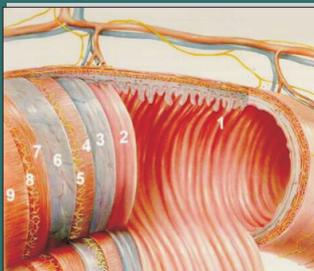
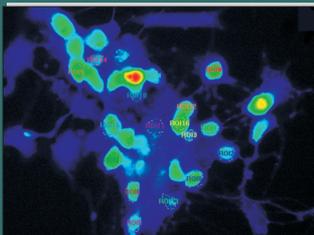
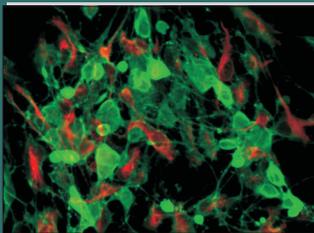




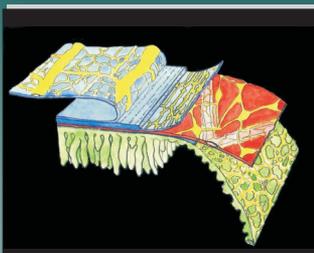
Funktionelle Charakterisierung spannungsabhängiger Calciumkanäle am Plexus myentericus der Ratte



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



NINA SCHÄUFELE



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2004

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

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

Funktionelle Charakterisierung spannungsabhängiger Calciumkanäle am Plexus myentericus der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Nina Schäufele
Tierärztin aus
Darmstadt

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Diener
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Clauss

Tag der Disputation: 14.10.2004

In Erinnerung an meine Großeltern
Elisabeth Fritz und Dr. Friedrich Fritz

Was wir wissen ist ein Tropfen, was wir nicht wissen ein Ozean.

(Sir Isaac Newton, 1643 - 1727)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
I Einleitung	3
I.1 Enterales Nervensystem	3
I.1.1 <i>Morphologische und funktionelle Differenzierung enteraler Neurone</i>	5
I.1.2 <i>Pathophysiologische Bedeutung des enteralen Nervensystems</i>	8
I.1.3 <i>Acetylcholin als enteraler Neurotransmitter</i>	10
I.1.4 <i>Second messenger als Boten für extrazellulärer Signale</i>	11
I.2 Calcium als intrazellulärer Botenstoff	13
I.2.1 <i>Calcium-Rekrutierung an unterschiedlichen Geweben</i>	14
I.3 Spannungsabhängige Kanäle	16
I.3.1 <i>Der spannungsabhängige Ca²⁺-Kanal</i>	18
I.4 Plexus myentericus in Zellkultur	22
I.5 Eigene Fragestellung	23
II Material und Methoden	25
II.1 Versuchstiere	25
II.2 Verwendete Elektrolytlösungen und Zellkulturmedien	25
II.2.1 <i>Lösungen für die Präparation und Zellkultur</i>	25
II.2.2 <i>Lösungen für die Immunhistochemie</i>	26
II.2.3 <i>Lösungen für die Imaging-Messungen</i>	27
II.3 Präparation	29
II.4 Zellkultur	33
II.5 Immunhistochemische Analyse	35
II.5.1 <i>Grundlagen der Immunhistochemie</i>	35
II.5.2 <i>Immunfluoreszenzverfahren</i>	35
II.5.3 <i>Verteilung neuronaler und glialer Zellen in Kultur</i>	39
II.6 Calcium-Imaging-Messungen	42
II.6.1 <i>Die Calcium-Imaging-Technik</i>	42
II.6.2 <i>Der Calcium-Imaging-Messstand</i>	49

Inhaltsverzeichnis

II.6.3	<i>Das Calcium-Imaging-Experiment</i>	51
II.7	Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	54
II.8	Auswertung	55
III	Ergebnisse	56
III.1	Dissoziierte Neurone und isolierte Ganglien-Kultur im Vergleich	56
III.2	Charakterisierung des spannungsabhängigen Calciumkanals	58
III.2.1	<i>Einfluss verschiedener Kaliumchlorid-Konzentrationen auf den Verlauf der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration</i>	58
III.2.2	<i>Wirkung von Inhibitoren spannungsabhängiger Calciumkanäle auf die Kaliumchlorid-induzierte Depolarisation</i>	60
III.2.3	<i>Wirkung von Calciumkanal-Inhibitoren auf eine Carbachol-induzierte Ca^{2+}-Antwort</i>	70
III.2.4	<i>Einfluss einer $TNF\alpha$-Vorbehandlung auf eine Carbachol-induzierte Ca^{2+}-Antwort</i>	73
III.2.5	<i>Einfluss verschiedener Eicosanoide auf die $[Ca^{2+}]_i$ myenterischer Neurone</i>	74
IV	Diskussion	76
IV.1	Funktioneller Nachweis von Subtypen des spannungsabhängigen Calciumkanals	77
IV.2	Entzündungsmediatoren	86
IV.2.1	<i>$TNF\alpha$</i>	86
IV.2.2	<i>Eicosanoide</i>	88
V	Zusammenfassung	91
VI	Summary	92
VII	Literaturverzeichnis	93
VIII	Danksagung	104
IX	Erklärung	106

Abkürzungen

Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
AgTx	Agatoxin
Ak	Antikörper
AM	Acetoxymethylester
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'- tetraessigsäure
BSA	bovines Serumalbumin
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration
$[Ca^{2+}]_z$	zytosolische Ca^{2+} -Konzentration
cADP	zyklisches Adenosindiphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCD	Charge-coupled device
Cch	Carbachol
CnTx	Conotoxin
DAG	Diacylglycerol
DHP	Dihydropyridin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENS	enterales Nervensystem
EPSP	erregendes postsynaptisches Potential
FKS	fetales Kälberserum

Abkürzungen

GFAP	saures Gliafaserprotein
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- N'-(2-ethanolsulfonsäure)
HVA	high voltage-activated = Aktivierung durch hohe Membranspannung
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K _D	Dissoziationskonstante
LT	Leukotrien
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	mit Triton X-100 versetzte PBS
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PGP	Protein gene product
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
R	Ratio
RyR	Ryanodinrezeptor
SEM	Standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
SOC	store-operated channel = speichergesteuerter Kanal
TNF α	Tumornekrose Faktor alpha
VDCC	Voltage-dependent Ca ²⁺ channel = spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanal
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid

I Einleitung

I.1 Enterales Nervensystem

Schon vor über 100 Jahren beobachteten Bayliss und Starling ein Phänomen, welches sie „das Gesetz des Darms“ nannten: Druck auf die luminale Seite der Darmwand löst eine gerichtete, propulsive und stereotype Bewegung aus, die aus einer Kontraktion oral der gedehnten Stelle und einer Relaxation aboral der gedehnten Stelle besteht (Bayliss & Starling 1899). Den heute gebräuchlichen Ausdruck für diese Beobachtung, „peristaltischer Reflex“, prägte Paul Trendelenburg 1917. Der peristaltische Reflex ist auch am völlig isolierten Organ zu beobachten, das keinerlei Innervation durch sympathische oder parasympathische Nerven mehr erfährt (Gershon et al. 1994). Die von Auerbach (1862) und Meißner (1857) beschriebenen, innerhalb der Darmwand gelegenen Nervengeflechte steuern folglich diesen Reflex.

In ihrer Gesamtheit werden die in der Darmwand gelegenen Neurone als „enterales Nervensystem“ (ENS) bezeichnet. Dieser Begriff wurde 1921 durch den englischen Physiologen J.N. Langley geprägt, der damit seine Überzeugung zum Ausdruck brachte, dass enterische Ganglien Charakteristika aufzeigen, die sie von anderen autonomen Ganglien deutlich unterscheiden. Er unterteilte als Erster das autonome Nervensystem in einen sympathischen, einen parasympathischen und einen enteralen Anteil (Langley 1921). Nach seinem Tod hat man das enterale Nervensystem jedoch lange Zeit „übersehen“ (Gershon et al. 1994).

Das ENS spielt als ein autonomer Teil des vegetativen Nervensystems eine zentrale Rolle in der Regulation vieler gastrointestinaler Funktionen, die durch das zentrale Nervensystem (ZNS) nur moduliert werden. Bedingt durch seine strukturelle und neurochemische Komplexität wird es auch als „little brain of the gut“, „enteric minibrain“ (Wood 1987, 1994) oder „the second brain“

(Gershon 1998) bezeichnet. Vorgänge wie der peristaltische Reflex, intestinaler Ionentransport und die Durchblutung der Magen-Darm-Schleimhaut erfolgen ohne extrinsischen autonomen und sensorischen Einfluss seitens des Zentralnervensystems. Außerdem moduliert das enterische Nervensystem die Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt (Wood 1994).

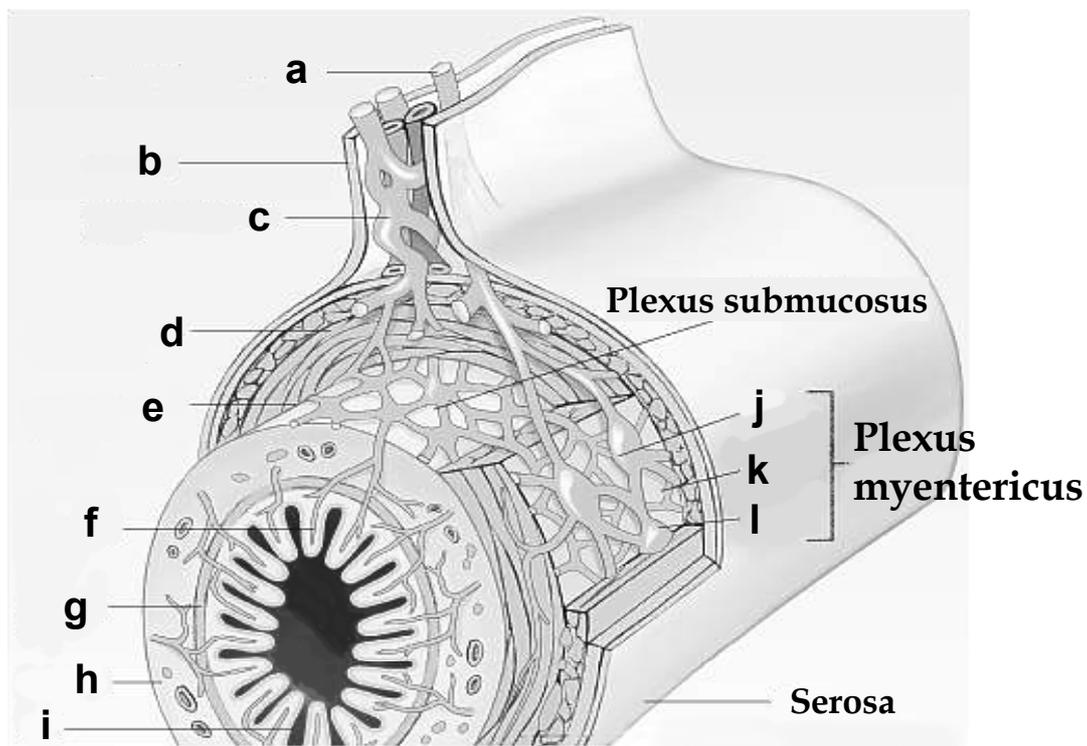


Abb. I-1: Schematischer Schnitt durch die Darmwand des Dünndarms. a: parasymphatische Fasern (N. vagus); b: Mesenterium; c: perivaskuläre sympathische Innervation; d: Längsmuskulatur; e: Zirkulärmuskulatur; f: Subepithelialer Plexus; g: Muscularis mucosae; h: Submucosa; i: Zotten; j: Ganglion; k & l: Verzweigungen (modifiziert nach Gershon & Erde, 1981)

Das enterale Nervensystem kann hauptsächlich in zwei aus sensorischen, motorischen und interneuronalen Anteilen bestehende ganglionäre Netzwerke unterteilt werden: Den Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) und den Plexus submucosus (Meißner-Plexus). Die Hauptaufgabe der myenterischen Neurone ist die Kontrolle der Motilität, wohingegen die Neurone des Plexus submucosus an der Regulation von Ionentransport (z.B. Sekretion am Kryptenepithel) und Mikrozirkulation beteiligt sind (Surprenant 1994).

Diese beiden Nervengeflechte durchziehen die Wand des gesamten Magen-Darm-Kanals, vom Oesophagus bis zum Rektum. Der Plexus myentericus ist zwischen Longitudinal- und Zirkulärschicht der Muscularis propria gelegen, der Plexus submucosus liegt zwischen Zirkulärmuskulatur und Mucosa im Bindegewebe der Submucosa (Abb. I-1). Die Ganglien des Plexus submucosus sind kleiner und feinmaschiger als diejenigen des Plexus myentericus; die Anzahl der Nervenzellen eines submucösen Ganglions entspricht einem Fünftel derer eines myenterischen Ganglions (Furness & Costa 1987). An der Gesamtzahl der Nervenzellen gemessen, macht das ENS den größten Teil des vegetativen Nervensystems aus. Die Anzahl enterischer Neurone ist mindestens so groß wie die des Rückenmarks; ihr stehen nur einige tausend extrinsische Nervenfasern gegenüber (Gershon 1999, Schemann 2000), die das Zentralnervensystem mit dem enteralen Nervensystem verbinden.

1.1.1 Morphologische und funktionelle Differenzierung enteraler Neurone

Einteilen lassen sich enterische Neurone sowohl nach morphologischen als auch nach funktionellen Gesichtspunkten. Die erste morphologische Differenzierung nahm der russische Histologe A. S. Dogiel 1899 vor, der enterale Neurone in drei Gruppen gliederte.

Neurone aller drei Gruppen kommen in beiden Plexen vor und sind je nach Form und Länge ihrer Dendriten bekannt als Dogiel Typ I, II und III. Außerdem nahm Dogiel an, dass unterschiedliche Form und Größe der Somata sowie der Dendriten mit unterschiedlichen Funktionen der Zelle einhergehen. Nach Dogiel sind Typ I Neurone uniaxonale Neurone mit vielen kurzen, dicken Dendriten. Dogiel Typ II Neurone haben eine glattere Oberfläche mit langen bis in die Mucosa reichenden Dendriten. Innerhalb der Typ II Neurone unterscheidet man zwei Formen: eine adendritische und eine dendritische Form (Brehmer et al. 1999). Dogiel Typ III Neurone sind den Typ II Neuronen nicht unähnlich, besitzen aber mehr kurze Dendriten am Soma. Mit der Entwicklung der Immunhistochemie in den späten 1970er Jahren nahm das Wissen um die Vielfalt der enteralen Neurone zu und vielfach wurde die Einteilung nach Dogiel nicht mehr verwendet (Brehmer et al. 1999). Seit einiger Zeit gibt es eine überarbeitete Differenzierung der Neurone nach morphologischen Kriterien, die Stach (1989) beschrieben hat.

Eine Unterscheidung unter funktionellen Gesichtspunkten ist allerdings noch umfangreicher, man unterscheidet sensorische Neurone (primär afferente Neurone), die als Sensoren für mechanische und chemische Reize dienen, Interneurone, die die Kommunikation zwischen den enterischen Neuronen gewährleisten, sowie Motoneurone, Sekreto-Motoneurone und Vaso-Motoneurone, welche die Effektoren (Muskel, Darmepithel und Gefäße) innervieren. Ebenso können enterale Neurone nach ihrem Neurotransmitter-Muster, dem so genannten „Chemical coding“, oder nach ihren elektrophysiologischen Eigenschaften unterschieden werden.

Eine Übersicht über die wichtigsten Neurotransmitter der verschiedenen Neuronentypen und ihre Wirkungen ist in Tabelle I-1 aufgezeigt.

Neuronen-Typ	Wichtige Transmitter	Wirkungsmechanismus
Primär afferente Neuronen	Substanz P, Calcitonin gene-related Peptide (CGRP), <i>Acetylcholin</i>	Aktivierung enterischer Neurone (erhöhte Durchblutung, Sekretion, Motilität)
Interneurone	<i>Acetylcholin</i> , <i>Somatostatin (SOM)</i> , <i>Serotonin (5-HT)</i> , <i>Substanz P</i>	Aktivierung hemmender und erregender Neurone über nicotinerge (und z.T. auch muscarinerge) Rezeptoren
Erregende Motoneurone	<i>Acetylcholin</i> , <i>Substanz P</i>	Aktivierung der Muskelzelle über muscarinerge Rezeptoren
Hemmende Motoneurone	Stickstoffmonoxid (NO), <i>Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP)</i> , <i>Adenosintriphosphat (ATP)</i>	NO-induzierte Erhöhung des cGMP-Spiegels in der Muskelzelle führt zur Relaxation
Erregende Sekretomotoneurone	<i>Acetylcholin</i> , <i>VIP</i>	Aktivierung der sekretorischen Zellen der Schleimhaut über muscarinerge und VIP Rezeptoren
Hemmende Sekretomotoneurone	Neuropeptid Y (NPY), <i>Somatostatin (SOM)</i>	Hemmung der sekretorischen Zellen der Schleimhaut über NPY und SOM Rezeptoren
Vaso-Motoneurone	<i>VIP</i> , <i>Acetylcholin</i> , <i>NO</i>	Relaxation der Blutgefäße über <i>VIP</i> und muscarinerge Rezeptoren

Tab. I-1: Übersicht wichtiger Neurotransmitter im Magen-Darm-Trakt und ihrer Hauptwirkungen. Bei den kursiv geschriebenen Transmittern handelt es sich um Cotransmitter, die nur in Kolokalisation mit anderen Transmittern vorkommen (modifiziert nach Schemann 2000).

Aufgrund ihres elektrophysiologischen Verhaltens, gemessen mit intrazellulärer Ableitung, werden myenterische Neurone des Dünndarms hauptsächlich in zwei Gruppen unterteilt: S/Typ-1- und AH/Typ-2-Neurone. Dieses Schema lässt sich allerdings nicht auf die enteralen Neurone des Magens übertragen. Hier spricht man von Gastric-I-, Gastric-II- und Gastric-III-Neuronen (Schemann 1990, Gershon et al. 1994, Wood 1994).

S/Typ-1-Neurone zeichnen sich durch ihre leichte Erregbarkeit und Tetrodotoxin (TTX)-sensitive Aktionspotentiale aus, die auf einem schnellen Na^+ -Einstrom beruhen. Das synaptische Verhalten von S/Typ-1-Neuronen zeichnet sich durch kurz andauernde erregende postsynaptische Potentiale

(schnelle EPSPs) aus, die spontan auftreten können. S/Typ-1-Neurone sind von ihrer Funktion her Interneurone und Motoneurone (Brookes 2001).

AH/Typ-2-Neurone sind hingegen durch geringe Erregbarkeit und Tetrodotoxin-resistente Aktionspotentiale mit ausgeprägter Nachhyperpolarisation charakterisiert. Ein Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Strom ist bei diesem Neurontyp für die Nachhyperpolarisation verantwortlich. Schnelle EPSPs kommen an AH/Typ-2-Neuronen im Dünndarm des Meerschweinchens sehr selten vor und treten nicht spontan auf (Schemann 1990, Wood 1994, Brookes 2001), am Dickdarm des Meerschweinchens gilt vergleichbares (Lomax et al. 1999). Am enterischen Nervensystem des Magenkörpers scheinen sie dagegen keine Rolle zu spielen (Schemann 1990).

Die Komplexität der enteralen Neurone und somit auch die Schwierigkeit einer Einteilung sowohl nach ihren morphologischen als auch nach ihren funktionellen Charakteristika wird schnell deutlich. Dennoch lässt sich sagen, dass zum Beispiel primär afferente Neurone am Dünndarm des Meerschweinchens meist AH/Typ-2-Neurone mit Dogiel Typ II-Morphologie sind, die eine Immunreaktivität für Calbindin, Substanz P und Cholin-Acetyltransferase (ChAT, das Enzym für die Acetylcholin-Synthese) aufweisen (Furness et al. 1998, Brookes 2001).

1.1.2 Pathophysiologische Bedeutung des enteralen Nervensystems

Komplexe Interaktionen zwischen enteralem Nervensystem, Immunsystem und Darmepithel bestimmen die Transportraten von Elektrolyten und Wasser entlang der Darmoberfläche (Cooke 1994). Die Kommunikation zwischen dem enteralen Nervensystem und dem Immunsystem vermitteln im allgemeinen lösliche Botenstoffe, wie z.B. Entzündungsmediatoren (Hinterleitner & Powell 1991).

Im Verlauf eines Entzündungsprozesses, wie Colitits ulzerosa oder Morbus Crohn, werden häufig pro-inflammatorische Zytokine (Interleukine, IL; Tumornekrose Faktor α , TNF α ; Interferon γ , IFN γ) vor allem von aktivierten Immunzellen freigesetzt, die u.a. eine Sekretion von Prostaglandinen und NO auslösen (Kolios et al. 1998).

Prostaglandine (PG) spielen eine große Rolle als Mittler zwischen Immunsystem und dem enterischen Nervensystem. Ihre stimulierenden Effekte auf intestinale Sekretion und Motilität sind teilweise direkt durch das ENS vermittelt (Sharkey & Kroese 2001). Für Prostacyclin (PGI₂) konnte eine direkte Wirkung auf Sekreto-Motoneurone des Plexus submucosus am Rattenkolon nachgewiesen werden (Diener et al. 1988).

Innerhalb der Gruppe der Zytokine spielt TNF α eine Rolle bei Morbus Crohn. In Mucosa-Biopsaten betroffener Patienten ist eine stark erhöhte TNF α -Produktion festgestellt worden (McCormack et al. 2001).

Auch Neurotransmitter spielen bei Immunantworten und Entzündungsreaktionen eine Rolle. So nimmt die Immunoreaktivität für Substanz P im Verlauf einer Entzündung zu, für VIP nimmt sie im Verlauf chronischer Kolonentzündungen jedoch ab (Kolios et al. 1998). Die Freisetzung von Acetylcholin wiederum sinkt bei einer *Trichinella* infizierten Ratte und nach einer akuten Entzündung. Dagegen nimmt beim *Trichinella*-infizierten Meerschweinchen die Sensitivität der myenterischen Neurone gegenüber Acetylcholin zu, vermutlich um die verminderte Freisetzung auszugleichen (Sharkey & Kroese 2001).

1.1.3 Acetylcholin als enteraler Neurotransmitter

Acetylcholin (ACh) ist der erste Neurotransmitter, der im Magen-Darm-Trakt identifiziert werden konnte, und spielt als Transmitter cholinergere Sekretomotorische Neurone bei der Kontrolle epithelialer Transportprozesse eine Rolle. Eine Beteiligung bei der Stimulation der Anionen-Sekretion am Kolon der Ratte ist bekannt (Diener et al. 1989). Auch bei der Modulation der gastrointestinalen Motilität und der Vermittlung des peristaltischen Reflexes über cholinerge Motoneurone ist Acetylcholin als wichtigster erregender Neurotransmitter beteiligt (Schemann 2000).

Im Rahmen der chemischen Signalübertragung an Synapsen ist Acetylcholin Überträgerstoff von schnellen EPSPs (Brown & Miller 1991). Es wirkt nach der Ausschüttung an postsynaptisch nicotinergen Rezeptoren. Acetylcholin spielt aber genauso bei der Vermittlung von langsamen EPSPs eine Rolle, allerdings wird die Wirkung dann über muscarinerge Rezeptoren vermittelt (Schemann 1990).

Es existieren verschiedene Rezeptorklassen (mit ihren jeweiligen Subtypen) für Acetylcholin. Nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren gehören zur Gruppe der ligandengesteuerten Kanäle, Bindungsstelle für den Liganden und der Ionenkanal sind Teil eines Protein-Komplexes. Das primäre Signal (Transmitterbindung) kann somit schnell in eine Änderung des Membranpotentials übertragen werden. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den muscarinergen Acetylcholin-Rezeptoren um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Hier werden über intrazelluläre Botenstoffe, die so genannten second messenger, die extrazellulären Signale weiterverarbeitet. In Folge der so initiierten intrazellulären Signalwege werden häufig ebenfalls Ionenkanäle geöffnet. Diese Form der Signalübertragung dauert aufgrund ihrer Komplexität länger als beim ligandengesteuerten Ionenkanal.

1.1.4 Second messenger als Boten für extrazellulärer Signale

Neurotransmitter stellen das primäre Signal z.B. in der Vermittlung von Sekretion von Wasser und NaCl ebenso dar wie in der Modulation der Darmmotilität. So handelt es sich bei VIP um ein Sekretagog und den Vermittler der Relaxation von Magen und Darm (Dockray 1994). Um das primäre, extrazelluläre Signal intrazellulär weiterverarbeiten zu können, sind viele Zellen auf intrazelluläre Botenstoffe angewiesen. Bisher bekannte, wichtige intrazelluläre Botenstoffe sind zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG), zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), zyklische Adenosindiphosphat-Ribose (cADP-Ribose), Stickstoffmonoxid (NO) und Ca²⁺. Direkt und indirekt konnten an enterischen Neuronen bisher Wirkungen der second messenger cAMP, IP₃ und DAG sowie Ca²⁺ nachgewiesen werden.

Die im Darm weit verbreiteten Rezeptoren der VIP-Familie sind über ein Guaninnucleotid-bindendes Protein (G-Protein) an den cAMP-Weg gekoppelt (Dockray 1994). Durch Bindung des Liganden am Rezeptor wird das trimere G_s-Protein („s“ für stimulierend) über Guanosintriphosphat-(GTP)-Bindung an seiner α-Untereinheit aktiviert. Das aktive G_s-Protein bindet an einer membranständigen Adenylatcyclase, durch deren Stimulation es zur Bildung von cAMP aus Adenosintriphosphat kommt. Das so gebildete cAMP steuert u.a. über Stimulierung einer Proteinkinase A Phosphorylierungsprozesse an Proteinen. Im Fall der β-adrenergen Stimulation am Herzmuskel ist eine Regulation des L-Typ Ca²⁺-Kanals über cAMP-vermittelte Phosphorylierung gezeigt, die zu einer Erhöhung der Herzfrequenz und der Kontraktilität des Herzens führt (Kameyama et al. 1985, Catterall 2000). Eine entscheidende Rolle spielen durch cAMP vermittelte

Phosphorylierungsprozesse unter Beteiligung von Ca^{2+} auch bei der neuronalen Transkription (Berridge 1998).

Bindet Acetylcholin an einem muscarinergen Rezeptor des Subtyps M_1 oder Substanz P an Neurokinin-Rezeptoren des Subtyps NK_1 , wird der als IP_3 -Kaskade bekannte Signalweg aktiviert (Vanden Berghe et al. 2000). Auch hier wird wie oben beschrieben ein G-Protein aktiviert. Das aktive G_q -Protein koppelt an eine membranständige Phospholipase $\text{C}\beta$, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu IP_3 und DAG hydrolysiert. Das wasserlösliche IP_3 kann in das Zytosol diffundieren und über die Bindung an einen IP_3 -Rezeptor Calcium aus intrazellulären Speichern freisetzen (Berridge & Irvine 1984). Die Entleerung der Speicher öffnet, unabhängig von der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_z$), speichergesteuerte Kanäle. Über den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt Calcium als tertiärer Botenstoff u. a. zu einer Öffnung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen, dies spielt bei der Nachhyperpolarisation von AH/Typ-2-Neuronen eine Rolle (s.o.). Das membranständige DAG stimuliert eine Proteinkinase C (Berridge & Irvine 1984), die wie schon die Proteinkinase A durch Proteinphosphorylierung das Signal des Transmitters vermittelt. Die Phosphorylierung von Ionenkanälen und die daraus resultierenden Änderungen der Kanalaktivität sind wichtige, der G-Protein-gekoppelten Rezeptoraktivierung nachgeschaltete Mechanismen, die auch an Neuronen eine Rolle spielen (Galligan 2002).

I.2 Calcium als intrazellulärer Botenstoff

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, gehört Calcium zu den wichtigsten und am besten untersuchten intrazellulären Botenstoffen. Die Bedeutung von Calcium als Regulator physiologischer Vorgänge erkannte Sydney Ringer schon 1883, als er die Kontraktionsvorgänge am Herzen untersuchte.

Heute weiß man, dass Calcium ein universell vorkommender second messenger ist, der nicht nur die Muskelkontraktion steuert, sondern u.a. auch an der Regulation von Prozessen wie der Fertilisation, Zelldifferenzierung und -proliferation, Transkription und am Energie-Metabolismus beteiligt ist (Berridge 1997, Berridge et al. 1998). Calcium spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei der Regulation neuronaler Prozesse wie Erregbarkeit, Neurotransmitter-Freisetzung und synaptischer Plastizität, die für Vorgänge wie das Lernen und der Erinnerung von Bedeutung ist (Berridge 1998).

Die $[Ca^{2+}]_z$ in der ruhende Zelle wird über mehrere, simultan ablaufende Prozesse niedrig gehalten. Verantwortlich hierfür sind eine Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA), die Calcium gegen seinen Konzentrationsgradienten in den Extrazellularraum transportiert, und ein Na^+/Ca^{2+} -Austauscher, der den transmembranären Na^+ -Gradienten nutzt, um Ca^{2+} aus der Zelle in den Extrazellularraum zu befördern. Außerdem füllen sarcoplasmatische bzw. endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) die intrazelluläre Speicher auf (Vanden Berghe et al. 2002). Zu diesen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern zählen auch die Mitochondrien, die über die Extrusion von Protonen einen elektrochemischen Gradienten aufbauen, welchen ein Uniporter nutzt, um Ca^{2+} in die Mitochondrien aufzunehmen (Kirichok et al. 2004). Bisher ging man davon aus, dass die Mitochondrien vor allem bei hohen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen eine Rolle spielen, die

dem Schutz der Zelle dienen. Bei myenterischen Neuronen scheinen die Mitochondrien aber schon bei niedrigen Konzentrationen an der Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol beteiligt zu sein (Vanden Berghe et al. 2002). Im Zytoplasma selbst dienen Ca^{2+} -bindende Proteine wie Parvalbumin, Calbindin und Calretinin als Puffer (Berridge et al. 2000). Calmodulin, das in diesem Zusammenhang auch oft genannt wird, hat aber viel weitreichendere Funktionen, als nur Puffer zu sein. Calcium vermittelt mit der Bindung an Calmodulin zelluläre Prozesse und Calmodulin spielt bei der Übertragung einer negativen Rückkopplung des Ca^{2+} -Einstroms zumindest an einigen Ionenkanälen eine Rolle (Levitan 1999).

Die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase ist für die Zelle von existenzieller Bedeutung, da Calcium zytotoxische Eigenschaften besitzt; eine langanhaltend erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führt zum Zelltod. Die Zelle verfügt also über Mechanismen, die es ihr erlauben Calcium als Botenstoff zu benutzen und dennoch die Kontrolle über die Ca^{2+} -Homöostase zu behalten (Berridge 1997).

Um seiner Funktion als Botenstoff nachkommen zu können, muss die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration bei Zellaktivierung von $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf $1000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und mehr erhöht werden. Dieser Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ wird über eine Vielzahl von Prozessen gesteuert, die eine Bereitstellung von Calcium aus dem Extrazellularraum und aus intrazellulären Speichern zur Folge haben (Berridge et al. 2000, Bootman et al. 2001).

1.2.1 Calcium-Rekrutierung an unterschiedlichen Geweben

Der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle erfolgt direkt oder indirekt über Kanäle in der Plasmamembran. Hierbei kann es sich um spannungsabhängige Kanäle, speichergesteuerte Kanäle oder um rezeptorgesteuerte Kanäle handeln. Bei den rezeptorgesteuerten Kanälen muss man zwischen den ionotropen oder

ligandengesteuerten Kanälen und den indirekt über metabotrope Rezeptoren aktivierten Kanälen unterscheiden. Wie bereits erwähnt ist der nicotinerge Acetylcholin-Rezeptor das bekannteste Beispiel für einen ligandengesteuerten Kanal. An nicht erregbaren Geweben wie z.B. Pankreas-Acinuszellen führt die Stimulation membranständiger Rezeptoren mittels des Hormons Cholezystokinin über cADP-Ribose zur Aktivierung von Ryanodinrezeptoren (RyR), die auf intrazellulären Organellen lokalisiert sind, zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Acetylcholin führt über den bereits beschriebenen IP_3 -Weg durch eine Konformationsänderung des IP_3 -Rezeptors zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Bei einigen Isoformen des Rezeptors hemmt eine hohe $[\text{Ca}^{2+}]_z$ die Öffnung der IP_3 -Rezeptor-Kanäle, während eine niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_z$ ihre Öffnung begünstigt (Berridge et al. 2000, Bootman et al. 2001). Auch an myenterischen Neuronen existieren cADP-Ribose- und IP_3 -sensitive Ca^{2+} -Speicher; die Superfusion solcher Neurone beispielsweise mit ATP führt zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$, die sowohl durch Ryanodin- als auch durch IP_3 -Rezeptor-Blocker antagonisierbar ist (Turner et al. 2001).

Weiterhin führt eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ über den Ryanodin- und den IP_3 -Rezeptor zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) aus intrazellulären Speichern. Am bekanntesten ist dieser Mechanismus an erregbaren Zellen, wie beispielsweise an cardialen Zellen. Die Depolarisation der Membran führt hier zu einem Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran. Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ führt über die Aktivierung von Ryanodinrezeptoren zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern. Eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung konnte den Ryanodinrezeptor betreffend aber auch an nicht erregbarem Gewebe wie Azinuszellen des Pankreas nachgewiesen werden. Vor kurzem ist dieser Nachweis auch am Kolonepithel der Ratte gelungen (Kocks et al. 2002).

Als Reaktion auf die Entleerung der Speicher öffnen über bisher unbekannte Mechanismen in der Plasmamembran speichergesteuerte Kanäle, so genannte „store-operated channels“ (SOC), die einen als kapazitativ bezeichneten Ca^{2+} -Einstrom zur Folge haben. Ein solcher kapazitativer Ca^{2+} -Einstrom galt als klassisch für nicht erregbare Gewebe, an denen er auch vorrangig auftritt. Dennoch gibt es Beispiele für kapazitative Ca^{2+} -Ströme an einigen Neuronen (Putney 2003). An myenterischen Neuronen konnte allerdings ein kapazitativer Ca^{2+} -Einstrom bisher noch nicht gezeigt werden (Vanden Berghe et al. 2000, 2002).

Der vorrangige Calcium Influx-Weg an Neuronen und anderen erregbaren Geweben ist der über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle („voltage-dependent Ca^{2+} channels“, VDCCs) infolge einer Membrandepolarisation. Über diese Kanäle ist zum jetzigen Zeitpunkt auch am meisten bekannt.

I.3 Spannungsabhängige Kanäle

In der Plasmamembran existieren verschieden Ionenkanäle, deren Verhalten direkt vom Potential der Membran abhängt. Am bekanntesten sind sicher Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - und Cl^- -Kanäle. An einigen Geweben gibt es aber auch spannungsabhängige Protonenkanäle (Decoursey 2003). Spannungsabhängige Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle sind evolutionär verwandt und haben funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten. Sie sind verantwortlich für die Bildung von elektrischen Signalen in Neuronen und anderen erregbaren Zellen. Ihre Reaktion auf Veränderungen des Membranpotentials ist biphasisch. Nach Depolarisation nimmt die Permeabilität für Natrium-, Kalium- bzw. Calciumionen stark zu und geht nach kurzer Zeit wieder auf Basalniveau zurück. Dieses biphasische Verhalten kommt durch zwei Prozesse zustande: die Aktivierung des Kanals mit Permeabilitätssteigerung im Anschluss an die Depolarisation und die Inaktivierung mit

Permeabilitätsrückgang im Verlauf der Depolarisation. Spannungsabhängige Kanäle können sich in drei verschiedenen Zuständen befinden: geschlossen aktivierbar, offen und geschlossen inaktiviert. Die Ionenleitfähigkeit eines aktivierten Kanals ist hochselektiv für das bevorzugtes Kation und sehr effizient (Catterall 1995).

Die Kanalproteine von Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen bestehen aus vier Domänen, die sich in je sechs α -helicale transmembranäre Segmente (S1 - S6) unterteilen. Segment 4 dient als Spannungssensor für die Kanalaktivierung. Die Kanalpore wird durch Segment 5 und 6 jeder Kanalproteindomäne gebildet und determiniert die Ionenleitfähigkeit und Selektivität des Kanals. Ein Austausch von nur drei Aminosäuren innerhalb der Polypeptidkette von Domäne I, III und IV würde aus einem Na^+ -Kanal einen Ca^{2+} -selektiven Kanal machen (Catterall et al. 2003).

Der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal besteht je nach Subtyp aus vier bzw. fünf Untereinheiten, wobei die Größte - die α_1 -Untereinheit - die Kanalpore bildet (Catterall 2000). Der spannungsabhängige Na^+ -Kanal besteht aus drei Untereinheiten, die kanalbildende Einheit ist auch hier das größte membrandurchspannende Protein, die α -Untereinheit. Bei Na^+ - und Ca^{2+} -Kanal werden vier homologe Domänen aus einer Polypeptidkette gebildet, es handelt sich bei diesen Kanälen also um Monomere (Catterall 1995, Hille 2001). Na^+ -Kanäle sind aufgrund ihrer Beteiligung bei der Ausbildung des Aktionspotentials am besten und längsten untersucht.

Pathologische Bedeutung haben spannungsabhängige Kanäle bei einer Reihe von seltenen Erbkrankheiten, die durch Punktmutationen an Ionenkanalgenen zustande kommen (Lehmann-Horn & Jurkat-Rott 1999). Diese so genannten Ionenkanalerkrankungen treten zudem im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und als Folge von Intoxikationen auf, sind aber insgesamt selten (Lerche et al. 2000).

1.3.1 Der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle kommen an fast allen erregbaren Membranen vor und übersetzen ein elektrisches Signal von der Membranoberfläche über den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in ein chemisches Signal innerhalb der Zelle. Sie regulieren so auch Ca^{2+} -abhängige intrazelluläre Prozesse.

In der Plasmamembran existieren verschiedene Subtypen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, die traditionell aufgrund der Kinetik ihrer Ströme und ihrer pharmakologischen Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen die Population der T-Typ Ca^{2+} -Kanäle, die auf eine niedrige Membranspannung reagieren („low voltage-activated“) und in einer Vielzahl von Zellen vorkommen. Zum anderen die Gruppe der Kanäle, die auf eine hohe Membranspannung reagieren („high voltage-activated“, HVA), die man weiter unterteilen kann. Man unterscheidet L-, N-, P-, Q- und R-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Tsien et al. 1995). L-Typ Ca^{2+} -Kanäle zeichnen sich durch einen verzögert auftretenden, lang anhaltenden Ca^{2+} -Strom aus, der durch Dihydropyridine (DHP), Phenylalkylamine und Benzothiazepine blockiert werden kann. Sie kommen überwiegend in Muskulatur und endokrinen Zellen vor und initiieren dort Kontraktion und Sekretion. Es sind aber auch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle an bestimmten Neuronen beschrieben, die hier für die Regulation der Genexpression wichtig zu sein scheinen. Unempfindlich gegenüber Dihydropyridinen, aber hemmbar durch Polypeptid-Toxine aus Kegelschnecken- und Spinnengiften sind N-, P-, Q- und R-Typ Ca^{2+} -Kanäle, die vor allem in Neuronen vorkommen und dort die synaptische Übertragung vermitteln (Catterall 2000).

Mittlerweile werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle basierend auf der Analyse ihrer α_1 -Untereinheit-Gene unter Berücksichtigung ihrer Funktionalität klassifiziert (Ertel et al. 2000).

Bisher sind drei Gen-Subfamilien bekannt, innerhalb derer man, durchnummeriert in der Reihenfolge ihrer Entdeckung, eine weitere Differenzierung vorgenommen hat. Entsprechend gehören bei dieser Nomenklatur der Ca_V1 Subfamilie ($Ca_V1.1$ bis $Ca_V1.4$) die Ca^{2+} -Kanäle unterschiedlicher Gewebe an, die L-Typ Kanalströme vermitteln. Die Ca_V2 Subfamilie ($Ca_V2.1$ bis $Ca_V2.3$) beinhaltet die P/Q-, N- und R-Typ Ca^{2+} -Kanäle und die Ca_V3 Subfamilie ($Ca_V3.1$ bis $Ca_V3.3$) vermittelt T-Typ Kanalströme (Catterall et al. 2003).

Trotz unterschiedlicher Eigenschaften und Verteilung entspricht sich der grundsätzliche Aufbau der verschiedenen Ca^{2+} -Kanal Subtypen. Neben

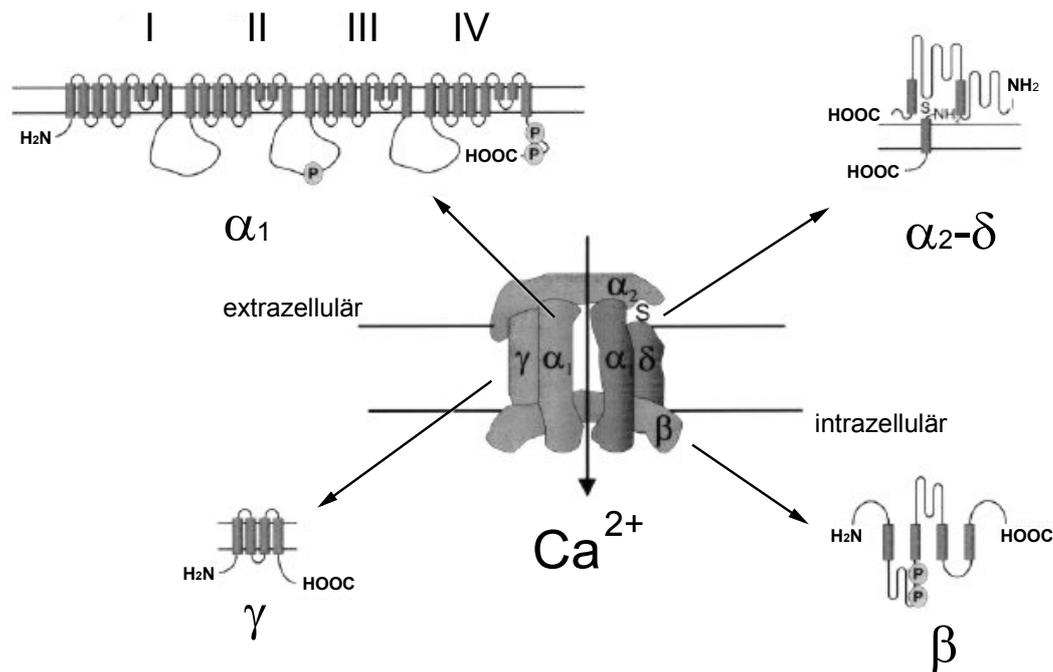


Abb. I-2: Membrantopologie der Subtypen des L-Typ Ca^{2+} -Kanals. Dargestellt sind die fünf Untereinheiten des L-Typ Ca^{2+} -Kanals. Die große, transmembranäre α_1 -Untereinheit bildet die Kanalpore. Die α_2 - und δ -Untereinheit sind über eine Disulfidbrücke (S) verbunden. Die β -Untereinheit liegt gänzlich intrazellulär (modifiziert nach Brini & Carafoli 2000).

ihren sie unterscheidenden α_1 -Untereinheiten besitzen sie alle eine intrazellulär gelegene β -Untereinheit sowie eine α_2 -Untereinheit, die über eine Disulfidbrücke mit einer δ -Untereinheit verbunden ist. Eine fünfte Untereinheit, die γ -Untereinheit, kommt beim L-Typ Kanal des Herzens und der Skelettmuskulatur vor (Abb. I-2), fehlt aber beim neuronalen L-Typ Ca^{2+} -Kanal. Eine weitere γ -Untereinheit, die die Spannungsabhängigkeit des P- und Q-Typ Ca^{2+} -Kanals verändert, konnte in neueren Untersuchungen gezeigt werden: Es ist allerdings noch nicht geklärt ob sie *in vivo* tatsächlich mit dem Kanal verbunden ist.

Wie bereits beschrieben bildet die α_1 -Untereinheit die Kanalpore mit Spannungssensor und Selektivitätsfilter. Die Funktion der anderen Untereinheiten ist noch weitestgehend unbekannt, die β -Untereinheit der am Skelettmuskel vorkommenden Ca^{2+} -Kanäle hat scheinbar Einfluss auf den Grad der Expression und bei Ca^{2+} -Kanälen am Herz und an Neuronen einen Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit und Kinetik des Öffnungsverhaltens des Kanals (Catterall 2000). Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle können z.B. durch Phosphorylierung an der α_1 - und β -Untereinheit über second messenger-Signalwege moduliert werden. Diese Modulation kann sowohl eine up- als auch eine down-Regulation des Kanals zur Folge haben (Dolphin 2003). Dies geschieht im Fall der L-Typ Kanäle durch eine Vielzahl von Hormonen und Transmittern. Vermittelt über den second messenger cAMP, phosphoryliert die Proteinkinase A Aminosäuren der α_1 - und β -Untereinheiten (Catterall 2000). cAMP-abhängige Proteinphosphorylierungen sind auch für die Dihydropyridin-sensitiven Ca^{2+} -Kanäle in Skelettmuskelzellen beschrieben, obwohl die elektromechanische Kopplung nicht von einem Ca^{2+} -Einstrom von außen abhängt, da der hier als Dihydropyridin-Rezeptor bezeichnete Kanal über direkte Protein-Protein Interaktionen eine Konformationsänderung am Ryanodinrezeptor auslöst und

es so zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarcoplasmatischen Reticulum kommt. Die Kraft der Kontraktion kann allerdings z.B. durch Adrenalin erhöht werden. Hierfür ist ein Ca^{2+} -Einstrom nötig, der über den cAMP-Signalweg vermittelt ist. Der cAMP-Signalweg und Ca^{2+} spielen aber auch eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Gen-Transkription (Berridge 1998).

N-, P-, Q- und R-Typ Kanäle an Neuronen und neuroendokrinen Zellen initiieren hauptsächlich die schnelle Neurotransmitter-Freisetzung an Synapsen und sie vermitteln die Sekretion von Hormonen und Neuropeptiden. Vor allem N-, P- und Q-Typ Kanäle werden über verschiedene G-Protein-gekoppelte Wege reguliert (Dolphin 2003). Nach Aktivierung eines G-Proteins ist die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins für die Modulation des Ca^{2+} -Kanals verantwortlich. Der modulierte Kanal aktiviert langsamer und erst bei viel positiveren Membranpotentialen. Neurotransmitter hemmen auf diesem Weg die synaptische Übertragung. Die Hemmung der N-, P- und Q-Typ Kanäle kann u.a. über eine Modulation des G-Proteins durch die Proteinkinase C wieder aufgehoben werden (Catterall 2000).

Bei den T-Typ Ca^{2+} -Kanälen oder „low voltage-activated“ Ca^{2+} -Kanälen handelt es sich mittlerweile um die Gruppe von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, über die man am wenigsten weiß. Sie spielen eine Rolle bei der neuronalen Erregbarkeit und vermitteln und formen das Muster aufeinander folgender Aktionspotentiale. In der jüngsten Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die α_1 -Untereinheit des T-Typ Ca^{2+} -Kanals an ihrem zytoplasmatischen Verbindungsstück der Domänen II und III durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II phosphoryliert wird und es so zu einer Modulation des T-Typ Ca^{2+} -Kanals kommt (Welsby et al. 2003).

Pathologische Bedeutung haben spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle im Zusammenhang mit seltenen Erbkrankheiten. Zum einen bei der familiären hemiplegischen Migräne: Eine Mutation an der α_1 -Untereinheit des neuronalen P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanals ist für diese Unterform von Migräne verantwortlich (Hans et al. 1999). Zum anderen bei der erblichen Form der stationären Nachtblindheit. Hier kommt es durch Mutationen der α_1 -Untereinheit eines spezifisch in der Retina exprimierten L-Typ Ca^{2+} -Kanals zum Verlust der Stäbchen- und Zapfenfunktion (Bech-Hansen et al. 1998, Strom et al. 1998).

I.4 Plexus myentericus in Zellkultur

Um Ca^{2+} -Kanäle an myenterischen Neuronen untersuchen zu können, müssen diese für *in vitro* Versuche isoliert werden. Myenterische Ganglien neugeborener Ratten können leicht isoliert und kultiviert werden (Schäfer et al. 1997). Die gewonnenen Ganglien eignen sich, ebenso wie isolierte Neurone, zur Untersuchung mittels der Patch-Clamp Technik (Haschke 2000, Rehn et al. 2004) oder für die Ermittlung von Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels Ca^{2+} -Imaging-Verfahren (Haschke et al. 2002). Da Kinetik und Spannungsabhängigkeit myenterischer Ca^{2+} -Kanäle, wie Franklin und Willard schon 1993 gezeigt haben, zwischen Geburt und frühem Erwachsenenalter keine bedeutenden Veränderung erfahren, eignen sich isolierte myenterische Ganglien neugeborener Ratten zur Untersuchung dieser Kanäle.

I.5 Eigene Fragestellung

Dass Calcium ein bedeutender Signalbotenstoff in allen Zellen ist, ist unbestritten. Ebenso anerkannt ist die Tatsache, dass spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle eine entscheidende Rolle bei der Neurotransmission spielen (s.o.).

Die Verteilung verschiedener Ca^{2+} -Kanaltypen beim Meerschweinchen ist mittlerweile relativ gut untersucht, allerdings weiß man bisher sehr wenig über die funktionelle Expression verschiedener Ca^{2+} -Kanaltypen am Plexus myentericus der Ratte. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine funktionelle Charakterisierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle an diesem Plexus durchgeführt.

Pathophysiologische Vorgänge, wie z.B. Entzündungsprozesse, werden über Entzündungsmediatoren vermittelt. Von Immunzellen freigesetzte Zytokine lösen die Sekretion von Eicosanoiden sowie weiteren löslichen Botenstoffen des Immunsystems aus. Da sich in neueren Patch-Clamp-Studien an myenterischen Neuronen gezeigt hat, dass eine $\text{TNF}\alpha$ -Vorbehandlung über Nacht die Zelle hyperpolarisiert und die durch nicotinerge Rezeptorstimulation hervorgerufene Depolarisation potenziert wurde (Rehn et al. 2004), war ich an möglichen Änderungen des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach nicotinerger Rezeptorstimulation in Anwesenheit des Zytokines interessiert.

Außerdem ist bekannt, dass verschiedene Eicosanoide, u.a. PGI_2 , PGE_2 und PGD_2 direkt neuronale Wirkungen haben, die bisher aber nur am Plexus submucosus gezeigt werden konnten. Daher wollte ich im Rahmen meiner Arbeit überprüfen, ob Eicosanoide direkten Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von myenterischen Neuronen haben.

Abweichend von früheren Untersuchungen, in denen isolierte myenterische Neurone verwendet wurden (Haschke 2000, Haschke et al.

2002), wurden in der vorliegenden Arbeit intakte myenterische Ganglien kultiviert. In den ersten Untersuchungen während der Erstellung dieser Arbeit hatte sich gezeigt, dass ein Großteil der isolierten myenterischen Neurone nicht auf eine Rezeptorstimulation durch Neurotransmitter reagierten. Bei intakten myenterischen Ganglien bleibt die Antwort auf eine Rezeptorstimulation durch Neurotransmitter in Kultur, im Gegensatz zu dissoziierten myenterischen Neuronen, besser erhalten (Rehn et al. 2004).

Die folgenden Fragen sollten durch meine Untersuchungen beantwortet werden:

- Kommen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle am Plexus myentericus der Ratte in der gewählten Zellkultur vor?
- Welche spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanalsubtypen werden funktionell exprimiert?
- Beeinflusst das Zytokin $\text{TNF}\alpha$ die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von myenterischen Neuronen?
- Haben Entzündungsmediatoren wie z.B. die verschiedenen Eicosanoide (Prostaglandine oder Leukotriene) einen direkten Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von myenterischen Neuronen?

II Material und Methoden

II.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es handelte sich um neugeborene Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts. Für die Messungen am isolierten Plexus myentericus wurden Tiere im Alter von drei bis elf Tagen verwendet. Bei Ratten im Alter von null bis vierzehn Tagen ist die Präparation unproblematisch, bei älteren Tieren ist die Isolierung des enteralen Nervensystems hingegen schwierig und aufwändig (Haschke 2000). Futter und Wasser standen den Muttertieren ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden bei zwölf-Stunden-hell, zwölf-Stunden-dunkel Zyklen in klimatisierten Räumen gehalten.

II.2 Verwendete Elektrolytlösungen und Zellkulturmedien

Die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien werden in Abschnitt II.7 gesondert aufgeführt.

II.2.1 Lösungen für die Präparation und Zellkultur

Die Lagerung und Präparation des aus dem Tier isolierten Intestinaltraktes erfolgte in N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure) (HEPES; $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) gepuffertem Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM). Dieses bezugsfertige Zellkulturmedium enthält neben HEPES auch einen hohen Glukoseanteil ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Vor Beginn der Präparation wurden diesem Medium L-Glutamin ($4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) sowie die Antibiotika Gentamycin ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) und Metronidazol (Clont[®] i.v.; $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) zugesetzt. Für die Inkubation des Gewebes wurde in dem verwendeten Kulturmedium Kollagenase Typ II (Endkonzentration: $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; Enzymaktivität: $268 - 273 \text{ units}\cdot\text{mg}^{-1}$) gelöst.

Die gewonnenen Plexus myentericus Ganglien wurden in Start-V[®]-Medium in Kultur gebracht. Es handelt sich hierbei um ein definiertes, serumfreies, speziell für neuronale Zellen hergestelltes Fertigmedium. Diesem Zellkulturmedium wurden die Antibiotika Penicillin G (100.000 units·l⁻¹) und Streptomycin (100 mg·l⁻¹) zugefügt.

Die Beschichtung der für die Zellkultur genutzten Glasplättchen (13 mm Durchmesser) wurde mit einer Poly-L-Lysin-Lösung durchgeführt. Die Plättchen wurden vor dem Beschichtungsprozess für mindestens zwei Stunden in 70 %-igen (Vol/Vol) Alkohol eingelegt. Eine Bevorratung in Alkohol bot sich daher an. Nach viermaligem Spülen der Glasplättchen in autoklaviertem Aqua bidest. wurden diese in die Poly-L-Lysin-Lösung eingelegt und lichtgeschützt für mindestens zwei Stunden geschüttelt. Für die Beschichtung wurde das Poly-L-Lysin (0,1 mg·ml⁻¹; Molekulargewicht > 300.000 D) 1 : 5 mit autoklaviertem Aqua bidest. verdünnt. Zum Trocknen wurden die beschichteten Plättchen einzeln auf einem Papierfilter in einer verschließbaren Glasschale aufgestellt und anschließend lichtgeschützt und kühl gelagert. Die beschichteten Plättchen waren ca. sieben Tage lagerbar, danach konnte ein ausreichendes Anwachsen der Zellen nicht mehr sicher gewährleistet werden.

II.2.2 Lösungen für die Immunhistochemie

II.2.2.1 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Für die immunhistochemische Untersuchung der Präparate wurden verschiedene Pufferlösungen verwendet. Die phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) setzte sich folgendermaßen zusammen: NaCl 130; Na₂HPO₄ 8 und NaH₂PO₄ 1,2 (alle Angaben in mmol·l⁻¹). Auch im Fall dieser Lösung wurde der pH-Wert mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

Die so erstellte PBS bildete die Grundlage für eine mit 0,05 % (Vol/Vol) Triton X-100 versetzte Lösung (PBS-T). Bei Triton X-100 handelt es sich um ein die Oberflächenspannung herabsetzendes nicht-ionisches Detergenz, das in Abhängigkeit von seiner Konzentration Membranproteine aus Membranproteinkomplexen löst.

II.2.2.2 Paraformaldehydlösung (PFA 4 %)

Paraformaldehyd, gelöst in einem $135 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer, wurde zur Fixation benötigt. Zunächst wurde ein $360 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer angesetzt, bestehend aus Na_2HPO_4 282 und NaH_2PO_4 76 (Angaben in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Dieser Stock wurde mit PFA-haltigem Aqua bidest. auf eine Endkonzentration von $135 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ verdünnt. Auch im Fall dieser Lösung wurde der pH-Wert mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

Zur Erstellung einer 4 %-igen (Gew/Vol) PFA-Lösung wurde eine entsprechende Menge PFA ($40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) unter dem Abzug abgewogen und unter Rühren einer definierten Menge Aqua bidest. zugegeben. Es bewährte sich, PFA zunächst in Aqua bidest. auf 60°C zu erwärmen und unter Zugabe von NaOH zu lösen. Vor Auffüllen mit dem $360 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer sollte die Lösung klar sein.

II.2.3 Lösungen für die Imaging-Messungen

Der genutzte Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, so dass eine $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Stammlösung entstand. Pluronic[®] F-127, ein Detergenz zur Verbesserung der Löslichkeit von Fura-2-AM, wurde ebenfalls in DMSO gelöst. Es wurde eine 20 %-ige (Gew/Vol) Stammlösung angesetzt. Die gelösten Substanzen wurden für die spätere Verwendung portioniert und eingefroren.

Als Standard-Lösung für die Versuche wurde eine $135 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Natriumchlorid-Tyrode verwendet, die (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) NaCl 135; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 5; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1 enthielt.

Um eine Depolarisation der Zellen zu erreichen wurde die Standard-Lösung wie folgt modifiziert: NaCl 105,4; KCl 35; HEPES 10; Glucose 5; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1 (alle Angaben in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Der pH-Wert beider Lösungen wurde mittels NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

II.3 Präparation

Für die Präparation wurden portioniertes DMEM (s.o.), einige Milliliter einer Kollagenase Typ II-Stammlösung ($2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), Reaktionsgefäße (1500 μl ohne und 2000 μl Safe-Lock mit Graduierung) sowie eine große Zellkulturschale (5,8 cm Durchmesser) auf Eis gelagert.

Außerdem standen eine große, gerade, abgerundete Schere, eine kleine, gerade, spitze Schere und eine Iridektomieschere (gebogen, spitz; Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland) genauso zur Verfügung wie eine gebogene Pinzette und zwei Dumont-Uhrmacherpinzetten (Nr. 5, gerade, extrafein, Stahl; Plano, Wetzlar, Deutschland). Zusätzlich benötigt wurden: kleine Zellkulturschalen (4 cm Durchmesser) zur Lagerung der gewonnenen Nervengeflechte, eine Stereolupe (Olympus SZX9, 10 - 25fache Vergrößerung; Olympus Optical, Tokyo, Japan) und eine Kaltlichtlampe (Schott KL 1500 electronic; Schott Glas, Mainz, Deutschland).

Die Ratten wurden mit einer Schere dekapitiert und entblutet (genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen). Für Tiere im Alter von 10 Tagen und älter ist eine Guillotine empfehlenswert. Unmittelbar im Anschluss daran wurde die Bauchhöhle entlang der Linea alba und mit zwei Entlastungsschnitten entlang des Rippenbogens mittels der kleinen Schere eröffnet (Abb. II-1). Nach Beurteilung des Geschlechts der Tiere wurde der Darm ausgehend vom Rektum nach kranial bis zum Magen herauspräpariert und in der vorbereiteten Kulturschale in Nährmedium gelagert.

Die nun folgenden Arbeitsschritte wurden unter Zuhilfenahme der Stereolupe durchgeführt. Mit Hilfe einer Uhrmacherpinzette wurde das Mesenterium gefasst und mit der Iridektomieschere unmittelbar entlang des Darmrohres, möglichst ohne die Darmmuskelschichten zu verletzen, entfernt.

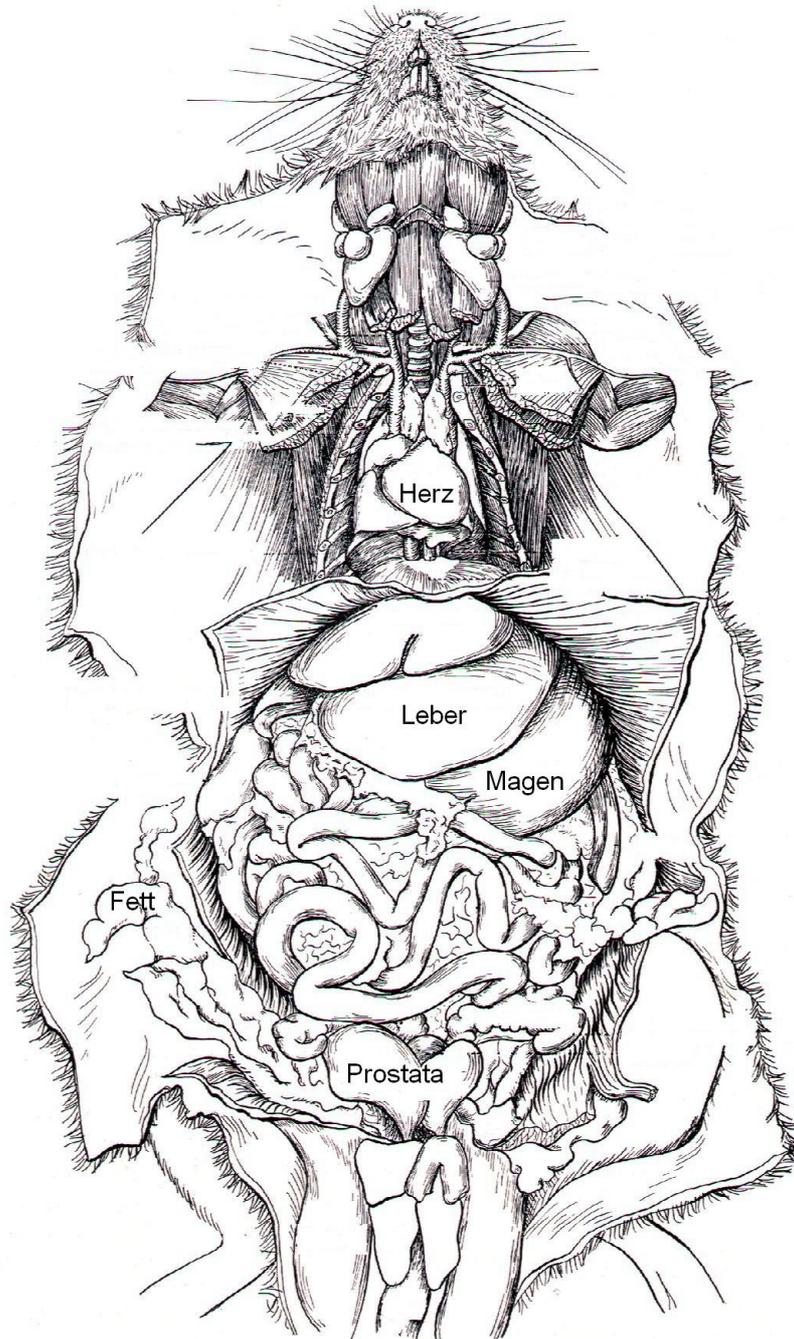


Abb. II-1: Thorax und Abdomen der Ratte in situ (modifiziert nach Greene 1949).

Um die Muskelschichten von der Tunica mucosa zu trennen, benötigte man beide Uhrmacherpinzetten. Die transparenter erscheinende Tunica muscularis wurde mit einer der beiden Pinzetten fixiert und strumpffartig von der Mucosa abgezogen, während mit der anderen Pinzette die verbleibenden Darmanteile auf Spannung gehalten wurden (Schäfer et al. 1997). Die genaue Lage des Plexus myentericus ist in Abbildung II-2 dargestellt. Der so gewonnene Muskelschlauch, bestehend aus Längsmuskelschicht, Auerbachplexus und Ringmuskelschicht, wurde zur enzymatischen Behandlung in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl DMEM sowie 400 µl des Kollagenase-Stammes aufgefüllt.

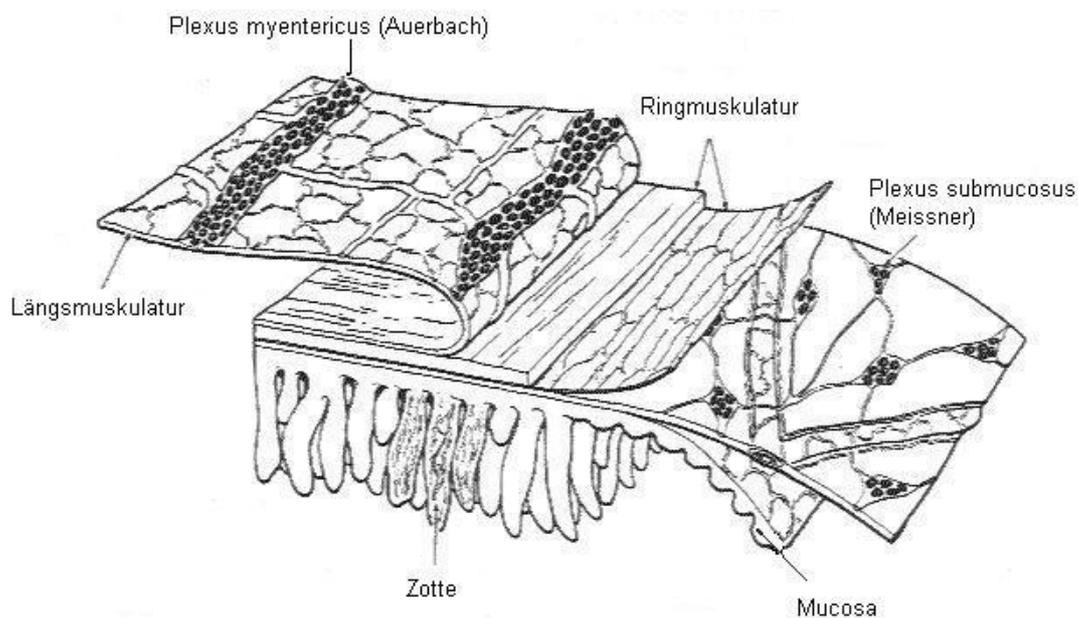


Abb. II-2: Lage des Plexus myentericus (modifiziert nach Furness & Costa 1987).

Nach einer 1½- bis maximal 2-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung (Vol/Vol) wurde das Reaktionsgefäß aus dem Brutschrank entnommen und für nicht mehr als 30 Sekunden auf einem Schüttler (Vortex®) durchmischt. Zunächst wurde nun der Überstand in eine kleine, mit Medium gefüllte Zellkulturschale pipettiert und nach Plexus myentericus

Anteilen durchmustert, die an ihrer netzartigen Struktur zu erkennen sind (Abb. II-3). Der verbleibende Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde in mehreren Schritten unter der Stereolupe nach Netzen durchsucht, um sie neben den größeren Muskelanteilen nicht zu übersehen. Vorhandene Nervenzellgeflechte wurden mit einer Pipette (200 μ l) aufgesammelt und in einer kleinen Kulturschale auf Eis gelagert. Die noch unverdauten Plexus-haltigen Muskelstücke wurden für eine weitere Inkubation in ein Reaktionsgefäß überführt.

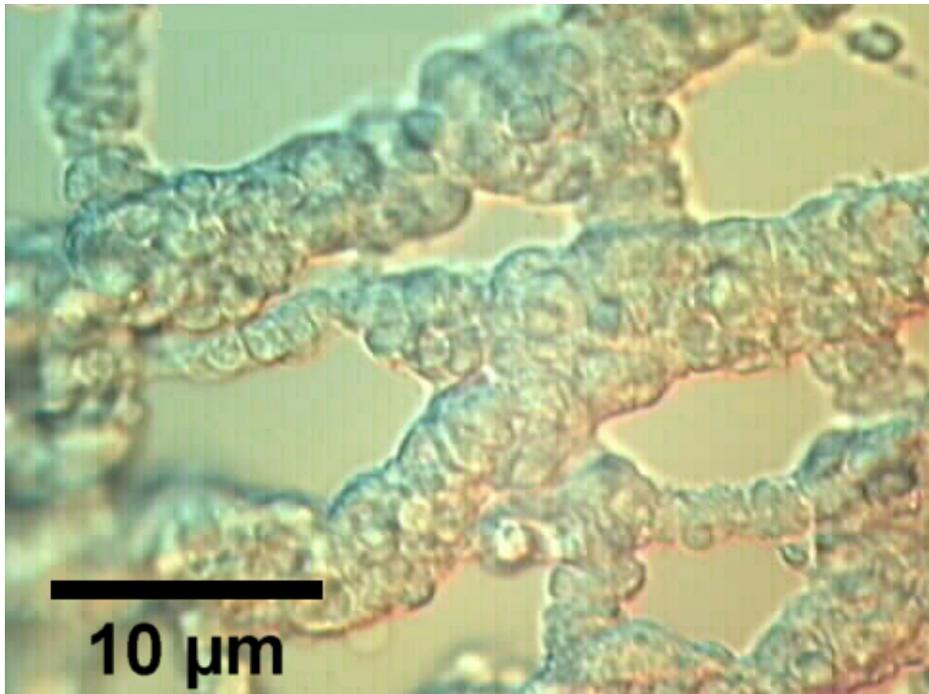


Abb. II-3: Durch enzymatische Behandlung isolierter Plexus myentericus.

Dieser Vorgang konnte bis zu viermal wiederholt werden, allerdings mussten die Inkubationsintervalle vom zweiten Durchlauf an auf 20 - 30 Minuten reduziert werden. Abschließend wurden die auf Eis gelagerten Plexus myentericus Netze mit einer 200 μ l Pipette in einem autoklavierten Reaktionsgefäß (1500 μ l) gesammelt.

II.4 Zellkultur

Die im Anschluss an die Präparation des Intestinaltraktes durchzuführenden Schritte erfolgten an einer Zellkulturarbeitsbank (flowbench). Außerdem benötigt man Pipetten der Größe 0 - 100 μl und 100 - 1000 μl , Reaktionsgefäße (1500 μl), kleine Zellkulturschalen, Multischalen mit vier Kammern und Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen.

Einem Teil des bereits vorbereiteten Start-V[®] Mediums musste unmittelbar vor Beginn der nun folgenden Tätigkeiten fetales Kälberserum (FKS; 10 % (Vol/Vol)) zugesetzt werden, um eine Inaktivierung der Peptidaseaktivität sicher gewährleisten zu können. Des weiteren wurde das die Kammern umgebende Volumen der Multischalen (Abb. II-4), in denen die beschichteten Glasplättchen zu liegen kamen, mit 3 ml Aqua bidest. aufgefüllt. Dieser Schritt war nötig, um die Verdunstung des Mediums im Brutschrank möglichst gering zu halten.

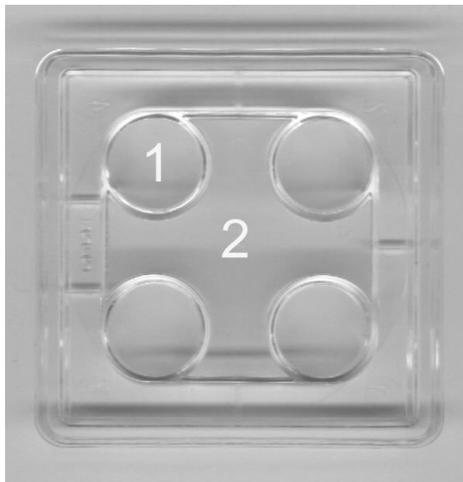


Abb. II-4: Multischalen mit vier Kammern
1:Kammer; 2: Destilliertes Wasser.

Die isolierten Nervengeflechte wurden zunächst für 10 Minuten mit 600 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (dies entsprach einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 40 000 g). Nachdem der Überstand vorsichtig entfernt und in einer kleinen Zellkulturschale aufgefangen wurde, um ihn

nochmals auf Plexusfragmente hin zu untersuchen, wurde das Reaktionsgefäß mit FKS-haltigem Start-V[®] Medium befüllt (100 µl pro Kammer). Eine gleichmäßige Verteilung der Auerbachplexus wurde durch zwei bis dreimaliges Aufziehen mit einer 100 µl Pipette gewährleistet, ehe die Zellen auf die Glasplättchen ausgebracht wurden. War eine Dissoziation der Zellen nötig, wurden die Nervengeflechte zwei bis dreimal vorsichtig durch eine feine Kanüle in eine Insulinspritze gezogen, bevor sie mit der Pipette dem Reaktionsgefäß entnommen wurden. Um sicherzustellen, dass sich die Plexusfragmente oder die dissoziierten Zellen ausreichend an den Glasplättchen anhefteten, ruhten sie für 30 bis maximal 45 Minuten im Brutschrank. Elektrostatische Kräfte (negativ geladener Anteile des Poly-L-Lysins) sind Grundlage für diesen Vorgang. Abschließend wurde jede Kammer mit Start-V[®] ohne FKS auf ein Endvolumen von 500 µl gebracht.

Die die Nervengeflechte enthaltende Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 5 % (Vol/Vol) CO₂-Atmosphäre inkubiert und im Verlauf des folgenden Tages im Experiment untersucht. Im Fall der dissoziierten Zellen war eine dreitägige Inkubation der Kultur notwendig.

II.5 Immunhistochemische Analyse

II.5.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Interaktion hochspezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper (IgG) mit dem entsprechenden, nachzuweisenden Antigen. Antigene besitzen spezielle Determinanten (Epitope), die von der hochvariablen F_{ab}-Region des entsprechenden Antikörpers erkannt werden. Dies führt zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen (Ag-Ak-Komplexen). Somit können, das Vorhandensein des spezifischen Antikörpers vorausgesetzt, Antigene jeglicher Art in verschiedensten Geweben detektiert und markiert werden.

Man unterscheidet verschiedenste immunhistochemische Methoden. Zum einen die direkte und indirekte Immunfluoreszenz (Coons 1958), zum anderen immunenzymatische Methoden. Die Avidin-Biotin-Methode mit anschließender Färbung ist eine weitere Möglichkeit, ebenso wie die Immuno-Gold-Reaktion, um nur einige zu nennen. Da es eine Vielzahl etablierter immunhistochemischer Nachweisverfahren gibt, möchte ich mich auf die Beschreibung der zum Einsatz gekommenen Immunfluoreszenz beschränken.

II.5.2 Immunfluoreszenzverfahren

Man unterscheidet die direkte und indirekte Immunfluoreszenz. Ein direkt mit dem Antikörper konjugiertes Fluorochrom bindet, im Fall der direkten Methode, mit dem Antigen. Ein Vorteil dieser Methode ist die geringe Hintergrund-Fluoreszenz. Allerdings ist die relativ geringe Sensitivität sowie der größere Bedarf an markierten Antikörper ein nicht zu unterschätzender Nachteil dieser Methode (Denk 1989).

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird zunächst ein spezifisch gegen das Antigen gerichteter, nicht fluorochromer Antikörper, auch Primärantikörper genannt, eingesetzt. Der Primärantikörper wird dann über einen gegen seine F_c-Region gerichteten konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Diese Methode hat gegenüber der zuerst beschriebenen den Vorteil höherer Sensitivität (Liddell & Weeks 1996). Da Primärantikörper zudem nur von wenigen Tierspezies stammen (v.a. Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Ziege und Schwein) genügt eine relativ geringe Zahl konjugierter Sekundärantikörper. Eine Doppelimmunfluoreszenz, d.h. die Verwendung von zwei Primärantikörpern aus unterschiedlich Tierspezies und Sekundärantikörpern mit unterschiedlichen Fluorophoren, ermöglicht die Detektion verschiedener Antigene und kann sowohl bei der direkten als auch bei der indirekten Methode angewendet werden (Denk 1989). Die Immunfluoreszenz kann aber auch mit anderen immunhistochemischen Verfahren kombiniert werden.

Im vorliegenden Fall wurde eine Doppelimmunfluoreszenz nach der indirekten Methode vorgenommen. Der gebildete Ag-Ak-Komplex wurde dann durch Anregung des Fluorophors mit der geeigneten Wellenlänge sichtbar gemacht.

II.5.2.1 Darstellung von Neuronen und Glia mittels indirekter Immunfluoreszenz

Eine erfolgreiche Markierung neuronaler und glialer Zellen konnte nur mit komplett dissoziierten Zellen in Kultur erreicht werden. Eine Analyse der Ganglien-Kultur erbrachte keine spezifische Markierung der Zellen. Zusätzliche Schwierigkeiten bereitete die starke Überlagerung der Zellen.

Zur Differenzierung wurden ein im Kaninchen hergestellter polyklonaler PGP 9.5 (protein gene product 9.5)-Antikörper und ein in der Maus hergestellter monoklonaler GFAP (glial fibrillary acidic protein)-

Antikörper genutzt. PGP 9.5 ist ein zytoplasmatisches, neuronenspezifisches Protein, das beim Meerschweinchen eine Immunreaktivität gegen 80 % aller myenterischen Neurone zeigt. Bei der Ratte ist dieser panneuronale Marker jedoch ein geeigneter Antikörper zur Differenzierung von myenterischen Neuronen und Glia (Johnson et al. 1998, Schäfer & Mestres 1999). GFAP wird vorrangig zur Differenzierung von Astrozyten im ZNS verwendet, da das Protein aber auch in enteraler Glia vorkommt (Furness & Costa 1987, Cabarroca et al. 2003), kann es auch zu deren zur Markierung eingesetzt werden. Bei den eingesetzten Primärantikörpern handelt es sich um etablierte Antikörper für die Unterscheidung von Neuronen und Glia innerhalb des ENS (Johnson et al. 1998, Schäfer & Mestres 1999, Schicho et al. 2001). Eine Übersicht über die eingesetzten Antikörper und ihre Konzentrationen liefert Tabelle II.1.

Primärantikörper <i>Konzentration</i>	konjugierter Sekundärantikörper <i>Konzentration</i>
rabbit anti-human PGP 9.5 (polyklonal) <i>1:500</i>	Alexa Fluor [®] 488 donkey anti-rabbit <i>1:500</i>
mouse anti-GFAP (monoklonal) <i>1:200</i>	Cy TM 3-konjugierter goat anti-mouse <i>1:800</i>

Tab. II-1: Tabellarische Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Doppelimmunfluoreszenz zur Differenzierung von enteralen Neuronen und Gliazellen.

II.5.2.2 Immunhistochemisches Protokoll

Im Anschluss an die Erstellung der Zellkultur wurde nach dreitägiger Inkubation der Zellen mit der immunhistochemischen Analyse begonnen. Die Präparate verblieben für sämtliche Wasch- und Inkubationsschritte dieses Protokolls in den Kammern der Multischalen. Bei allen Wasch- und Inkubationsgängen wurden die entsprechenden Lösungen, sofern nicht anders vermerkt, mit einem Volumen von 500 µl pro Kammer eingesetzt und bei Raumtemperatur inkubiert.

Zunächst wurde das Start-V[®] Medium entfernt und die Präparate 3 x 5 min mit PBS gespült. Diesen gründlichen Waschschritten folgte die Fixation der Präparate für 15 Minuten mit frisch angesetzter, 4 %-iger (Gew/Vol) PFA-Lösung. Paraformaldehyd bewirkt in dieser Konzentration eine gute Strukturerhaltung durch Quervernetzung bei ausreichender Erhaltung der Antigenität. Um sicherzustellen, dass die PFA-Lösung vollständig entfernt wurde, schloss sich auch hier wieder ein Waschvorgang an. Dazu wurden die Zellen zunächst 2 x 5 min in PBS und anschließend für 5 min in PBS-T inkubiert.

Zur Maskierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Präparate mit 10 % (Vol/Vol) FKS-haltigem PBS-T für eine Stunde inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte nun die Inkubation mit den in FKS-haltigem PBS-T gelösten Primärantikörpern für drei Tage bei 4 °C. Anti-PGP 9.5 wurde in einer Konzentration von 1:500, anti-GFAP in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt. Überschüssiger Primärantikörper wurde in einem weiteren 3 x 5 min Waschgang mit PBS-T ausgespült, bevor die Zellen für 120 min mit den (ebenfalls in FKS-haltigem PBS-T gelösten) Sekundärantikörpern, CyTM3-konjugierter-Antikörper (1:800) und Alexa Fluor[®] 488 (1:500), inkubiert wurden. Mit einem letzten gründlichem Waschschriff wurde die den

Sekundärantikörper enthaltende Lösung ausgetauscht und die Zellen 2 x 5 min in PBS-T und 1 x 5 min in PBS gespült.

Zur Betrachtung am Mikroskop sowie zur Aufbewahrung wurden die Glasplättchen auf einem Objektträger in Citiflour[®] (Glycerol-PBS-„antifade mountant“) eingebettet. Die so erstellten Präparate konnten bei 4 °C und unter Ausschluss von Licht aufbewahrt werden.

II.5.3 Verteilung neuronaler und glialer Zellen in Kultur

Zur Charakterisierung der verwendeten Primärkultur wurde in Vorversuchen die Verteilung neuronaler und glialer Zellen immunhistochemisch untersucht. Im Gegensatz zu den meisten peripheren Nerven sind die Neurone und Nervenfasern des ENS nicht von Schwann-Zellen umgeben, sondern von einer den Astrozyten des ZNS ähnlichen einzigartigen Gliazellpopulation (Furness & Costa 1987). Diese Ähnlichkeit zeigt sich im Vorkommen von GFAP und *gap junctions*, beides Merkmale die andere unterstützende Zellen im peripheren autonomen Nervensystem nicht aufweisen. Die Anzahl der enteralen Gliazellen übertrifft *in vivo* die Anzahl der Neurone (Cabarrocas et al. 2003). Mittels immunhistologischer Analyse sollte festgestellt werden, in welchem Verhältnis Neurone und Glia in den untersuchten Kulturen vorkommen.

Eine erfolgreiche Durchführung der Immunfluoreszenz war nur in der dissoziierten Neuronen-Kultur möglich, da bei der Ganglienkultur durch die hohe Zelldichte und Überlagerung von Zellen innerhalb der einzelnen Ganglien die immunhistochemische Abgrenzung einzelner Zellen stark erschwert wurde. *In vivo* ist die Anordnung der Gliazellen im Verhältnis zu den Neuronen abhängig von der Spezies. Bei kleinen Säugetieren wie der Ratte unterteilen Gliazellen Neurone nur in Gruppen mit direktem Kontakt der einzelnen Nervenzellkörper. Bei großen Säugern wie Affe oder Mensch

allerdings sind die einzelnen Axone durch Gliazellfortsätze voneinander getrennt (Furness & Costa 1987).

In Abbildung II-5 sind zwei Ausschnitte aus verschiedenen immunhistochemischen Präparaten beispielhaft dargestellt, die das Verteilungsmuster der dissoziierten Neuronen-Kultur repräsentieren.

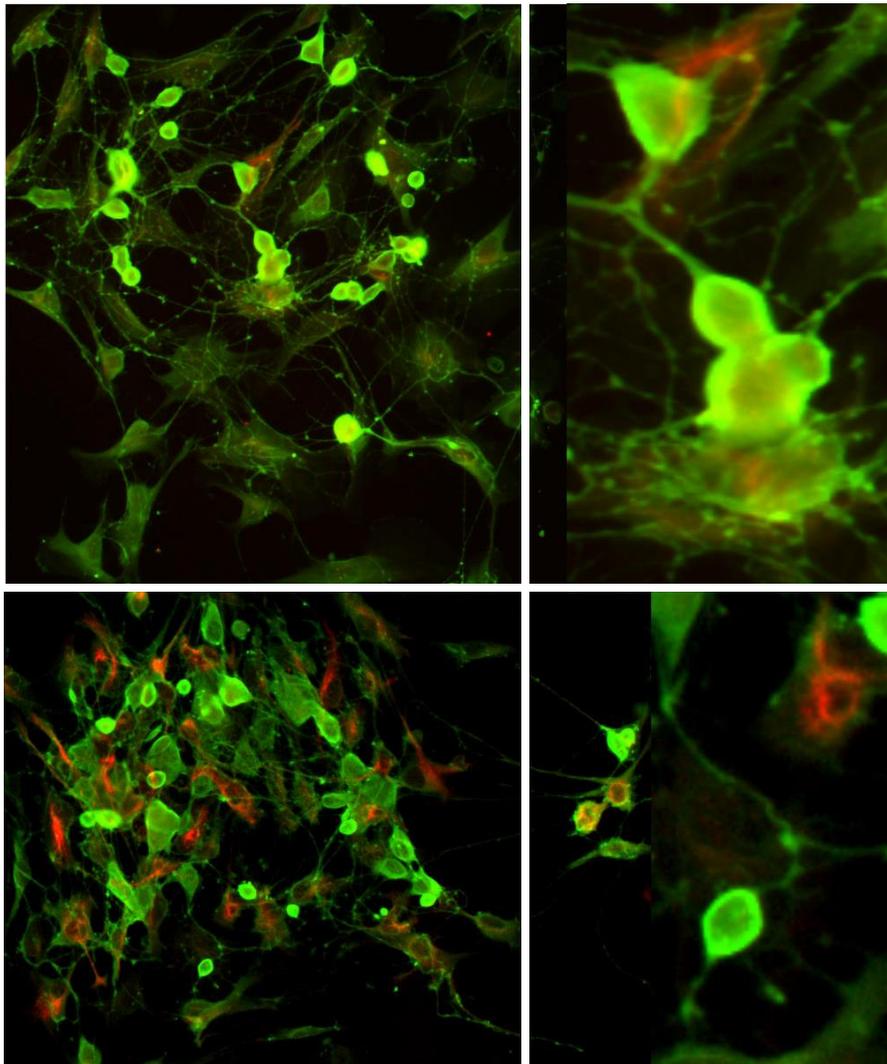


Abb. II-5: Dargestellt sind zwei typische Bereiche aus immunhistochemischen Präparationen der dissoziierten Neuronen-Kultur mit einer zugehörigen Ausschnittsvergrößerung jeweils rechts (Neurone: grün; Glia: rot).

Die Darstellung ist repräsentativ für 7 immunhistochemische Präparate aus dissoziierten Neuronen-Kulturen von 6 Tieren. Wie Abbildung II-5 bereits andeutet, zeigt sich innerhalb der Kultur ein durchaus unterschiedliches Bild. In jedem der untersuchten Präparate kommen ungefähr zu gleichen Teilen Bereiche vor, in denen sich fast ausschließlich grün fluoreszierende Zellen (Neurone) befinden (s. Abb. II-5 oben) und Bereiche, in denen das Verhältnis zwischen Neuronen und Glia (rot) relativ ausgewogen zu sein scheint (s. Abb II-5 unten). Die Verteilung der Zellen innerhalb der Kultur kann, bedingt durch die zum Aussäen der Zellen angewendete Technik, nur zufällig sein. Zu einem Wachstum von Gliazellen innerhalb der Kultur sollte es in der nur ca. 20 Stunden andauernden Inkubationsphase noch nicht gekommen sein.

Die dissoziierte Neuronen-Kultur weist also in jedem Fall ein anderes Bild auf als das von Cabarrocas et al. (2003) *in vivo* beschriebene.

II.6 Calcium-Imaging-Messungen

II.6.1 Die Calcium-Imaging-Technik

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kann mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. Es gibt mittlerweile eine Vielzahl solcher Farbstoffe, die sich anhand ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden lassen. Die Vorläufer der neuen Generation von Farbstoffen wurde von Roger Y. Tsien synthetisiert (Baylor & Hollingworth 2000). 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA) ist durch chemische Modifikation aus Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) entstanden. BAPTA ist ebenso wie EGTA hochselektiv für Calciumionen, ist aber weniger pH-sensibel und bindet Calcium schneller (Tsien 1980). Fura-2 ist eines der Fluorochrome der neuen Generation. Er zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu Calcium und im Vergleich zu seinen Vorgängern sehr viel stärkeren Fluoreszenz aus (Grynkiewicz et al. 1985). Fura-2 kann die intakte Zellmembran aufgrund seiner elektrischen Ladung nicht passieren. Um eine invasive Methode zum Befüllen der Zellen mit Farbstoff dennoch zu vermeiden, nutzt man die ungeladene, lipophile Form: Fura-2-AM (Abb. II-6). Die fünf Carboxylgruppen des Fura-2 Salzes tragen nach Veresterung Acetoxymethylreste, die nicht in der Lage sind, Ionen zu binden.

Fura-2-AM kann durch die Membran diffundieren und wird intrazellulär in zwei Schritten durch unspezifische Esterasen zur freien Säure Fura-2, Formaldehyd und Acetat gespalten. Der Chelatbildner Fura-2 umschließt die Ca^{2+} -Ionen mit vier seiner Säurereste klauenartig und bildet so einen Komplex (griechisch: chele = Klaue). Die fünfte Carboxylgruppe kann für die Chelation nicht genutzt werden, da sie keine nennenswerte Ladung trägt. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass der aktive Farbstoff die Zelle

aufgrund seiner negativen Ladung nicht mehr verlassen und auch durch Perfusion des Präparates nicht mehr ausgewaschen werden kann.

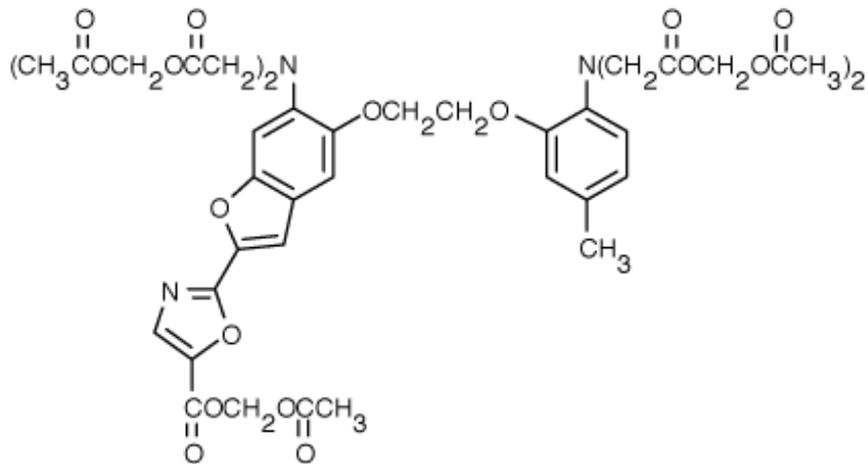


Abb. II-6: Fura-2-Acetoxyethylester.

Man unterscheidet aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften zwei Gruppen von Fluoreszenzfarbstoffen: Die Wellenlängen-stabilen („wavelength stable dyes“) und die Wellenlängen-wechselnden Farbstoffe („wavelength shifting dyes“). Bei Letzteren kann sich sowohl die Exzitations- als auch die Emissionswellenlänge durch Bindung des Zielions verändern. Das ist auch der entscheidende Vorteil dieser Farbstoffe, den man sich durch die Verhältnismessung zunutze macht (Grynkiwicz et al. 1985). Fura-2 gehört in die Gruppe der „wavelength shifting dyes“, es ändert mit Bindung an Ca^{2+} seine Anregungswellenlängenmaximum von 362 auf 340 nm. Das Emissionswellenlängenmaximum liegt unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration bei 510 nm. Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) lassen sich ermitteln, indem man das Verhältnis (Ratio) aus gemessener Emissionsintensität des an Ca^{2+} gebundenen Fura-2 und gemessener Emissionsintensität (beide bei 510 nm) des freien Farbstoffes bildet.

Die sich bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen ergebenden Exzitationspektren von Fura-2 sind in Abbildung II-7 aufgezeigt. In dieser Abbildung wird deutlich sichtbar, dass die Anregungsspektren von Fura-2 bei 360 nm einen Schnittpunkt bilden, den man als isoemissiven Punkt bezeichnet. Bei einer Anregung mit dem Wellenlängenmaximum des freien Fura-2 von 362 nm wäre eine Unterscheidung der Emissionswerte der beiden Farbstoffarten und somit auch eine Ratiobildung nicht möglich. Aus diesem Grund werden Verhältnismessungen mit Fura-2 bei 340 und 380 nm durchgeführt. Der gebundene Farbstoff wird also an seinem Maximum und der freie Anteil 18 nm von seinem Maximum entfernt angeregt. Allerdings ist dies die optimale Anregungswellenlänge, wenn man die Überlappung der Spektren berücksichtigt. Es ist der Bereich mit der größten Nettodifferenz zwischen den Kurven.

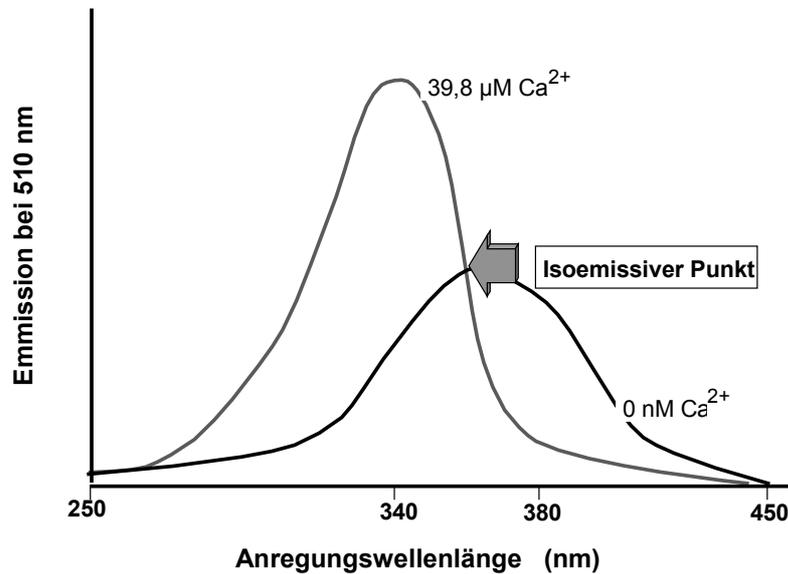


Abb. II-7: Exzitationsspektren von Fura-2 bei zwei verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen.

Im Vergleich zu Fluoreszenzmessungen mit Wellenlängen-stabilen Farbstoffen hat die Verhältnismessung folgende Vorteile (Tsien & Poenie 1986):

- Die Messung ist unabhängig von der absoluten Farbstoffkonzentration in der Zelle.
- Die Zellmorphologie, z.B. die Zelldicke, spielt keine Rolle.
- Fehlkalkulationen aufgrund von Ausbleichen oder durch das Austreten des Farbstoffes sind reduziert.

Die aufgezählten Faktoren spielen bei beiden Wellenlängen eine Rolle und werden durch die Anwendung der Verhältnismessung ausgeblendet.

Ein Maß für die oben bereits erwähnte Affinität der Farbstoffe zu Ca^{2+} und somit ein weiteres wichtiges Charakteristikum von Fura-2 ist die Dissoziationskonstante (K_D). Die K_D ist ein Maß für die Fähigkeit eines Chelators sein Zielion zu binden. In einer Bindungskurve (Abb. II-8) kann dargestellt werden, wie sich der Anteil an Ca^{2+} -gebundenem Farbstoff mit der Konzentration des Ions ändert. Ihr Verlauf ist sigmoidal.

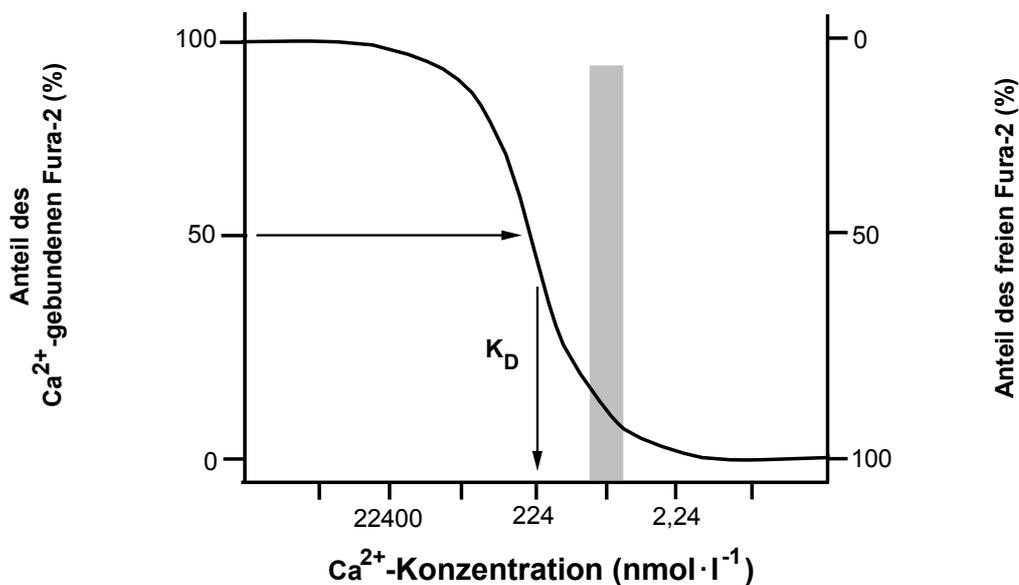


Abb. II-8: Fura-2 Bindungskurve in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. Die graue Säule markiert die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration unter Ruhebedingungen.

Per Definition liegt die K_D eines Indikatorfarbstoffes bei 50 %-Sättigung und wird als Konzentration angegeben. Je kleiner der Wert, umso höher ist die Affinität des Zielions zum Chelator. Im Fall von Fura-2 liegt die K_D bei einer Ca^{2+} -Konzentration von $224 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ein optimaler Wert um intrazelluläre Messungen durchzuführen. Der Bereich, in dem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen mit Fura-2 möglich sind, liegt zwischen $2,24$ und $22400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, mit einem Optimum zwischen $22,4$ und $2240 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Die physiologische, zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration unter Ruhebedingungen liegt bei ca. $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Bedingt durch das sigmoidal verlaufende Bindungsverhalten von Fura-2 können schon kleine Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen werden.

Mit der Verhältnismessung können natürlich nur Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration festgestellt, aber keine absoluten Werte ermittelt werden. Es ist heute üblich, die gemessenen Ratio-Werte als solche anzugeben. Möchte man dennoch die absoluten Ionenkonzentrationen ermitteln, ist eine Kalibrierung des Systems vor Beginn der Experimente erforderlich.

Bei einer extrazellulären Kalibrierung mittels mehrerer Lösungen mit Ca^{2+} -Konzentrationen von $39,8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bis hin zu einer Ca^{2+} -freien Lösung wird eine Eichkurve erstellt. Mit Hilfe der Grynkiewicz-Gleichung (Grynkiewicz et al. 1985) kann man nun die in den Experimenten gewonnenen Daten in Ca^{2+} -Konzentrationen umrechnen.

Die Grynkiewicz-Gleichung sieht folgendermaßen aus:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \cdot (S_{f2}) / (S_{b2})$$

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ = intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration

K_D = Dissoziationskonstante

R = Gemessene Ratio (Fluoreszenzsignal bei 340 nm dividiert durch Fluoreszenzsignal bei 380 nm)

R_{\min} = Ratio bei $0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Calcium

R_{\max} = Ratio bei $39,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Calcium

S_{f2}/S_{b2} = Fluoreszenzsignal bei 380 nm bei $0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Calcium dividiert durch das Fluoreszenzsignal bei 380 nm bei $39,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Calcium

Man sollte beim Umrechnen von Ratio-Werten in absolute Ca^{2+} -Konzentrationen jedoch immer bedenken, dass die Eichkurve ausschließlich mit Eichlösungen, also nicht unter intrazellulären Bedingungen gemessen wird. Die Fluoreszenz-Eigenschaften von Fura-2 ändern sich jedoch nicht nur mit Bindung an Calciumionen, sondern hängen auch von Faktoren wie Proteinkonzentration, pH und auch der Osmolarität der Lösung ab (Baylor & Hollingworth 2000). Selbst nach einer intrazellulär durchgeführten Kalibrierung sollten direkte Umrechnungen der gemessenen Ratio in Ca^{2+} -Konzentrationen immer unter diesen Aspekten und somit nur als Größenordnung der Konzentrationsänderung betrachtet werden.

II.6.2 Der Calcium-Imaging-Messstand

II.6.2.1 Mikroskop und elektrische Komponenten

Für die Durchführung der Experimente stand ein inverses Lichtmikroskop (Olympus IX-50; Olympus Optical, Tokyo, Japan) zur Verfügung, das mit einem Epifluoreszenz-Setup und einem Imagingsystem (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland; s. Abb. II-9) ausgestattet war.

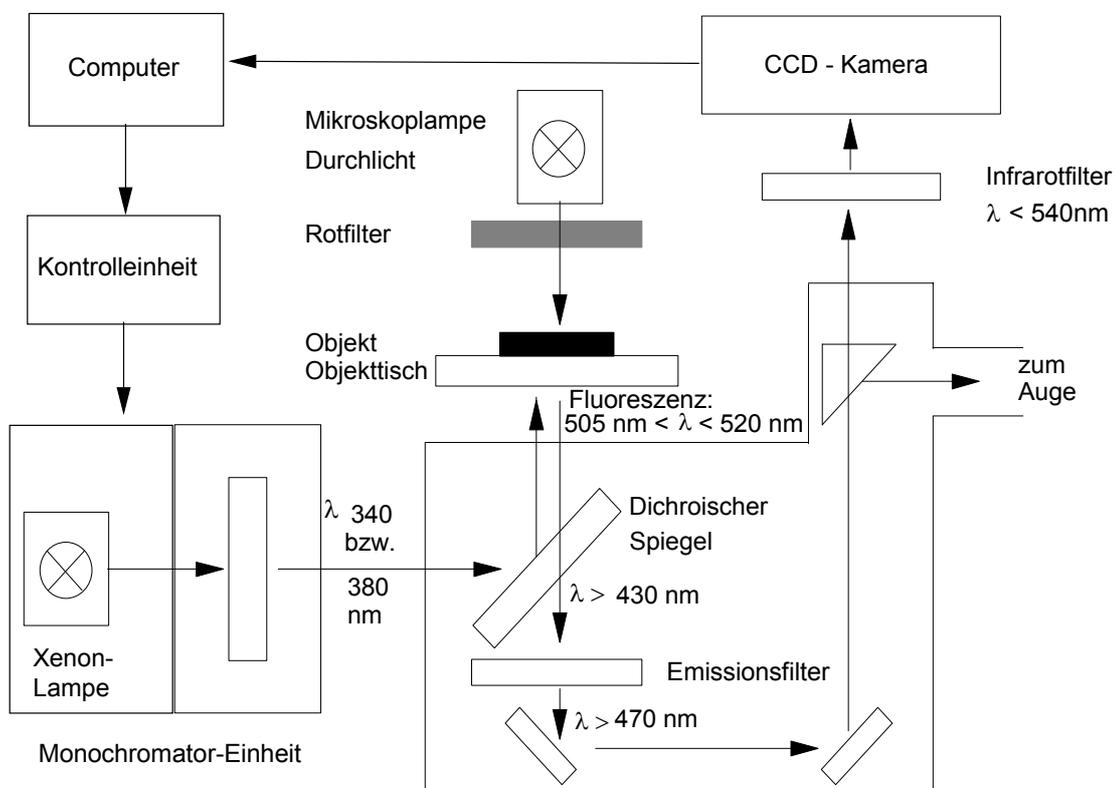


Abb. II-9: Schematische Darstellung des Systems für die Fluoreszenzmessung.

Die Software stellt das zentrale Element dar, da sie sowohl die angeschlossenen Geräte bedient als auch die im Experiment gewonnenen Daten über eine spezielle Schnittstelle im Computer erfasst. Eine Kontrolleinheit steuert anhand der in einem Software-Protokoll festgelegten Vorgaben die Monochromator-Einheit an. Aus dem Licht einer, in der

Monochromator-Einheit integrierter Xenonlampe entstehen mit Hilfe von Spiegeln, Linsen und einem Beugungsgitter die gewünschten Wellenlängen. Diese werden über ein Lichtleiterkabel und einen Epifluoreszenz-Kondensator zum Mikroskop geleitet. Ein dichroischer Spiegel reflektiert das auftreffende Anregungslicht ($\lambda < 500 \text{ nm}$) durch das Objektiv zu den Zellen. Das von den Zellen emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht (505 - 520 nm) kann den dichroischen Spiegel durchdringen und wird nach Durchtritt durch einen Emissionsfilter von einer CCD (charge-coupled device) - Kamera (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) erfasst. Die CCD-Kamera übermittelt die entstehenden Bilder an den Rechner. Bei entsprechender Vorauswahl im Software-Protokoll kann die gesamte Messung am Monitor des Computers verfolgt werden.

II.6.2.2 Messkammern und Perfusionssystem

Als Messkammern dienten die schon für die Präparation genutzten kleinen Zellkulturschalen (4 cm Durchmesser), in deren Bodenfläche zentral eine 10 mm große Aussparung gebohrt wurde. Die mit Plexusfragmenten bewachsenen Glasplättchen wurden mittels einer hochviskösen Silikonpaste (Baysilone[®]) unter der Bohrung an den Kammern befestigt. Die Perfusion erfolgte hydrostatisch. Mit Hilfe von Infusionsbestecken, die über eine großlumige, abgeschliffene Kanüle mit einem Verteiler verbunden waren, wurde das Präparat kontinuierlich mit etwa 1 ml pro Minute überspült. Ein mit ungefähr 3 ml gleichbleibendes Kammervolumen wurde über eine Absaugvorrichtung gewährleistet, die dem Zulauf gegenüberlag.

II.6.3 Das Calcium-Imaging-Experiment

II.6.3.1 Versuchsdurchführung

Zunächst mussten die zu untersuchenden Zellen mit dem Indikatorfarbstoff Fura-2 „beladen“ werden. Hierfür wurden 10 µl der Fura-2-AM Stammlösung (Endkonzentration: 5 µmol·l⁻¹) und 5 µl des Pluronic[®] F-127 Stammes (Endkonzentration: 0,05 % (Gew/Vol)) mit DMEM auf ein Gesamtvolumen von 2 ml gebracht. Unter Lichtschutz wurden je 500 µl dieser Lösung, im Austausch gegen das Kulturmedium, in die Kammern der Multischalen pipettiert und diese für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubation sollte keinesfalls länger andauern, da sonst nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch intrazelluläre Speicher aufgeladen werden. Unmittelbar nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit DMEM gespült, um überschüssiges Fura-2-AM auszuwaschen. Die Zellen wurden bis zur Messung im Brutschrank aufbewahrt.

Für die Messung wurde ein an der Messkammer fixiertes Glasplättchen in eine Haltevorrichtung am Objektisch des Mikroskops eingesetzt und geeignete Zellen im Sichtfeld justiert. Nachdem der Strahlengang des Mikroskops auf die CCD-Kamera umgestellt worden war, konnte mittels der Ansteuerungs- und Analyse-Software „TILLvisION“ (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) ein „Schnappschuss“ bei 340 nm der im Sichtfeld scharfgestellten Zellen erstellt werden. Die Fluoreszenzwerte werden, in Abhängigkeit von ihrer Stärke, von der Software in Falschfarben und Zahlenwerte umgesetzt (Abb. II-10).

Die Farbskala erstreckte sich ausgehend von dunkelblau bis blau über grün und gelb bishin zu rot. Die dunkelblauen Bereiche der Aufnahme stellen Regionen mit geringer bis gar keiner Fluoreszenz dar. Zellen mit der intensivsten Fluoreszenz bekamen den Farbton rot zugewiesen. Die zu

messenden Zellen wurden markiert (regions of interest = ROI) und die Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration innerhalb dieser Regionen im Verlauf des Experimentes ermittelt.

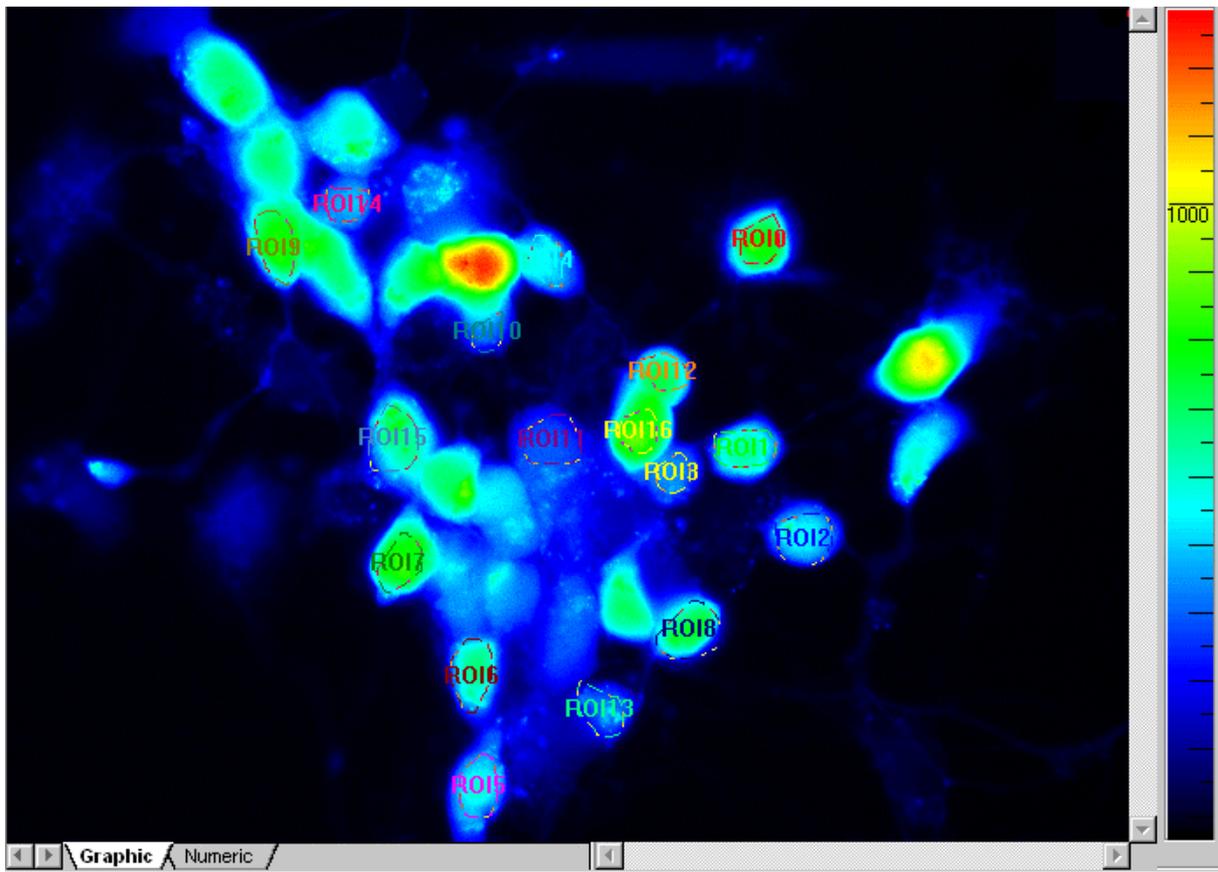


Abb. II-10: Falschfarbendarstellung eines Plexusfragmentes (Emission bei 340 nm).

Zu Beginn eines jeden Versuches wurde das zu untersuchende Präparat mit Standard-Tyrode superfundiert. Erst wenn unter diesen annähernd physiologischen Bedingungen eine Stabilisierung der Grundlinie (Baseline) für einige Minuten eingetreten war, wurde ein Lösungswechsel bzw. eine Substanzapplikation durchgeführt. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

II.6.3.2 Datenerfassung

Die Imaginganalyse-Software „TILLvisION“ steuert entsprechend den gewählten Einstellungen nicht nur den Versuch, sondern sie erfasst auch die gewonnenen Daten und setzt diese graphisch um. Für alle Versuche wurde dasselbe, vordefinierte Protokoll gewählt. Das Präparat wurde abwechselnd für jeweils 20 ms mit einer Wellenlänge von 340 und 380 nm angeregt. Die Sammelrate betrug 0,2 Hz. Das bedeutet, dass alle 5 Sekunden ein von der CCD-Kamera gesendetes Bildpaar auf dem Rechner gespeichert wurde. Die Software setzt die gesammelten Daten in Zahlenwerte um. Es ist möglich die bei 340 bzw. 380 nm gesammelten Daten separat zu betrachten. Über das gewählte Protokoll wurden jedoch direkt die Ergebnisse der Verhältnismessung in Form von Zahlen und Graphen dargestellt. Veränderungen der Ratio konnten so während des Versuches über den Verlauf der Graphen konstant verfolgt werden. Im Anschluss an den Versuch wurden die Daten zur weiteren Nutzung auf der Festplatte des Computers gespeichert.

II.7 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Substanzen, die nachfolgend nicht aufgeführt sind, wurden bei der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland bezogen.

Alexa Fluor [®] 488	Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande
Citiflour [®]	Citiflour Ltd., London, Großbritannien
Cy3-gekoppelter Ak	Dianova, Hamburg, Deutschland
FKS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fura-2-AM	Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
anti-GFAP	Chemicon, Hofheim, Deutschland
Infusionsbestecke	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Kollagenase Typ II	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Metronidazol	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Multischalen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Penicillin G	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
PFA	Merck, Darmstadt, Deutschland
anti-PGP 9.5	Ultra Clone Ltd., Isle of Wight, Großbritannien
Pluronic [®] F-127	Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rundfilter	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Silikonpaste	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Start-V [®] -Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Zellkulturschalen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland

Die für die Imaging-Messungen genutzten Toxine stammten ausnahmslos von Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel.

Alle eingesetzten Toxine sowie murines TNF α (1 μ g) wurden in wässriger Stammlösung, der 1 mg·ml⁻¹ bovines Serumalbumin (BSA) zugesetzt wurde, gelöst und in kleinen Aliquots bei -20 °C gelagert. Carbachol, NiCl₂, CoCl₂ und Verapamil wurden in Standard-Tyrode gelöst. Alle Prostaglandine, Leukotrien D₄ und Nifedipin wurde mit Ethanol (max. Endkonzentration 0,2 %, Vol/Vol) als Stammlösung angesetzt und war zu jeder Zeit lichtgeschützt. Die verwendeten Lösungsmittel zeigten in Kontrollversuchen keine Effekte.

II.8 Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Originalwerte oder als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM = standard error of the mean) angegeben. Ein F-Test bestimmte ob Student-t-Test oder U-Test zum Einsatz kam. Sowohl paariger als auch unpaariger Student-t-Test wurden, wie jeweils anwendbar, eingesetzt. Daten einer Versuchsserie wurden mit dem paarigen Student-t-Test verglichen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p < 0,05$) wurde als statistisch signifikant angesehen. Für die Durchführung der Berechnungen und die Erstellung der Grafiken kamen die Software-Programme LotusTM 1-2-3 und Lotus Freelance Graphics (Lotus Software/IBM Software Group, Cambridge, USA), StatMostTM 3.5 (Dataxiom Software Inc., Los Angeles, USA) sowie OriginTM 5.0 (Microcal, Northampton, USA) zum Einsatz.

III Ergebnisse

III.1 Dissoziierte Neurone und isolierte Ganglien-Kultur im Vergleich

Im Verlauf der ersten Ca^{2+} -Imaging-Versuche fiel auf, dass ein Großteil der eingesetzten isolierten myenterischen Neurone nicht auf eine Rezeptorstimulation durch das stabile Acetylcholinderivat Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) reagierten. Außerdem erwies sich, dass sich ein hoher Anteil der Zellpräparationen nicht ausreichend mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2 aufladen ließ. So waren von 57 Präparaten mit isolierten Neuronen nur 18 ausreichend mit Fura-2 beladen. In den anderen 39 Präparaten lag die "Aufladung" nur auf dem Niveau der Hintergrundfluoreszenz, die von der Imaging-Analyse-Software automatisch subtrahiert wird, um die Erfassung falsch positiver Daten zu verhindern oder erfuhren während der Kontrollphase vor Applikation der zu untersuchenden Substanz einen schnellen Fura-2-Ratioabfall.

Die Antwort der an den 18 ausreichend aufgeladenen Präparaten getesteten 81 Zellen auf Carbachol ist in Abb. III-1 dargestellt. Es fällt auf, dass 26 (32,1 %) von diesen 81 Zellen überhaupt nicht auf diesen Botenstoff mit einem Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reagierten; die Antwort der 55 ansprechenden Zellen war meist klein.

Daher wurde in den folgenden Versuchen ein neuartiges Präparat eingesetzt, d.h. intakte kultivierte myenterische Ganglien. Dort bot sich ein deutlich anderes Bild. Von 15 gewonnenen Ganglien waren 11 sehr gut mit Fura-2 beladen. Von 93 individuellen Zellen in diesen 11 Präparaten zeigten lediglich 10 Zellen (10,8 %) keinen Anstieg der Fura-2-Ratio nach Gabe von Carbachol, in allen anderen Zellen ließen sich z.T. starke Anstiege von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auslösen (Abb. III-1). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle nachfolgenden Versuche an der Ganglienkultur durchgeführt.

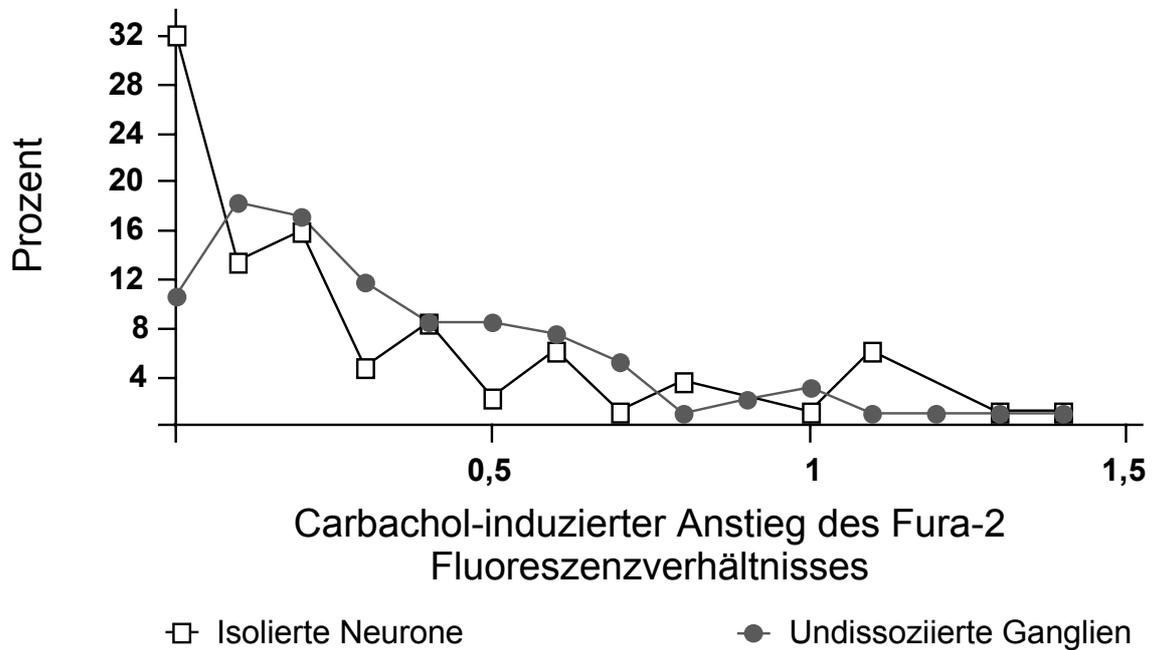


Abb. III-1: Vergleich des Anstiegs in der Fura-2-Ratio ausgelöst durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) an komplett isolierten myenterischen Neuronen (weiße Quadrate) und an undissoziierten, intakten myenterischen Ganglien (graue Kreise). Dargestellt ist das Verteilungsmuster des Carbachol-induzierten Anstiegs in der Fura-2-Ratio bei den beiden Präparaten (n = 81-93).

III.2 Charakterisierung des spannungsabhängigen Calciumkanals

III.2.1 Einfluss verschiedener Kaliumchlorid-Konzentrationen auf den Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Zum funktionellen Nachweis spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in den kultivierten Ganglien wurden in einer ersten Serie von Experimenten die Ganglien mit Tyrode-Lösungen, deren Kaliumchlorid-Konzentration unterschiedlich stark erhöht wurde, superfundiert. Die Perfusion mit einer kaliumreichen Tyrode führt zur Depolarisation der Zelle und somit zum Ca^{2+} -Einstrom durch Öffnen spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Tatsumi et al. 1988). Ziel dieser Versuche war es, eine Konzentration zu ermitteln, bei der nach dem mit der Depolarisation erfolgenden schnellen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine möglichst stabile und lang andauernde Plateauphase erreicht werden konnte. Beurteilt wurde der Verlauf des Fluoreszenzverhältnisses bei Kaliumchlorid-Konzentrationen von 10, 20, 35, 50 und 140,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zwei Bedingungen mussten erfüllt werden: Zum Einen sollte ein möglichst hoher maximaler Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erreicht werden, zum Anderen sollte diese erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ möglichst anhaltend stabil bleiben, um die möglichen Blocker in ansteigender Konzentration über einen längeren Zeitraum zugeben zu können.

Diese beiden Bedingungen wurden bei einer Konzentration von 35 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl am Besten erfüllt (Abb. III-2). Bei Wechsel der Superfusion von einer Standard-Tyrode zu einer 105,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl/35 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl stieg im Durchschnitt das Fura-2 Fluoreszenzverhältnis von $0,44 \pm 0,02$ auf $1,32 \pm 0,09$ an (n = 10).

Die Superfusion mit $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl führte zwar zu der stabilsten und am längsten andauernden Plateauphase, der maximale Anstieg des Fura-2 Fluoreszenzverhältnisses war jedoch für das angestrebte Versuchsprotokoll nicht ausreichend. Im Gegensatz dazu konnte mit der Perfusion einer $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kaliumchlorid-Lösung zwar ein ansehnlicher Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses erreicht werden, es bildete sich im Anschluss daran jedoch keine stabile Plateauphase aus. Kontrollversuche mit einer Ca^{2+} -freien Lösung zeigten, dass sowohl der hohe Anstieg als auch die Plateauphase durch einen Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär getragen sind (Daten nicht gezeigt).

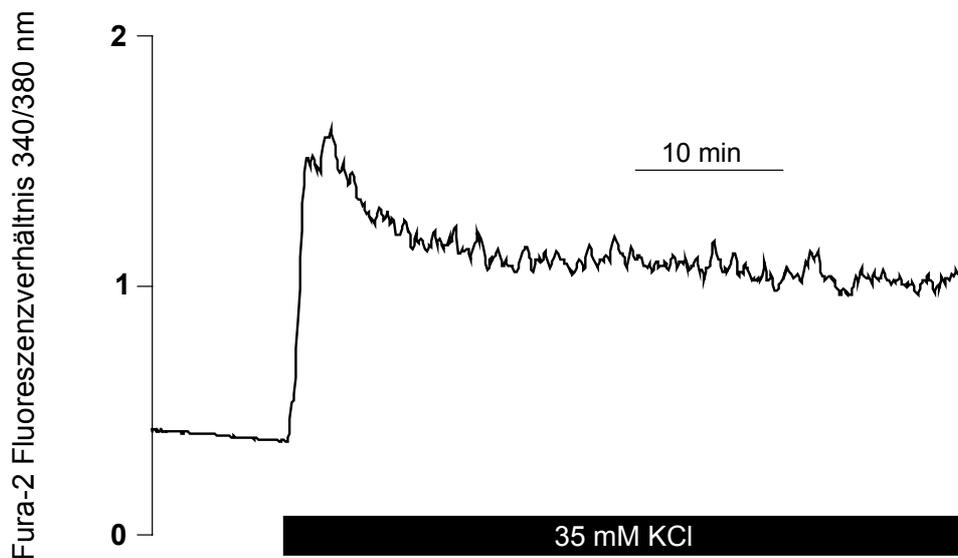


Abb. III-2: Die Depolarisation mit einer $35 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kaliumchlorid-Tyrode (schwarzer Balken) führte zu einem Anstieg des Fura-2 Fluoreszenzverhältnisses mit anschließender Plateaubildung. Der hier gezeigte Original-Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 10$. Statistik siehe Text.

III.2.2 Wirkung von Inhibitoren spannungsabhängiger Calciumkanäle auf die Kaliumchlorid-induzierte Depolarisation

In den folgenden Versuchen wurden verschiedene bekannte Antagonisten des spannungsabhängigen Calciumkanals (VDCC, voltage-dependent calcium channel) getestet. In einer ersten experimentellen Herangehensweise wurden die Zellen durch Superfusion mit $35 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Kaliumchlorid-Tyrode depolarisiert was, wie bereits erwähnt, zu einem stabilen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führte. Die Antagonisten wurden, nach Plateaubildung des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses, kumulativ in ansteigender Konzentration verabreicht.

Zunächst wurden unspezifischen Blocker der VDCCs eingesetzt. Die Metalle Ni^{2+} und Co^{2+} , die in diese Gruppe von Blockern gehören (Hsieh et al. 2001), induzierten einen signifikanten Abfall der Fluoreszenzratio und wiesen somit auf eine Abnahme des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hin (Abb. III-3). Die erste signifikante Hemmung konnte bei einer Konzentration von $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ festgestellt werden (Tabelle III-1).

Um die Subtypen des VDCC unter pharmakologischen Gesichtspunkten charakterisieren zu können, wurden im Folgenden Subtyp-spezifische Ca^{2+} -Kanal Blocker getestet. Getestet wurden ausschließlich mögliche Blocker der Ströme, die durch ein hohes Membranpotential ausgelöst werden.

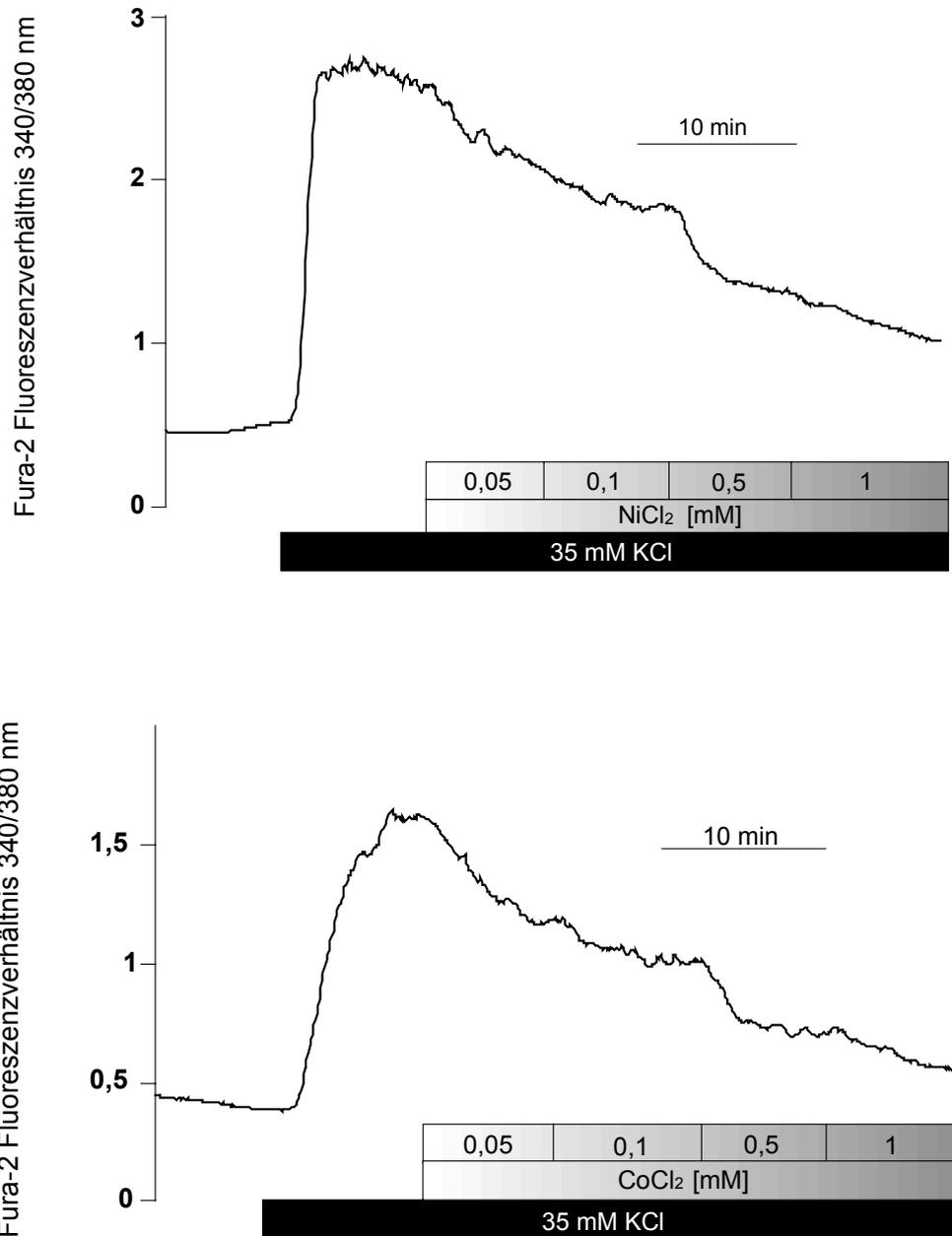


Abb. III-3: Originalaufzeichnungen des Fura-2 Fluoreszenzverhältnisses. Die Grafiken zeigen zunächst den KCl bedingten Anstieg (schwarze Balken) und dann den Abfall der Kurve nach kumulativer Zugabe der unspezifischen Blocker Ni²⁺ (obere Kurve) und Co²⁺ (untere Kurve). Dieser Abfall ist gleichbedeutend mit einer Abnahme der [Ca²⁺]_i. Die Kurvenverläufe sind repräsentativ für n = 20 (Ni²⁺) und n = 14 (Co²⁺). Statistik siehe Tab. III-1.

Substanz	Konzentration [mol l ⁻¹]	Δ Abfall der Fura-2-Ratio [min ⁻¹]	n
NiCl ₂	5 · 10 ⁻⁵	-0.003 ± 0.13	20
	10 ⁻⁴	-0.003 ± 0.10	20
	5 · 10 ⁻⁴	-0.35 ± 0.07 *	20
	10 ⁻³	-0.35 ± 0.08	20
CoCl ₂	5 · 10 ⁻⁵	-0.22 ± 0.16	14
	10 ⁻⁴	-0.22 ± 0.09	14
	5 · 10 ⁻⁴	-0.70 ± 0.07 *	14
	10 ⁻³	-0.70 ± 0.09	14

Tab. III-1: Die in der Tabelle abgebildeten Daten stellen die Differenz zum Spontanabfall des Fura-2 Fluoreszenzverhältnisses vor Zugabe des potentiellen Blockers dar. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM; * gibt die Konzentration an, bei der bei p < 0,05 die erste signifikante Hemmung beobachtet wurde (paariger Student t-Test versus Spontanabfall unter Kontrollbedingungen).

Nifedipin, ein L-Typ Ca²⁺-Kanalblocker vom Dihydropyridintyp (Kochegarov 2003), der klinisch seit langem zur Behandlung der arteriellen Hypertonie und stabiler Angina pectoris etabliert ist (Förstermann 2001), hatte eine erste signifikante Hemmung bei einer Konzentration von 5·10⁻⁷ mol·l⁻¹ zur Folge (Abb. III-4, Tab. III-2).

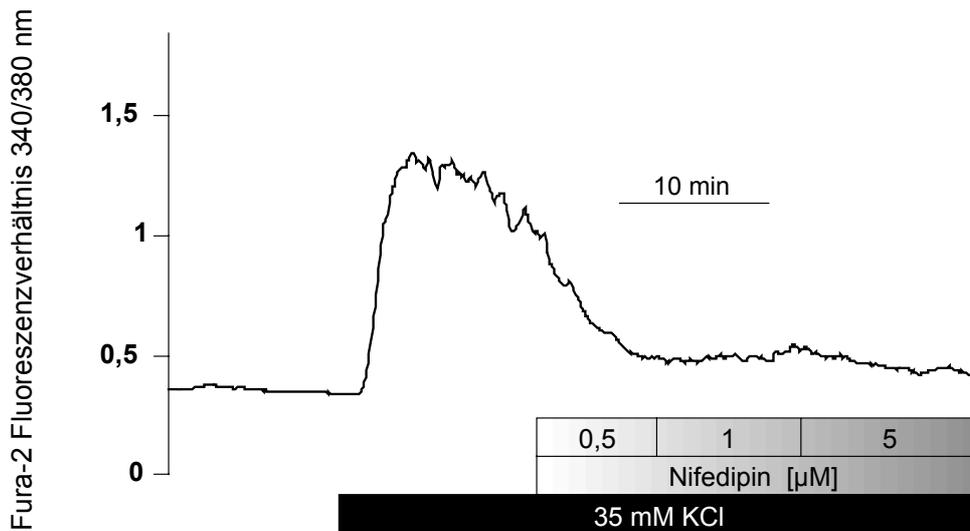


Abb. III-4: Durch die Gabe von Nifedipin ($0,5 - 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, grauer Balken) kommt es zu einem deutlichen Abfall des Fluoreszenzverhältnisses. Eine weitere Erhöhung der Konzentration führt zu keiner weiteren Abnahme. Dieser Original-Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 64$.

Im Gegensatz dazu konnte ein zweiter L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker, das Phenylalkylaminderivat Verapamil (Kochegarov 2003), die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nur sehr variabel und bei höheren Konzentrationen senken. Verapamil ist durch seine klinische Anwendung zur Herabsetzung von Frequenz am Herzen über Jahre bekannt (Schütz 2001). Diese Wirksamkeit zeigte sich bei den myenterischen Ganglien nicht. Die für eine Hemmung erforderliche Konzentration variierte von Ganglion zu Ganglion vorrangig zwischen $5 \cdot 10^{-6}$ und $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Die Antworten eines Ganglions wichen jedoch sehr stark von einander ab. Bei einzelnen Zellen zeigten Konzentration im Bereich von 10^{-6} bis $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ durchaus deutlich Hemmungen (Abb. III-5), wohingegen andere Neurone desselben Ganglions erst bei $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ reagierten.

Substanz	Konzentration [mol l ⁻¹]	Δ Abfall der Fura-2-Ratio [min ⁻¹]	n
Nifedipin	5 · 10 ⁻⁷	-0.67 ± 0.14*	64
	10 ⁻⁶	-0.67 ± 0.11	84
	5 · 10 ⁻⁶	-0.67 ± 0.10	69
	10 ⁻⁵	-0.67 ± 0.04	12

Tab. III-2: Die Daten stellen die Differenz zum Spontanabfall des Fura-2 Fluoreszenzverhältnisses vor Zugabe von Nifedipin dar. Im Fall von Nifedipin wurden mehrere Experimente in denen verschiedene Konzentrationsbereiche getestet wurden zusammengefasst, woraus sich eine unterschiedliche n-Zahl für die einzelnen Konzentrationen ergibt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM; * gibt die Konzentration an, bei der bei p < 0,05 die erste signifikante Hemmung beobachtet wurde (paariger Student t-Test versus Spontanabfall unter Kontrollbedingungen).

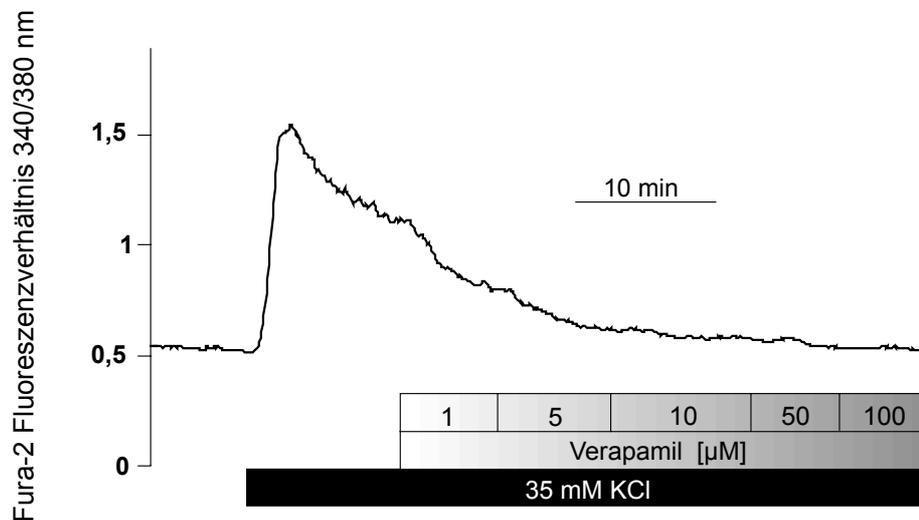


Abb. III-5: Die Gabe von 10⁻⁶ mol·l⁻¹ Verapamil führt im Fall der hier untersuchten Zelle zu einer Hemmung, die durch Zugabe von 5·10⁻⁶ mol·l⁻¹ noch leicht verstärkt wird. Dieser Original-Kurvenverlauf steht beispielhaft für n = 12.

Sich an die Untersuchung der L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker anschließend, wurde die Wirkung von zwei spezifischen N-Typ Ca^{2+} -Kanalblockern aus der Gruppe der ω -Conotoxine, ω -Conotoxin GVIA (CnTx-GVIA) und ω -Conotoxin MVIIA (CnTx-MVIIA), untersucht (Olivera et al. 1987, Feng et al. 2001, Kochegarov 2003). CnTx-GVIA, ein Polypeptid der Kegelschnecke *Conus geographus*, führte zu einer signifikanten Verminderung der Fura-2-Ratio bei einer Konzentration von $\geq 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Abb. III-6, Tab. III-3). CnTx-MVIIA, das Toxin von *Conus magnus*, war hingegen erstaunlicherweise nur bei einer relativ hohen Konzentration von $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ wirksam (Abb. III-7, Tab. III-3), obwohl es genauso wirkungsvoll wie CnTx-GVIA sein soll (Olivera et al. 1987, Kochegarov 2003).

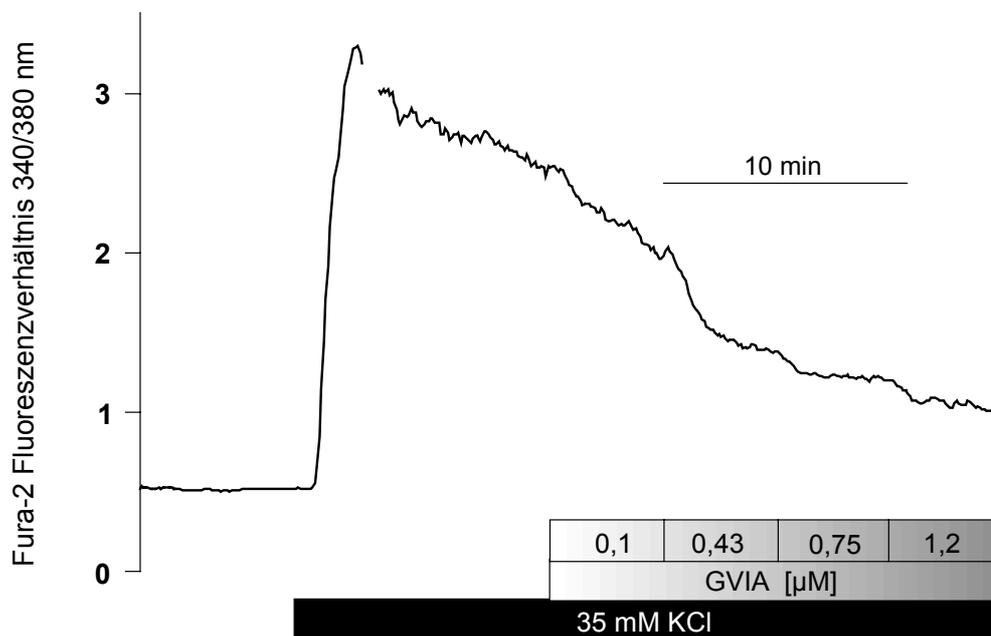


Abb. III-6: Originalaufzeichnung der Fluoreszenzsignal-Änderungen einer Zelle (typischer Verlauf für $n = 19$). In Anwesenheit von CnTx-GVIA kommt es zum Abfall des Fluoreszenzsignals, der bei einer Konzentration von $4,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ signifikant ist. Bei dem fehlenden Kurven-Teilstück handelt es sich um einen Messartefakt der durch ein kurzes Flackern der Xenonlampe ausgelöst wurde.

Ergebnisse

Substanz	Konzentration [mol l ⁻¹]	Δ Abfall der Fura-2-Ratio [min ⁻¹]	n
CnTx-GVIA	10 ⁻⁷	-0.16 ± 0.14	19
	4.3 · 10 ⁻⁷	-0.58 ± 0.10 *	26
	7.5 · 10 ⁻⁷	-0.61 ± 0.17	28
	1.2 · 10 ⁻⁶	-0.79 ± 0.06	19
CnTx-MVIA	10 ⁻⁷	-0.04 ± 0.09	31
	5 · 10 ⁻⁷	-0.09 ± 0.08	31
	10 ⁻⁶	-0.09 ± 0.07	21
	2 · 10 ⁻⁶	-0.32 ± 0.12 *	12

Tab. III-3: Die Daten geben die Differenz zum Spontanabfall des Fluoreszenzsignals an. Wie schon im Fall des Nifedipin (siehe Tab. III-2) wurden auch bei diesen beiden Toxinen mehrere Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zusammengefasst, womit sich die verschiedenen n-Zahlen erklären. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM; * gibt die Konzentration an, bei der bei p < 0,05 die erste signifikante Hemmung beobachtet wurde (paariger Student t-Test versus Spontanabfall unter Kontrollbedingungen).

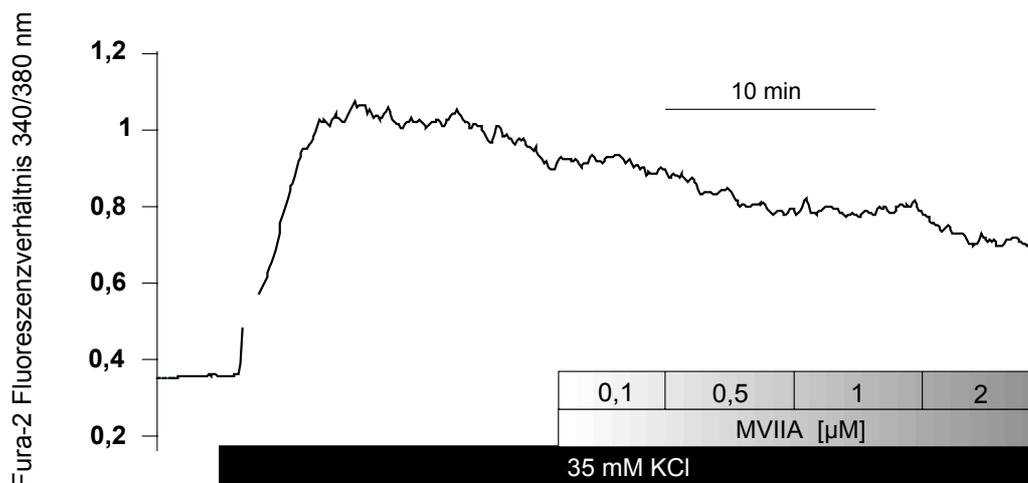


Abb. III-7: Original-Kurvenverlauf repräsentativ für n = 12. Bei dem fehlenden Kurven-Teilstück handelt es sich um einen Messartefakt (siehe Abb. III-6).

Um die mögliche Beteiligung von P- und Q-Typ Calciumkanälen zu untersuchen, wurden zwei Toxine aus dem Gift der Trichternetzspinne *Agelenopsis aperta*, ω -Agatoxin IVA (AgaTx-IVA) und ω -Agatoxin TK (AgaTx-TK), eingesetzt (Mintz et al. 1992, Teramoto et al. 1993, Nooney et al. 1997). AgaTx-IVA induzierte einen signifikanten Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ bei einer Konzentration von $\geq 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Abb. III-8, Tab. III-4). Die Gabe von $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ AgaTx-TK führte jedoch zu einem paradoxen Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ (Daten nicht aufgeführt).

Substanz	Konzentration [mol l ⁻¹]	Δ Abfall der Fura-2-Ratio [min ⁻¹]	n
AgaTx-IVA	10^{-8}	0 ± 0.12	13
	$2 \cdot 10^{-8}$	-0.03 ± 0.09	13
	10^{-7}	-0.14 ± 0.13	13
	$2 \cdot 10^{-7}$	$-0.44 \pm 0.12^*$	24
	$3 \cdot 10^{-7}$	-0.44 ± 0.13	30
	$5 \cdot 10^{-7}$	-0.44 ± 0.06	11
SNX-482	$1,5 \cdot 10^{-8}$	-0.11 ± 0.14	8
	$3 \cdot 10^{-8}$	-0.11 ± 0.23	8
	10^{-7}	-0.11 ± 0.37	8
	$2 \cdot 10^{-7}$	$-1.10 \pm 0.25^*$	8

Tab. III-4: Die Daten geben die Differenz zum Spontanabfall des Fluoreszenzsignals an. Auch hier wurden, im Fall von Aga-Tx-IVA, wieder mehrere Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zusammengefasst (n-Zahl). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM; * gibt die Konzentration an, bei der bei $p < 0,05$ die erste signifikante Hemmung beobachtet wurde (paariger Student t-Test versus Spontanabfall unter Kontrollbedingungen).

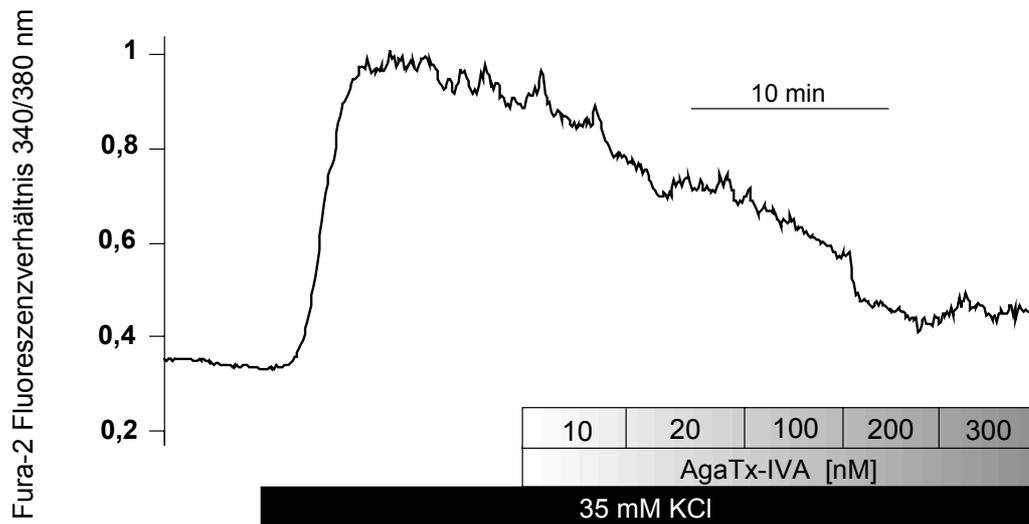


Abb. III-8: Originalaufzeichnung der Fluoreszenzsignal-Änderungen einer Zelle (typischer Verlauf für $n = 13$). In Anwesenheit von AgaTx-IVA kommt es zum Abfall des Fluoreszenzsignals, der bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ signifikant ist.

Schlussendlich wurde das Toxin SNX-482, ein Peptid das aus dem Gift der afrikanischen Riesenvogelspinne *Hysteroocrates gigas*, in einem Bereich zwischen $1,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ und $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ getestet, da es nach neusten Erkenntnissen R-Typ Calciumkanäle hemmen soll, die bisher als resistent (R = „resistent to drugs“) galten (Newcomb et al. 1998). Nur die Gabe der höchsten, untersuchten Konzentration dieses Blockers war wirkungsvoll (Abb. III-9, Tab. III-4).

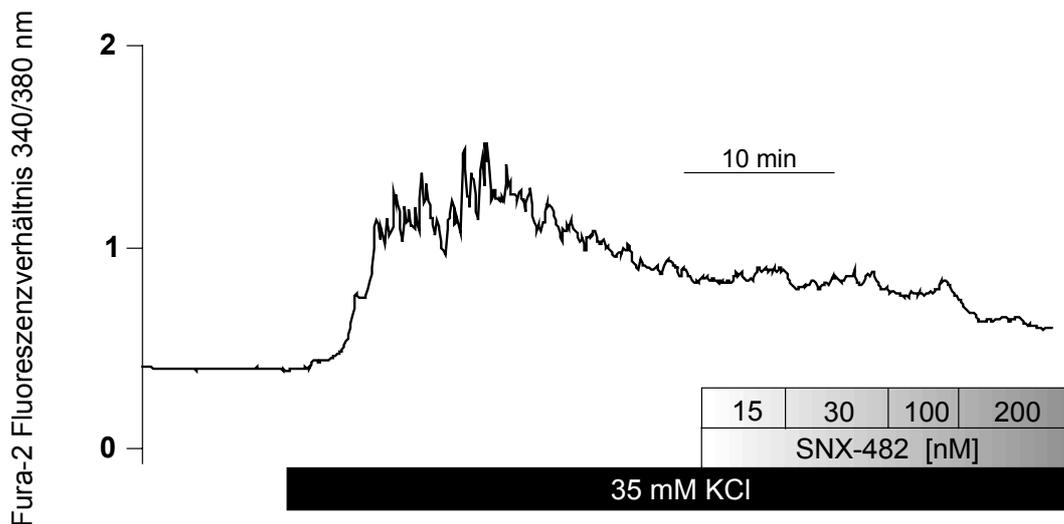


Abb. III-9: Wie in dieser Abbildung deutlich zu erkennen, kommt es erst bei einer Gabe von $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ SNX-482 zu einem signifikanten Abfall des Fura-2 Fluoreszenzverhältnisses. Der Original-Kurvenverlauf ist repräsentativ für $n = 8$.

III.2.3 Wirkung von Calciumkanal-Inhibitoren auf eine Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Antwort

Nach dieser basalen Charakterisierung wurde anstelle der KCl-Depolarisation ein physiologischer Stimulus für das Öffnen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, nämlich die Stimulation mit dem stabilen Acetylcholinderivat Carbachol (s. Abb. III-1), gewählt, um herauszufinden, ob auch unter diesen Bedingungen ähnliche Typen von Ca^{2+} -Kanälen aktiviert werden. In diesem Fall bedeutete dies eine Depolarisation der Zellen ausgelöst durch nicotinerge Rezeptorstimulation (Rehn et al. 2004). Die $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort auf Carbachol wurde zunächst allein und dann in Gegenwart des potentiellen Inhibitors getestet. Aus Patch-Clamp Experimenten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass bei wiederholten Applikationen von Carbachol keine Desensitivierung der myenterischen Ganglienzellen auftritt. Die im vorhergehenden Modell schon eingesetzten Blocker Nifedipin und CnTx-GVIA reduzierten beide die durch Carbachol hervorgerufene Zunahme der Fura-2 Fluoreszenzratio.

Eine Carbachol-Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ verursachte einen maximalen Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses von durchschnittlich $0,26 \pm 0,04$. In Anwesenheit von Nifedipin ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) verringerte sich der Carbachol-induzierte Anstieg auf $0,08 \pm 0,01$ ($n = 9$, $P < 0,05$, paariger Student-t-Test). CnTx-GVIA ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) war noch effektiver, es senkte die maximal erreichte Fura-2 Fluoreszenzratio von $0,60 \pm 0,13$ auf $0,15 \pm 0,05$ ab ($n = 16$, $P < 0,05$, paariger Student-t-Test; Abb. III-10, Abb. III-11).

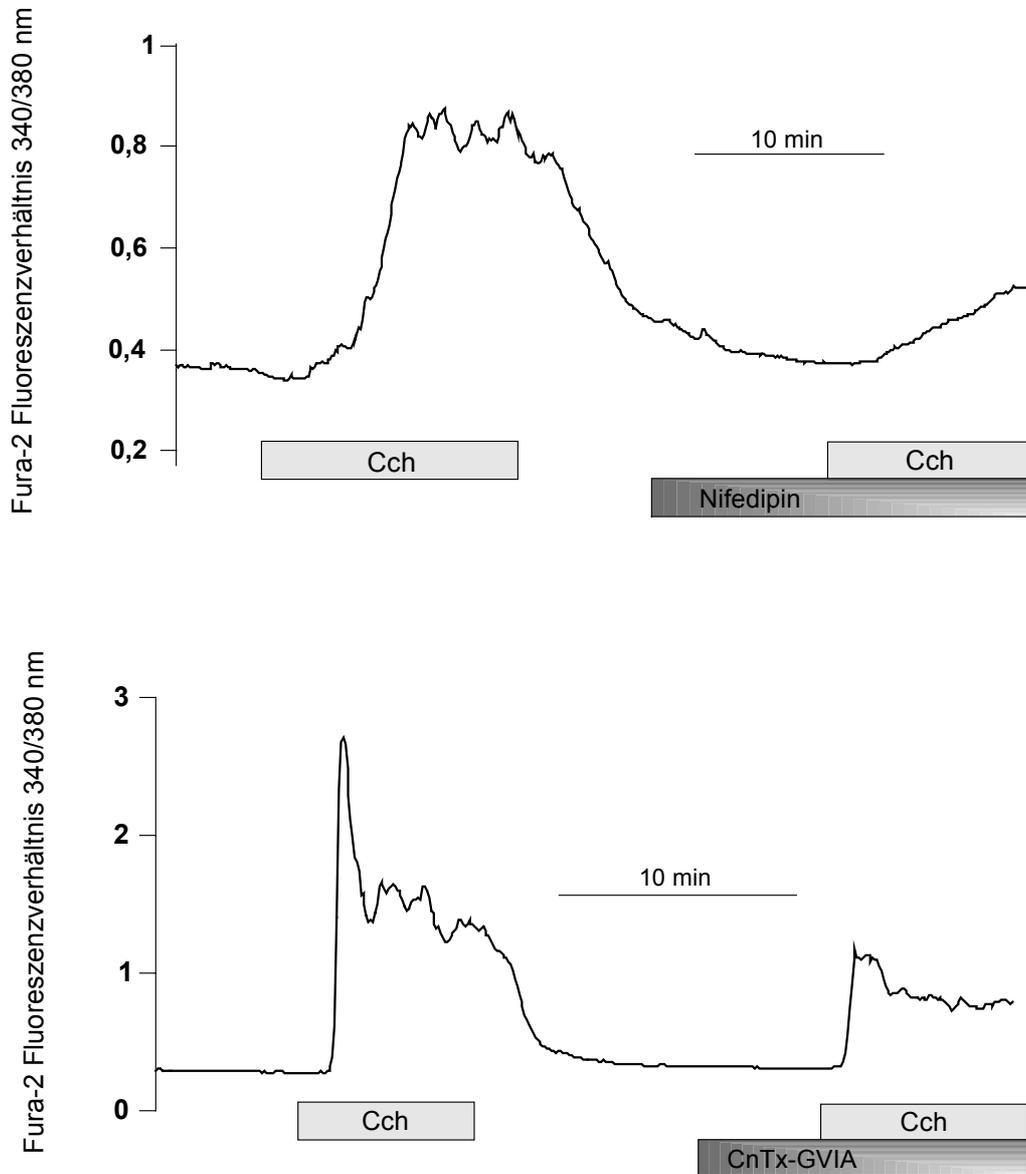


Abb. III-10: Effekt von Carbachol (Cch; $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, kleine hellgraue Balken) auf das Fura-2 Fluoreszenzverhältnis in Abwesenheit und in der Anwesenheit von Nifedipin ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, obere Kurve) und CnTx-GVIA ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, untere Kurve). Die Original-Kurvenverläufe sind repräsentativ für $n = 9$ (Nifedipin) und $n = 16$ (CnTx-GVIA).

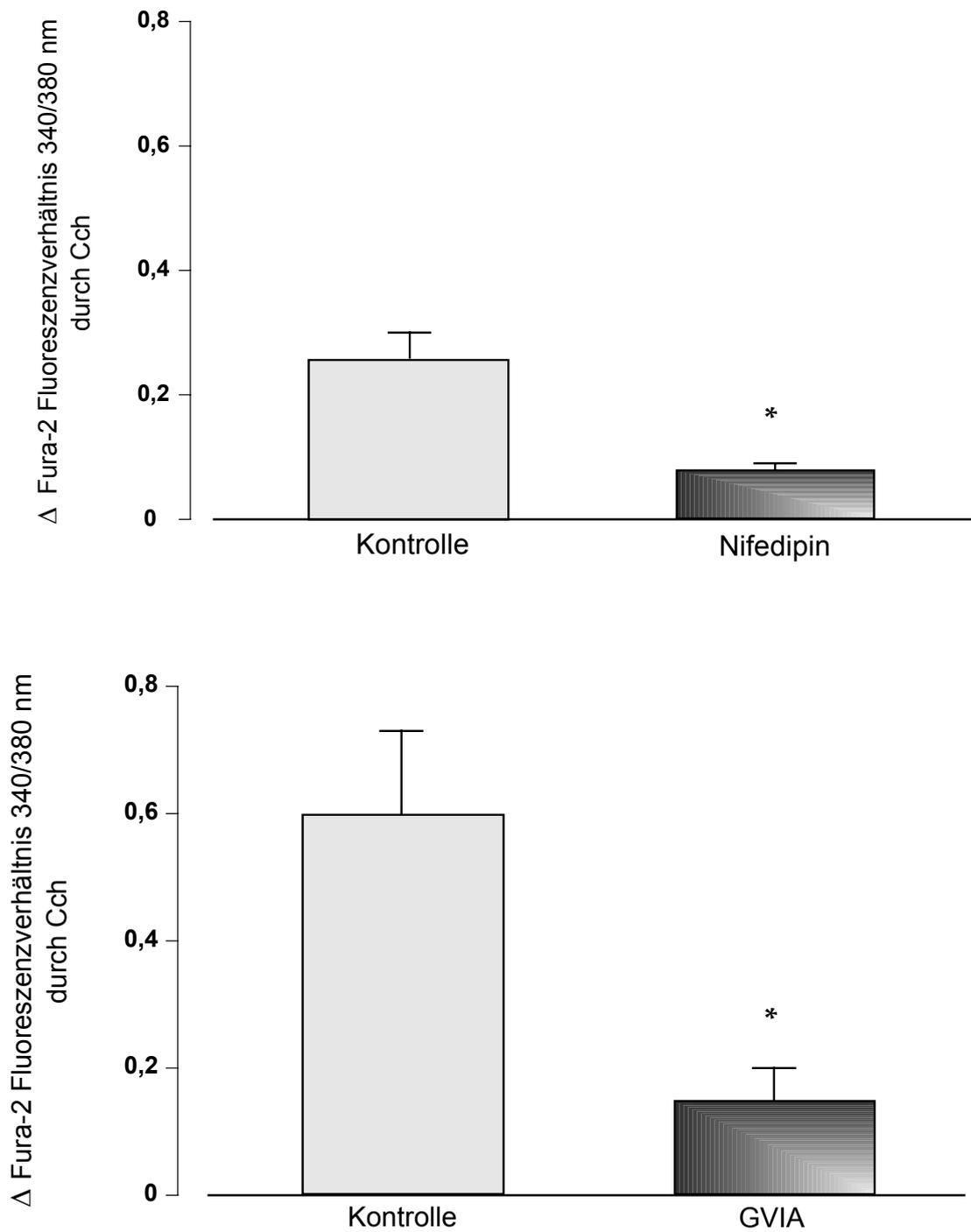


Abb. III-11: Darstellung der signifikanten Abnahme des Carbachol-induzierten maximalen Anstieges der Fluoreszenzratio nach Gabe von Nifedipin (oberes Diagramm) und CnTx-GVIA (unteres Diagramm). Werte sind Mittelwerte \pm SEM; n = 9 (Nifedipin) und n = 16 (CnTX-GVIA); * = p < 0,05 versus Kontrolle.

III.2.4 Einfluss einer $TNF\alpha$ -Vorbehandlung auf eine Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Antwort

In neueren Patch-Clamp-Studien an myenterischen Neuronen wurde beobachtet, dass eine $TNF\alpha$ -Vorbehandlung über Nacht die Zelle hyperpolarisiert und die durch nicotinerge Rezeptorstimulation hervorgerufene Depolarisation potenziert wurde (Rehn et al. 2004). Daher war ich an möglichen Änderungen des $[Ca^{2+}]_i$ nach nicotinerger Rezeptorstimulation in Anwesenheit des Zytokines interessiert.

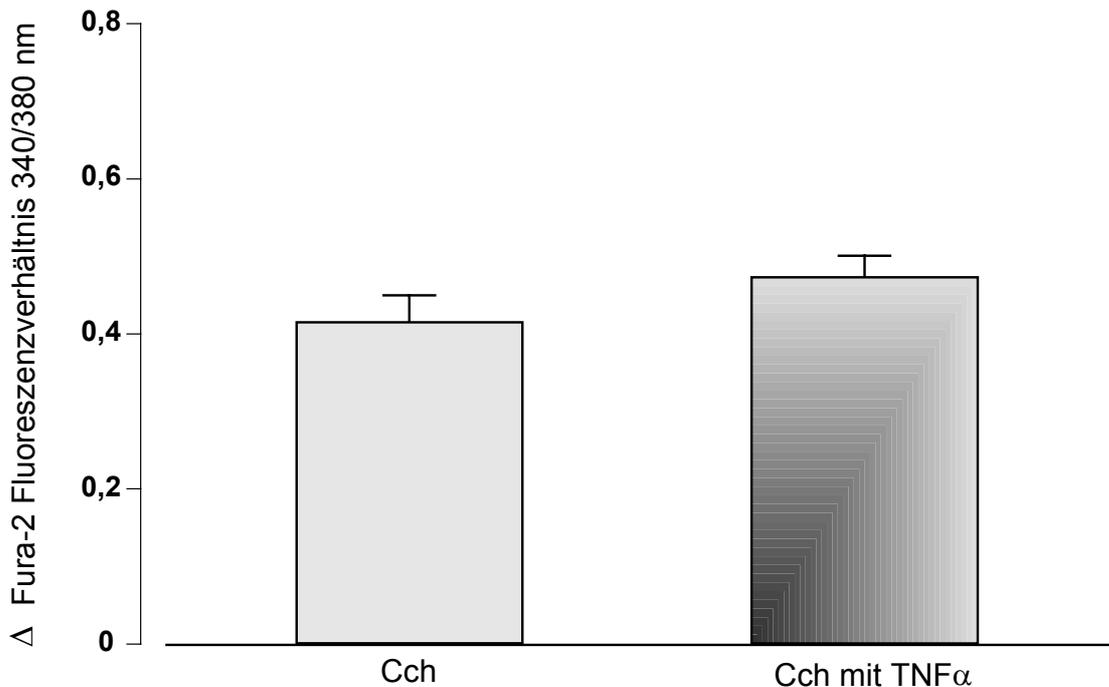


Abb. III-12: Der Carbachol(Cch)-induzierte maximale Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses nach $TNF\alpha$ -Vorbehandlung ist gegenüber den Kontrollexperimenten nicht signifikant erhöht. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM; n= 96 (Kontrolle) und n = 149 ($TNF\alpha$ -Vorbehandlung).

Im Gegensatz zu den Veränderungen des Membranpotentials nach nicotinerger Rezeptorstimulation hat TNF α die $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort nach Carbachol-Gabe ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) nicht signifikant verändert. Innerhalb der Kontrollgruppe löste Carbachol einen maximalen Anstieg des Fura-2 Fluoreszenzsignals von $0,42 \pm 0,03$ aus ($n = 96$). Nach Vorbehandlung mit TNF α ($100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) betrug diese Zunahme $0,47 \pm 0,03$ ($n = 149$, $P > 0,05$ versus unbehandelte Kontrolle, unpaariger Student-t-Test; Abb. III-12).

III.2.5 Einfluss verschiedener Eicosanoide auf die $[Ca^{2+}]_i$ myenterischer Neurone

Die direkte Wirkung von Eicosanoiden, z.B. PGI $_2$, auf die Erregbarkeit von Neuronen des Plexus submucosus ist bekannt (Diener et al. 1988). Ein möglicher Einfluss von Eicosanoiden auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von myenterischen Neurone war daher von naheliegender Interesse, da eine Erregung von Neuronen durch die dabei stattfindende Depolarisation zu einem Öffnen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und damit zu einem Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals führen sollte.

Untersucht wurde die Wirkung von verschiedenen Prostaglandinen und des Leukotriens D $_4$ (LTD $_4$; siehe Tabelle III-5). Alle verwendeten Prostaglandine wurden in einer Konzentration von $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt. Abweichend davon wurde LTD $_4$ in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ getestet. Folgende 3 Bedingungen mussten erfüllt sein, damit ein Eicosanoid-Effekt akzeptiert wurde:

1. Die Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ trat innerhalb von maximal fünf Minuten nach Zugabe auf.
2. Die Amplitude lag mindestens über der 4-fachen Standardabweichung der Streuung der Fura-2-Ratio während der Kontrollphase vor Applikation des Eicosanoids.
3. Die Amplitude des Anstiegs der Fura-2-Ratio war größer als 0,01.

Die generelle Stimulierbarkeit der Zellen wurde durch Zugabe von Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) getestet.

Im Fall von PGD_2 reagierten 29,6 % der 54 auf Carbachol ansprechenden Zellen nach Zugabe mit einem solchen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Ergebnisse aller untersuchten Eicosanoide sind in Tabelle III-5 zur Übersicht aufgeführt.

Die beobachteten Effekte divergieren allerdings sehr stark in Höhe, Dauer und Verlauf.

Untersuchtes Eicosanoid <i>eingesetzte</i> Konzentration	n-Zahl	Anzahl der auf Carbachol reagierenden Zellen	Eicosanoid-Effekte in Prozent
$\text{PGD}_2 \ 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	55	54	29,6
$\text{PGE}_2 \ 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	43	43	34,9
$\text{PGF}_{2\alpha} \ 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	54	51	15,7
$\text{PGI}_2 \ 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	79	56	24,6
$\text{LTD}_4 \ 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	5	5	0

Tab. III-5: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Eicosanoid-Effekte an der Gesamtzahl Carbachol positiver Zellen. Zum Vergleich finden sich in Spalte 2 die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen.

IV Diskussion

Das enterale Nervensystem ist in seiner Gesamtheit über die Jahre ausgiebig sowohl in elektrophysiologischer als auch in immunhistochemischer Hinsicht untersucht worden. In der jüngsten Vergangenheit wurden diese Ansätze zusätzlich durch Imaging-Techniken und molekularbiologische Analysen ergänzt. Gleichwohl gibt es noch mehr als genug offene Fragen. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse beschreiben weitere Erkenntnisse zum Plexus myentericus der Ratte in Zellkultur und beschäftigen sich insbesondere mit der Rolle der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle.

Die funktionelle Charakterisierung bzw. der funktionelle Nachweis von Subtypen des spannungsabhängigen Calciumkanals stand im Vordergrund, gleichzeitig wurde der mögliche Einfluss des Zytokins $\text{TNF}\alpha$ und verschiedener Eicosanoide auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von myenterischen Neuronen untersucht.

Es wurden enterische Zellen neugeborener Ratten kultiviert, da sie leicht isoliert werden können und es zu keinen größeren Veränderungen der Kinetik und der Spannungsabhängigkeit myenterischer Ca^{2+} -Kanäle zwischen Geburt und frühem Erwachsenenalter kommt (Franklin & Willard 1993). Hinzu kommt, dass sich die Gesamtpopulation der myenterischen Neurone erwachsener Ratten im Vergleich zu jugendlichen Tieren nicht verändert (Johnson et al. 1998).

IV.1 Funktioneller Nachweis von Subtypen des spannungsabhängigen Calciumkanals

In Abhängigkeit ihrer pharmakologischen Eigenschaften und der Kinetik ihrer Ströme werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VDCC) in verschiedene Gruppen unterteilt: Die bei niedrigem Membranpotential aktivierten T-Typ Ca^{2+} -Kanäle („T“ steht für „transient current“) und eine weiter zu unterteilende Gruppe von Ca^{2+} -Kanälen, die bei hoher Membranspannung („high-voltage activated“, HVA) aktiviert werden. T-Typ Ca^{2+} -Kanäle, die nach ihrer α_1 -Untereinheit-Struktur als $\text{Ca}_v3.1$ bis $\text{Ca}_v3.3$ bezeichnet werden, weisen eine geringe Einzelkanalleitfähigkeit auf.

Die high-voltage activated Ca^{2+} -Kanäle werden in L-, N-, P-, Q- und R-Typ untergliedert. L-Typ Ca^{2+} -Kanäle („L“ steht für „long-lasting current“) werden klassischerweise durch Dihydropyridine und Phenylalkylamine gehemmt. Sie bilden eine Gruppe von HVA Ca^{2+} -Kanälen, die vor allem in Muskel- und endokrinen Zellen vorkommt und die die größte Einzelkanalleitfähigkeit unter den spannungsabhängigen Kanälen aufzeigt (Förstermann 2001). Entsprechend ihrer α_1 -Untereinheit-Struktur werden sie auch - in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert - als $\text{Ca}_v1.1$ bis 1.4 bezeichnet. An neuronalen Zellen kommen $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$ vor (Hell et al. 1993, Catterall 2000).

Der ebenfalls zu den HVA Ca^{2+} -Kanälen gehörende N-Typ Ca^{2+} -Kanal (auch $\text{Ca}_v2.2$ genannt) wird durch bestimmte ω -Conotoxine (CnTx) wirksam blockiert. Diese Peptide entstammen dem Gift der Kegelschnecken, *Conacae*, deren Lebensraum sich in seichten, tropischen Gewässern befindet. Bisher kennt man ca. 500 verschiedene Kegelschnecken und jede dieser Schnecken besitzt vermutlich über 100 verschiedene Giftkomponenten (Terlau & Olivera 2004). Hierzu zählen unter anderem das CnTx GVIA aus dem Gift der Kegelschnecke *Conus geographus*, das auch dem Menschen gefährlich werden

kann, und das CnTx MVIIA aus dem Gift der Fisch jagenden Schnecke *Conus magnus* (Abb. IV-1). Beide blockieren sie den N-Typ Kanal, wobei die Blockade durch CnTx MVIIA reversibel, die durch CnTx GVIA jedoch irreversibel ist (Hirata et al. 1997).



Abb. IV-1: Eine Fisch jagende *Conus*-Spezies beim Beutefang. Der Fisch wird mit Hilfe des rötlichen Schlundrohres angelockt und mittels eines im Anschluss abgeschossenen Giftpfeiles gelähmt (Terlau et al. 1996).

P-Typ Ca^{2+} -Kanäle, wobei „P“ für Purkinje-Zellen steht, da dieser Ca^{2+} -Kanalsubtyp erstmals in diesen Zellen entdeckt wurde, sind insensitive gegenüber den beiden vorgenannten Toxinen, sprechen aber auf eine Fraktion des Giftes der Trichternetzspinne (*Agelenopsis aperta*), das ω -Agatoxin IVA (AgTx IVA), an. P-Typ Kanäle werden schon von sehr geringen Konzentrationen des Toxins gehemmt. Der Stromanteil, der erst bei höheren AgTx IVA-Konzentrationen gehemmt werden kann, wurde als Q-Typ bezeichnet. Dieser Subtyp wurde erstmals in zerebralen Körnerzellen gefunden. Der P- und Q-Typ Ca^{2+} -Kanal werden nach der Klassifizierung ihrer α_1 -Untereinheit-Gene auch als $\text{Ca}_v2.1$ bezeichnet.

Der verbleibende, durch keinen der bisher genannten Antagonisten hemmbaren Ca^{2+} -Einwärtsstrom wurde als R-Typ ($\text{Ca}_v2.3$) bezeichnet, wobei „R“ für „resistant“ steht. Zumindest ein Teil dieser R-Typ Ca^{2+} -Kanäle scheint empfindlich gegenüber SNX-482 zu sein, einem Toxin aus dem Gift der afrikanischen Riesenvogelspinne, *Hysteroocrates gigas*, eine der größten Taranteln (Siehe z.B. Ertel et al. 2000, Kochegarov 2003, Newcomb et al. 1998, Nooney et al. 1997). Alle voranstehend beschriebenen Ca^{2+} -Antagonisten wurden im Verlauf dieser Arbeit eingesetzt.

In einer ersten experimentellen Herangehensweise wurde eine Depolarisation der Zellen mittels einer hohen extrazellulären Kaliumkonzentration induziert (Tatsumi et al. 1988). Die Konzentrationsabhängige Inhibition der KCl-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Antwort durch die Metalle Nickel und Kobalt, zwei unspezifischen Antagonisten des VDCCs, zeigt, dass dieses Protokoll zu einer Aktivierung dieses Typs von Kationenkanälen führt (siehe Abb. III-3). Die beobachtete Hemmung durch divalente Kationen begann bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, das ist etwas höher als in der Literatur für andere Neurone beschrieben (N'Gouemo & Morad 2003).

Bei dieser KCl-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Antwort scheinen mehrere Subtypen der VDCC eine Rolle zu spielen; der L-Typ Ca^{2+} -Kanal ist einer von ihnen. Der L-Typ Antagonist Nifedipin, klinisch im Einsatz bei der Behandlung von Hypertonie und stabiler Angina pectoris, hatte eine signifikante Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zur Folge (s. Abb. III-4). Ein anderer Antagonist, das Verapamil, hingegen war weniger effektiv und zeigte ziemlich variable Ergebnisse. Verapamil wird klinisch zur Therapie supraventrikulärer Tachyarrhythmien durch Herabsetzung der Frequenz über eine Verzögerung der Erregungsausbreitung in Sinus- und AV-Knoten benutzt. Eine unerwünschte kardiale Nebenwirkung ist die Herabsetzung der myokardialen Kontraktilität. Phenylalkylamine sind aber - ebenso wie Dihydropyridine -

auch potente Dilatatore arterieller Gefäßmuskulatur (Förstermann 2001, Schütz 2001). Die divergente Sensitivität der myenterischen Ca^{2+} -Kanäle gegenüber Nifedipin und Verapamil deutet auf Unterschiede in den Eigenschaften der enterischen Ca^{2+} -Kanäle zu den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen im kardiovaskulären System hin, möglicherweise bedingt durch eine andere Zusammensetzung der Untereinheiten (siehe weiter unten), Splice-Varianten oder ähnliches, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

Im Gegensatz dazu wurde eine konsistente Hemmung bei Einsatz des N-Typ Blockers CnTx GVIA beobachtet (s. Abb. III-6). Eine erste signifikante Hemmung wurde bei einer Konzentration von $4,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ gemessen. Diese Konzentration stimmt mit den Größenordnungen in früheren Publikationen überein (Kochegarov 2003). Von geringerer Wirkung war indes CnTx MVIIA, welches erst bei relativ hohen Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ einen inhibitorischen Effekt zeigte. Dies überrascht insofern, als dass dieses Toxin in der Literatur als ebenso potent beschrieben wird wie CnTx GVIA, wenn es um die Hemmung von N-Typ Ca^{2+} -Kanälen bei Säugerzellen geht (Kochegarov 2003, Olivera et al. 1987).

Die Conotoxine sind nicht nur experimentell, sondern auch therapeutisch von Interesse. So ist das CnTx MVIIA (Ziconotide; Prialt™) in den USA schon ein Kandidat klinischer Studien bei AIDS und Krebspatienten und steht als mögliches Therapeutikum für den Menschen bei chronischen Schmerzen vor der Markteinführung (Proksch et al. 2002, Terlau & Olivera 2004). Sie stellen eine mögliche Alternative zu Opioiden dar, die an G-Protein gekoppelten Rezeptoren binden und bei kontinuierlicher Einnahme eine Rezeptor-down-Regulation erfahren (Terlau & Olivera 2004). Allerdings ist bei den ω -Conotoxinen aufgrund der von mir gezeigten Wirkungen auf das enterische Nervensystem ebenso mit potenziellen gastrointestinalen

Nebenwirkungen z.B. in Form von Obstipationen zu rechnen wie bei Opiaten oder dem L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker Verapamil.

Als Antagonist der P- und Q-Typ Kanäle fand AgTx IVA Verwendung (Teramoto et al. 1993). ω -Agatoxin IVA hemmt bei Konzentrationen unter 10^{-8} $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ selektiv P-Typ Ca^{2+} -Kanäle, die Q-Typ Kanal-Population benötigt höhere Konzentrationen (10^{-7} - $2\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [Nooney et al. 1997]). Bei den myenterischen Ganglien war nur eine höhere Konzentration ($2\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) effektiv (s. Abb. III-8), was vermuten lässt, dass das Toxin an Q-Typ Kanälen wirkte.

Abschließend wurde SNX-482 untersucht. Es wurde von einer antagonistischen Wirkung gegenüber dem R-Typ Ca^{2+} -Kanal in einem Konzentrationsbereich von $4\cdot 10^{-9}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bis $4\cdot 10^{-8}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ berichtet (Newcomb et al. 1998). Ein Absinken der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte jedoch erst bei einer Konzentration von $2\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ festgestellt werden, was eine Beteiligung von R-Typ Kanälen fraglich erscheinen lässt (s. Abb. III-9).

Die beiden Inhibitoren, die die stärkste Hemmung bewirkten, nämlich Nifedipin und CnTx GVIA, wurden in einem zweiten Block von Experimenten auf ihre Fähigkeit hinuntersucht, den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausgelöst durch Carbachol-Gabe zu beeinflussen (s. Abb. III-10, Abb. III-11). Diese, einem physiologischeren Ansatz einer cholinergen Rezeptorstimulation folgendende Carbachol-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Antwort, wurde durch Nifedipin um 70 % und durch CnTx GVIA um 75 % ebenso gehemmt wie die mittels KCl-induzierter Depolarisation.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass isolierte myenterische Ganglien der Ratte in Zellkultur verschiedene Typen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen exprimieren, von welchen der L- und der N-Typ die wichtigsten zu sein scheinen.

Das Auftreten, die Verteilung und die Lokalisation von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (VDCC) scheint allerdings nicht nur Gewebe- sondern auch Spezies-abhängig zu sein. Selbst innerhalb einer Tierart ist das Auftreten und die Lokalisation der VDCC innerhalb der Zelle abhängig vom untersuchten Abschnitt des Verdauungsapparates (Kirchgessner & Liu 1999, De Laet et al. 2002). Darüber, dass der N-Typ Ca^{2+} -Kanal in der Gruppe der VDCC innerhalb des ENS der am weitesten verbreitete ist und er eine wichtige Rolle spielt, besteht zumindest bei Ratte und Meerschweinchen kein Zweifel.

In verschiedensten immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine $\text{Ca}_v2.2$ (N-Typ) Immunoreaktivität sowohl an Zellkörpern myenterischer Neurone am Oesophagus (De Laet et al. 2002) als auch am Ileum der Ratte nachgewiesen werden. Ähnliches gilt für das Ileum und das Duodenum des Meerschweinchens (Kirchgessner & Liu 1999, Vogalis et al. 2002). Am Oesophagus der Ratte konnten N-Typ Kanäle dagegen weder für die intrinsischen noch für die extrinsischen Nervenfasern beobachtet werden (De Laet et al. 2002). Im Gegensatz dazu zeigte sich gerade bei der Ratte an Nervenfasern und cholinergen Nervenendigungen des Plexus myentericus eine solche Reaktivität, die sich auch funktionell widerspiegelt (s. Abb. III-10, Abb. III-11). Damit unterscheiden sich die Ergebnisse an der Ratte von denen, die am Meerschweinchen erhoben wurden, da bei dieser Tierart die $\text{Ca}_v2.2$ -Dichte an Nervenfasern sehr viel geringer ist (Kirchgessner & Liu 1999). Auch in Patch-Clamp Experimenten wurde die Existenz des N-Typ Ca^{2+} -Kanals bestätigt und seine Rolle innerhalb des ENS untersucht (Starodub & Wood 1999, Hanani et al. 2000, Vogalis et al. 2002). $\text{Ca}_v2.2$ -exprimierende Neurone innerhalb des myenterischen Plexus, vor allem aber innerhalb des Plexus submucosus, sind sehr häufig auch Calbindin-positiv, ein Grund zur Vermutung, dass es sich um primär afferente Neurone handelt.

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass N-Typ Ca^{2+} -Kanäle die vorherrschenden VDCC an intrinsischen primär afferenten Neuronen des ENS sind und sie somit eine wichtige Rolle bei intrinsischen enterischen Reflexen zu spielen scheinen (Kirchgessner & Liu 1999). Rugiero et al. (2002) vermuten aufgrund ihrer Ergebnisse sogar, dass sie der einzige VDCC Subtyp an myenterischen sensorischen Neuronen sind. Des weiteren scheinen sie an diesen Zellen eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung auszulösen, die nicht-selektive Kationen-Kanäle aktiviert (Vogalis et al. 2002). Vanden Berghe et al. (2002) spekulierten wiederum, dass N-Typ Kanäle an myenterischen Neuronen rekrutiert werden, um intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher aufzufüllen, da eine Entleerung der intrazellulären Speicher zu einem MVIIA-sensitiven Ca^{2+} -Einstrom führte.

Im Gegensatz zu den recht einheitlichen Ergebnissen den N-Typ Ca^{2+} -Kanal betreffend, wird das Vorkommen von L-Typ Kanälen ($\text{Ca}_V1.2$ und $\text{Ca}_V1.3$) an myenterischen Neuronen wesentlich kontroverser diskutiert. So konnten immunhistochemisch $\text{Ca}_V1.2$ -Kanäle an Nervenfasern des Plexus myentericus und an den die gestreifte Muskulatur des Oesophagus innervierenden Fasern der Ratte nachgewiesen werden, nicht jedoch an den Somata (De Laet et al. 2002). $\text{Ca}_V1.3$ Immunoreaktivität war gar nicht vorhanden. Kirchgessner und Liu (1999) wiederum konnten am Ileum von Ratte und Meerschweinchen beide Isoformen vorrangig an Zellkörper und Neuriten nachweisen, allerdings in unterschiedlicher Dichte. $\text{Ca}_V1.2$ überwiegt bei der Ratte, wohingegen $\text{Ca}_V1.3$ beim Meerschweinchen weiter verbreitet ist als die erstgenannte Isoform. Am Duodenum des Meerschweinchen konnte, im Gegensatz zu den Beobachtungen am Ileum, keine $\text{Ca}_V1.3$ Immunoreaktivität gezeigt werden (Vogalis et al. 2002). In parallel dazu durchgeführten Patch-Clamp Experimenten hatte Nicardipin keinen Effekt auf die Nachhyperpolarisation der untersuchten AH/Typ-2 Neurone. Grafe et al.

(1980) konnten bei elektrophysiologischen Untersuchungen des Duodenums beim Meerschweinchen unter Verwendung des Verapamil-Derivates D-600 keinen Hinweis für einen L-Typ Kanal finden. Wurde der gesamte Dünndarm untersucht, konnte im Gegensatz dazu ein Dihydropyridin-sensitiver Ca^{2+} -Strom nachgewiesen werden (Hanani et al. 2000, Van den Berghe 2002). Gleiches gilt für den Dünndarm der Ratte (Franklin & Willard 1993).

Die im Verlauf meiner Arbeit erlangten Resultate fügen sich in die vorgenannten Ergebnisse durchaus ein. Es konnte, den Dünndarm der Ratte betreffend, ein Dihydropyridin-sensitiver Ca^{2+} -Strom nachgewiesen werden, jedoch zeigte das Phenylalkylamin Verapamil keinen eindeutigen Effekt. Eine Hemmung konnte nur sehr variabel und bei hohen Konzentration erzielt werden (s. Abb. III-5). Dabei muss man allerdings bedenken, dass Verapamil dann auch N- bzw. P/Q-Typ Kanäle hemmen kann (Franklin & Willard 1993, Zamponi 1997).

Eine von vielen möglichen Erklärungen für die ungleiche Wirkungsweise der beiden Derivate könnte die unterschiedlichen Bindungsstelle für Dihydropyridine bzw. Phenylalkylamine an der α_1 -Untereinheit in Verbindung mit der unterschiedlichen Struktur von neuronalen L-Typ Ca^{2+} -Kanälen sein, die im Gegensatz zu L-Typ Kanälen an Herz- und Skelettmuskulatur keine γ -Untereinheit besitzen.

L-Typ Ca^{2+} -Kanäle scheinen die Neurotransmitter-Freisetzung zumindest an einigen Neuronen zu unterstützen und spielen wohl bei der Fortleitung von Aktionspotentialen entlang der Dendriten eine Rolle (Kirchgessner & Liu 1999).

P- und Q-Typ Kanäle scheinen von sehr viel geringerer Signifikanz zu sein als L- und v.a. N-Typ Kanäle, konnten aber dennoch am enteralen Nervensystem von Ratte und Meerschweinchen nachgewiesen werden. Am Oesophagus der Ratte konnte beispielsweise eine $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q-Typ)

Immunoreaktivität auf der Höhe der motorischen Endplatte nachgewiesen werden, nicht aber an Somata oder Nervenfasern. Eine mögliche Rolle der Kanäle bei der neuromuskulären Transmission muss aber noch untersucht werden (De Laet et al. 2002). Anders das Bild am Dünndarm der Ratte, hier konnte, wenn auch nur in sehr geringer Dichte, eine $\text{Ca}_v2.1$ -Immunoreaktivität an einem Teil neuronaler Zellkörper und -fortsätze des Plexus submucosus und myentericus der Ratte gezeigt werden (Kirchgessner & Liu 1999).

Vogalis et al. gelang 2002 sowohl der Nachweis einer $\text{Ca}_v2.1$ Immunoreaktivität am Duodenum des Meerschweinchens als auch der Nachweis eines MVIIC-sensitiven Stromes an AH-Neuronen. Sie stimmen dabei mit Starodub und Wood (1999) überein, die einen CnTx MVIIC-sensitiven Strom beim erwachsenen Meerschweinchen zeigten, was die Präsenz von N- und P/Q-Typ Kanälen vermuten lässt. Rugiero et al. (2002) konnten diese MVIIC-Sensitivität myenterischer AH-Neurone zwar bestätigen, konnten jedoch keinen AgTx IVA-Effekt zeigen und zweifeln daher die Beteiligung von P/Q-Typ Kanälen an der Nachhyperpolarisation dieser Neurone des Meerschweinchens an. Vanden Berghe et al. (2002) wiederum bestätigten das Vorkommen dieses Subtyps am Plexus myentericus des Meerschweinchens. Kirchgessner & Liu (1999) vermuten, dass Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle eine funktionelle Rolle bei der Erhaltung der Neurotransmission spielen, insbesondere bei der nonadrenergen, noncholinergen Relaxation des Duodenums der Ratte, da sie nur sensitiv gegenüber Q-Typ Kanalblocker ist.

Das von mir eingesetzte AgTx IVA zeigte in einem höheren Konzentrationsbereich ($2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) einen Effekt auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Zellen (s. Abb. III-8). Dies erlaubt die Vermutung, dass Q-Typ Kanäle am Dünndarm der Ratte existieren.

Abschließend kann man sagen, dass die aus meinen Ergebnissen gezogene Schlussfolgerung, dass isolierte myenterische Ganglien der Ratte verschiedene Typen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle exprimieren, von welchen der L- und der N-Typ die wichtigsten zu sein scheinen, in der Literatur (bisher v.a. am Meerschweinchendarm) Bestätigung findet.

IV.2 Entzündungsmediatoren

IV.2.1 *TNF α*

TNF α ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, welches u.a. von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Fibroblasten in Reaktion z.B. auf Entzündungsprozesse, Infektionen und Verletzungen produziert wird. Es löst verschiedenste Prozesse im Organismus und auf zellulärer Ebene aus wie die Aktivierung und Migration von Zellen des Immunsystems, Fieber, Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose. Stimuli für eine Freisetzung von *TNF α* können u.a. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Viren oder Immunkomplexe sein (Aderka et al. 1992). Bekannt ist auch, dass *TNF α* seine eigene Synthese stimulieren kann (Müller 1997). *TNF α* gehört zu einer Familie trimerer Zytokine und bindet an zwei verschiedenen Rezeptoren: TNFR1 und TNFR2. Beide sind Rezeptorproteinkinasen, die durch Bindung mit ihrem Liganden Proteine an der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors rekrutieren und so die Wirkung von *TNF α* vermitteln (Baud & Karin 2001).

Mit Bindung von *TNF α* an seine Rezeptoren kommt es u.a. zu einer Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. nukleärer Faktor-kappa B (NF- κ B) oder aktivierendes Protein-1 (AP-1), die wiederum Gene induzieren, die bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen (Baud & Karin 2001). Innerhalb der Gruppe der Zytokine spielt *TNF α* eine wichtige Rolle bei Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und Morbus Alzheimer (Zhao & Schwartz 1998, Balkwill et al. 2000, Baud & Karin

2001), ebenso wie bei der Pathogenese vieler entzündlicher Darmerkrankungen wie z.B. Morbus Crohn (Balkwill et al. 2000, Baud & Karin 2001), nichtsdestotrotz weiß man bisher wenig über den Einfluss von TNF α auf enterische Neurone, welche die Schlüsselfunktion bei der Kontrolle intestinaler Funktionen innehaben.

Innerhalb des Gastrointestinaltraktes löst TNF α jedoch nicht nur Apoptose aus (Gitter et al. 2000), sondern beeinträchtigt auch die Barrierefunktion des intestinalen Epithels durch den Abbau von *tight junctions* (Schmitz et al. 1999). Außerdem induziert TNF α eine Elektrolytsekretion im Kolon verschiedener Spezies (Schmitz et al. 1996) und potenziert die Ca²⁺-abhängigen epithelialen Sekretionswege (Oprins et al. 2002).

Khan und Collins untersuchten 1994 *Trichinella spiralis* infizierte Ratten und stellten fest, dass 24 Stunden nach Infektion der Tiere eine vermehrte Interleukin 1 β (IL1 β) und TNF α Expression im Bereich von Längsmuskulatur und Plexus myentericus auftraten. Hurst und Collins konnten 1994 zeigen, dass eine Vorbehandlung mit TNF α in einer Muskel/Plexus myentericus Präparation am Jejunum der Ratte zeit- und konzentrationsabhängig die Noradrenalinfreisetzung hemmt. Eine Inaktivierung der Katecholaminfreisetzung nach chronischer TNF α -Behandlung ist auch vom ZNS bekannt (Müller 1997). Verschiedene Untersuchungen haben des weiteren gezeigt, dass TNF α Einfluss auf die Motilität des Darmes hat (Lodato et al. 1999, Ceregrzyn et al. 2001).

Rehn et al. zeigten erst in der jüngeren Vergangenheit (2004), dass eine TNF α -Vorbehandlung myenterische Neurone hyperpolarisiert und die durch nicotinerge Rezeptorstimulation hervorgerufene Depolarisation potenziert. Im Gegensatz zu den Veränderungen des Membranpotentials nach nicotinerger Rezeptorstimulation hat TNF α , in meinen Untersuchungen, die [Ca²⁺]_i-

Antwort nach Carbachol-Gabe ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) nicht signifikant verändert (s. Abb. III-12).

Sowohl die von Schmitz et al. (1996) gezeigte $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Sekretion als auch die von Rehn et al. (2004) gezeigten $\text{TNF}\alpha$ -bedingten Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften myenterischer Neurone sind sensitiv gegenüber Cyclooxygenase-Hemmern, was darauf hinweist, dass die beobachteten Vorgänge durch bestimmte Eicosanoide vermittelt worden sein müssen.

IV.2.2 Eicosanoide

Mit der Sammelbezeichnung Eicosanoide werden die verschiedenen Derivate des Arachidonsäurestoffwechsels zusammengefasst. Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene sind Mediatoren mit vielfältigen, z.T. hormonähnlichen Wirkungen, die eine wichtige Rolle bei Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktionen spielen. Sie kommen im Organismus ubiquitär vor und werden in den verschiedenen Geweben nicht gespeichert, sondern auf bestimmte Stimuli hin synthetisiert und freigesetzt. Das für die Thromboxan- und Prostaglandinsynthese verantwortliche Enzym Cyclooxygenase (COX) liegt in zwei Isoformen vor: Die konstitutiv vorkommende Form COX-1, die ubiquitär vorkommt, und die induzierbare Form COX-2, die vorwiegend in entzündetem Gewebe gebildet wird, aber zumindest in einigen Zellen auch konstitutiv exprimiert wird (Reuter et al. 1996, Porcher et al. 2002). Im Gegensatz zur Cyclooxygenase kommen verschiedene Lipoxygenasen nur in bestimmten Zellen vor. Über die Tätigkeit der 5-Lipoxygenase entstehen die Leukotriene (LT). Leukotriene können aus Leukozyten, Makrophagen und verschiedenen Tumorzellen in Kultur freigesetzt werden und scheinen eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen zu spielen.

Prostaglandine haben sehr vielfältige Effekte auf den Organismus der unterschiedlichsten Spezies. Neben Wirkungen auf Kreislauf, Niere und Thrombozytenfunktion haben Prostaglandine ausgeprägte Effekte auf die Darmmotilität sowie die gastrointestinale Sekretion. Die Längsmuskulatur des Darmes wird durch PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ kontrahiert, die Ringmuskulatur durch PGE_2 im Gegensatz zu $\text{PGF}_{2\alpha}$ jedoch relaxiert (Peskar 2001). *In vivo* hat eine orale Gabe von PGE_2 eine verkürzte Darmpassagezeit, Diarrhö, Erbrechen und Koliken zur Folge. Eine gastroprotektive Wirkung haben PGE_2 und PGI_2 ; sie hemmen die HCl-Sekretion im Magen und steigern die Schleim- und Bicarbonatsekretion. Diese Effekte der genannten Prostaglandine erklären, in Verbindung mit ihren stimulierenden Wirkungen auf die glatte Muskulatur des Darmes, die typischen Diarrhöen nach oraler oder parenteraler Gabe (Peskar 2001).

Dass diese Symptome zumindest teilweise durch eine direkte Stimulation enteraler Neurone zustande kommen, haben verschiedene Untersuchungen gezeigt. Prostacyclin (PGI_2) verursacht am Kolon der Ratte eine Stimulation von Sekretomotorone des Plexus submucosus. PGE_2 induziert hier eine Sekretion zumindest teilweise neuronal, wirkt aber auch direkt auf das Epithel (Diener et al. 1988). Am Kolon des Meerschweinchens konnte eine neuronal vermittelte Cl^- -Sekretion mittels PGD_2 gezeigt werden (Frieling et al. 1994). Dekkers et al. konnten 1997 am Ileum des Meerschweinchens einen direkten PGE_2 -Effekt auf das Membranpotential von myenterischen Neuronen zeigen. In ihren Untersuchungen reagierten sowohl AH-Neurone als auch S-Neurone mit einer konzentrationsabhängigen reversiblen, langsamen Depolarisation. Die Erregbarkeit der AH-Neurone nahm durch eine Reduktion der Nachhyperpolarisation zu. Da aber weder Form noch Dauer des Aktionspotentials der AH-Neurone verändert war, konnte eine Hemmung des Ca^{2+} -Einstromes während des Aktionspotentials

als Ursache ausgeschlossen werden. Manning et al. (2002) konnten PGE₂-Effekte auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von myenterischen Neuronen am Kolon des Meerschweinchens zeigen. Auch hier zeigte sich eine erhöhte Erregbarkeit der AH-Neurone. Ebenso konnten Linden et al. (2003) bei Untersuchungen an myenterischen Neuronen des entzündeten Meerschweinchenkolons eine erhöhte Erregbarkeit dieser AH-Neurone feststellen und schlossen eine Veränderung des Ca²⁺-Einstromes ebenso wie Dekkers et al. (1997) aus.

Die vielfach gezeigten, elektrophysiologisch nachweisbaren Effekte von zumindest einigen Prostaglandinen auf myenterische Neurone wirken sich scheinbar, wie auch meine Ergebnisse zeigen, nicht bzw. nur in geringem Ausmaß auf Ca²⁺-Ströme aus. Folglich scheinen Ca²⁺-Imaging Messungen nicht die geeignete Methode zur Untersuchung von Eicosanoid-Effekten im speziellen oder Entzündungsreaktionen im allgemeinen an enterischen Neuronen zu sein.

V Zusammenfassung

Spannungsabhängige Calciumkanäle in isolierten Ganglien des Plexus myentericus neugeborener Ratten wurden pharmakologisch charakterisiert. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten wurden isolierte Ganglien und nicht dissoziierte Neurone kultiviert, da diese nicht auf eine Rezeptorstimulation durch Neurotransmitter reagierten.

Die Ganglien von drei bis elf Tage alten Ratten wurden enzymatisch isoliert und nach ca. 20 Stunden in Kultur mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM beladen und mit einer $35 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl-Lösung superfundiert, um einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) via Depolarisation der Membran hervorzurufen. Dieser Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war sensitiv gegenüber Ni^{2+} und Co^{2+} ebenso wie gegenüber ω -Conotoxin MVIIA, ω -Agatoxin IVA und SNX-482. Die stärkste Hemmung wurde jedoch durch Nifedipin ($5\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und ω -Conotoxin GVIA ($4,3\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) erreicht. Diese beiden Blocker hemmten auch den durch nicotinerge Rezeptorstimulation mittels Carbachol hervorgerufenen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstieg. Folglich exprimieren isolierte myenterische Ganglien in Zellkultur verschiedene Typen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle, von welchen der L- und der N-Typ die wichtigsten zu sein scheinen.

TNF α Vorbehandlung dieser Ganglien über Nacht veränderte die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Antwort nach Carbachol-Gabe ($5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), im Gegensatz zu Hyperpolarisation der Zelle und Potenzierung der durch nicotinerge Rezeptorstimulation hervorgerufenen Depolarisation, nicht signifikant. Ein direkter Einfluss von Eicosanoiden auf myenterische Neurone der Ratte konnte nur sehr bedingt gezeigt werden. Folglich scheinen Ca^{2+} -Imaging Messungen nicht die geeignete Methode zur Untersuchung der Wirkung von Entzündungsreaktionen an enterischen Neuronen zu sein.

VI Summary

Voltage-dependent calcium channels of isolated ganglia from the myenteric plexus of newborn rats were pharmacologically characterised.

Because they did not respond to receptor stimulation via neurotransmitters, in contrast to previous work isolated ganglia and not dissociated neurons were cultured.

Ganglia of three to eleven day old rats were enzymatically isolated and loaded with the Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye fura-2, after about 20 hours in culture. A depolarisation-induced increase in the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was evoked by superfusion with 35 mmol l^{-1} KCl. This increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was sensitive to Ni^{2+} and Co^{2+} as well as ω -conotoxin MVIIA, ω -agatoxin IVA and SNX-482. The strongest inhibition was achieved by nifedipine ($5 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1}) and ω -conotoxin GVIA ($4,3 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1}). These two blockers also inhibited the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase evoked by nicotinic receptor stimulation. Consequently, isolated myenteric ganglia in culture express different types of voltage-dependent calcium channels, from which the L- and the N-type seem to be the most important.

A TNF α pre-treatment of the ganglia over night did not alter the carbachol-induced ($5 \cdot 10^{-5}$ mol $\cdot \text{l}^{-1}$) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response significantly, in contrast to the cellular hyperpolarisation and the potentiation of depolarisation due to nicotinic receptor stimulation. Furthermore, an only limited direct influence of eicosanoids on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of rat myenteric neurons could be shown. Consequently, Ca^{2+} -imaging does not seem to be an appropriate method to study the action of mediators of inflammation on enteric neurons.

VII Literaturverzeichnis

- Aderka D, Engelmann H, Wysenbeek AJ, Levo Y (1992).** The possible role of tumor necrosis factor (TNF) and its natural inhibitors, the soluble-TNF receptors, in autoimmune diseases. *Isr. J. Med. Sci.* 28: 126-130
- Auerbach L (1862).** Über einen Plexus gangliosis myogastricus. *39er Jahr-Bericht u. Abh. d. Schlesischen Gesellsch. f. Vaterländ. Cult.:* 103-104
- Balkwill F, Foxwell B, Brennan F (2000).** TNF is here to stay! *Immunol. Today* 21: 470-471
- Baud V, Karin M (2001).** Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11: 372-377
- Bayliss WM, Starling EH (1899).** The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol. (Lond)* 24: 99-143
- Baylor SM, Hollingworth S (2000).** Measurement and interpretation of cytoplasmic [Ca²⁺] signals from calcium-indicator dyes. *News Physiol. Sci.* 15: 19-26
- Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM (1998).** Loss-of-function mutations in calcium-channel α_1 -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* 19: 264-267
- Berridge MJ, Irvine RF (1984).** Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321
- Berridge MJ (1997).** Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Exp. Biol.* 200: 315-319
- Berridge MJ (1998).** Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21: 13-26
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998).** Calcium - a life and death signal. *Nature* 395: 645-648
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000).** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 11-21
- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P (2001).** Calcium signalling - an overview. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12: 3-10

- Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W (1999).** Morphological classifications of enteric neurons – 100 years after Dogiel. *Anat. Embryol.* 200: 125-135
- Brookes SJH (2001).** Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec.* 262: 58-70
- Brown DR, Miller RJ (1991).** Neurohormonal control of fluid and electrolyte transport in intestinal mucosa. In: *Handbook of Physiology, Section 6 The Gastrointestinal System, Vol. 4 Intestinal Absorption and Secretion, 2nd Edition.* Hrsg.:Rauner BB, Schultz SG, Field M, Frizzell RA, Am.Physiol. Soc., Bethesda, Maryland: 527-589
- Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS (2003).** Role of enteric glia cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41: 81-93
- Catterall WA (1995).** Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 493-531
- Catterall WA (2000).** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev.* 16: 521-555
- Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E (2003).** International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: Calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 55: 579-581
- Ceregrzyn M, Kamata T, Yajima T, Kuwahara A (2001) .** Biphasic alterations in gastrointestinal transit following endotoxaemia in mice. *Neurogastroenterol. Mot.* 13: 605-613
- Cooke HJ (1994).** Neuroimmune signaling in regulation of intestinal ion transport. *Am. J. Physiol.* 266: G167-G178
- Coons AH (1958).** Fluorescent antibody methods. In: *General cytochemical methods,* Hrsg.: Danielli JF, Academic Press, New York: 399-422
- Decoursey TE (2003).** Voltage-Gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol. Rev.* 83: 475-579
- Dekkers JAJM, Akkermans LMA, Kroese ABA (1997).** Effects of the inflammatory mediator prostaglandin E₂ on myenteric neurons in guinea-pig ileum. *Am. J. Physiol.* 272: G1451-G1456
- De Laet A, Adriaensen D, van Bogaert PP, Scheuermann DW, Timmermans JP (2002).** Immunohistochemical localisation of voltage-activated calcium channels in the rat oesophagus. *Neurogastroenterol. Mot.* 14: 173-181

- Denk H (1989).** Immunhistochemische Färbemethoden. In: *Mikroskopische Technik*, 17. Aufl., Hrsg.: Böck P, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore: 251-261
- Diener M, Bridges RJ, Knobloch SF, Rummel W (1988).** Neuronally mediated and direct effects of prostaglandins on ion transport in rat colon descendens. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 337: 74-78
- Diener M, Knobloch SF, Bridges RJ, Keilmann T, Rummel W (1989).** Cholinergic-mediated secretion in the rat colon: neuronal and epithelial muscarinic responses. *Eur. J. Pharmacol.* 168: 219-229
- Dockray GJ (1994).** Physiology of enteric neuropeptides. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Vol. 1, 3rd Edition. Hrsg.: Johnson LR, Raven Press, New York: 169-209
- Dogiel AS (1899)** Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. *Arch. Anat. Physiol. Leip. Anat. Abt.:* 130-158
- Dolphin A (2003).** G Protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 55: 607-627
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000).** Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25: 533-535
- Förstermann U (2001).** Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: die Blutgefäße. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Aufl., Hrsg.: Forth W, Henschler D, Rummel W, Urban & Fischer, München: 496-499
- Franklin JL, Willard AL (1993).** Voltage-dependent sodium and calcium currents of rat myenteric neurons in cell culture. *J. Neurophysiol.* 69: 1264-1275
- Frieling T, Rupprecht C, Kroese ABA, Schemann M (1994).** Effects of the inflammatory mediator prostaglandin D2 on submucosal neurons and secretion in guinea-pig colon. *Am. J. Physiol.* 266: G132-G139
- Furness JB, Costa M (1987).** The enteric nervous system. *Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York:* 7
- Furness JB, Kunze WAA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC (1998).** Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* 54: 1-18
- Galligan JJ (2002).** Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Mot.* 14: 611-623

- Gershon MD, Erde SM (1981).** The nervous system of the gut. *Gastroenterology* 80: 1571-1594
- Gershon MD, Kirchgessner AL, Wade PR (1994).** Functional anatomy of the enteric nervous system. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Vol. 1, 3rd Edition.* Hrsg.: Johnson LR, Raven Press, New York: 381-422
- Gershon MD (1998).** The second brain. *Haper Collins Publishers, New York:* 1-314
- Gershon MD (1999).** The enteric nervous system: A second brain. *Hosp. Pract.* 34 (7): 31-32
- Gitter AH, Bendfelst K, Schulzke JD, Fromm M (2000).** Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF- α -induced single-cell apoptosis. *FASEB J.* 14: 1749-1753
- Grafe P, Mayer CJ, Wood JD (1980).** Synaptic modulation of calcium-dependent potassium conductance in myenteric neurons in the guinea-pig. *J Physiol.*, 305: 235-248
- Greene EC (1949).** Gross Anatomy In: *The rat in laboratory investigation, 2nd Edition.* Hrsg.: Farris EJ, Griffith JQ, JB Lippincott Company, Philadelphia, London, Montreal: 32
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985).** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450
- Hanani M, Francke M, Härtig W, Grosche J, Reichenbach A, Pannicke T (2000).** Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am. J. Physiol.* 278: G644-G651
- Hans M, Luvisetto S, Williams ME, Spagnolo M, Urrutia A, Tottene A, Brust PF, Johnson EC, Harpold MM, Stauderman KA, Pietrobon D (1999).** Functional consequences of Mutations in the human α_{1A} calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J. Neurosci.* 19(5): 1610-1619
- Haschke G (2000).** Elektrophysiologische Charakterisierung des Plexus myentericus der Ratte in Zellkultur. *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.* S. 11
- Haschke G, Schäfer H, Diener M (2002).** Effect of butyrate on membrane potential, ionic current and intracellular Ca²⁺ concentration in cultured rat myenteric neurons. *Neurogastroenterol. Mot.* 14: 133-142

- Hell JW, Westenbroeck RE, Warner C, Ahlijanian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA (1993).** Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel α_1 subunits. *J. Cell Biol.* 123: 949-962
- Hille B (2001).** Ionic currents of excitable membranes. 3rd Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts
- Hinterleitner TA, Powell DW (1991).** Immune system control of intestinal ion transport. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 197: 249-260
- Hirata H, Almudena A, Fernández F, Mediano J, Jurkiewicz A, García AG (1997).** ω -Conotoxin block neurotransmission in the rat vas deferens by binding to different presynaptic sites on the N-type Ca^{2+} channel. *Europ. J. Pharmacol.* 321: 217-223
- Hsieh YC, Hsu EL, Chow YS, Kou R (2001).** Effects of calcium channel antagonists on the corpora allata of adult male loreyi leafworm *mythimna loreyi*: Juvenile hormone acids and intracellular calcium level. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 48: 89-99
- Hurst SM, Collins SM (1994).** Mechanism underlying tumor necrosis factor-suppression of norepinephrine release from rat myenteric plexus. *Am. J. Physiol.* 266: G1123-G1129
- Johnson RJR, Schemann M, Santer RM, Cowen T (1998).** The effects of age on the overall and sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192: 479-488
- Kameyama M, Hofmann F, Trautwein W (1985).** On the mechanism of β -adrenergic regulation of the Ca channel in the guinea-pig heart. *Pflügers Arch.* 405: 285-293
- Khan I, Collins SM (1994).** Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. *Gastroenterology* 107: 691-700
- Kirchgessner AL, Liu MT (1999).** Differential localization of Ca^{2+} channels α_1 subunits in the enteric nervous system: Presence of α_{1B} channel-like immunoreactivity in intrinsic primary afferent neurons. *J. Comp. Neurol.* 409: 85-104
- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004).** The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427: 360-364
- Kochegarov AA (2003).** Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. *Cell Calcium* 33: 145-162

- Kocks S, Schultheiss G, Diener M (2002).** Ryanodine receptors and the mediation of Ca^{2+} -dependent anion secretion across rat colon. *Pflugers Arch.* 445: 390-397
- Kolios G, Petoumenos C, Nakos A (1998).** Mediators of inflammation: Production and implication in inflammatory bowel disease. *Hepato-Gastroenterology* 45: 1601-1609
- Langley JN (1921).** The autonomic nervous system, part 1. *W. Heffer and Sons, Cambridge*
- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K (1999).** Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79: 1317-1372
- Lerche H, Mitrovic N, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2000).** Ionenkanalerkrankungen – Krankheitsbilder. *Dt. Ärztebl.* 97: A1902-A1907
- Levitan IB (1999).** It is calmodulin after all! Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels. *Neuron* 22: 645-648
- Liddell E, Weeks I (1996).** Immunlokalisation. In: *Antikörper-Techniken (Labor im Fokus), Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford: 109-128*
- Linden DR, Sharkey KA, Mawe GM (2003).** Enhanced excitability of myenteric AH neurons in the inflamed guinea-pig distal colon. *J. Physiol.* 547: 589-601
- Lodato RF, Khan AR, Zembowicz MJ, Weisbrodt NW, Pressley TA, Li YF, Lodato JA, Zembowicz A, Moody FG (1999).** Roles of IL-1 and TNF in the decreased ileal muscle contractility induced by lipopolysaccharide. *Am. J. Physiol.* 276: G1356-G1362
- Lomax AEG, Sharkey KA, Bertrand PP, Low AM, Bornstein JC, Furness JB (1999).** Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon. *J. Auton. Nerv. Syst.* 76 (1): 45-61
- Manning BP, Sharkey KA, Mawe GM (2002).** Effects of PGE₂ in guinea pig colonic myenteric ganglia. *Am. J. Physiol.* 283: G1388-G1397
- McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP, McCormick PA, Sheahan K, Baird AW (2001).** Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Res.* 50: 491-495
- Meißner G (1857).** Über die Nerven der Darmwand. *Z. Ration. Med. N.F.* 8: 364-366
- Mintz IM, Adams ME, Bean BP (1992).** P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9: 85-95

- Müller N (1997).** Die Rolle des Zytokinnetzwerks im ZNS und psychische Störungen. *Nervenarzt* 68: 11-20
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G (1998).** Selective peptide antagonist of the class E channel from venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37: 15353-15362
- N'Gouemo P, Morad M (2003).** Voltage-gated calcium channels in adult rat inferior colliculus neurons. *Neuroscience* 120: 815-826
- Nooney JM, Lambert RC, Feltz A (1997).** Identifying neuronal non-L Ca²⁺ channels – more than stamp collecting? *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 363-371
- Olivera BM, Cruz LJ, de Santos V, LeCheminant GW, Griffin D, Zeikus R, McIntosh JM, Galyean R, Varga J, Gray WR, Rivier J (1987).** Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using ω -conotoxin from *Conus magnus* venom. *Biochemistry* 26: 2086-2090
- Oprins JCJ, van der Burg C, Meijer HP, Munnik T, Groot JA (2002).** Tumor necrosis factor α potentiates ion secretion induced by histamine in a human intestinal epithelial cell line and in mouse colon: involvement of the phospholipase D pathway. *Gut* 50: 314-321
- Peskar BE (2001).** Derivate des Arachidonsäurestoffwechsels. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8.Aufl., Hrsg.: Forth W, Henschler D, Rummel W, Urban & Fischer, München: 381-392*
- Porcher C, Horowitz B, Bayguinov O, Ward SM, Sanders KM (2002).** Constitutive expression and function of cyclooxygenase-2 in murine gastric muscles. *Gastroenterology* 122: 1442-1454
- Proksch P, Edrada RA, Ebel R (2002).** Drugs from the seas – current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 125-134
- Putney Jr. JW (2003).** Capacitative calcium entry in the nervous system. *Cell Calcium* 34: 339-344
- Rehn M, Hübschle T, Diener M (2004).** TNF- α hyperpolarises membrane potential and potentiates the response to nicotinic receptor stimulation in cultured rat myenteric neurons. *Acta Physiol. Scand.* 181: 13-22
- Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL (1996).** Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 98: 2076-2085

- Ringer S (1883).** A further contribution regarding the influence of different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol. (Lond)* 4: 29-43
- Rugiero F, Gola M, Kunze WAA, Reynaud JC, Furness JB (2002).** Analysis of whole-cell currents by patch clamp of guinea-pig myenteric neurons in intact ganglia. *J. Physiol.* 538: 447-463
- Schäfer KH, Saffrey MJ, Burnstock G, Mestres-Ventura P (1997).** A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract. *Brain Res. Protoc.* 1 : 109-113
- Schäfer KH, Mestres P (1999).** The GDNF-induced neurite overgrowth and neuronal survival in dissociated myenteric plexus cultures of the rat small intestine decreases postnatally. *Exp. Brain Res.* 125: 447-452
- Schemann M (1990).** Neurophysiologie des enterischen Nervensystems. *Verdauungskrankheiten* 8: 183-192
- Schemann M (2000).** Enterisches Nervensystem und Innervation des Magen-Darm-Traktes. In: *Physiologie der Haustiere, Hrsg.: von Engelhardt W, Breves G, Enke Verlag, Stuttgart:* 308-317
- Schicho R, Schemann M, Holzer P, Lippe IT (2001).** Mucosal acid challenge activates nitergic neurons in myenteric plexus of rat stomach. *Am. J. Physiol.* 281: G1316-G1321
- Schmitz H, Fromm M, Bode H, Scholz P, Riecken EO, Schulzke JD (1996).** Tumor necrosis factor- α induces Cl^- and K^+ secretion in human distal colon driven by prostaglandin E_2 . *Am. J. Physiol.* 271: G669-G674
- Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD (1999).** Tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF}\alpha$) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J. Cell Sci.* 112: 137-146
- Schütz W (2001).** Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: das Herz. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8.Aufl., Hrsg.: Forth W, Henschler D, Rummel W, Urban & Fischer, München:* 439-449
- Sharkey KA, Kroese ABA (2001).** Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: Neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat. Rec.* 262: 79-90
- Stach W (1989).** A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. In: *Nerves and the Gastrointestinal Tract. Hrsg.: Singer MV, Goebell H, MTP press limited, Lancaster:* 29-45

- Starodub AM, Wood JD (1999).** Selectivity of ω -CgTx-MVIIC toxin from *Conus magnus* on calcium currents in enteric neurons. *Life Sci.* 64 (26): PL305-PL310
- Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BHF, Wutz K, Gutwillinger N, Rütther K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A, Meindl A (1998).** An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* 19: 260-263
- Surprenant A (1994).** Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 117-140
- Tatsumi H, Hirai K, Katayama Y (1988).** Measurement of the intracellular calcium concentration in guinea-pig myenteric neurons by using fura-2. *Brain Res.* 451: 371-375
- Teramoto T, Kuwada M, Niidome T, Sawada K, Nishizawa Y, Katayama K (1993).** A novel peptide from funnel web spider venom, ω -agatoxin-TK, selectively blocks P-type calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 134-140
- Terlau H, Shon KJ, Grilley M, Stocker M, Stuhmer W, Olivera BM (1996).** Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature* 381: 148-151
- Terlau H, Olivera BM (2004).** *Conus* venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Am. J. Physiol.* 84: 41-68
- Trendelenburg P (1917).** Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarm Peristaltick. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.:* 55-129
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A (1995).** Reflections on Ca²⁺-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci.* 18: 52-54
- Tsien RY (1980).** New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19: 2396-2404
- Tsien RY, Poenie M (1986).** Fluorescence ratio imaging: A new window into intracellular ionic signalling. *TIBS* 11: 450-455
- Turner DJ, Segura BJ, Cowles RA, Zhang W, Mulholland MW (2001).** Functional overlap of IP₃- and cADP-ribose-sensitive calcium stores in guinea-pig myenteric plexus. *Am. J. Physiol.* 281: G208-G215

- Vanden Berghe P, Tack J, Andrioli A, Missiaen L, Janssens J (2000).** Receptor-induced Ca^{2+} signaling in cultured myenteric neurons. *Am. J. Physiol.* 278: G905-G914
- Vanden Berghe P, Missiaen L, Janssens J, Tack J (2002).** Calcium signalling and removal mechanisms in myenteric neurons. *Neurogastroenterol. Mot.* 14: 63-73
- Vogalis F, Harvey JR, Lohman RJ, Furness JB (2002).** Action potential afterdepolarization mediated by a Ca^{2+} -activated cation conductance in myenteric AH neurons. *Neuroscience* 115: 375-393
- Welsby PJ, Wang H, Wolfe JT, Colbran RJ, Johnson ML, Barrett PQ (2003).** A mechanism for direct regulation of T-type calcium channels by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II. *J. Neurosci.* 23 (31): 10116-10121
- Wood JD (1987).** Physiology of the enteric nervous system. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract, 2nd Edition*. Hrsg.: Johnson LR, Raven Press, New York: 67-111
- Wood JD (1994).** Physiology of the enteric nervous system. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Vol. 1, 3rd Edition*. Hrsg.: Johnson LR, Raven Press, New York: 423-482
- Zamponi GW (1997).** Antagonist binding sites of voltage-dependent calcium channels. *Drug Develop. Res.* 42: 131-143
- Zhao B, Schwartz JP (1998).** Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: Recent progress and perspectives. *J. Neurosci. Res.* 52: 7-16

VIII Danksagung

Herzlichen Dank an alle, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Martin Diener** für die Überlassung des Themas bedanken. Die stets freundliche, geduldige und rasche Bearbeitung aller Fragen und Probleme, sowie seine bemerkenswerte Begeisterung für die Physiologie und für die Forschung, die ansteckte und motivierte, haben die Erstellung meiner Dissertation zu einer sehr lehrreichen, aber auch erfrischenden Zeit gemacht, die immer ein wichtiger Abschnitt meines Lebens bleiben wird.

Danke an *Herrn PD Dr. Gerhard Schultheiß*, für die interessanten und anregenden fachlichen Diskussionen, nicht nur diese Arbeit betreffend und für seine stete Hilfsbereitschaft,

an *Salah A. Hamodeh, Dr. Sarah L. Kocks* und *Dr. Matthias Rehn* für die lebenswürdige und unbegrenzte Hilfestellung zu Beginn des Versuchsabschnitts und für die stetigen Anregungen und Diskussionsbeiträge im Anschluss,

an *Brigitta Brück, Eva-Maria Haas, Alice Metternich* und *Bärbel Schmidt*, die mir im Labor und bei der Zellkultur tatkräftig zur Seite standen und ohne deren Hilfe vieles meinen „Geduldsfaden“ strapaziert hätte,

einen besonderen Dank an *Daniela Hild* für die uneingeschränkte Hilfe in Rat und Tat bei der Durchführung der immunhistochemischen Analysen, da ohne ihre Hilfe die Untersuchungen wohl noch heute andauern würden,

Danksagung

an *Michael Haas* und *Silke Handstein* für die gewissenhafte Pflege und Versorgung der Versuchstiere und an *Karl-Hermann Maurer* für die Hilfsbereitschaft bei der Lösung kleiner und größerer technischer Probleme,

an *alle Mitarbeiter des Institutes für Veterinär-Physiologie* für die angenehme und humorvolle Arbeitsatmosphäre, die nicht selbstverständlich ist und die ich deshalb in sehr guter Erinnerung behalten werde,

an meinen Freund *Heiko P. Karp* für seine fortwährende Unterstützung, das „Babysitten“ und die vielen Spaziergänge mit meinem Hund. Besonders aber dafür, dass er vor allem gegen Ende dieser Arbeit die Ruhe dann nicht verloren hat, wenn ich schon lange keine mehr hatte. Die für mich daraus resultierende Kraft war und ist unendlich wichtig.

Vielen Dank an **meine Eltern** *Annegret Fritz* und *Klaus-Dieter Schäufele* die mich während des Studiums und der Promotion stets liebevoll unterstützt und mit großem Interesse begleitet haben.

Gedankt sei auch all denen die ich nicht namentlich nennen konnte, die durch ihren Zuspruch und ihren Glauben an mich aber immer mit dafür gesorgt haben, dass ich in schwierigen Momenten nicht verzagt habe.

Ich widme diese Arbeit **meinen Großeltern** *Anna Elisabetha* und *Dr. Friedrich Fritz*, weil ich ohne die große Liebe meines Großvaters zu Natur und Tierwelt, sowie seine Fähigkeit Andere dafür zu begeistern nicht schon frühzeitig gewusst hätte, dass ich diese Bewunderung teile; und meiner Großmutter, weil ihre unvoreingenommene Neugier, ihre Offenheit und ihre Wärme mir immer eine Inspiration sein werden.

IX Erklärung

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
Email: vvb-ips@t-online.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-487-X



9 7 8 3 8 9 6 8 7 4 8 7 0