FEMALE URINARY INCONTINENCE RAT MODEL*. UROLOGIA INTERNATIONALIS, 2011. **86**(1): P. 110-6.
 39. DU, X.W., ET AL., *EXPERIMENTAL STUDY OF THERAPY OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS OR MUSCLE-LIKE CELLS/CALCIUM ALGINATE COMPOSITE GEL FOR THE TREATMENT OF STRESS URINARY INCONTINENCE*. NEUROUROLOGY AND URODYNAMICS, 2013. **32**(3): P. 281-6.
 40. KINEBUCHI, Y., ET AL., *AUTOLOGOUS BONE-MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION INTO INJURED RAT URETHRAL SPHINCTER*. INTERNATIONAL JOURNAL OF UROLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE JAPANESE UROLOGICAL ASSOCIATION, 2010. **17**(4): P. 359-68.
 41. SHABBIR, A., ET AL., *HEART FAILURE THERAPY MEDIATED BY THE TROPHIC ACTIVITIES OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS: A NONINVASIVE THERAPEUTIC REGIMEN*. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY, 2009. **296**(6): P. H1888-97.
 42. LAGOSTENA, L., ET AL., *ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF MOUSE BONE MARROW C-KIT+ CELLS CO-CULTURED ONTO NEONATAL CARDIAC MYOCYTES*. CARDIOVASCULAR RESEARCH, 2005. **66**(3): P. 482-92.
 43. SCHERSCHEL, J.A., ET AL., *ADULT BONE MARROW-DERIVED CELLS DO NOT ACQUIRE FUNCTIONAL ATTRIBUTES OF CARDIOMYOCYTES WHEN TRANSPLANTED INTO PERI-INFARCT MYOCARDIUM*. MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, 2008. **16**(6): P. 1129-37.
 44. WEI, F., ET AL., *MESENCHYMAL STEM CELLS NEITHER FULLY ACQUIRE THE ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF MATURE CARDIOMYOCYTES NOR PROMOTE VENTRICULAR ARRHYTHMIAS IN INFARCTED RATS*. BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY, 2012. **107**(4): P. 274.
 45. STENZL, A. AND W. AICHER. *KLINISCHE FORSCHERGRUPPE 273*. 2014; AVAILABLE FROM: WWW.KFO273.ORG.
 46. HODGKIN, A.L. AND A.F. HUXLEY, *A QUANTITATIVE DESCRIPTION OF MEMBRANE CURRENT AND ITS APPLICATION TO CONDUCTION AND EXCITATION IN NERVE*. THE JOURNAL OF PHYSIOLOGY, 1952. **117**(4): P. 500-44.
 47. KLINKE, R., H.-C. PAPE, AND S. SILBERNAGEL, *PHYSIOLOGIE*. VOL. 1. 2005, STUTTGART: GEORG THIEME VERLAG KG.
 48. NUMBERGER, M. AND A. DRAGUHN, *PATCH-CLAMP-TECHNIK MIT EINEM GELEITWORT VON BERT SAKMANN*. LABOR IM FOKUS, ED. M. NUMBERGER 1996, HEIDELBERG, BERLIN, OXFORD: SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG GMBH.
 49. HODGKIN, A.L. AND A.F. HUXLEY, *CURRENTS CARRIED BY SODIUM AND POTASSIUM IONS THROUGH THE MEMBRANE OF THE GIANT AXON OF LOLIGO*. THE JOURNAL OF PHYSIOLOGY, 1952. **116**(4): P. 449-72.

50. MOLLEMAN, A., *PATCH CLAMPING: AN INTRODUCTORY GUIDE TO PATCH CLAMP ELECTROPHYSIOLOGY* 2003, WEST SUSSEX, ENGLAND: JOHN WILEY & SONS LTD.
51. SCHÄFER, L., *ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS*, IN *APPLIED LIFE SCIENCE* 2013, UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES: KAISERSLAUTERN.
52. LIU, R., K.L. LESLIE, AND K.A. MARTIN, *EPIGENETIC REGULATION OF SMOOTH MUSCLE CELL PLASTICITY*. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, 2014.
53. VILAMAIOR, P.S., S.R. TABOGA, AND H.F. CARVALHO, *MODULATION OF SMOOTH MUSCLE CELL FUNCTION: MORPHOLOGICAL EVIDENCE FOR A CONTRACTILE TO SYNTHETIC TRANSITION IN THE RAT VENTRAL PROSTATE AFTER CASTRATION*. *CELL BIOLOGY INTERNATIONAL*, 2005. **29**(9): P. 809-16.
54. SUI, G.P., C. WU, AND C.H. FRY, *THE ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF CULTURED AND FRESHLY ISOLATED DETRUSOR SMOOTH MUSCLE CELLS*. *THE JOURNAL OF UROLOGY*, 2001. **165**(2): P. 627-32.
55. SUI, G.P., C. WU, AND C.H. FRY, *INWARD CALCIUM CURRENTS IN CULTURED AND FRESHLY ISOLATED DETRUSOR MUSCLE CELLS: EVIDENCE OF A T-TYPE CALCIUM CURRENT*. *THE JOURNAL OF UROLOGY*, 2001. **165**(2): P. 621-6.
56. WANG, G.K., J. CALDERON, AND S.Y. WANG, *STATE- AND USE-DEPENDENT BLOCK OF MUSCLE NAV1.4 AND NEURONAL NAV1.7 VOLTAGE-GATED Na⁺ CHANNEL ISOFORMS BY RANOLAZINE*. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*, 2008. **73**(3): P. 940-8.
57. GOULD, H.J., 3RD, ET AL., *RANOLAZINE ATTENUATES BEHAVIORAL SIGNS OF NEUROPATHIC PAIN*. *BEHAVIOURAL PHARMACOLOGY*, 2009. **20**(8): P. 755-8.
58. SCHMALHOFER, W.A., ET AL., *PROTx-II, A SELECTIVE INHIBITOR OF NAV1.7 SODIUM CHANNELS, BLOCKS ACTION POTENTIAL PROPAGATION IN NOCICEPTORS*. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*, 2008. **74**(5): P. 1476-84.
59. GROOME, J.R., ET AL., *NAV1.4 MUTATIONS CAUSE HYPOKALAEMIC PERIODIC PARALYSIS BY DISRUPTING IIIIS4 MOVEMENT DURING RECOVERY*. *BRAIN : A JOURNAL OF NEUROLOGY*, 2014. **137**(PT 4): P. 998-1008.
60. SILVA, J.R. AND S.A. GOLDSTEIN, *VOLTAGE-SENSOR MOVEMENTS DESCRIBE SLOW INACTIVATION OF VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNELS I: WILD-TYPE SKELETAL MUSCLE Na(V)1.4*. *THE JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY*, 2013. **141**(3): P. 309-21.
61. HO, W.S., ET AL., *EFFECTIVE CONTRACTILE RESPONSE TO VOLTAGE-GATED Na⁺ CHANNELS REVEALED BY A CHANNEL ACTIVATOR*. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. CELL PHYSIOLOGY*, 2013. **304**(8): P. C739-47.
62. BERTOLO, A., ET AL., *AN IN VITRO EXPANSION SCORE FOR TISSUE-ENGINEERING APPLICATIONS WITH HUMAN BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS*. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE*, 2013.
63. RUSSELL, K.C., ET AL., *IN VITRO HIGH-CAPACITY ASSAY TO QUANTIFY THE CLONAL HETEROGENEITY IN TRILINEAGE POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS REVEALS A COMPLEX HIERARCHY OF LINEAGE COMMITMENT*. *STEM CELLS*, 2010. **28**(4): P. 788-98.
64. CHOUDHERY, M.S., ET AL., *DONOR AGE NEGATIVELY IMPACTS ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL EXPANSION AND DIFFERENTIATION*. *JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE*, 2014. **12**: P. 8.
65. HO, J.H., ET AL., *CELL CONTACT ACCELERATES REPLICATIVE SENESCENCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS INDEPENDENT OF TELOMERE SHORTENING AND P53 ACTIVATION: ROLES OF RAS AND OXIDATIVE STRESS*. *CELL TRANSPLANTATION*, 2011. **20**(8): P. 1209-20.

66. WANG, S.P., ET AL., *POTASSIUM CHANNEL CURRENTS IN RAT MESENCHYMAL STEM CELLS AND THEIR POSSIBLE ROLES IN CELL PROLIFERATION*. CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY & PHYSIOLOGY, 2008. **35**(9): P. 1077-84.
67. SUNDELACRUZ, S., M. LEVIN, AND D.L. KAPLAN, *ROLE OF MEMBRANE POTENTIAL IN THE REGULATION OF CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION*. STEM CELL REVIEWS, 2009. **5**(3): P. 231-46.
68. ASHCROFT, F.M., *ION CHANNELS AND DISEASE* 2000, SAN DIEGO, USA: ACADEMIC PRESS.
69. BAUER, C.K. AND J.R. SCHWARZ, *PHYSIOLOGY OF EAG K⁺ CHANNELS*. THE JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY, 2001. **182**(1): P. 1-15.
70. BONNET, P., ET AL., *ELECTROPHYSIOLOGICAL MATURATION OF RAT MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER INDUCTION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL DIFFERENTIATION IN VITRO*. STEM CELLS AND DEVELOPMENT, 2008. **17**(6): P. 1131-40.

7. ANHANG

7.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Anatomie der weiblichen Harnblase und Urethra	2
Abbildung 2: Schaltbild eines Patch-Clamp-Vorverstärkers	21
Abbildung 3: Patch-Clamp-Messung an einer mesenchymalen Stammzelle....	29
Abbildung 4: Gesamtprotokoll zur allgemeinen Charakterisierung der auf einer Zelle vorhandenen Ströme.	30
Abbildung 5: Natriumprotokoll zur Messung von Natriumströmen.	31
Abbildung 6: Calciumprotokoll zur Messung von Calciumströmen.	31
Abbildung 7: Protokoll Test 30mV zur Überprüfung der Stromstabilität von Kaliumströmen bei MSC.....	32
Abbildung 8: Zellkultur glatter Muskelzellen.	35
Abbildung 9: Schneller Auswärtsstrom I_{Ks} auf einer glatten Muskelzelle.....	37
Abbildung 10: Einwärtsströme glatter Muskelzellen	39
Abbildung 11: Einwärtsstrom einer glatten Muskelzelle unter Zugabe von 50 μ M Nifedipin	40
Abbildung 12: Verhalten des Einwärtsstroms unter Veränderung der extrazellulären Natriumkonzentration.	41
Abbildung 13: Inhibition des Natriumstroms glatter Muskelzellen durch TTX...	43
Abbildung 14: Inhibition von Natriumströmen glatter Muskelzellen durch ProToxin-II.....	45
Abbildung 15: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen glatter Muskelzellen über die Kulturdauer	47
Abbildung 16: Möglicher Calciumstrom einer glatten Muskelzelle	48
Abbildung 17: Zellkultur mesenchymaler Stammzellen.	49
Abbildung 18: Stromantworten einer mesenchymalen Stammzelle auf repetitive Depolarisation	51
Abbildung 19: Schneller Auswärtsstrom I_{Ks} einer mesenchymalen Stammzelle.....	53
Abbildung 20: Langsamer Auswärtsstrom I_{Kl} einer mesenchymalen Stammzelle.....	54

Abbildung 21: Überschießender Auswärtsstrom I_{Ku} einer mesenchymalen Stammzelle.....	55
Abbildung 22: Grafischer Vergleich der Auswärtsstrommuster I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} mesenchymaler Stammzellen	56
Abbildung 23: Prozentualer Anteil der Auswärtsströme I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} mesenchymaler Stammzellen über die Kulturdauer.	57
Abbildung 24: Einwärtsströme mesenchymaler Stammzellen.	59
Abbildung 25: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen mesenchymaler Stammzellen in Passage 2 bei Zelllinien verschiedener Spender.....	60
Abbildung 26: Weiterer Einwärtsstrom einer mesenchymalen Stammzellen....	62
Abbildung 27: Inhibition eines Calciumstroms auf einer mesenchymalen Stammzelle durch $200\mu\text{M Cd}^{2+}$	62
Abbildung 28: Zellkultur mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung	64
Abbildung 29: Vergleich der Membrankapazitäten und des Ruhemembranpotentials	66
Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Auswärtsströme I_{Ks} , I_{Kl} und I_{Ku} im Vergleich	67
Abbildung 31: Strom-Spannungs-Kurve der Natriumstromdichten der verschiedenen Zellpopulationen im Vergleich.	68
Abbildung 32: Vergleich der Natriumstromgrößen bei +20mV in Abhängigkeit von der Membrankapazität.	69
Abbildung 33: Inhibition des Natriumstroms mesenchymaler Stammzellen an Tag 7 der myogenen Differenzierung durch TTX	70
Abbildung 34: Vergleich der Natriumstrominhibition durch Ranolazin $100\mu\text{M}$..	72
Abbildung 35: Vergleich der Natriumstrominhibition durch ProToxin-II 2nM und 100nM	73
Abbildung 36: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen innerhalb einer Zelllinie von mesenchymalen Stammzellen in myogener Differenzierung über die Differenzierungsdauer	74

Abbildung 37: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen verschiedener Zelllinien mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung über die Differenzierungsdauer	75
Abbildung 38: Stromdichte und prozentualer Anteil von Natriumströmen im Vergleich	77
Abbildung 39: Strom-Spannungs-Kurve von Calciumströmen nativer mesenchymaler Stammzellen und mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung	79
Abbildung 40: Inhibition eines Calciumstroms einer mesenchymalen Stammzelle in myogener Differenzierung durch Nifedipin 50µM	80
Abbildung 41: Inhibition von Calciumströmen mesenchymaler Stammzellen in myogener Differenzierung durch 200µM Cd ²⁺ und 50µM Nifedipin	81
Abbildung 42: Stromdichte und prozentualer Anteil von Calciumströmen über die Differenzierungsdauer	82
Abbildung 43: Koexistenz von Natrium- und Calciumkanälen bei einer mesenchymalen Stammzelle in myogener Differenzierung.....	83

7.2 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Kulturmedium MSC.....	15
Tabelle 2: Einfriermedium MSC.....	15
Tabelle 3: Kulturmedium SMC.....	15
Tabelle 4: Einfriermedium SMC.....	15
Tabelle 5: Myogenes Differenzierungsmedium	15
Tabelle 6: Lösungen Zellkultur	16
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien Zellkultur	16
Tabelle 8: Geräte Zellkultur	16
Tabelle 9: Substanzen zur Patch-Clamp-Messung	22
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien zur Patch-Clamp-Messung.....	22
Tabelle 11: Geräte zur Patch-Clamp-Messung	23
Tabelle 12: Extrazellulärlösung für MSC und SMC zur Messung von Kaliumströmen	23

Tabelle 13: Extrazellulärlösung für MSC und SMC zur Messung von Natrium- und Calciumströmen.....	24
Tabelle 14: NaCl- und NMDG-Konzentrationen zur Substitution von Na ⁺ in der Extrazellulärlösung	24
Tabelle 15: Intrazellulärlösung für MSC zur Messung von Kaliumströmen.....	25
Tabelle 16: Intrazellulärlösung für SMC zur Messung von Kaliumströmen.....	25
Tabelle 17: Intrazellulärlösung für MSC und SMC zur Messung von Natrium- und Calciumströmen.....	25
Tabelle 18: Darstellung des extrapolierten und errechneten Gleichgewichtspotentials für Na ⁺ in Abhängigkeit der extrazellulären Na ⁺ -Konzentration	42
Tabelle 19: Statistischer Vergleich der Stromdichte für Natriumströme zwischen den einzelnen Zellpopulationen.....	78

8. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Konzeption der Studie oblag Herrn Dr. rer. nat. Udo Kraushaar. Er war für die methodische Einarbeitung und wissenschaftliche Betreuung der Dissertation verantwortlich.

Die mesenchymalen Stammzellen wurden durch Frau Tanja Abruzzese, technische Assistentin, isoliert und charakterisiert, weiterhin führte sie die myogene Differenzierung der Zellen durch.

Die Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen erfolgte in Eigenleistung. Die Zellkultur der glatten Muskelzellen wurde in Gemeinschaftsarbeit mit Frau Dipl.-Biol. Sandra Buckenmaier durchgeführt, die ebenfalls an der technischen Einarbeitung beteiligt war.

Sämtliche angeführten Versuche wurden, begonnen bei der Vorbereitung bis zur statistischen Auswertung, eigenständig von mir durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig, unter Korrektur durch Dr. Kraushaar, verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.