

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Elektrophysiologische Charakterisierung
des Plexus myentericus der Ratte
in Zellkultur**

Inaugural-Dissertation

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

Eingereicht von
Guido Haschke

Gießen 2000

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

**Elektrophysiologische Charakterisierung
des Plexus myentericus der Ratte
in Zellkultur**

Inaugural-Dissertation

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

Eingereicht von
Guido Haschke

Tierarzt aus
Köln

Gießen 2000

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Hartwig Bostedt

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Diener**
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Clauß**

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2000

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
I Einleitung	2
I.1 Enterales Nervensystem	2
I.1.1 <i>Definition</i>	2
I.1.2 <i>Anatomie und Histologie</i>	2
I.1.3 <i>Wichtige Überträgerstoffe</i>	5
I.1.4 <i>Elektrisches Verhalten des Plexus myentericus</i>	6
I.1.5 <i>Aufgabe und Arbeitsweise</i>	7
I.1.6 <i>Plexus myentericus in Zellkultur</i>	9
I.2 Fragestellungen	9
I.2.1 <i>Elektrophysiologisches Verhalten des Plexus myentericus</i>	9
I.2.2 <i>Wirkung von Butyrat</i>	10
I.2.3 <i>Volumenregulation</i>	10
I.2.4 <i>pH-Wert-Regulation</i>	10
II Material und Methoden	11
II.1 Versuchstiere	11
II.2 Elektrolytlösungen	11
II.2.1 <i>Lösungen für die Präparation und Zellkultur</i>	11
II.3 Präparation	13
II.4 Zellkultur	19
II.5 Messtechnik	21
II.5.1 <i>Patch-Clamp-Methode</i>	21
II.5.2 <i>Patch-Clamp-Messstand</i>	25
II.5.3 <i>Ausführung der Patch-Clamp-Versuche</i>	30
II.6 Chemikalien	38
II.7 Auswertung	39
II.8 Multi-Media-Darstellung (CD-ROM)	39

Inhaltsverzeichnis

III	Resultate	41
III.1	Verteilung der Neuronentypen	41
III.1.1	<i>Tetrodotoxin – Sensitivität</i>	45
III.1.2	<i>Inaktivierung spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle</i>	47
III.1.3	<i>Besonderer Neuronentyp</i>	52
III.1.4	<i>Glia – Zellen</i>	54
III.1.5	<i>Membranpotentiale myenterischer Zellen</i>	55
III.2	Kurzkettige Fettsäuren (Butyrat)	56
III.2.1	<i>Membranpotential</i>	57
III.2.2	<i>Einwärtsstrom</i>	58
III.2.3	<i>Blockierung des Auswärtsstroms durch Cäsium</i>	59
III.3	Volumenregulation im Vergleich mit Butyrat-Wirkung	63
III.3.1	<i>Mannitol und hypotones Milieu</i>	63
III.4	pH – Regulation (saures Milieu)	66
IV	Diskussion	69
IV.1	Eine basale Charakterisierung myenterischer Neurone	69
IV.2	Butyrat, ein bekannter Stimulus des Magen-Darm-Trakts	74
IV.3	Die Zellkultur des Plexus myentericus der Ratte als Modell	80
V	Zusammenfassung	82
	Summary	83
VI	Literaturverzeichnis	84
VII	Danksagung	90

Abkürzungen

Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Medium
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)- tetraessigsäure
ENS	Enterales Nervensystem
FKS	Fetales Kälberserum
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- N'-(2-ethanolsulfonsäure)
SCFA	Short-chain fatty acid (kurzkettige Fettsäure)
TEA	Tetraethylammonium
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
I_{ein}	Einwärtsstrom in Ampere
I_{aus}	Auswärtsstrom in Ampere
e	Euler'sche Zahl (2,718)
k	Boltzmannkonstante ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ V} \cdot \text{C} \cdot \text{K}^{-1}$)
R	Allgemeine Gaskonstante ($8,315 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
T	Absolute Temperatur in Kelvin (K)
F	Faraday Konstante ($9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

I Einleitung

I.1 Enterales Nervensystem

I.1.1 Definition

Das enterale Nervensystem (ENS) ist ein autonomes, mit Ganglien versehenes Nervensystem, das wichtige Aufgaben der Magen-Darm-Funktionen steuert (siehe Langley, 1921). Es ist für den peristaltischen Reflex, die Kontrolle der Durchblutung der Magen-Darm-Schleimhaut und die Regulation des Ionentransportes verantwortlich. Außerdem moduliert es Immunreaktionen im enteralen System. Es wird als „little brain of the gut“ (siehe Wood, 1987) bezeichnet. Diese Bezeichnung spiegelt die Komplexität des enterischen Nervensystems wider, welches aus sensorischen Neuronen, Interneuronen und Motoneuronen besteht und mit dem Zentralnervensystem vergleichbar ist. Das Vorhandensein von enteralen Gliazellen und eine starke Vernetzung der einzelnen Neuronen, die mit einer Vielzahl verschiedener Neurotransmitter ausgestattet sind, unterstreichen diese Ansicht.

I.1.2 Anatomie und Histologie

Das intrinsische Nervensystem des Magen-Darm-Traks besteht im wesentlichen aus dem Plexus myentericus, der zwischen der Longitudinal- und der Zirkulärmuskulatur gelegen ist, und dem Plexus submucosus, der zwischen der Zirkulärmuskulatur und der Mucosa liegt (siehe Abb.I-1 und Auerbach, 1862 & Meissner, 1857).

Lokalisation des enteralen Nervensystems (ENS)

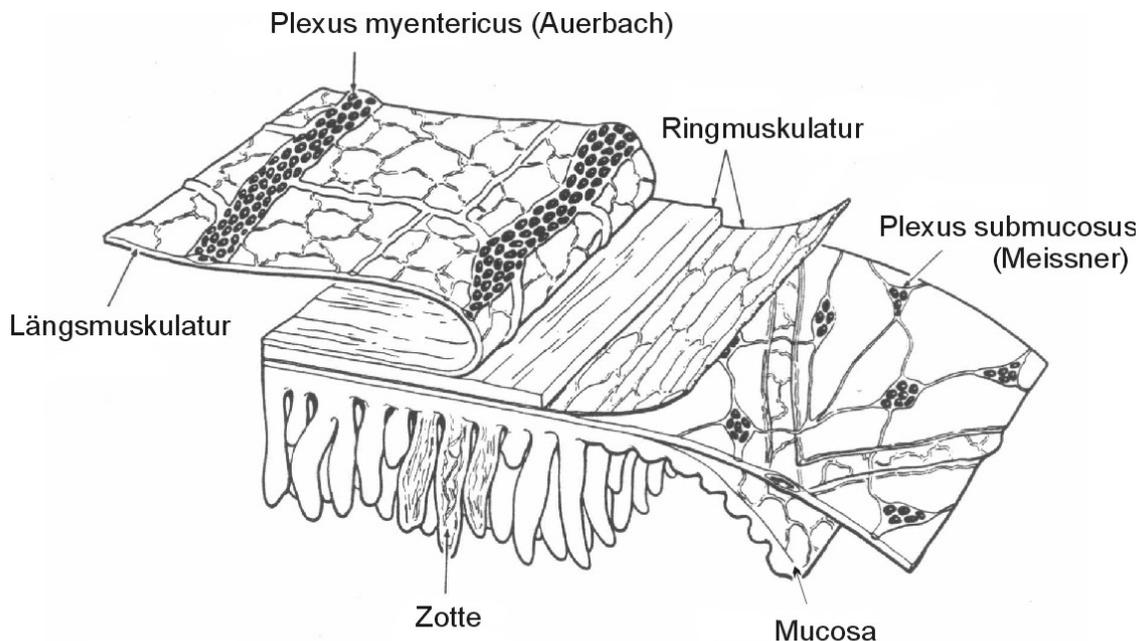


Abb.I-1 Enterales Nervensystem. Der Plexus myentericus befindet sich zwischen der Längs- und Ringmuskulatur des Magen-Darm-Trakts. Der Plexus submucosus ist zwischen Ringmuskulatur und Mucosa lokalisiert (nach Furness & Costa, 1980).

Das enterale Nervensystem verbindet als netzartiges Geflecht den gesamten Bereich der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Trakts und durchzieht die Submucosa. Die Gesamtzahl von mehr als 10 Millionen Neuronen (siehe Furness & Costa, 1980) ist vergleichbar mit der im Rückenmark vorhandenen Anzahl von Nervenzellen.

Die morphologische Differenzierung der enteralen Neurone wurde durch den Neuroanatom S. Dogiel (siehe Dogiel, 1899) in drei Gruppen gegliedert. Die Einteilung erfolgte nach seinem Namen in Dogiel Typ I, II und III, von denen alle drei Populationen in beiden Plexen lokalisiert sind (siehe Abb.I-2).

Morphologie nach Dogiel

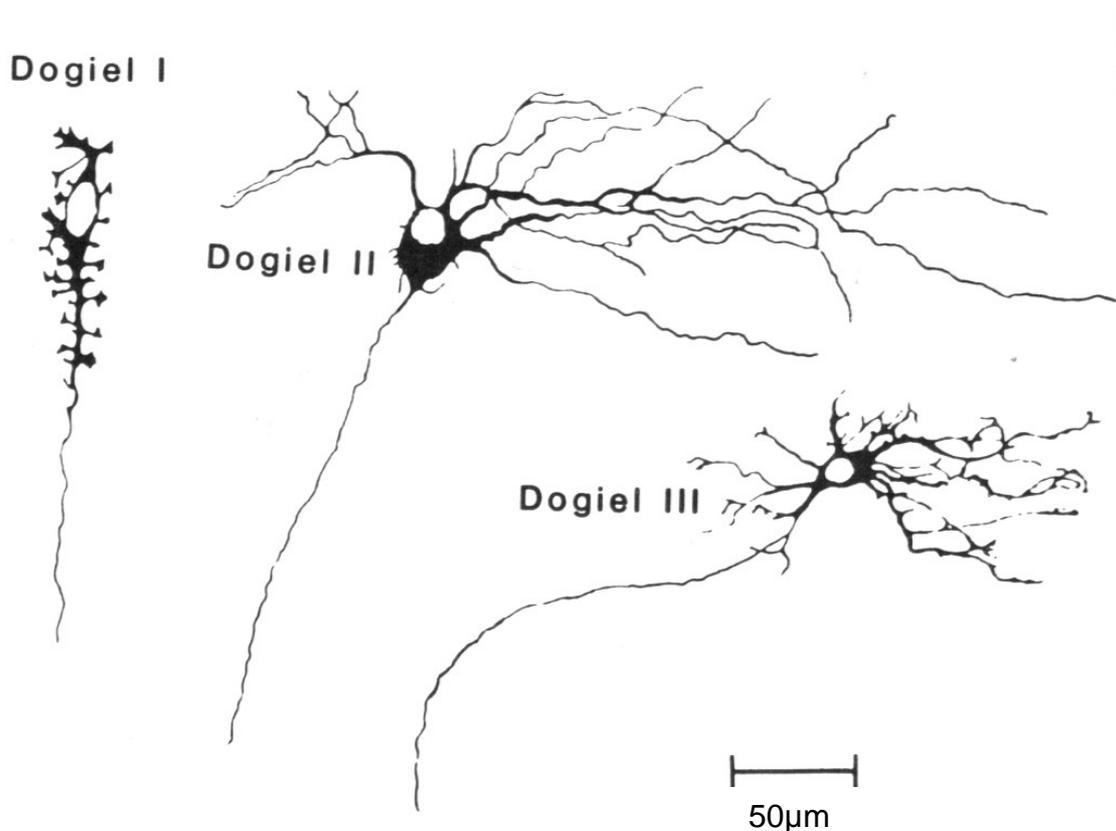


Abb.I-2 Neurone des enteralen Nervensystems. Einteilung nach Dogiel in Typ I bis III. Alle Populationen sind im Plexus myentericus und submucosus vorhanden (nach Dogiel, 1899).

Dogiel Typ I Neurone sind uniaxonale Neurone mit einer Vielzahl kleiner Dendriten, die vom Zellkörper ausgehen. Die Dogiel Typ II Neurone besitzen eine glattere Oberfläche mit langen und kurzen Dendriten und einem Axon. Im Vergleich zu Dogiel Typ II Neuronen besitzt der Typ III mehr kurze Dendriten am Zellkörper. Eine weiterführende Differenzierung der Neurone nach morphologischen Gesichtspunkten ist durch Stach beschrieben worden (siehe Stach, 1988).

I.1.3 Wichtige Überträgerstoffe

Das enterale Nervensystem verfügt über eine Vielzahl von verschiedenen Neurotransmittern, die auf benachbarte Neurone, die glatte Muskulatur der Darmwand, auf Gefäße sowie auf die Epithelzellen einwirken (Übersicht bei Schemann, 1990).

Eine Klassifizierung der einzelnen Überträgerstoffe kann nach ihrer erregenden und hemmenden Wirkung durchgeführt werden. In der nachfolgenden Tabelle (siehe Abb.I-3) wird ein kurzer Überblick über die wichtigsten Neurotransmitter und deren Wirkungen auf enterische Nervenzellen gegeben.

Die verschiedenen Neurontypen unterscheiden sich im wesentlichen durch ihre Aktivität und Erregbarkeit, die nach einer Stimulation von Nervenfasern bestimmt werden können und die synaptische Membran depolarisieren oder hyperpolarisieren. Das synaptische Verhalten wird in schnelle erregende postsynaptische Potentiale (fast EPSPs), langsam erregende postsynaptische Potentiale (slow EPSPs) und inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) eingeteilt. Auch präsynaptische Hemmungen spielen eine bedeutende Rolle in der Modulation der Informationsvermittlung. Schnelle erregende postsynaptische Potentiale werden einerseits vermittelt durch nicotinerge Rezeptoren, das heißt Azetylcholin, und andererseits durch Serotonin (5-HT), welches an 5-HT₃-Rezeptoren bindet (Übersicht bei Wood, 1992).

Klassifizierung enteraler Überträgerstoffe

Langsame inhibitorische postsynaptische Potentiale	Langsame excitatorische postsynaptische Potentiale	Inhibitorische präsynaptische Wirkung
Azetylcholin <i>Tokimasa et al. (1983)</i>	Serotonin (5-HT) <i>Wood & Mayer(1978)</i>	Dopamin <i>Hirst & Silinsky (1975)</i>
Enkephaline <i>North & Tonini (1977)</i>	Histamin <i>Frieling et al. (1994)</i>	Histamin <i>Tamura et al. (1988)</i>
Serotonin (5-HT) <i>Johnson et al. (1980)</i>	Azetylcholin <i>Morita et al. (1982)</i>	Serotonin (5-HT) <i>Henderson & North (1975)</i>
Neurotensin <i>Williams et al. (1979)</i>	Substanz P <i>Katayama & North (1978)</i>	γ-Aminobuttersäure <i>Jessen et al. (1987)</i>
Cholecystokinin <i>Nemeth et al. (1985)</i>	Vasoactives intestinales Peptid (VIP) <i>Willard (1990)</i>	Enkephaline <i>Cherubini et al. (1985)</i>
Somatostatin <i>Shen & Surprenant (1992)</i>	Cholecystokinin <i>Ngu (1983)</i>	Azetylcholin <i>North et al. (1985)</i>
Purine <i>Palmer et al. (1987)</i>	Caerulein <i>Zafirov et al. (1985)</i>	Galanin <i>Tamura et al. (1987)</i>
Galanin <i>Palmer et al. (1986), Tamura et al. (1988)</i>	Bombesin <i>Mihara et al. (1985)</i>	
Neuropeptid Y <i>Hirai et al. (1997)</i>	Gastrin-releasing peptide <i>Zafirov et al. (1985)</i>	

Abb.I-3 Tabelle einiger wichtiger Überträgersubstanzen des enteralen Nervensystems an Synapsen.

I.1.4 Elektrisches Verhalten des Plexus myentericus

Nach ihren elektrophysiologischen Eigenschaften lassen sich die Neurone in den meisten Abschnitten des enteralen Nervensystems mit Ausnahme des Magens in zwei Gruppen einteilen (Übersicht bei Wood, 1994):

1. *AH-* (oder *Typ-2*) *Neurone*, die nach einem gegenüber dem Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX)-resistenten Aktionspotential eine langdauernde Nachhyperpolarisation aufweisen. Das Aktionspotential wird bei diesen Zellen durch einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen getragen.

2. *S-* (oder *Typ-1*) *Neurone*, die TTX-sensitive Aktionspotentiale über einen Einstrom von Na^{+} -Ionen generieren. (siehe Abb.I-4).

Elektrisches Verhalten enteraler Nervenzellen

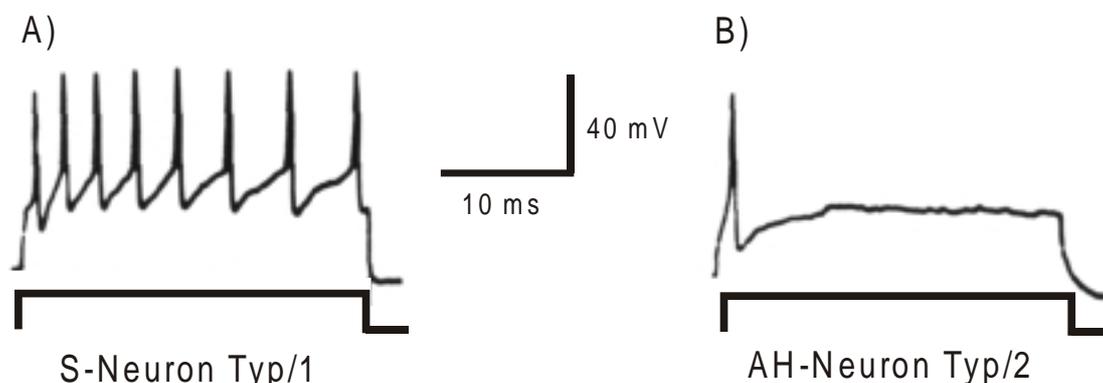


Abb.I-4 Elektrisches Verhalten enteraler Nervenzellen. Differenzierung der Neurone in ein (A) S / Typ 1 Neuron, das nach Depolarisation repetitiv Aktionspotentiale feuern kann, und (B) AH / Typ 2 Neuron, das nach einem Aktionspotential eine lange Nachhyperpolarisation zeigt (nach Wood, 1994).

I.1.5 Aufgabe und Arbeitsweise

Das enterale Nervensystem ist ein unabhängiger Abschnitt des vegetativen Nervensystems, das viele Aufgaben wie Steuerung der gastrointestinalen Motilität, des Elektrolyttransportes durch das Darmepithel oder der Durchblutung der Schleimhaut erfüllt (Übersicht bei Surprenant, 1994).

Eine Aufgabe des enteralen Nervensystems ist die *Kontrolle des Ionentransportes* durch das Darmepithel (Übersicht bei Brown & Miller, 1991). Dazu ist die Mucosa dicht mit deszendierenden und aszendierenden Nervenfasern innerviert, die sich in ihrem Neurotransmittermuster deutlich voneinander unterscheiden. So ist z.B. die Mehrzahl der aszendierenden Neurone durch das Schlüsselenzym für die Azetylcholinsynthese, ChAT (Cholin-Azetyl-Transferase) gekennzeichnet, ist also cholinerg, während die Mehrzahl der deszendierenden Neurone die NO-Synthase exprimiert, d.h. Stickoxid als Transmitter verwendet (siehe Neunlist et al., 1998).

Eine zweite zentrale Rolle spielt das enterische Nervensystem für die Modulation der *gastrointestinalen Motilität* und die Vermittlung des *peristaltischen Reflexes* (siehe Furness & Costa, 1987).

Eine dritte Aufgabe des enterischen Nervensystems besteht in der Wahrnehmung *sensorischer Reize*, die vom Darmlumen ausgehen, wie z.B. mechanische oder chemische Stimuli. Ein chemischer Stimulus, der von enteralen Neuronen registriert wird, sind z.B. kurzkettige Fettsäuren, die bei der Fermentation von Strukturkohlenhydraten im Kolon anfallen und die, vermittelt über das enterale Nervensystem, eine Cl⁻-Sekretion am Dickdarm (siehe Yajima, 1988) und am Ileum (siehe Diener et al., 1996) sowie eine Stimulation der gastrointestinalen Motilität (siehe Yajima, 1985) induzieren. Am Meerschweinchenileum ist gezeigt worden, dass das Aufbringen von Acetat auf die Mucosaoberfläche Aktionspotentiale an Plexus myentericus Neuronen induziert (siehe Bertrand et al., 1997). Die Erregungsphase ist nur transient; ihr folgt eine langdauernde Hyperpolarisation (siehe Neunlist et al., 1999).

I.1.6 Plexus myentericus in Zellkultur

Bisher wurden nur sehr wenige Untersuchungen an kultivierten Darmnervenzellen vorgenommen, die als Explantate *in vitro* nach enzymatischer Dissektion der Plexus gewonnen werden können (siehe Jessen, 1982). Sie bilden ein für Mikroelektroden- oder Patch-Clamp Versuche ideales Präparat, da die Nervenzellen frei der Ableitung zugänglich sind (siehe z.B. Hanani et al., 1994 & Barajas-López et al., 1998). Einzelne Neurone können direkt auf einen Stimulus hin untersucht werden und es ist somit möglich, ein Modell für eine Vielzahl von Versuchen zu etablieren.

I.2 Fragestellungen

I.2.1 Elektrophysiologisches Verhalten des Plexus myentericus

Lassen sich nach Anlegen einer Primärkultur an myenterischen Nervenzellen elektrophysiologische Versuche mit der Patch-Clamp-Technik durchführen?

Wie verhalten sich myenterische Neurone einer Zellkultur unter Patch-Clamp-Bedingungen?

Lassen sich anhand elektrophysiologischer Kriterien verschiedene Neuronentypen beschreiben?

Werden alle myenterischen Neurone durch das Nervengift Tetrodotoxin (TTX) blockiert?

Zeigt sich eine „typische“ Inaktivierung der schnellen Einwärtsströme, wie sie von Nervenzellen des Zentralnervensystems bekannt sind?

Welche Eigenschaften haben enterale Gliazellen?

I.2.2 Wirkung von Butyrat

Welche Wirkung hat Butyrat auf enterale Neurone?

Können die zellulären Mechanismen der Butyratwirkung beschrieben werden?

I.2.3 Volumenregulation

Hängt die Butyratwirkung mit einer Volumenregulation zusammen?

I.2.4 pH-Wert-Regulation

Kann die Butyratwirkung durch einen veränderten intrazellulären pH-Wert verursacht sein?

II Material und Methoden

II.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Universität Gießen. Es handelte sich um neugeborene Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts. Für Messungen am isolierten Plexus myentericus wurden Tiere im Alter von null bis vierzehn Tagen verwendet. Bei älteren Tieren ist eine Isolierung des enteralen Nervensystems (ENS) sehr schwierig und aufwendig. Futter und Wasser stand den Muttertieren ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden unter einem 12 Stunden hellen und 12 Stunden dunklen Zyklus gehalten.

II.2 Elektrolytlösungen

II.2.1 Lösungen für die Präparation und Zellkultur

Die Isolation des Darmtraktes erfolgte in N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure) (HEPES, $25\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) gepuffertem Dulbecco's modified Medium (DMEM) mit den Antibiotika Gentamycin ($50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) und Metronidazol ($100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die Inkubation des Gewebes geschah in dem vorher beschriebenen Medium mit Zusatz von Kollagenase Typ II ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $255\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$). Die aufgetrennten Zellen wurden in Start-V[®]-Medium für ein bis fünf Tage inkubiert. Das Medium enthielt Penicillin ($10000\text{units}\cdot\text{ml}^{-1}$) und Streptomycin ($10000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

II.2.1.1 Perfusionslösungen bei den Patch-Clamp-Versuchen

Als Standardlösung wurde eine HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung verwendet. Alle nachfolgenden Angaben verstehen sich in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Zusammensetzung: NaCl 140; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 12; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1. Perfusionslösungen mit Butyrat enthielten: NaCl 90; KCl 5,4; HEPES 10; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1; Na^+ -Buttersäure (Na^+ -Butyrat) 50; Glucose 12. Lösungen zur Volumenregulation enthielten in der isotonen Form: NaCl 70; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 12; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1; Mannitol 120. Die hypotone Lösung hatte folgende Zusammensetzung: NaCl 70; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 12; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1. Der pH-Wert dieser Lösungen wurde mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt. Die KCl-Lösung hatte folgende Bestandteile: KCl 140; HEPES 10; Glucose 12; CaCl_2 1,25; MgCl_2 2. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit KOH/HCl auf 7,4 eingestellt. Lösungen zur pH-Regulation wurden aus einer HEPES-gepufferten Tyrode-Lösung mit HCl auf einen pH von 6,9 und 6,4 eingestellt.

II.2.1.2 Pipettenlösung für Patch-Clamp-Versuche

Die Standardpipettenlösung für die Patch-Clamp-Experimente enthielt ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): KGluc 100; KCl 40; Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA) 0,1; Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) 10; ATP 5; MgCl_2 2.

Die CsCl-Pipettenlösung hatte folgende Zusammensetzung ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): CsCl 140; EGTA 0,1; TRIS 10; ATP 5; MgCl_2 2. Beide Lösungen wurden mit TRIS/HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

II.3 Präparation

Benötigte Werkzeuge waren: Pinzette, gebogen; Dumont-Uhrmacherpinzetten der Größe 3 und 4; kleine spitze Schere; große, stumpfe Schere; Pipetten für 0-100 μ l und 100-1000 μ l; Kunststoffschälchen mit 10cm Durchmesser; Stereolupe (2 – 20fache Vergrößerung) und Kaltlichtlampe.

Nährflüssigkeiten und enzymhaltige Lösungen enthielten: Medium, bestehend aus N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfon-säure) (HEPES), gepuffertem Dulbecco's Modified Medium (DMEM) mit den Antibiotika Metronidazol (100 μ g \cdot mg⁻¹) und Gentamycin (50 μ g \cdot ml⁻¹) zur Aufbewahrung des isoliertem Darms und der Nervengeflechte auf Eis; HEPES gepuffertes DMEM mit Kollagenase Typ II (255units \cdot mg⁻¹) in einer Konzentration von 1mg \cdot ml⁻¹ zur enzymatischen Trennung des Muskelgewebes vom myenterischen Plexus; Trypsin (0,02mg \cdot ml⁻¹) zur Separation des Nervengeflechts.

Die Ratten wurden mittels Schere dekapitiert und anschließend entblutet. Die Bauchhöhle wurde entlang der Linea alba eröffnet. Nach Identifizierung des Geschlechts, Vorhandsein von Hoden oder Eileitern, wurde der gesamte Darm vom distalen Colon nach cranial zum Magen herauspräpariert. Hierbei wurde das Gekröse und Fett vorsichtig vom Darmrohr separiert, ohne die Darmmuskelschichten zu verletzen. Der gewonnene Darmtrakt wurde in Medium (HEPES gepuffertes DMEM) auf Eis gelagert (siehe MPG-Film PRÄP1.MPG auf beiliegender CD-ROM).

Der in Medium gelagerte Darm wurde zur Isolation der Längs- und Ringmuskelschicht stückweise entnommen. Die Darmabschnitte hatten eine Länge von je ca. 10cm. Das abgetrennte Darmstück

wurde in ein zweites Plastikschälchen (10cm Durchmesser) mit Medium (HEPES gepuffertes DMEM) gelegt. Unter Zuhilfenahme einer Stereolupe und einer Kaltlichtquelle sowie Uhrmacherpinzetten wurde der Darm von der Serosa befreit. Serosanteile mit Blut- und Lymphgefäßen wurden verworfen. Für die weitere Präparation wurde nun mit den Uhrmacherpinzetten die Einheit aus Längsmuskelschicht (muscularis externa), Auerbachschem Plexus (plexus myentericus) und Ringmuskelschicht (muscularis interna) von der Mucosa frei präpariert. (siehe Abb.II-1).

Lage des Plexus myentericus

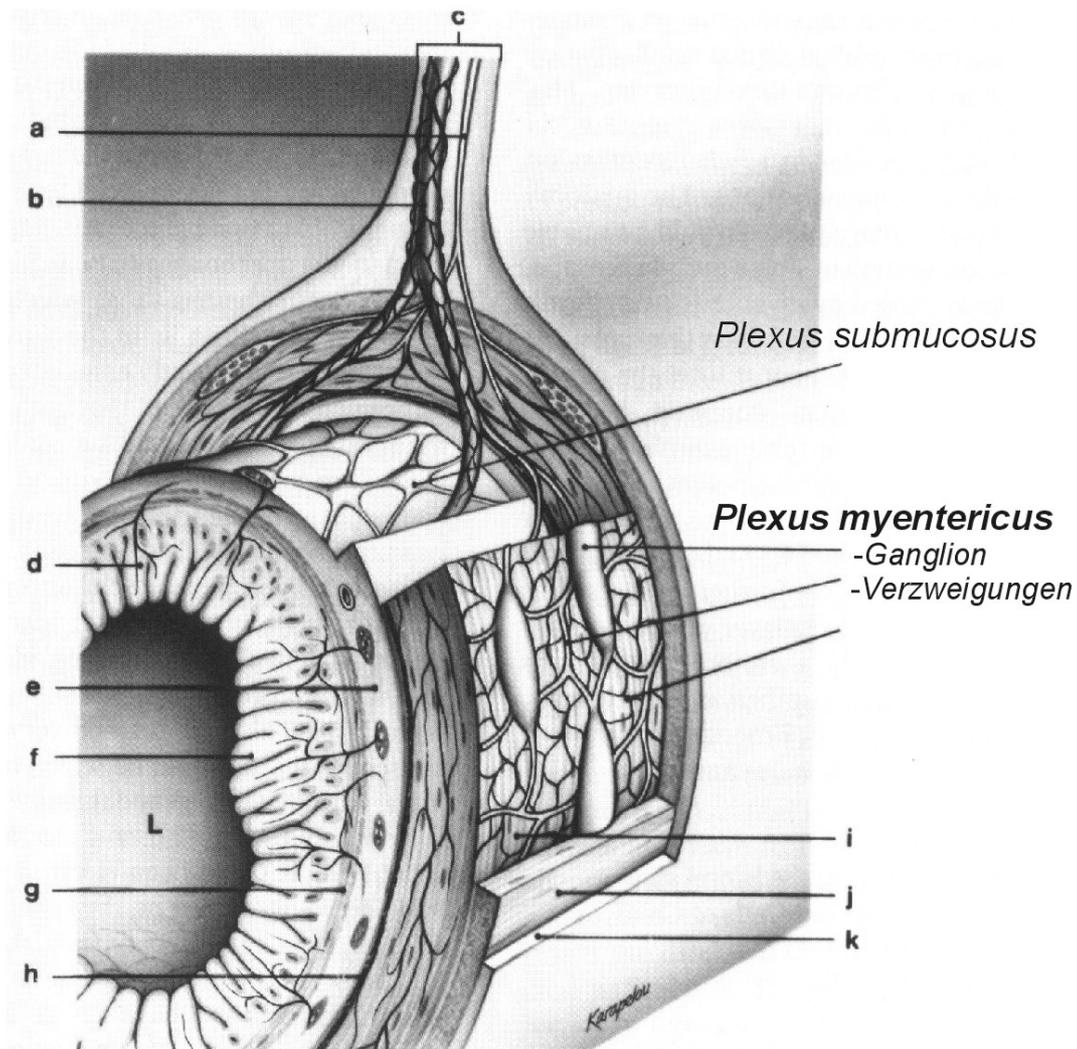


Abb.II-1 Schematischer Schnitt durch die Darmwand des Dünndarms.
a) parasympatische Fasern (Vagus); b) perivaskuläre sympathische Innervation; c) Mesenterium; d) sensorische Neurone; e) Submucosa; f) Zotten; g) muscularis mucosa; h) tiefe muskuläre Nervenfasern; i) Ringmuskulatur; j) Längsmuskulatur; k) Serosa; L) Darmlumen, (modifiziert nach Gershon & Erde, 1981).

Die Isolation erfolgte durch Erfassen der Muskelschichten mit den Uhrmacherpinzetten und nachfolgendem strumpffartigem Abziehen dieser Schichten (siehe MPG-Film PRÄP2.MPG auf beiliegender CD-ROM). Der gewonnene Muskelschlauch wurde im Anschluss enzymatisch aufbereitet, um Muskelanteile vom

Nervengeflecht zu trennen. Als Enzym wurde Kollagenase Typ II ($255\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$) benutzt. Die Kollagenase wurde in HEPES gepuffertem DMEM gelöst ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). In ca. $400\mu\text{l}$ dieser Lösung wurde der isolierte Muskel mit Anteilen des enteralen Nervensystems in einem geschlossenen Reaktionsgefäß ($1000\mu\text{l}$) im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach einer Inkubation von ca. $1\frac{1}{2}$ Stunden wurde das Reaktionsgefäß aus dem Brutschrank entnommen. Auf einem Schüttler wurde der Inhalt für ca. 30 Sekunden kontinuierlich durchgemengt. Das entstandene Suspensat wurde in einem mit Medium (DMEM mit HEPES) gefüllten Kunststoffschälchen aufgesammelt und mit einer Stereolupe (20facher Vergrößerung) nach Plexus myentericus Segmenten durchsucht (siehe Abb.II-2) und mit einer $200\mu\text{l}$ Pipette aufgesammelt (siehe MPG-Film PRÄP3.MPG auf beiliegender CD-ROM).

Isolierter Plexus myentericus

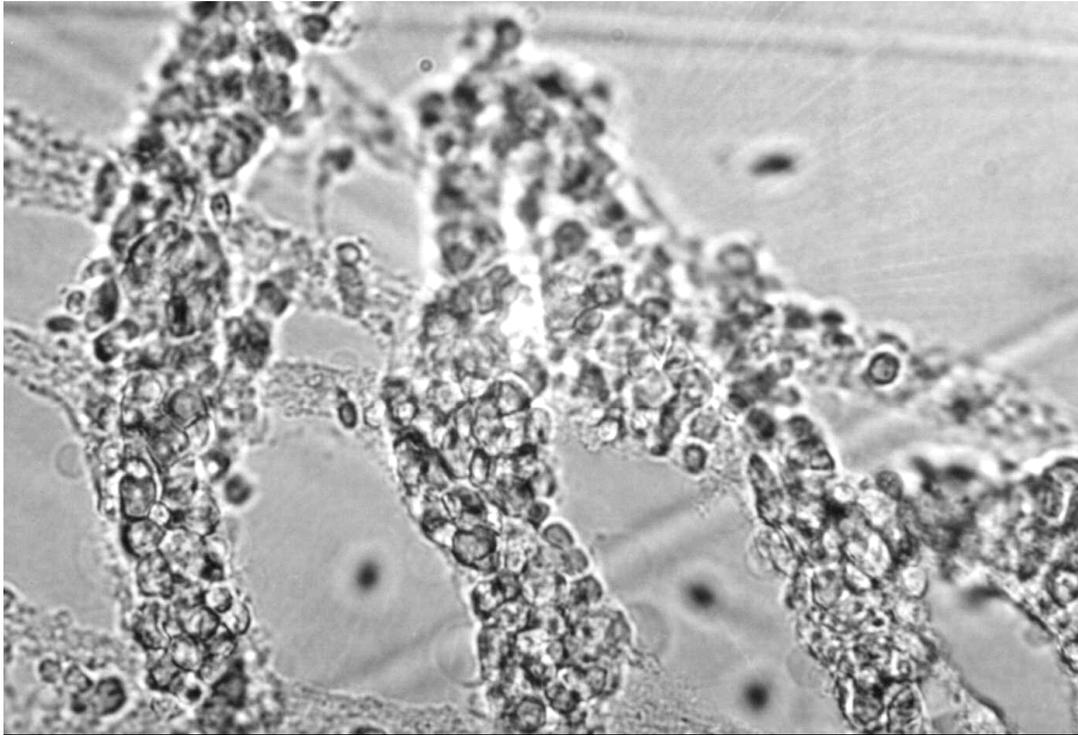


Abb.II-2 Isolierter Plexus myentericus nach enzymatischer Behandlung mit Kollagenase.

Der Pipetteninhalt wurde anschließend im Medium (HEPES gepuffertes DMEM) auf Eis in einem Kunststoffschälchen gelagert. Muskelanteile mit Plexus-Strukturen wurden wieder aufgesammelt und nach der oben beschriebenen Methode reinkubiert. Dieses Verfahren konnte bis zu viermal wiederholt werden, um isolierte Plexus myentericus Anteile zu erhalten (siehe Abb.II-3 und MPG-Film PRÄP3.MPG auf beiliegender CD-ROM).

Arbeitsgang der Präparation

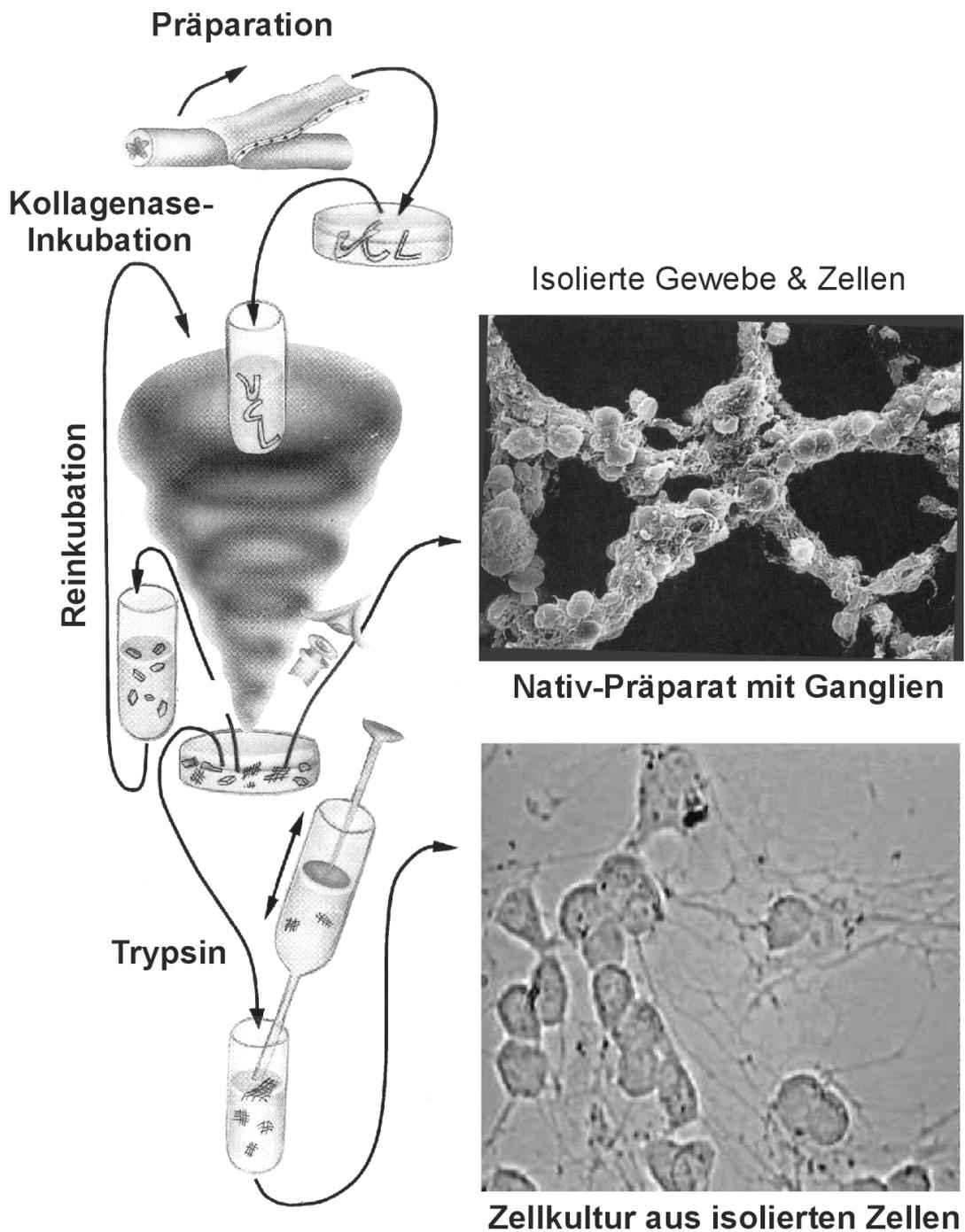


Abb.II-3 Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte. Nach einer enzymatischen Dissoziation können native Plexus-Anteile weiter als Primärkultur angelegt werden (modifiziert nach Schäfer et al., 1997).

II.4 Zellkultur

Benötigte Werkzeuge waren: Zellkulturarbeitsbank (flowbench), um ein steriles Arbeiten zu ermöglichen; Pipetten der Größen 0-100 μ l und 100-1000 μ l; Reaktionsgefäße 1000 μ l; Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen (13mm Durchmesser; Poly-L-Lysin: Molekulargewicht 70.000 – 150.000 D), auf denen die separierten Neurone ausgesät wurden; Zellkulturschälchen mit vier Kammern für die Inkubation der beschichteten Glasplättchen mit Nervenzellen; Tuberkulineinmalspritzen (1ml) mit Injektionskanülen (0,40 x 42mm) für die mechanische Auftrennung in einzelne Zellen; Trypsin (0,02mg·ml⁻¹), um die Neurone zu separieren; Medium (Start-V[®]) mit und ohne fetalem Kälberserum (FKS, 10%) unter Zusatz von Antibiotika Penicillin/Streptomycin; destilliertes Wasser (autoklaviert).

Die aus dem Präparat isolierten Plexus-Myentericus-Fragmente (netzartige Struktur; siehe Abb.II-2) wurden mit einer 200 μ l Pipette aufgesammelt und in ein 1000 μ l Reaktionsgefäß überführt. Das restliche Volumen wurde mit Trypsin (0,02mg·ml⁻¹) aufgefüllt. Trypsin diente der enzymatischen Zerlegung des vorhandenen Auerbachschen Plexus. Das verschlossene Reaktionsgefäß wurde anschließend für 10 Minuten in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nachfolgend musste das Gefäß für 10 Minuten mit 600 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert werden, um den Trypsin- und Mediumüberstand von den neuronalen Teilen zu trennen. Der Überstand wurde mit einer 1000 μ l Pipette vorsichtig entfernt und anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit FKS-haltigem Start-V[®] Medium aufgefüllt (400 μ l). Fetales Kälberserum (FKS) musste

hinzugefügt werden, um die enzymatische Aktivität des Trypsins zu inaktivieren.

Die zuvor zentrifugierten Anteile des Auerbachschen Plexus mussten durch mechanische Zerkleinerung in Einzelzellen aufgespaltet werden. Durch Aufziehen und nachfolgendes Injizieren des Plexus-Myentericus-Suspensats mit einer 1ml Tuberkulinspritze und einer feinen Kanüle in das Reaktionsgefäß wurde dies bewerkstelligt. Der Vorgang wurde 3-4 mal wiederholt. Mit einer 100 μ l Pipette konnten die Zellen entnommen und zu vier Anteilen gleichmäßig auf die beschichteten Glasplättchen in die Kammern der Zellkulturplatten verteilt werden. Die Zellkulturplatten bestanden aus vier Kammern für die mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen. Das die Kammer umgebende Volumen wurde mit 4ml destilliertem Wasser aufgefüllt (siehe Abb.II-4).

Zellkulturplatte

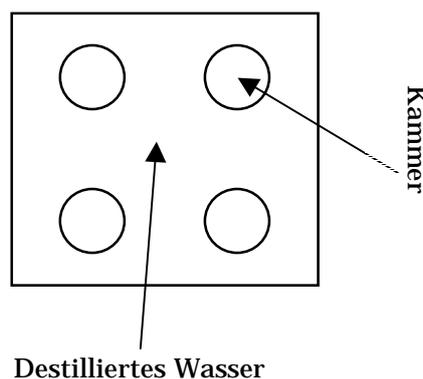


Abb.II-4 Zellkulturplatte mit Einbuchtungen für polylysinbeschichtete Glasplättchen. Jedes Glasplättchen wurde mit 100 μ l des Zellsuspensats beimpft und anschließend für 30 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nachfolgend wurden die Kammern auf 500 μ l aufgefüllt (Start-V[®] Medium, ohne FKS).

Die mit einem Deckel geschlossenen Zellkulturplatten wurden für 30-60 Minuten in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ – Atmosphäre inkubiert. Während dieser Zeit konnten sich die einzelnen Zellen auf den mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen anheften. Grundlage dafür sind elektrostatische Kräfte, die von negativ geladenen Teilen des Poly-L-Lysins ausgehen. Im nachfolgenden Schritt wurden die Kammern mit definiertem Start-V[®] Medium, ohne FKS, auf 500µl aufgefüllt. Die inkubierten Zellen konnten unter diesen Bedingungen für 1 bis 5 Tage im Brutschrank aufbewahrt werden. Vierundzwanzig Stunden nach Anlegen der Zellkultur waren die ersten Ausläufer (Dendriten und Axone) der inkubierten Nervenzellen sichtbar (siehe Abb.II-8 und MPG-Film KULTUR.MPG auf beiliegender CD-ROM).

Zur Durchführung der elektrophysiologischen Experimente konnten die Zellen ab dem ersten Tag mit den Glasplättchen entnommen werden. Zellkulturen, die ein Alter von 5 Tagen überschritten hatten, konnten als Versuchsmaterial nicht mehr benutzt werden, da vorhandene Gliaanteile das neuronale Gewebe überwucherten. Es wurden keine Zytostatika hinzugegeben, um das Wachstum der Gliazellen zu supprimieren.

II.5 Messtechnik

II.5.1 Patch-Clamp-Methode

Das Membranpotential und die Ströme durch die Zellmembran enteraler Nervenzellen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gemessen. Diese Methode wurde erstmals 1976 von Erwin Neher und Bert Sackmann beschrieben. Beide wurden 1991 dafür mit dem

Nobelpreis für Physiologie und Medizin („Funktion einzelner zellulärer Ionenkanäle“) ausgezeichnet. Die Methode ermöglicht die Messung von Ionenströmen über die Membran sowie einzelner Ionenkanäle (die gemessenen Ströme bewegen sich im pA(10^{-12} A)-Bereich).

Das Prinzip der Messmethode beruht darin, dass eine mit Elektrolytlösung gefüllte Glaspipette auf die Membran einer Zelle aufgesetzt wird. Die Glaspipetten haben einen Öffnungsdurchmesser zwischen 0,5 und 1 μ m. Das Aufsetzen der Glaspipette auf die Zellmembran lässt einen abgedichteten Bereich, den sogenannten Fleck, „patch“, entstehen. Dieser isolierte Patch wird durch Anlegen eines leichten Unterdrucks in der Glaspipette von seiner Umgebung elektrisch isoliert und ermöglicht das Ableiten einzelner Ionenströme durch Kanäle in dem Membranareal direkt unterhalb der Pipettenspitze.

Die Charakterisierung des Auerbachschen Plexus wurde mit Ganzzelleableitungen („whole-cell“) durchgeführt. Durch einen weiteren kurzen Unterdruck in der Pipette wird der Membranfleck durchgebrochen. Die Zelle bildet nun eine Einheit mit der Glaspipette und kann damit für elektrische Ableitungen über die ganze Membran der Nervenzelle genutzt werden. Die Pipettenlösung muss für solche Versuche einer Elektrolytlösung entsprechen, die mit einer intrazellulären Elektrolytlösung vergleichbar ist.

II.5.1.1 Patch-Clamp-Konfigurationen

Nach Kontakt der Glaspipette mit der Zellmembran und nach Anlegen eines Unterdrucks wird der Membranfleck von der restlichen Membran und der Badlösung isoliert, wobei ein Widerstand von

mehreren Gigaohm ($1\text{G}\Omega = 10^9\Omega$) aufgebaut wird. Dieser Abdichtwiderstand wird auch als „seal“ oder „gigaseal“ bezeichnet. Diese Verbindung aus Zelle und Glaspipette ist die sogenannte „cell-attached-configuration“; intrazelluläre Komponenten der Zelle bleiben unbeeinflusst. Der Gigaseal unterdrückt ein starkes elektrisches Rauschen und macht Messungen an Einzelkanälen über dem Membranfleck möglich. Wird die Pipette nachfolgend vorsichtig zurückgezogen, erhält man eine „inside-out-configuration“, bei der die zytoplasmatische Oberfläche des Membranpatches zur Badlösung hinzeigt.

Die in dieser Arbeit genutzte „whole-cell-configuration“ entsteht durch kurze Applikation eines Unterdrucks in die Glaspipette im Cell-Attached-Modus. Die Zellmembran wird unter der Pipette durchbrochen, so dass ein elektrischer Zugang zum Zellinneren entsteht.

In dieser Messanordnung kann das Membranpotential (V) und der Stromfluss (I) über der gesamten Membran der Zelle gemessen werden. Die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran können durch Anlegen einer Spannungsklemme (voltage-clamp) oder durch Applikation von Strom (current-clamp) verändert werden und anschließend bestimmt werden. Diese Technik ist besonders für basale Charakterisierungen von elektrischen Membraneigenschaften geeignet im Gegensatz zur Cell-Attached-Konfiguration mit Betrachtung einzelner Kanalströme. Eine weitere Modifikation besteht in der „outside-out-configuration“. Nachdem ein „whole-cell“ entstanden ist, muss die Pipette zurückgezogen werden. Der Vesikel wird durch Passieren der Wasser-Luft-Grenzschicht aufgebrochen und es resultiert eine Messanordnung, bei der die extrazelluläre Seite

der Membran zum Bad und die zytoplasmatische zur Pipette hinweist (siehe Abb.II-5, Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik).

Patch-Clamp-Konfigurationen

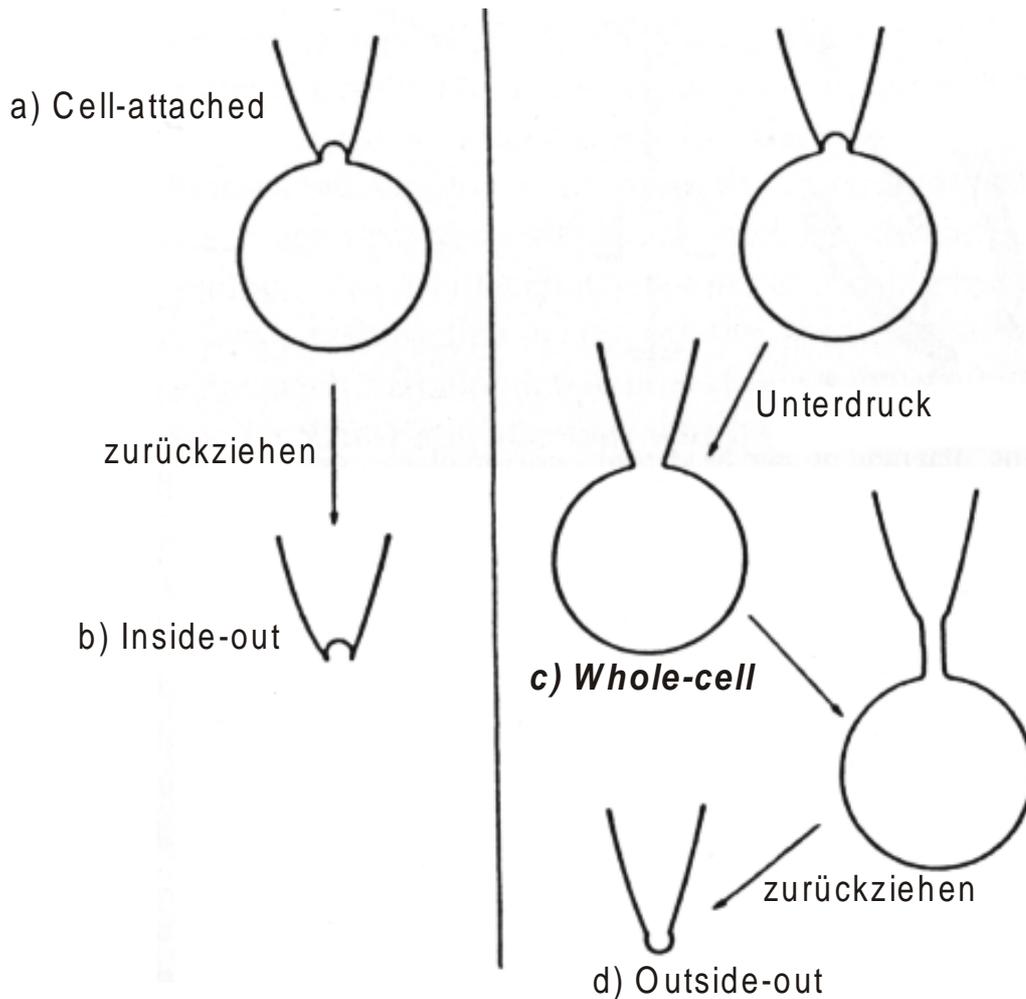


Abb.II-5 Modell der Patch-Clamp-Konfigurationen. Nach dem Aufsetzen der Glaspipette auf die Zellmembran können folgende Messanordnungen hergestellt werden: a) cell-attached b) inside-out, c) whole-cell, d) outside-out (modifiziert nach Odgen & Stanfield, 1994)

II.5.1.1.1 Vorzeichenkonvention

Die Richtung des Stroms wird generell aus Sicht der Zelle dargestellt. Fließt ein Strom von positiv geladenen Ionen als Einwärtsstrom in die Zelle, wird er per Definition als negativer Strom betrachtet. Positive Ionen, die aus der Zelle herausfließen, werden als positiver Auswärtsstrom beschrieben. Negative Ionen verhalten sich umgekehrt.

II.5.2 Patch-Clamp-Messstand

II.5.2.1 Mikroskop

Alle Versuche mussten unter optischer Kontrolle durchgeführt werden. Hierzu wurde ein inverses Mikroskop (IX 70 Olympus, Tokyo, Japan) verwendet. Das Mikroskop besaß Objektive mit 4-, 10-, 20- und 40facher Vergrößerung (großer Arbeitsabstand) und einem 10x-Weitwinkelokular.

Voraussetzung eines guten Experiments ist ein kontrolliertes Aufsetzen der Glaspipette auf die Zelloberfläche. Um dies zu gewährleisten, wurde eine Nomarskiptik eingesetzt, die dünne optische Schnitte durch das Präparat legte. Die Normaskioptik ist ein kontrastverstärkendes Verfahren mit differentiellm Interferenzkontrast (Übersicht bei Gerlach, 1985).

II.5.2.2 Messkammer und Perfusionssystem

Die Messkammer wurde auf einem modifizierten Objektisch des Mikroskops eingesetzt und konnte in X- und Y-Richtung bewegt werden. Die aus Plexiglas hergestellte Messkammer entsprach ihrem Aussehen nach einem herkömmlichen Objektträger aus Glas für Mikroskope, hatte jedoch in der Mitte eine Vertiefung für die mit

Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen. Das Volumen der Vertiefung entsprach 0,6ml, der Durchmesser betrug 15mm. Zur Perfusion wurden Infusionsbestecke verwendet, die 60cm oberhalb der Versuchsanordnung installiert waren. Die Infusionsbestecke endeten in einem Verteiler, der in die Messkammer mündete. Gegenüberliegend wurde eine Saugpumpe installiert, um ein konstantes Volumen von 0,6ml in der Kammer zu halten. Der Zulauf erfolgte kontinuierlich und hatte eine Fließgeschwindigkeit von 1ml pro Minute. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

II.5.2.3 Messtisch und mechanische Komponenten

Die sehr fragile Verbindung und durch elektrische Felder sehr störungsträchtige Messanordnung zwischen Zelle und Messpipette erforderte ein schwingungsfreies Arbeiten in einem elektrisch isolierten Raum. Aufgrund dieser Voraussetzungen wurde ein schwingungsgedämpfter Tisch verwendet, der von einem Faradaykäfig umgeben war. Auf diesem Tisch befand sich das Mikroskop mit der Messapparatur. Kontrolliertes Bewegen der Glasspipette in allen Raumrichtungen wurde durch einen hydraulischen Mikromanipulator (MHV-103, Narishige International, London, England) verwirklicht, der auch die Befestigung des Vorverstärkers und des Pipettenhalters sicherstellte. Die Bedienelemente des Mikromanipulators wurden separat vom schwingungsgedämpften Tisch angebracht, um mechanische Erschütterungen zu vermeiden.

II.5.2.4 Elektronische Komponenten

Die Messung der Membranströme und -potentiale erfolgte mit einem Patch-Clamp-Verstärker (RK 400, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich). Der dazugehörige Vorverstärker (HK 409, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich), der mit einem Pipettenhalter auf dem Mikromanipulator befestigt wurde, registrierte den Strom, der durch die Membran floss, und wandelte ihn in eine Spannung um (siehe Abb.II-6).

Schematisches Schaltbild eines Patch-Clamp-Vorverstärkers

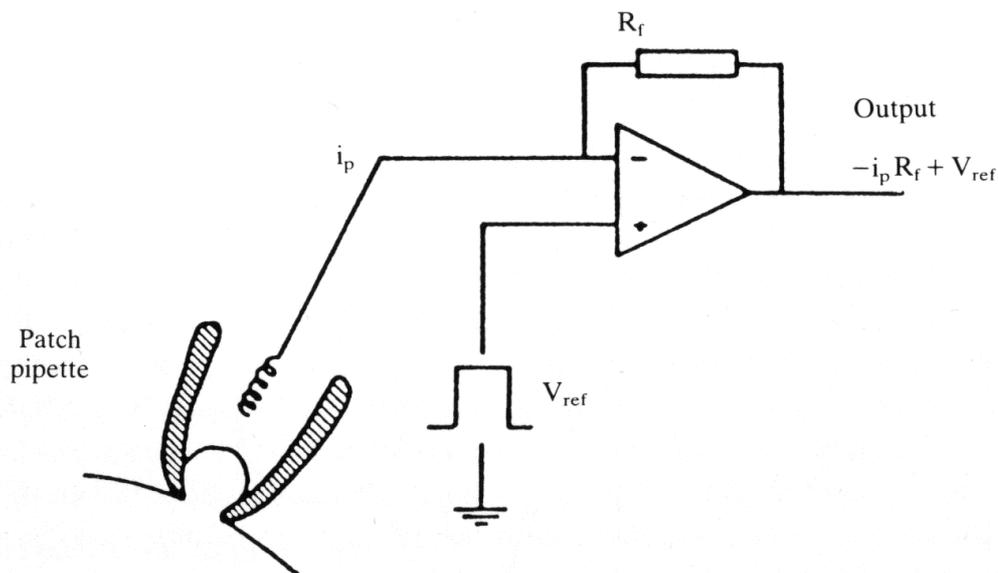


Abb.II-6 Schematische Darstellung des Vorverstärkers. Durch Anlegen einer Kommandospannung (V_{ref} , Rechteckpuls), wird ein Strom i_p über einen Rückkopplungswiderstand R_f in die Pipette appliziert und ein definiertes Haltepotential eingestellt.

Dieses Signal wurde in den Patch-Clamp-Verstärker übertragen. Der Verstärker wurde über eine spezielle Software (CED Patch and Voltage Clamp Software, Cambridge Electronics Design

LTD, Cambridge, England) gesteuert. Zur Kommunikation zwischen Computer und Verstärker diente ein DA-AD-Wandler (CED 1401, Cambridge, England).

II.5.2.5 Elektroden und Patchpipetten

Die Badreferenz- und die Pipettenelektrode wurden aus einem Silber/Silberchlorid-Draht hergestellt. Die Referenzelektrode wurde über eine Agarbrücke ($3\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl + 3% Agar) mit dem Versuchsbad und dem Vorverstärker gekoppelt. Die Messelektrode befand sich in einer mit Elektrolytlösung gefüllten Glaspipette und wurde mit dem Vorverstärker über den Pipettenhalter verbunden.

Die Patchpipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Jencons Scientific, Bedfordshire, England) hergestellt. Ein Vertikalpuller (Typ PC 95, Hans Ochozki Feinmechanik, Homburg/Saar, Deutschland) formte die Glaskapillaren in zwei symmetrische Glaspipetten. Das Ausziehen der Glaskapillaren erfolgte durch Erhitzen innerhalb einer Heizspule in zwei Stufen (siehe Abb.II-7), wobei die erste Temperatur eine Streckung der Glaskapillare zur Folge hatte und die nachfolgende zweite Erhitzung den Bruch der Kapillare bewirkte.

„Der Puller“
Pipetten werden vertikal in 2 Stufen gezogen

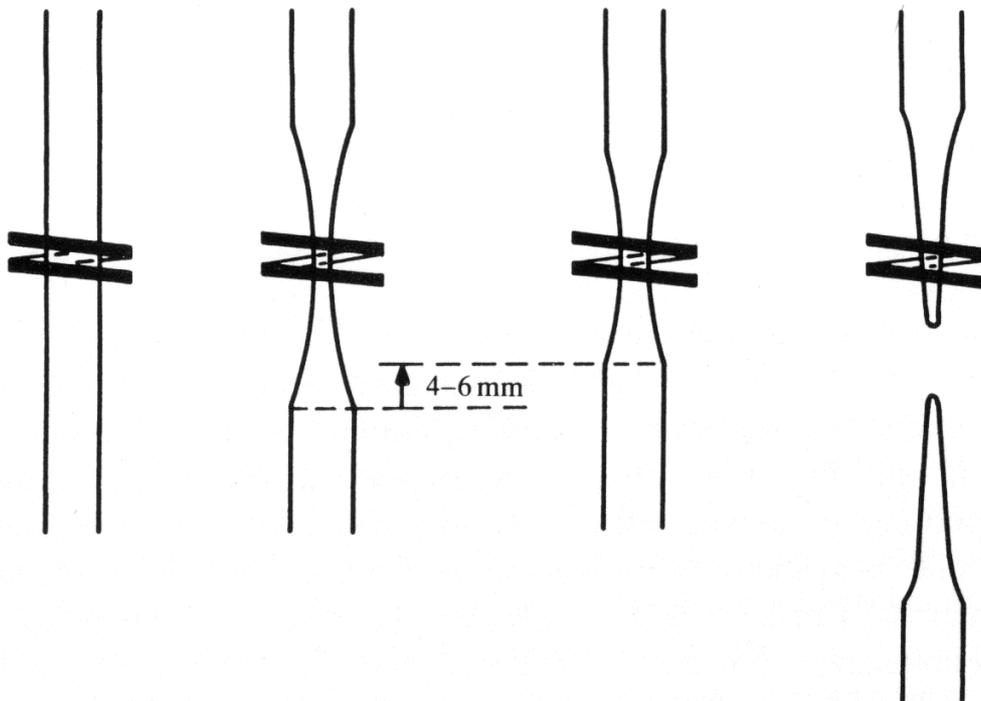


Abb.II-7 Puller. Das Ziehen der Glaspipetten erfolgt in zwei Temperaturstufen. Erhitzung einer Metallspule und ein Gewicht an der Glaskapillare formten die Pipettenspitzen.

Der Innendurchmesser der Pipetten betrug 1,15mm, der Außendurchmesser 1,8mm. Die Pipettenspitzen hatten eine Öffnung von 1 μ m Durchmesser und der Widerstand der Pipetten betrug 5 – 9 Mega Ohm (M Ω) nach Füllung mit der Standardpipettenlösung.

II.5.2.6 Datenerfassung

Die verstärkten und gefilterten (low-pass-Filter) analogen Daten wurden zur weiteren Bearbeitung in verschiedenen Geräten erfasst. Alle Strom- und Spannungssignale wurden während der Versuche auf einem digitalen Speicheroszilloskop (HM-205-3 HAMEG Instruments, Frankfurt, Deutschland) dargestellt.

Kontinuierlich wurde mit einem Papierschreiber (Phywe Systeme, Göttingen, Deutschland) während des gesamten Versuchs das Membranpotential analog aufgezeichnet. Synchron wurden die Daten in digitale Informationen umgewandelt (DA-AD-Wandler CED 1401, Cambridge, England) und auf der Festplatte eines Computers sowie auf einem digitalen Kassettenrekorder (DTR 1204, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) gespeichert. Die Datenerfassung erfolgte mit einer speziellen Software (CED Patch and Voltage Clamp Software, Cambridge Electronics Design LTD, Cambridge, England).

II.5.3 Ausführung der Patch-Clamp-Versuche

Unter mikroskopischer Kontrolle wurde eine geeignete Nervenzelle lokalisiert. Nachfolgend musste eine Patchpipette blasenfrei mit einer Elektrolytlösung gefüllt und in der Pipettenhalterung befestigt werden. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Pipette in das Versuchsbad geführt und ein leichter Überdruck an die Glaspipette angelegt. Der Überdruck gewährleistet eine saubere Pipettenöffnung und besseres Aufsetzen („seal“) auf die Zelloberfläche. Durch Eintauchen der Glaspipette in das Perfusionsbad entsteht ein Messartefakt, „Liquid Junction Potential“ oder „Offsetpotential“ genannt. Dieses Messartefakt entsteht innerhalb der Messkette, bestehend aus Silberdraht – Pipettenlösung – Badlösung – Referenzelektrode. Das Offsetpotential konnte durch den Verstärker korrigiert werden, indem die Spannung nachreguliert wurde. Durch Applikation einer definierten Spannung (10mV) und dem daraus resultierenden Strom lässt sich der Pipettenwiderstand nach dem Ohmschen Gesetz berechnen ($R = U/I$). Er lag zwischen 5 und 9 M Ω (siehe Abb.II-9 a).

Nachdem das Offsetpotential korrigiert wurde, konnte die Pipette an die Zelle herangeführt und der Zellkontakt hergestellt werden (siehe Abb.II-8 und MPG-Film PATCH.MPG auf beiliegender CD-ROM).

Patch-Pipette auf einem Neuron



Abb.II-8 Patch-Pipette auf einem Neuron. Die Versuche wurden in der whole-cell-Konfiguration durchgeführt.

Der Überdruck an der Pipette wurde anschließend abgelassen. Es entstand eine Zell-Glaspipetten-Verbindung, der Seal. Leichter Unterdruck in der Pipette bewirkte eine noch stärkere Bindung zwischen Glas und Membran der Zelle. Der Membranfleck unter der Pipettenöffnung war nun fast vollständig isoliert und hatte einen Widerstand von einigen Giga Ohm (siehe Abb.II-9 b), der Cell-

Attached-Mode (siehe II.5.1.1). Die Stromantwort auf den Kommandospannungspuls wurde vernachlässigbar klein und zeigte zwei kapazitative Artefakte zu Beginn und Ende des Kommandospannungspuls. Die kapazitiven Artefakte entstehen durch Umladeprozesse an der Pipette und der Zellmembran. Sie konnten mit dem Hauptverstärker kompensiert werden (siehe Abb.II-9 c). Zusätzlich wurde ein definiertes Haltepotential eingestellt (-80mV).

Durch ruckartiges Saugen konnte die Zelle unter der Patchpipette geöffnet werden. Somit wurde der elektrische Zugang zur Zelle (Whole-Cell-Modus) ermöglicht.

Im Whole-Cell-Modus werden Stromflüsse durch die gesamte Membran der Zelle bestimmt. Durch die Perforation der Zellmembran änderte sich die Stromantwort nach jedem Rechteckspannungspuls, da nun nicht mehr lediglich der Membranfleck unter der Pipettenöffnung umgeladen werden musste, sondern die gesamte Fläche der Zellmembran. Dies hatte eine starke Zunahme der kapazitiven Ströme zur Folge. Eine Kapazitätskompensation konnte nur noch geringfügig durchgeführt werden (Abb.II-9 d).

Nach der beschriebenen Kompensation der Kapazität und Einstellung eines definierten Haltemembranpotentials wurde der Verstärker auf den Strom-Klemm-Modus (current-clamp) umgeschaltet. Es wird in die Pipette ein definierter Strom appliziert und der Experimentator erhält das resultierende Zellmembranpotential. Wird kein Strom appliziert, kann das Ruhemembranpotential bestimmt werden.

Kapazitätskompensation

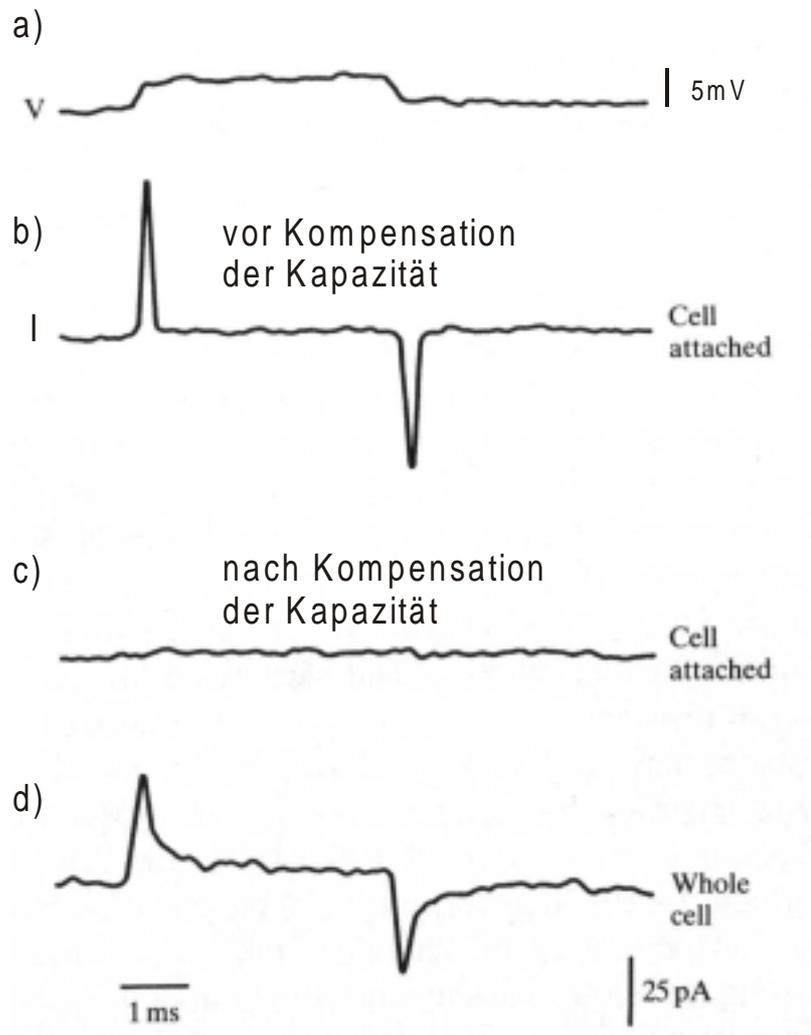


Abb.II-9 a) Kommandopuls (V), hier von 5mV. b) cell-attached vor einer Kompensation der Kapazität. c) cell-attached nach Kompensation der Kapazität. d) whole-cell nach Perforation durch einen kurz angelegten Unterdruck in die Pipette.

II.5.3.1 Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven)

Wird ein Strom bei definierter Spannung (Voltage-Clamp-Modus) gemessen und nachfolgend eine Abhängigkeit zwischen den einzelnen Stromwerten und Haltepotentialen aufgezeichnet, erhält man eine charakteristische Strom-Spannungskurve, die den Stromfluss bei einer vorgegebenen Spannung beschreibt. Für die

Charakterisierung enteraler Neurone wurden zwei Messprotokolle verwendet. Diese Protokolle dienten der Darstellung schneller Einwärtsströme und deren Inaktivierung sowie der Charakterisierung von Auswärtsströmen.

Die Darstellung schneller Einwärtsströme und nachfolgender Auswärtsströme wurde mit einem „Aktivationsprotokoll“ erreicht. Durch Veränderung des Klemmpotentials, das in 5mV-Schritten von einem Haltepotential von -80mV bis zu einem finalen Potential von $+60\text{mV}$ erfolgte, wurde untersucht, ob sich an den Zellen ein schneller Einwärtsstrom auslösen ließ, der typisch für das Aktionspotential von Nervenzellen ist. Zwischen den einzelnen Spannungssprüngen in diesem „Aktivationsprotokoll“ wurde die Membran für 1 Sekunde auf das Ausgangspotential von -80mV zurückgeklemmt (siehe Abb.II-10 a)).

In dieser Arbeit wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung myenterischer Neurone mit einem „Inaktivationsprotokoll“ beschrieben. Durch Veränderung des Vorpotentials, das in 5mV-Schritten von einem Haltepotential von -110mV bis zu einem finalen Potential von $+20\text{mV}$ erfolgte, wurde untersucht, ob das Membranpotential, das vor einem depolarisierenden Reiz herrscht, durch Inaktivierung der Kanäle Einfluss auf deren Öffnungsverhalten hat. Nachfolgend wurde das Membranpotential auf -20mV eingestellt, d.h. auf ein Potential, bei dem sich Na^+ -Kanäle öffnen, sofern sie nicht inaktiviert sind. Zwischen den einzelnen Spannungssprüngen in diesem „Inaktivationsprotokoll“ wurde die Membran für 1 Sekunde auf das Ausgangspotential von -110mV zurückgeklemmt (siehe Abb.II-10 b)).

Pulsprotokolle

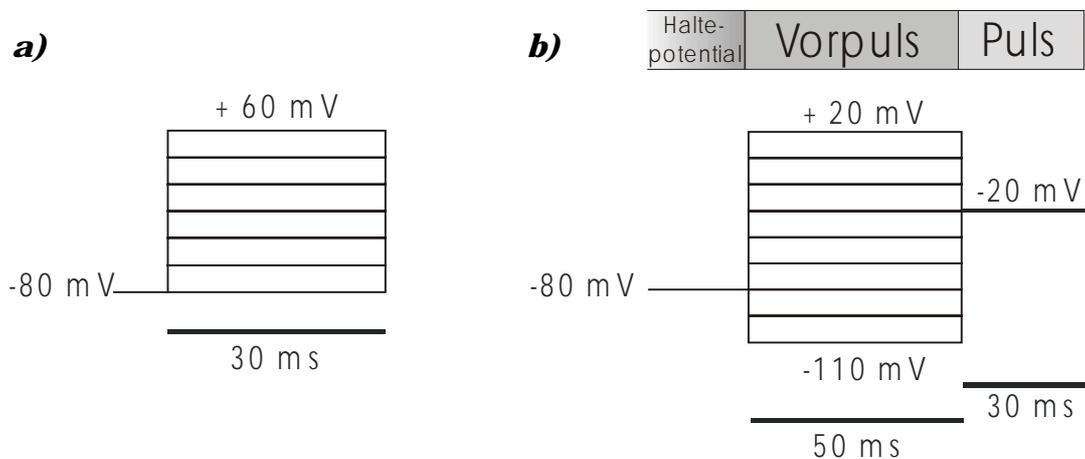


Abb.II-10 Protokolle der a) Aktivierung. Einem Haltepotential von -80mV folgten Rechteckpulse mit einer Spannung von je 5mV Schritten für 30ms . b) Inaktivierung. Dem Haltepotential von -80mV folgte ein Vorpuls für 50ms dessen Amplitude in 5mV -Schritten von -110mV bis $+20\text{mV}$ variiert wurde. Nachfolgend wurde das Membranpotential für 30ms auf -20mV geklemmt.

Alle erfassten Messwerte wurden mit einer Sammelrate von 10kHz digitalisiert und aufgezeichnet.

Der Schnittpunkt der Strom-Spannungskurve mit der X-Achse beschreibt das Membranpotential, bei dem kein Strom fließt. Dies entspricht dem Umkehrpotential oder auch Nernstpotential. Das Nernstpotential hängt von den ionalen Bedingungen auf beiden Seiten der Membran ab und kann für jedes Ion mit der Nernst-Gleichung (siehe Abb.II-11 und Simulation MEMPOT.EXE auf beiliegender CD-ROM) beschrieben werden, vorausgesetzt, die Ionenkonzentrationen sind bekannt.

Nernst Gleichung

$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[Ion]_a}{[Ion]_i}$$

Abb.II-11 Nernst-Gleichung zur Bestimmung des Gleichgewichtspotentials eines bestimmten Ions an der Zellmembran. Konzentrationen des extrazellulären und intrazellulären Milieus müssen gegeben sein.

E = Gleichgewichtspotential in Volt (V)

R = Allgemeine Gaskonstante ($8,315 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T = Absolute Temperatur in Kelvin (K)

z = Ladung des Ions

F = Faraday-Konstante ($9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

$[Ion]_a$ = Ionenkonzentration außen ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

$[Ion]_i$ = Ionenkonzentration innen ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

ln = natürlicher Logarithmus

Die Leitfähigkeiten für die einzelnen Ionen lassen sich mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes bestimmen. Die Leitfähigkeit (G) entspricht dem Kehrwert des Widerstandes $R = U / I$, somit ist die Leitfähigkeit $G = 1 / R$ in Siemens (S).

R = Widerstand in Ohm (Ω)

U = Spannung in Volt (V)

I = Strom in Ampere (A)

G = Leitfähigkeit in $1/\Omega$ (S)

Die Bestimmung der Na⁺-Leitfähigkeit wurde nach Hodgkin und Huxley (1952) durchgeführt (siehe Abb.II-12).

Leitfähigkeit für Natrium nach Hodgkin & Huxley

$$G_{Na} = \frac{I_{Na}}{E - E_{Na}}$$

Abb.II-12 Leitfähigkeit für Natrium während einer definierten Spannung. Die Leitfähigkeit (G) wird in der Einheit Siemens (S) wiedergegeben.

G_{Na} = Leitfähigkeit für Natrium (S)

I_{Na} = Einwärtsstrom für Natrium (A)

E = Klemmpotential (V)

E_{Na} = Gleichgewichtspotential für Natrium (V)

Der Einfluss veränderter Ionenkonzentration in der Perfusionslösung und/oder der Pipettenlösung auf die Leitfähigkeiten wurden nach der Goldman-Strom-Gleichung berechnet (siehe Goldman, 1943 & Abb.II-13).

Goldman-Strom-Gleichung

$$I_{ion} = \frac{F^2}{R \cdot T} \cdot z \cdot P_{ion} \cdot V \cdot \frac{[ion]_a - [ion]_i \cdot e^{\frac{z \cdot F \cdot V}{R \cdot T}}}{1 - e^{\frac{z \cdot F \cdot V}{R \cdot T}}}$$

Abb.II-13 Goldman-Strom-Gleichung zur Bestimmung der Ionenströme bei bekannten Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle, die sich bei einer definierten Spannung einstellen.

I_{ion} = Strom (A)

V = Membranspannung in Volt (V)

R = Allgemeine Gaskonstante (8,315 J·K⁻¹·mol⁻¹)

T = Absolute Temperatur in Kelvin (K)

z = Ladung des Ions

F = Faraday-Konstante (9,648·10⁴C·mol⁻¹)

P = Permeabilität (cm·s⁻¹)

[Ion]_a = Ionenkonzentration außen (mol·l⁻¹)

[Ion]_i = Ionenkonzentration innen (mol·l⁻¹)

II.6 Chemikalien

Chemikalien, die nicht gesondert bezeichnet sind, wurden von der Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland bezogen. Dulbecco's Modified Medium (DMEM) mit N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure) (HEPES), Poly-L-Lysin (MG 70.000-150.000 D), Tetraethylammonium-Chlorid (TEA), 4-Aminopyridin (4-AP), Bariumchlorid. Tetrodotoxin (TTX) der Firma Alamone Labs Ltd,

Jerusalem, Israel, wurde in $20\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Citratpuffer gelöst. Kollagenase Typ II ($255\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$), Penicillin ($10000\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$), Streptomycin ($10000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Trypsin (0,05%) der Firma Gibco BRL, England. Fetales Kälberserum (FKS), Start-V[®] Medium der Firma Biochrom, Berlin, Deutschland. Gentamycin ($50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland. Metronidazol (Flagyl[®], $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) der Firma Bayer, Leverkusen, Deutschland.

II.7 Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Statistische Vergleiche wurden mit verbundenem oder unverbundenem Student's t-Test durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Zur Durchführung der Berechnungen wurden die Software-Programme Excel[®] (Microsoft, Redmond, USA) und Origin[®] (Microcal, Northampton, USA) benutzt.

II.8 Multi-Media-Darstellung (CD-ROM)

Die in dieser Arbeit dargestellten Informationen können, wie im herkömmlichen Sinne, als gedruckte Ausgabe durchgearbeitet werden oder es besteht die Möglichkeit, auf der beiliegenden CD-ROM mit einem Computer die Informationen interaktiv zu erarbeiten.

Die beigelegte CD-ROM verfügt über ein elektronisches Dokument der hier vorliegenden Arbeit im PDF-Format (Acrobat Reader[®], Adobe Systems, Seattle, USA) sowie eine Word[®] 2000-Datei (Microsoft). Weiterhin werden die Filme als MPG-Dateien und eine Multi-Media-Darstellung unter Toolbook II[®] (Asymetrix, London, England) angeboten.

Simulationen und Animationen wurden unter den Programmiersprachen C (Turbo C[®], Borland) und Basic (Visual Basic[®], Microsoft) programmiert.

Installation:

- °Setup.exe auf CD-ROM starten um das Multi-Media-Programm zu installieren.
- °Die einzelnen Filme können direkt durch Anklicken von der CD-ROM gestartet werden.
- °Können Simulationen & Animationen nicht gestartet werden, muss aus dem Verzeichnis VB_INSTALL\setupVB.exe gestartet werden, um Visual Basic zu installieren.

Systemvoraussetzungen:

- Empfohlen mindestens 486er, 100MHz
- CD-ROM-Laufwerk (4fach empfohlen)
- Bildschirmauflösung: min. 800x600
(Schriftgröße: kleine Schriftart, min. 256 Farben)
- Betriebssystem: ab Windows 95 (32 Bit-Systeme)

III Resultate

III.1 Verteilung der Neuronentypen

Zur Differenzierung der einzelnen Zelltypen des Plexus myentericus wurden die myenterischen Zellen unter Voltage-Clamp-Bedingungen untersucht (siehe II.5.3.1). Durch Veränderung des Klemmpotentials, das in 5mV-Schritten von einem Haltepotential von -80mV bis zu einem finalen Potential von $+60\text{mV}$ erfolgte, wurde untersucht, ob sich an den Zellen ein schneller Einwärtsstrom auslösen ließ, der typisch für das Aktionspotential von Nervenzellen ist. Zwischen den einzelnen Spannungssprüngen in diesem „Aktivationsprotokoll“ wurde die Membran für 1 Sekunde auf das Ausgangspotential von -80mV zurückgeklemmt. Bei definierten Haltespannungen zeigten die gemessenen Zellen verschieden starke Einwärts- und Auswärtsströme (siehe Abb.III-1). Diese gesammelten Daten werden als „Originaltracing“ bezeichnet und können weiter umgerechnet werden.

„Original-Tracing“ des Membranstroms bei definierten Haltepotentialen einer myenterischen Nervenzelle

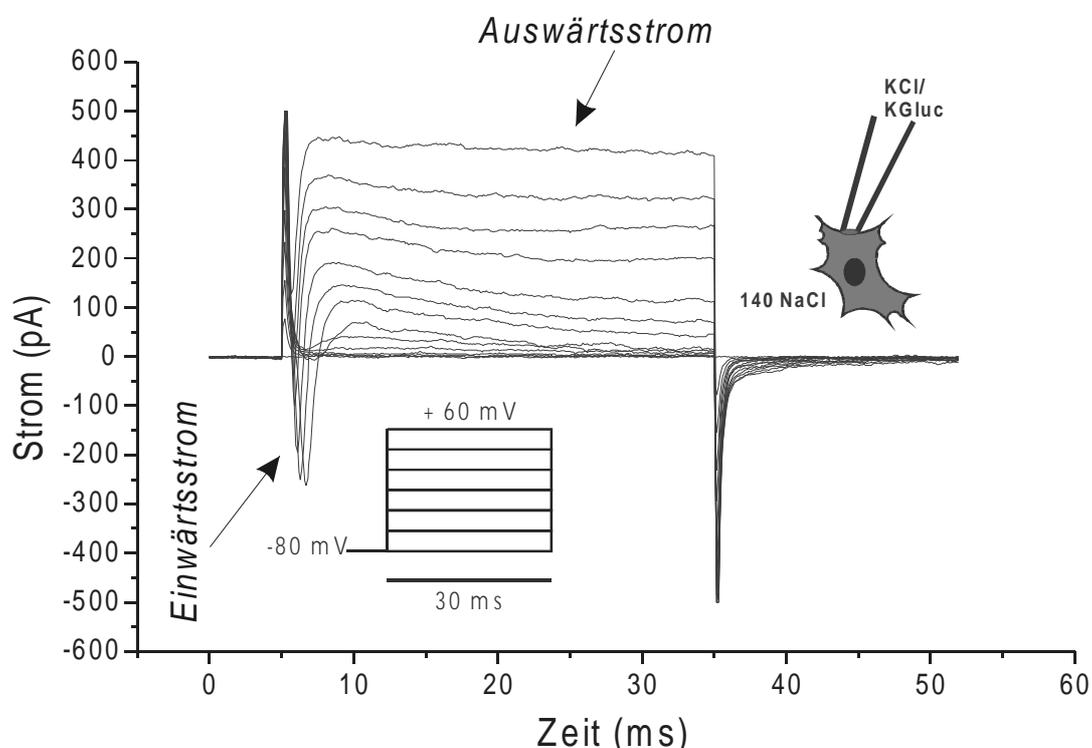


Abb.III-1 Ionenströme bei definierten Haltepotentialen. Das Aktivationsprotokoll hielt das Membranpotential für 30ms auf einer bestimmten Spannung (-80mV bis +60mV in 5mV Schritten). Typisch für 30 Neurone, die einen schnellen Einwärtsstrom nach Depolarisation der Zellmembran zeigten.

Die Originaldaten des Tracings wurden in IV-Kurven (Strom-Spannungs-Kurven, siehe II.5.3.1) umgerechnet, um eine Aussage über die Spannungsabhängigkeiten zu bekommen. Die maximalen Einwärtsströme und die maximalen Auswärtsströme wurde gegen das Haltepotential aufgetragen (siehe Abb.III-2). Zellen, die einen Einwärtsstrom zeigten, wurden als myenterische Neurone angesehen und für weitere Experimente genutzt. Da alle Einwärtsströme der Neurone durch das Nervengift Tetrodotoxin (TTX, ein spezifischer Blocker spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle) gehemmt werden

konnten (siehe III.1.1 & Catterall, 1980) und die Inaktivierung eine typische Spannungsabhängigkeit (siehe III.1.2) zeigte, wurden die Einwärtsströme als Na^+ -Fluxe in die Zelle angesehen. Fehlte der Einwärtsstrom, handelte es sich um mutmaßlich nicht erregbare enterale Gliazellen.

Strom-Spannungs-Beziehung des schnellen Einwärtsstroms bei einem myenterischen Neuron

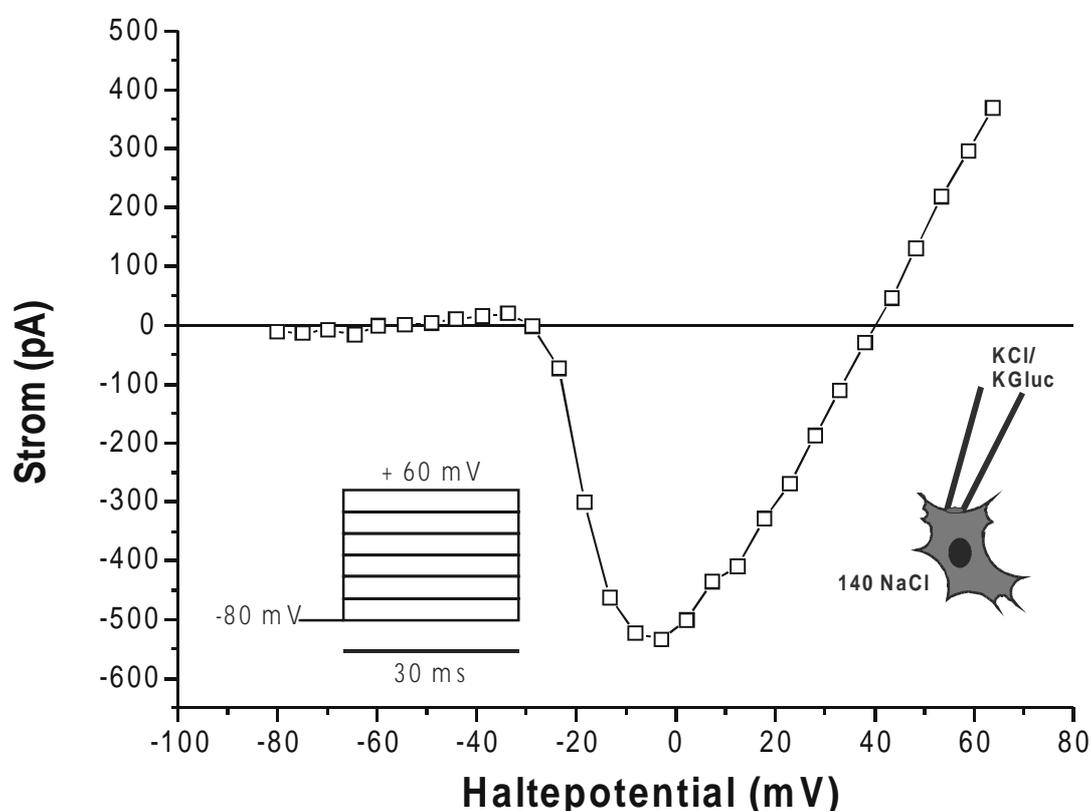


Abb.III-2 Strom-Spannungs-Kurve eines Neurons. Neurone zeigten einen Einwärtsstrom durch die Nervenzellmembran in der Frühphase des depolarisierenden Pulses, Gliazellen hingegen nicht.

Für die basale Charakterisierung wurden die Eigenschaften von 30 Neuronen bzw. 19 Gliazellen gemittelt.

Die enteralen Neurone ließen sich nach Bestimmung ihres maximalen Einwärtsstroms bei definierten Membranspannungen in zwei Hauptgruppen unterteilen. Die erste Gruppe zeigte einen maximalen Einwärtsstrom bei einem Haltepotential von -40mV , während die zweite Population ihren maximalen Einwärtsstrom bei -10mV aufwies (siehe Abb.III-3).

Verteilung von myenterischen Neuronen nach dem Membranpotential, bei dem ein maximaler Einwärtsstrom auftrat

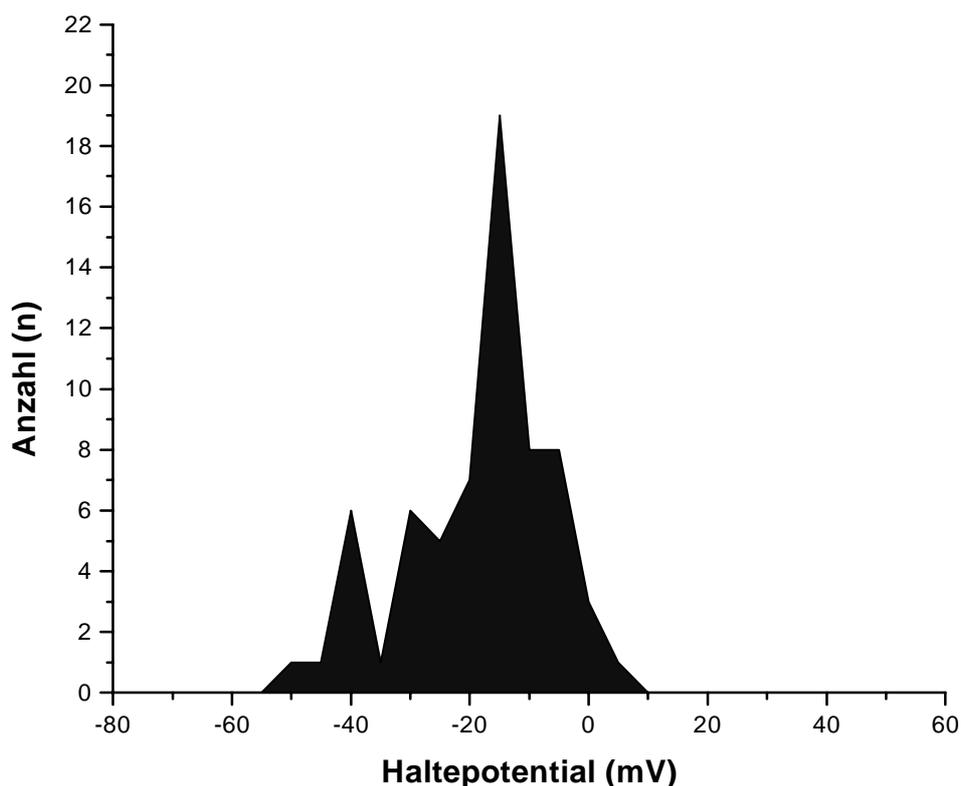


Abb.III-3 Verteilung der Neuronenpopulationen. Die Charakterisierung erfolgte nach dem Membranpotential, bei dem ein maximaler Einwärtsstrom auftrat. Es lassen sich zwei Populationen unterscheiden.

Die Einwärtsströme über die Membran der Nervenzellen variierten in einer Größenordnung von 100pA bis 2800pA, was auf eine sehr variable Größe der Zellen zurückzuführen war. Der mittlere Einwärtsstrom der gemessenen myenterischen Neurone betrug $-664,7 \pm 106\text{pA}$ ($n=30$).

III.1.1 Tetrodotoxin - Sensitivität

Der Einwärtsstrom von allen zur basalen Charakterisierung gemessenen Neurone ($n=30$) konnte durch das Nervengift Tetrodotoxin (TTX, $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) des Kugelfischs vollständig blockiert werden (siehe Abb.III-4).

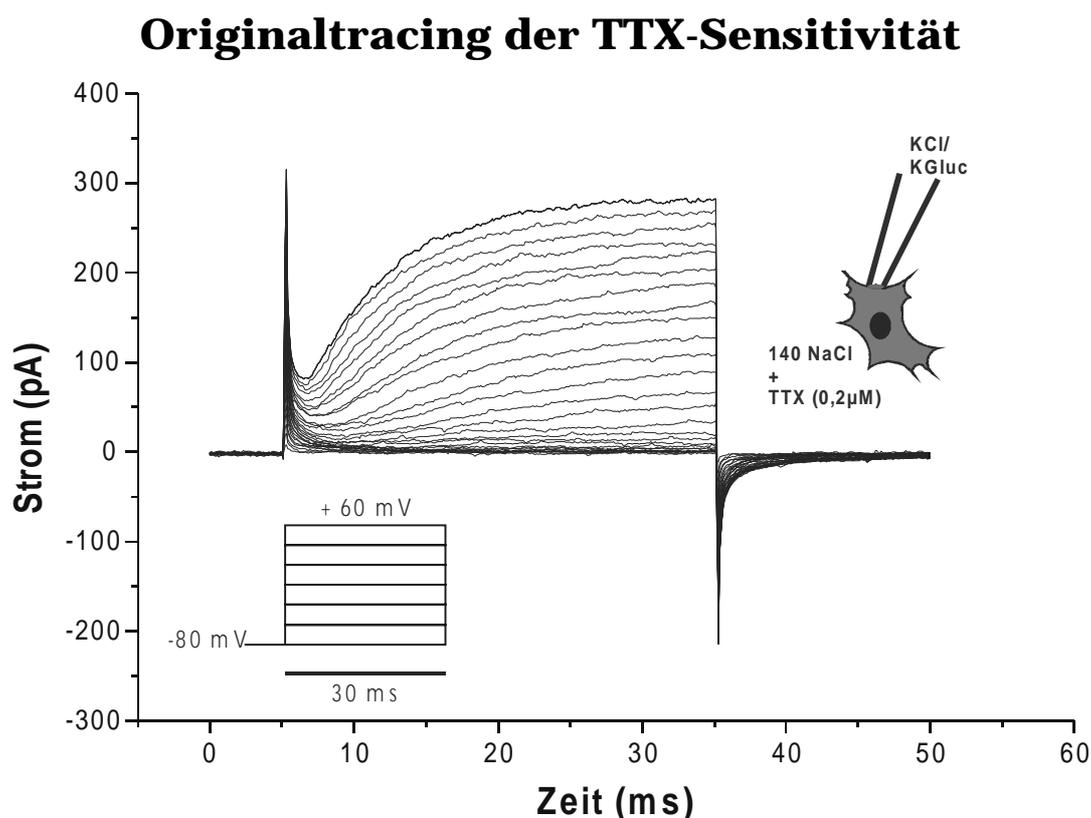


Abb.III-4 Originaltracing nach Applikation von Tetrodotoxin (TTX). Tetrodotoxin (TTX, $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) hemmte den Einwärtsstrom von myenterischen Nervenzellen komplett.

TTX ist ein selektiver Na⁺-Kanalblocker (siehe Catterall, 1980), der die Erregbarkeit von Nervenzellen verhindert und die Auslösung von Aktionspotentialen unterdrückt. Die Wirkung beruht in einer positiven Guanidingruppe des Giftes, das die Öffnung der Pore von der extrazellulären Seite blockiert und somit Natrium nicht mehr in die Zelle gelangen lässt.

Versuche mit Mikroelektroden an AH-Neuronen (siehe I.1.4) zeigen eine TTX-Resistenz dieser Zellen (siehe Wood, 1994). Die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Patch-Clamp-Versuche an kultivierten Neuronen zeigten eine TTX-Sensitivität aller gemessenen Neuronen. Dies ließ vermuten, dass AH-Neurone nicht in der Zellkultur vorhanden waren oder es zu einer Veränderung des elektrischen Verhaltens der Zellen in der Kultur kam. Die Blockade des Einwärtsstroms durch TTX konnte anhand von IV-Kurven bei jedem Haltepotential an myenterischen Neuronen gezeigt werden (siehe Abb.III-5).

Strom-Spannungs- Kurve vor und nach Zugabe von TTX ($0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

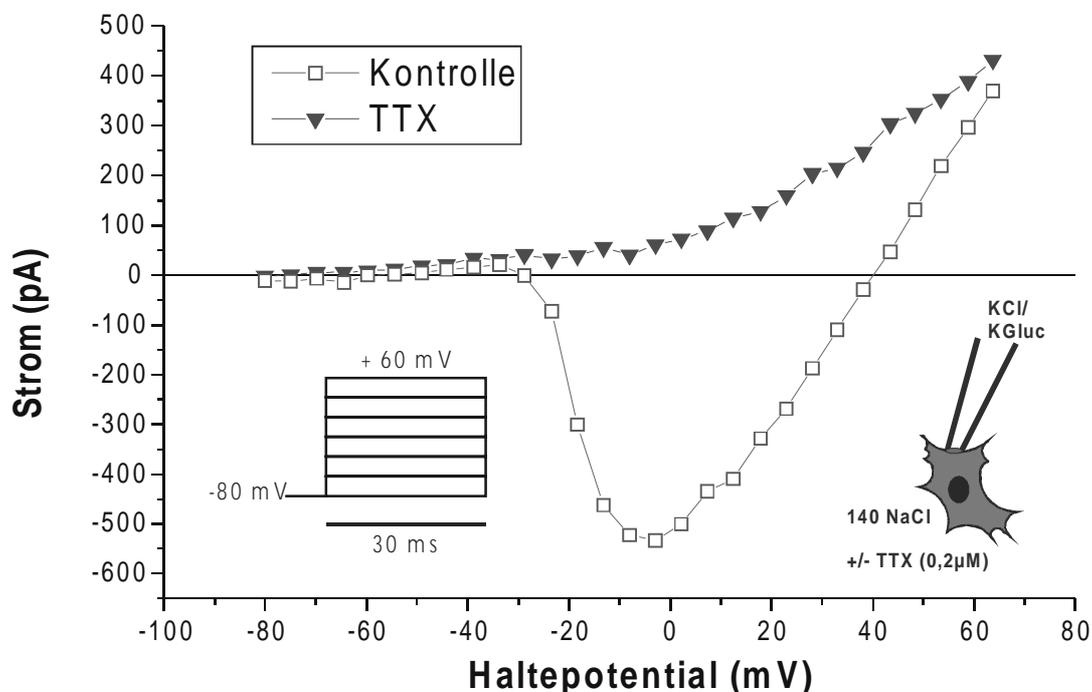


Abb.III-5 IV-Kurve vor und nach Zugabe von Tetrodotoxin (TTX, $0,2\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Die Hemmung des Natriumeinwärtsstroms durch TTX ist spannungsunabhängig. Das Ergebnis ist typisch für 30 myenterische Neurone.

III.1.2 Inaktivierung spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle

Neurone des Plexus myentericus zeigten bei Depolarisation der Zellmembran einen typischen Einwärtsstrom in die Zelle, der nach 1 bis 2 ms inaktiviert wurde. Die Inaktivierung ist auf spannungsabhängige Natrium-Kanäle zurückzuführen, die sich nach kurzem Öffnen wieder schließen und danach einen weiteren Einstrom von Natrium in die Zelle verhindern (siehe Hodgkin & Huxley, 1952 & Patlak, 1991). Nahe der extrazellulären Seite der Membran befinden sich die Aktivationspartikel, die sich bei einer

Hyperpolarisation schließen und durch Depolarisation geöffnet werden. Nahe der intrazellulären Seite in der Membran befindet sich das Inaktivationspartikel, welches bei negativen Potentialen von -80 bis -60mV geöffnet ist und sich nach Depolarisation zeitabhängig schließt und somit den Kanal inaktiviert. In dieser Arbeit wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung myenterischer Neurone mit dem Inaktivationsprotokoll (siehe II.5.3.1) beschrieben.

Durch Veränderung des Vorpotentials, das in 5mV -Schritten von einem Haltepotential von -110mV bis zu einem finalen Potential von $+20\text{mV}$ erfolgte, wurde untersucht, ob das Membranpotential, das vor einem depolarisierenden Puls herrscht, durch Inaktivierung der Kanäle Einfluss auf deren Öffnungsverhalten hat. Nachfolgend wurde das Membranpotential auf -20mV eingestellt, d.h. auf ein Potential, bei dem sich Na^+ -Kanäle öffnen, sofern sie nicht inaktiviert sind. Zwischen den einzelnen Spannungssprüngen in diesem „Inaktivationsprotokoll“ wurde die Membran für 1 Sekunde auf das Ausgangspotential von -110mV zurückgeklemmt.

In Abb.III-6 sind zwei Tracings der Membranströme dargestellt, die eine maximale Aktivierung und eine maximale Inaktivierung der myenterischen Neurone präsentieren. Wurde ein Vorpuls von -110mV für 50ms angelegt und nachfolgend ein Haltepotential von -20mV für 30ms eingestellt, konnte bei allen Neuronen ein Einwärtsstrom ausgelöst werden. Wurde ein Vorpuls von -20mV eingestellt und dieses Potential nachfolgend weiter auf -20mV gehalten, ließ sich bei allen untersuchten Neuronen kein Einwärtsstrom mehr auslösen, d.h. die Na^+ -Kanäle waren inaktiviert.

Originaltracing: Inaktivierung der Na⁺-Ströme Vorpuls von -110 (Aktivierung) und -20mV (Inaktivierung)

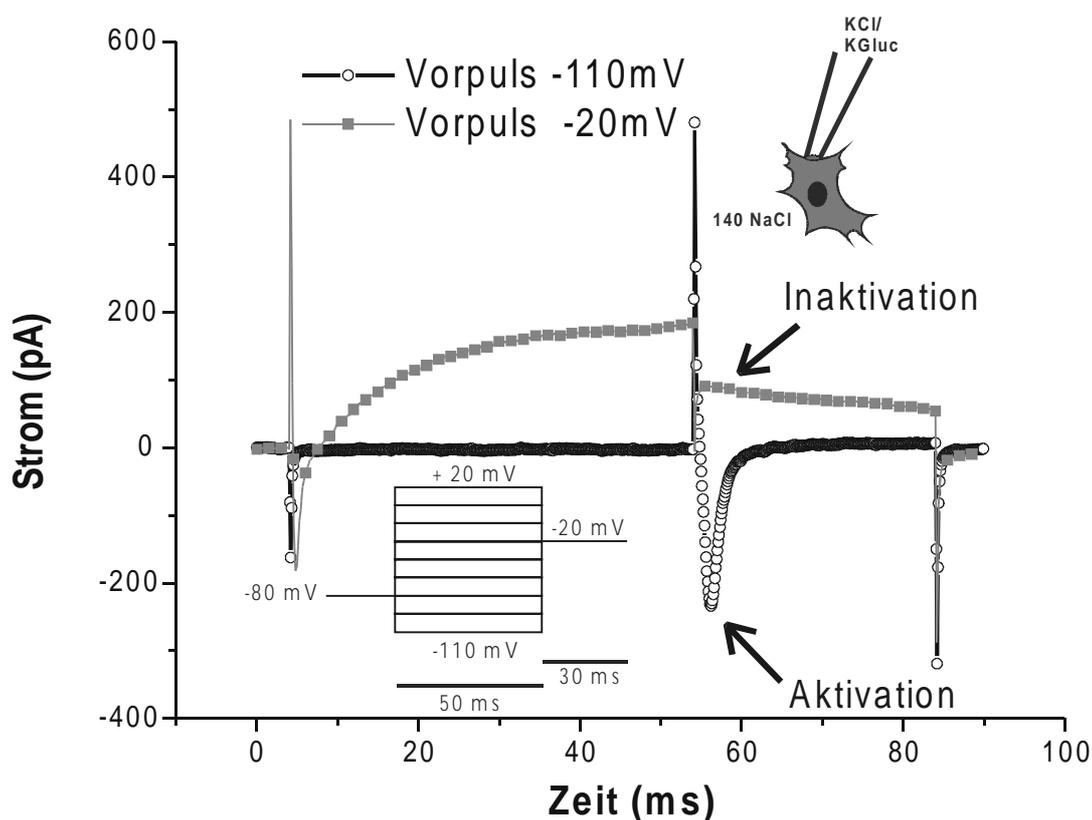


Abb.III-6 Originalströme für die Darstellung der Inaktivierung. Nach definierten Vorpulsen von -110 bis +20mV in 5mV Schritten wurde auf ein Potential von -20mV eingestellt.

Die gesammelten Daten wurden in IV-Kurven (siehe Abb.III-7) umgerechnet und nach der Boltzmann-Gleichung (siehe Abb.III-8) berechnet. Es ergab sich eine Wahrscheinlichkeit, dass die Hälfte aller spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle bei einem Membranpotential von $V_{1/2} = -40,0 \pm 0,8\text{mV}$ inaktiviert waren ($n=12$; siehe Abb.III-7). Die Anpassung der Daten an die Boltzmann-Gleichung erfolgte durch eine nicht lineare Regression (least square fit) mit der Software

Origin 5.0[®] der Firma Micocal an die IV-Kurve der Inaktivierung (siehe Abb.III-7).

Strom-Spannungs-Kurve: Inaktivierung der Na⁺-Ströme

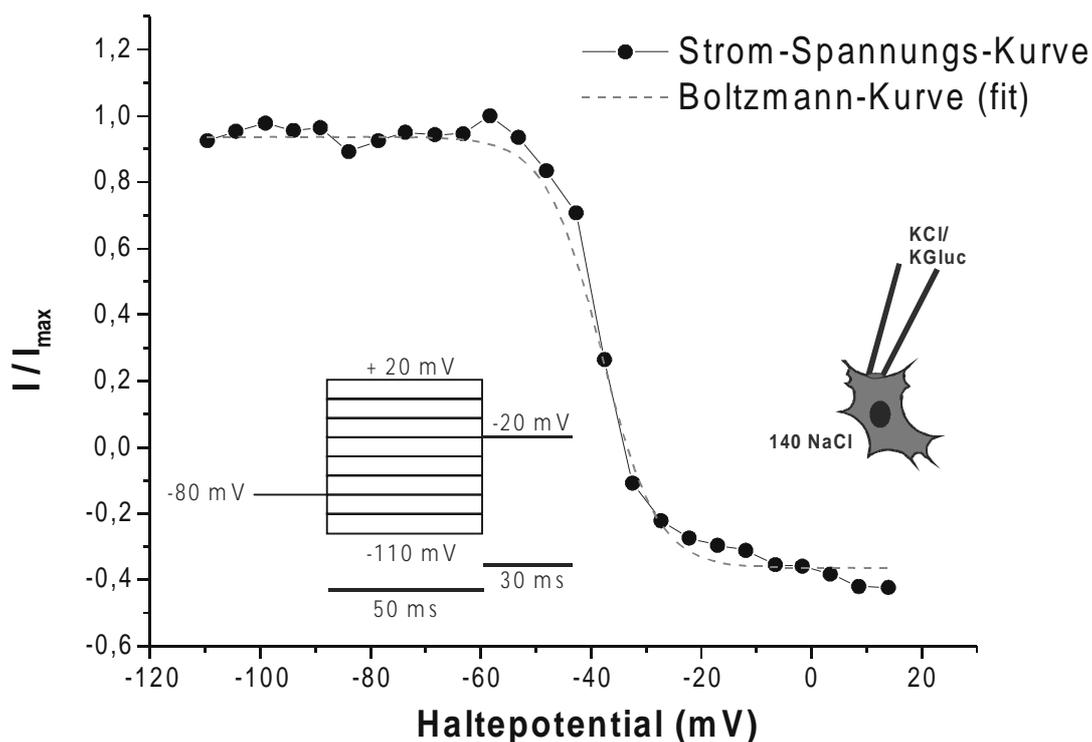


Abb.III-7 Inaktivierung spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle. Die Inaktivierung wurde mit der Boltzmann-Gleichung bestimmt. $V_{1/2}$ beschreibt die Spannung, bei der die Hälfte aller spannungsabhängigen Natrium-Kanäle inaktiviert sind, sie betrug hier -38mV.

Das an die IV-Kurve angepasste Boltzmann-Modell konnte mit der nachfolgenden Formel beschrieben werden:

Boltzmann-Gleichung

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{A}{1 - e^{(V - V_{1/2})/k}} + B$$

Abb.III-8 Boltzmann-Gleichung. Beschreibung der Inaktivierung. $V_{1/2}$ ist die Spannung, bei der die Hälfte aller Natrium-Kanäle inaktiviert ist.

Die unten aufgeführten Parameter wurden einer Messung entnommen, wie sie in Abb.III-7 veranschaulicht ist:

I = Einwärtsstrom (Ampere, A)

I_{\max} = Maximaler Einwärtsstrom (Ampere, A)

V = Haltespannung (mV)

$V_{1/2} = -38,1\text{mV}$ = Spannung bei der die Hälfte aller Na^+ -Kanäle inaktiviert sind (mV)

$k = 5,0\text{mV}$

$A = 0,6$

$B = -0,4$

III.1.3 Besonderer Neuronentyp

Vereinzelt konnte ein besonderer Neuronentyp beobachtet werden, der unter basalen Bedingungen ein atypisches Verhalten während der Inaktivierung der Einwärtsströme zeigte. Die Strom-Spannungs-Beziehung der Inaktivierung zeigte ein anderes Verhalten als die übrigen Neurone, die mit der Boltzmannverteilung beschrieben werden konnten. Bei starker Hyperpolarisation der Zellmembran von -110 bis -80mV (Vorpuls) konnte bei nachfolgender Depolarisation der Zellmembran auf -20mV (Puls) nur eine geringe Aktivierung der Einwärtsströme gemessen werden. Erst wenn der depolarisierende Vorpuls positiver als -80mV war, konnte ein maximaler Einwärtsstrom durch nachfolgende Depolarisationen ausgelöst werden ($n=3$) (siehe Abb.III-9).

Originale Tracings eines atypischen Neurons bei Vorpulsen von -80 , -55 und -10 mV

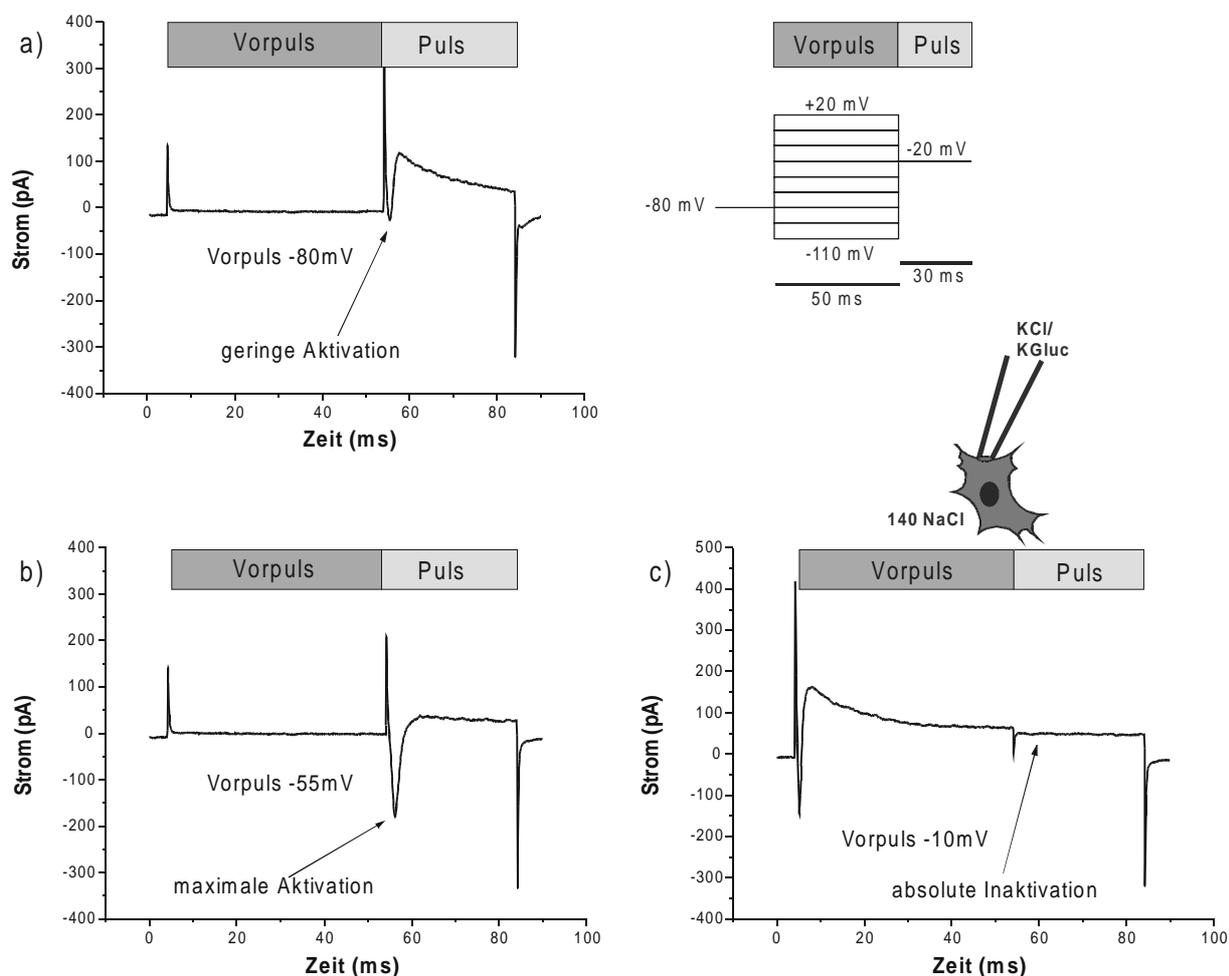


Abb.III-9 Atypischer Neurontyp. a) Geringe Aktivierung bei einem Vorpuls von -80 mV. b) Maximale Aktivierung bei einem Vorpuls von -55 mV. c) Absolute Inaktivierung bei einem Vorpuls von -10 mV. Die Länge des Vorpulses betrug 50 ms, der nachfolgende Puls hatte eine Dauer von 30 ms.

In der nachfolgenden Abbildung wurde das Inaktivationsverhalten der „typischen“ und „atypischen“ Neuronentypen in Form einer Strom-Spannungs-Kurve dargestellt (siehe Abb.III-10).

Strom-Spannungs-Beziehung eines atypischen Neurontyps während der Inaktivierung

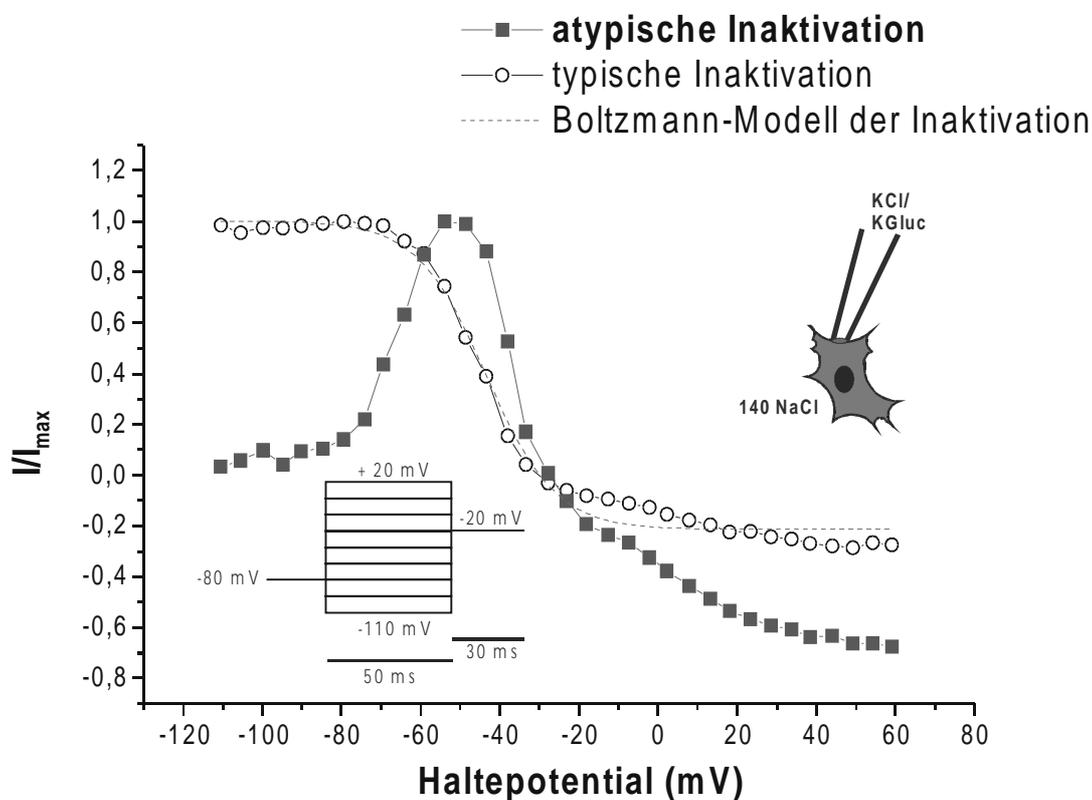


Abb.III-10 Atypisches Neuron. Darstellung der Membranströme in einer Strom-Spannungs-Kurve der Inaktivierung.

III.1.4 Glia - Zellen

Etwa zwei Fünftel der gemessenen Zellen zeigten keinen Einwärtsstrom während des Aktivationsprotokolls. Diese Zellen wurden als enterale Gliazellen (n=19) angesehen. Die Strom-Spannungs-Beziehung des Auswärtsstroms solch einer Zelle ist in Abb.III-11 im Vergleich mit einem Neuron dargestellt.

Strom-Spannungs-Kurve für Auswärtsströme: Vergleich Gliazelle zu Neuron

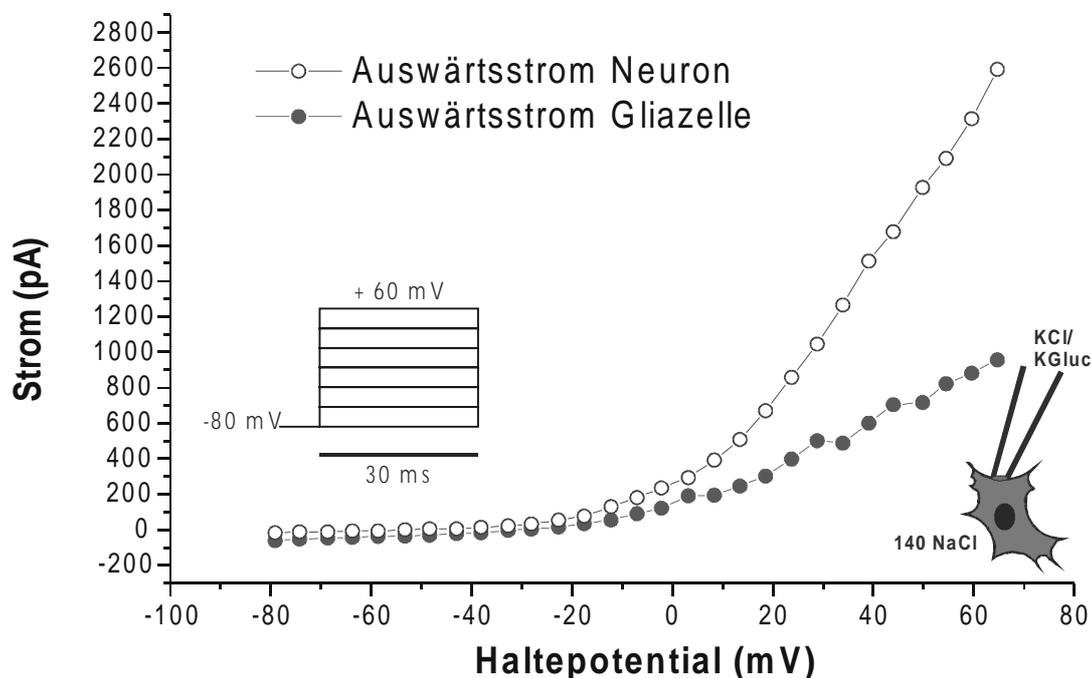


Abb.III-11 IV-Kurve einer Gliazelle im Vergleich zu einem Neuron. Es wurden die maximalen Auswärtsströme gemessen.

Die Auswärtsströme der untersuchten Gliazellen (n=19) lagen in einem Bereich von 200 – 1500pA, der mittlere Wert betrug $598 \pm 109,7$ pA. Die Neurone des Auerbachschen Plexus hingegen zeigten einen höheren Auswärtsstrom bis zu 2800pA. Der mittlere Auswärtsstrom der Neurone lag bei 2318 ± 196 pA (n=30). Die Variabilität der Auswärtsströme ist auf die Zellgröße und die damit gemessene Membranfläche zurückzuführen.

III.1.5 Membranpotentiale myenterischer Zellen

Das Ruhemembranpotential von Neuronen des Plexus myentericus lag in einem Bereich zwischen -30 mV und -80 mV. Das mittlere Ruhemembranpotential hatte einen Wert von -47 ± 3 mV (n=12). Die gemessenen Gliazellen zeigten ein

Ruhemembranpotential, das sich in einem Bereich von -15 bis -40mV bewegte. Das mittlere Ruhemembranpotential betrug $-26 \pm 2\text{mV}$ ($n=12$).

Wurden myenterische Neurone mit einer K^+ -reichen Lösung (siehe II.2.1.1) superfundiert, depolarisierte die Membran im Mittel auf einen Wert von $+2 \pm 0,5\text{mV}$ ($n=10$). Dieses verschobene Membranpotential zeigt, dass das Ruhemembranpotential durch einen K^+ -Ausstrom aufgebaut wurde und das Membranpotential vom K^+ -Gleichgewichtspotential dominiert wird (siehe II.5.3.1).

III.2 Kurzkettige Fettsäuren (Butyrat)

Ein bekannter sensorischer Stimulus des enteralen Nervensystems ist Butyrat (siehe Diener, 1996). Er wurde zur Untersuchung am Auerbachschen Plexus eingesetzt. Der Einfluss kurzkettiger Fettsäuren auf Membranpotentiale und Membranströme wurde gemessen. Als Substrat wurde Na^+ -Butyrat (Na^+ -Buttersäure, siehe Abb.III-12) verwendet.

Buttersäure



Abb.III-12 Strukturformel der Buttersäure.

III.2.1 Membranpotential

Die basale Wirkung von Butyrat auf die Plexus myentericus Neurone wurde mit Messungen des Membranpotentials untersucht. Die Standard-Tyrode-Lösung wurde isoton durch eine $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na^+ -Butyrat-Lösung (siehe II.2.1.1) ersetzt. Die Zellmembran hyperpolarisierte nach ca. 30 Sekunden um -7 bis -15 mV. Die mittlere Hyperpolarisation betrug $11,6 \pm 0,9\text{mV}$ ($n=9$; $p<0,05$; siehe Abb.III-13).

Natrium-Butyrat ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) hyperpolarisiert die Zellmembran enteraler Neurone



Abb.III-13 Aufzeichnung des Membranpotentials vor und nach Zugabe von Natrium-Butyrat ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) unter isotonen Bedingungen. Butyrat induzierte eine Hyperpolarisation der Zellmembran.

Bei allen getesteten Zellen führte Butyrat zu einer Hyperpolarisation der Membran. Der Effekt war vollständig reversibel und konnte an der gleichen Zelle mehrfach ausgelöst werden.

III.2.2 Einwärtsstrom

Die Erregbarkeit der Nervenzellen wurden unter dem Einfluss von Butyrat verändert. In Anwesenheit von Na^+ -Butyrat ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurden die schnellen Einwärtsströme mit dem Aktivationsprotokoll gemessen, um die Zusammenhänge zwischen Spannung und Stromfluss zu charakterisieren. Unter Standardbedingungen mit einer Tyrode-Lösung zeigten die myenterischen Neurone ($n=9$) einen wie oben beschrieben schnellen Einwärtsstrom (siehe III.1), der nach Zugabe von Na^+ -Butyrat deutlich vermindert wurde. Die Abnahme des mittleren Einwärtsstroms betrug $273 \pm 34,6\text{pA}$ ($n=9$; $p<0,05$; siehe Abb.III-14).

IV-Kurve eines myenterischen Neurons vor und nach Zugabe von Butyrat ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

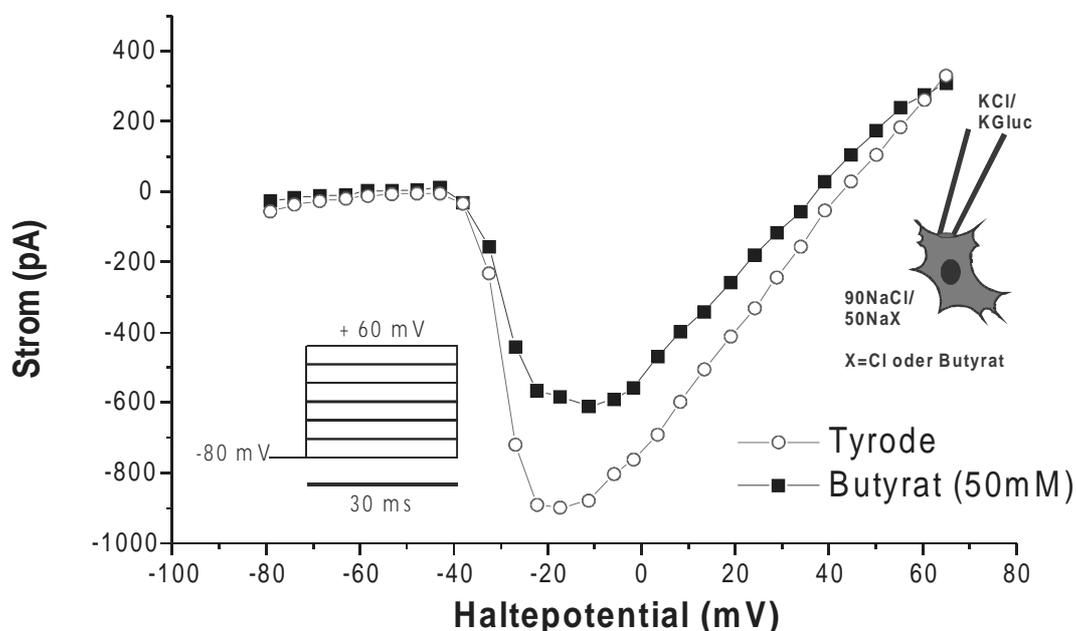


Abb.III-14 Strom-Spannungs-Kurve eines Neurons vor und nach Zugabe von Na^+ -Butyrat ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) unter isotonen Bedingungen.

Alle Effekte waren reversibel. Nach einem Wechsel in die Standard-Tyrode-Perfusion stellte sich der ursprüngliche Einwärtsstrom wieder ein.

III.2.3 Blockierung des Auswärtsstroms durch Cäsium

Die durch Butyrat induzierte Hyperpolarisation ließ vermuten, dass sich der Auswärtsstrom der Zelle änderte und es somit zu einer Verschiebung des Membranpotentials kam. Geöffnete K^+ -Kanäle sind die Hauptursache für einen Auswärtsstrom aus einer Zelle (siehe III.1.5). Um den Einfluss dieser Kanäle zu beschreiben, wurde Cäsium als unspezifischer Blocker für K^+ -Kanäle (Übersicht bei Cook & Quast, 1990) verwendet. Die Glaspipetten für die Patch-Clamp-

Versuche wurden mit einer Cäsiumlösung (siehe II.2.1.2) gefüllt, so dass Cäsium in die Zelle gelangen konnte und den Auswärtsstrom hemmte. Zur Veranschaulichung sind in der folgenden Abbildung die Auswärtsströme unter Kontrollbedingungen und bei den mit Cäsium durchgeführten Versuchen als Strom-Spannungs-Beziehung dargestellt (siehe Abb.III-15). Der mittlere Auswärtsstrom eines Neurons mit intrazellulären Cäsium lag bei $51,7 \pm 3,8\text{pA}$ ($n=7$).

IV-Kurven der Auswärtsströme ohne und mit Cäsium

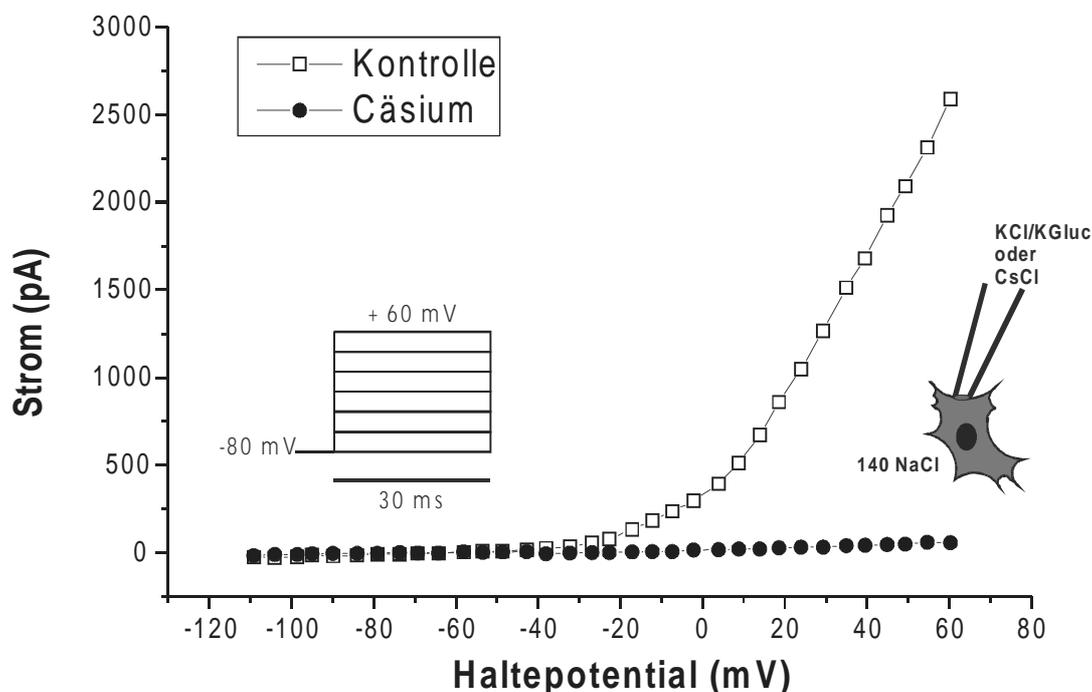


Abb.III-15 *Strom-Spannungs-Kurve für Auswärtsströme unter Kontrollbedingungen und mit Cäsium intrazellulär. Der Auswärtsstrom wurde durch Cäsium fast vollständig blockiert.*

Messungen des Membranpotentials zeigten keine Änderung nach Wechsel von einer Tyrode-Perfusion zu isotonem Butyrat (50 mmol·l⁻¹) (siehe Abb.III-16). Es wurden n=11 Messungen mit Cäsium durchgeführt und das Membranpotential bestimmt. Das Membranpotential blieb bei n=10 unbeeinflusst. Eine einzige Zelle zeigte eine Hyperpolarisation der Zellmembran nach Zugabe von Butyrat, wie sie in III.2.1 beschrieben wurde.

Membranpotential unter Einfluss von Cäsium intrazellulär vor und nach Zugabe von Butyrat

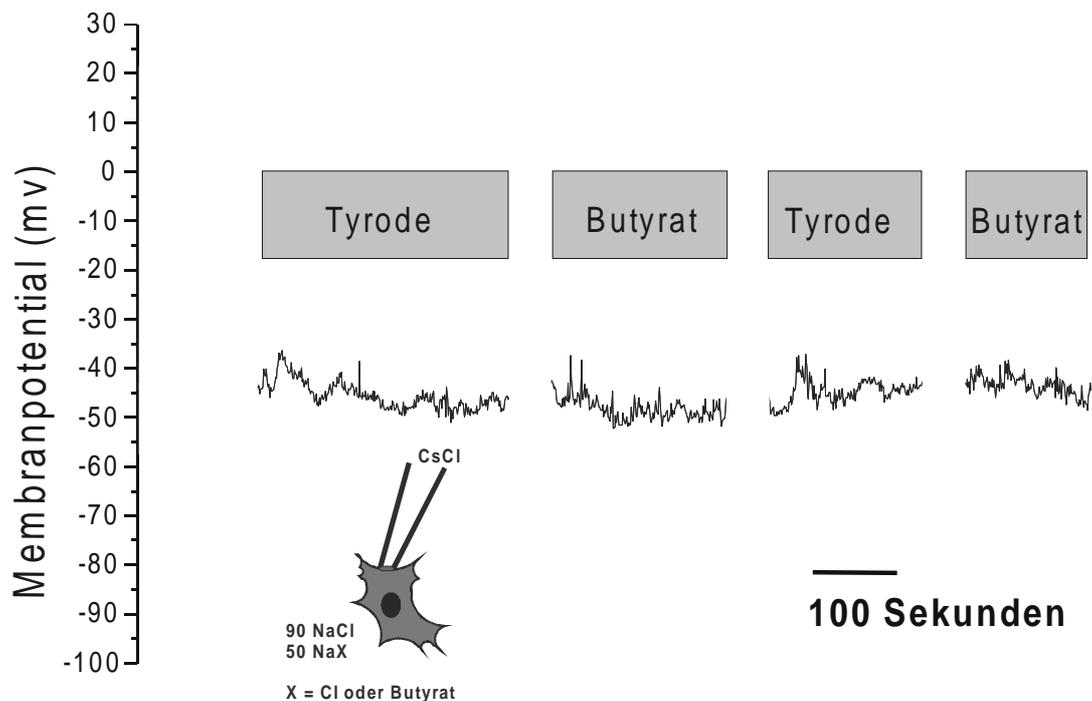


Abb.III-16 Membranpotential während intrazellulärem Cäsium-Einfluss. Es wurde mehrere Male von einer Standard-Tyrode-Lösung zu Butyrat gewechselt.

III.2.3.1 4-Amino-Pyridin (4-AP), Tetraethylamoniumchlorid (TEA), Barium (Ba^{2+})

Zur weiteren Differenzierung der beteiligten Kalium-Kanäle wurden verschiedene selektive Blocker dieser Kanäle verwendet (Übersicht bei Cook & Quast, 1990). Keiner der in Abb.III-17 getesteten Blocker war in der Lage, die durch Butyrat induzierte Hyperpolarisation zu hemmen.

Selektive Kalium-Kanal-Blocker

Name	Effekt	K⁺-Kanaltyp	Autor
4-AP	keiner	A-current, delayed rectifier	Cook & Quast (1990), Hille (1992)
TEA	keiner	delayed rectifier, inward rectifier, A-current, Ca ²⁺ -activated	Cook & Quast (1990), Hille (1992)
Ba²⁺	keiner	delayed rectifier, inward rectifier, ATP-dependent	Cook & Quast (1990), Hille (1992)

Abb.III-17 Kalium-Kanal-Blocker. Die in der Tabelle aufgeführten Kalium-Kanal-Blocker konnten die Effekte von Butyrat nicht beeinflussen.

Butyrat in Gegenwart von 4-Amino-Pyridin (4-AP, 10mmol.l⁻¹) zeigte eine mittlere Hyperpolarisation von 14mV der Zellmembran (n=3). Wurde Tetraethylamonium (TEA, 5mmol.l⁻¹) eingesetzt, blieb die Wirkung von Butyrat unbeeinflusst und die Zellmembran wurde im Mittel um 9mV (n=3) hyperpolarisiert. Auch Barium (Ba²⁺, 10mmol.l⁻¹) zeigte keinen Effekt nach einem Wechsel der Perfusionslösung zu Butyrat und die Zellmembran hyperpolarisierte im Mittel um 8mV (n=3). Diese Hyperpolarisation der Zellmembran

entsprach dem Verhalten unter Kontrollbedingungen mit Butyrat (siehe III.2.1).

III.3 Volumenregulation im Vergleich mit Butyrat-Wirkung

Butyrat löst bei vielen Zellen eine Zellschwellung aus (siehe Diener et. al., 1993 & Sellin, 1999), da es per nicht ionaler Diffusion sehr gut Zellmembranen passieren kann. Um herauszufinden, ob die Butyrat induzierte Hyperpolarisation durch eine Zellschwellung verursacht wird, wurde der Effekt von Butyrat mit dem eines hypotonen Mediums verglichen.

Die kultivierten Zellen wurden zuerst einem isotonen Milieu ausgesetzt, welches aus 70NaCl und Mannitol bestand. Nachfolgend wurde das Milieu mit 70NaCl auf ein hypotones Verhältnis eingestellt, um eine Zellschwellung hervorzurufen.

III.3.1 Mannitol und hypotones Milieu

Bevor eine Perfusion mit 70NaCl eine Zellschwellung induzierte, wurde die Perfusionslösung gegen eine isotone Mannitol-70NaCl-Lösung (siehe II.2.1.1) ausgetauscht, um den Einfluss der verringerten Ionenkonzentration für Natrium zu überprüfen. Die Zellen zeigten unter diesen Bedingungen eine Hyperpolarisation der Zellmembran im Mittel um $12,3 \pm 1,3\text{mV}$ ($n = 8$; $p < 0,05$; siehe Abb.III-18). Aufgrund der verringerten Konzentration von Natrium im extrazellulären Milieu verändert sich das Gleichgewichtspotential für Na^+ , was als Erklärung für die Hyperpolarisation am ehesten in Frage kommt (siehe II.5.3.1 und Simulation, MEMPOT.EXE auf beiliegender CD-ROM). Wurde das Perfusionsbad gegen ein hypotones Milieu mit 70NaCl ausgetauscht, konnte keine weitere

Änderung des Membranpotentials festgestellt werden (siehe Abb.III-18).

Einfluss einer hypotonen Umgebung auf das Membranpotential

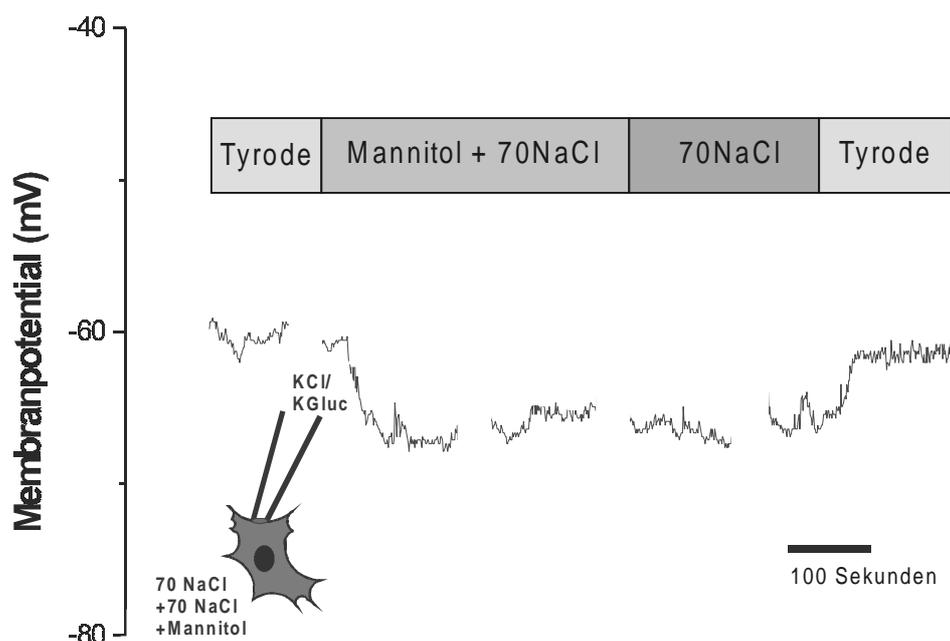


Abb.III-18 Änderung des Membranpotentials nach Natrium-Substitution und nachfolgender hypotoner Umgebung.

Die Auswertung der Strom-Spannungs-Kurven zeigte einen verringerten Einwärtsstrom bei einer Perfusion mit isotonem 70NaCl-Mannitol (siehe Abb.III-19). Im Mittel wurde der Einwärtsstrom myenterischer Neurone um $396,1 \pm 83,9 \text{ pA}$ vermindert ($n=16$; $p<0,05$). Die Abnahme des Einwärtsstroms ist durch die Verringerung der extrazellulären Na^+ -Konzentration bedingt, da sich nach der Goldman-Strom-Gleichung (siehe II.5.3.1) der Na^+ -Strom vermindern muss.

Wurden im Anschluss hypotone Verhältnisse mit 70NaCl eingestellt, änderte sich der Einwärtsstrom nur noch minimal. Der Strom nahm im Vergleich zur isotonen 70NaCl-Mannitol-Lösung nicht signifikant um $30,5 \pm 16,5 \text{ pA}$ ($n=16$; $p>0,05$) (siehe Abb.III-19) ab.

Strom-Spannungs-Beziehung der Einwärtsströme vor und nach hypotonen Bedingungen

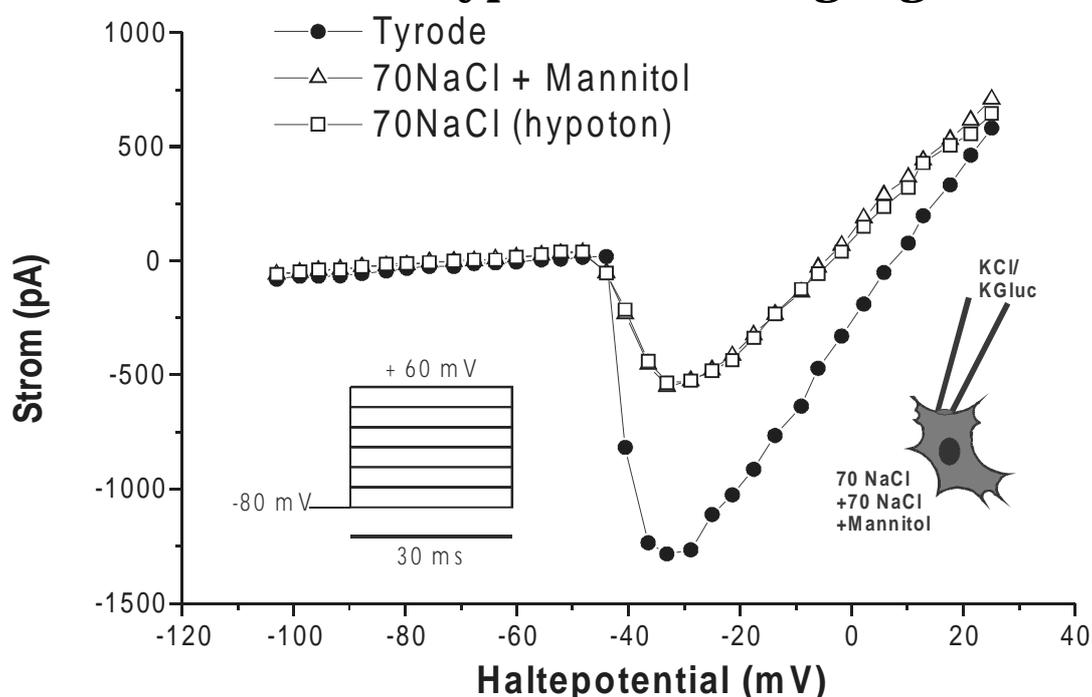


Abb.III-19 IV-Kurve vor und nach Änderung des Natrium-Gradienten und nachfolgender Einstellung eines hypotonen Milieus.

Der Vergleich zwischen der Wirkung von Butyrat und dem Einsatz eines hypotonen Mediums zeigte, dass keine gemeinsamen Mechanismen in der Regulation bestanden, da die Hyperpolarisation der Membran nur auf eine Verringerung der Na^+ -Konzentration zurückzuführen war, wie sie mit der Nernst-Gleichung zur Bestimmung des Gleichgewichtspotentials berechnet werden konnte

(siehe II.5.3.1). Eine Zellschwellung hatte keinen Effekt auf die untersuchten Zellen. Auch die Verminderung des Einwärtsstroms ist nicht auf eine Zellschwellung zurück zu führen, da sich nach der Goldman-Strom-Gleichung der Einwärtsstrom durch eine Reduktion der Na^+ -Konzentration vermindert. Der Wechsel von einer isotonen 70NaCl-Mannitol-Lösung in eine hypotone 70NaCl-Lösung verursachte keine weitere Abnahme des Einwärtsstroms.

III.4 pH - Regulation (saures Milieu)

Butyrat diffundiert nicht ionisch durch Zellmembranen und setzt intrazellulär Protonen frei, aufgrund dessen wird eine Senkung des pH-Werts in der Zelle induziert. Intrazelluläre Untersuchungen zeigten in Epithelien der Darmwand eine Absenkung des pH-Werts um bis zu 0,4 nach Applikation von Butyrat (siehe Diener et al., 1993). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde das biologische Verhalten der myenterischen Nervenzellen in Gegenwart eines sauren pH-Werts untersucht.

Das Protokoll des Versuchs wurde in der folgenden Reihenfolge durchgeführt: Die Neurone wurden erst unter Kontrollbedingungen im Current-Clamp-Modus zur Messung des Membranpotentials mit einer Standard-Tyrode-Lösung untersucht. Anschließend wurde der pH-Wert im Wechsel auf einen Wert von 6,9 und nach einem Auswaschen mit Standard-Tyrode auf 6,4 eingestellt. Die Membranpotentiale und Ströme wurden im Anschluss bestimmt. Die untersuchten myenterischen Neurone (n=7) zeigten unter keinen der oben aufgeführten Bedingungen eine Änderung des Membranpotentials (siehe Abb.III-20).

Einfluss des pH-Werts auf das Membranpotential

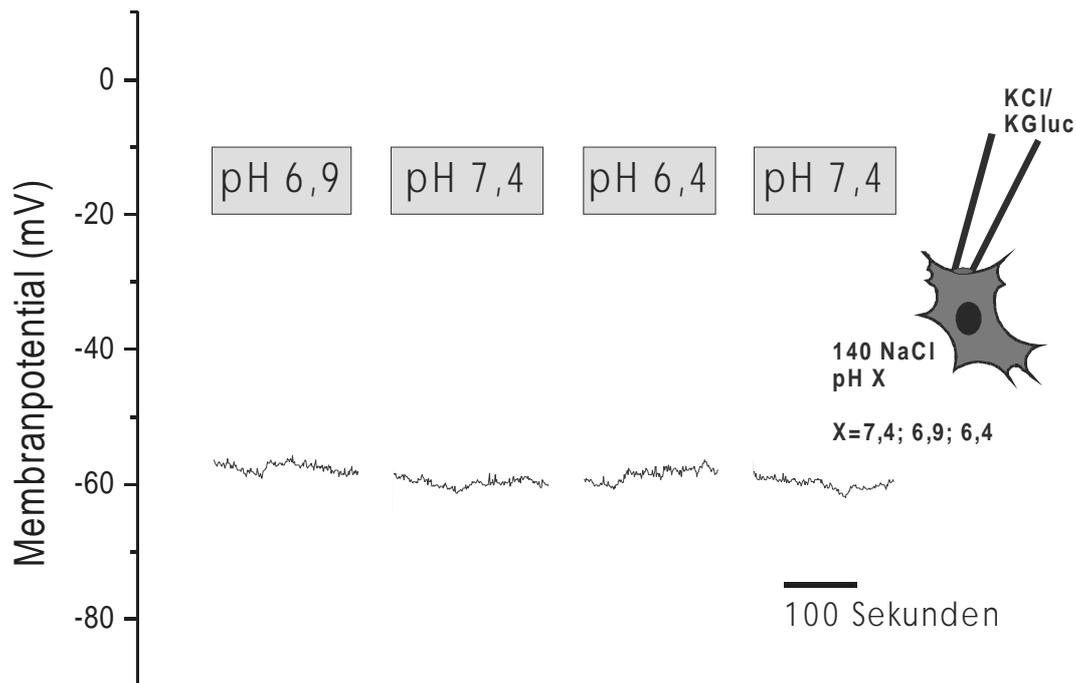


Abb.III-20 Darstellung des Membranpotentials bei einer Änderung des pH-Werts auf 6,4 und 6,9.

Der Vergleich der Einwärtsströme unter Kontrollbedingungen und saurem Milieu zeigte eine Reduktion des Na^+ -Einwärtsstroms (siehe Abb.III-21). Die mittlere Hemmung betrug $86,2 \pm 18,4 \text{ pA}$ ($n=7$; $p<0,05$) bei einem Wechsel zu einem pH-Wert von 6,9. Wurde ein pH-Wert von 6,4 eingestellt, reduzierte sich der Einwärtsstrom noch drastischer, der im Mittel um $230,6 \pm 25,1 \text{ pA}$ ($n=7$; $p<0,05$) abnahm.

Strom-Spannungs-Kurven bei Wechsel in saure pH-Wert-Bereiche

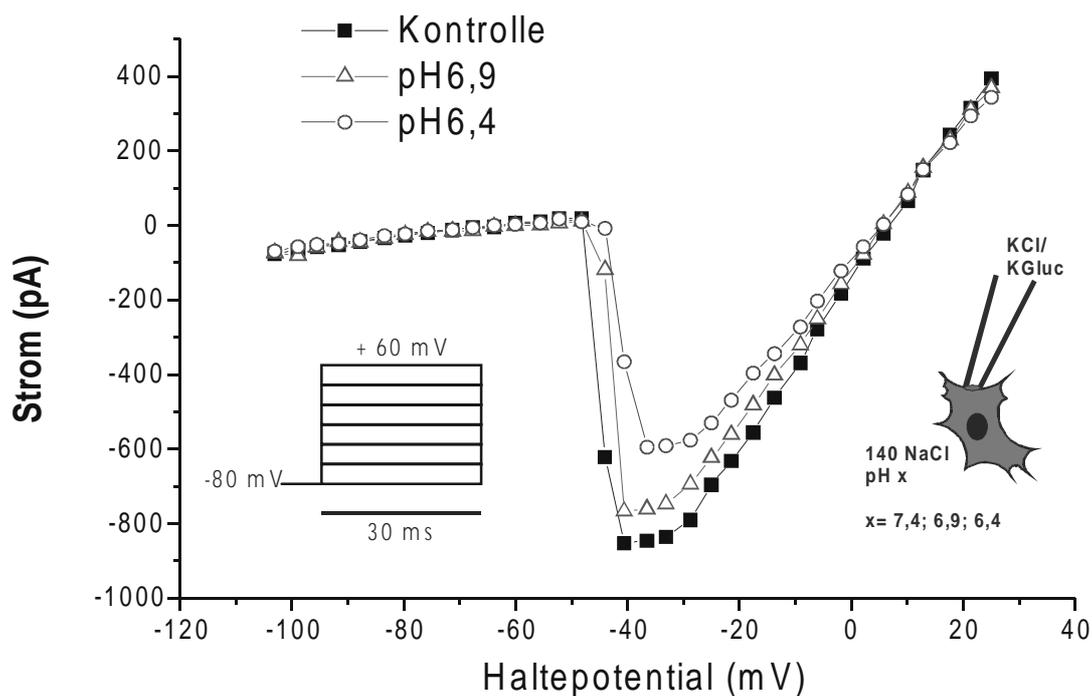


Abb.III-21 Strom-Spannungs-Beziehung des Einwärtsstroms vor und nach einer pH-Wert-Änderung von 7,4 auf 6,9 und 6,4.

Dies ließ vermuten, dass Butyrat einen ähnlichen Effekt durch Freigabe von Protonen in myenterischen Neuronen ausübte, den Einwärtsstrom verminderte und die Erregbarkeit in enteralen Neuronen reduzierte.

IV Diskussion

IV.1 Eine basale Charakterisierung myenterischer Neurone

Das enterale Nervensystem wurde in den letzten Jahren intensiv in elektrophysiologischer und immunhistologischer Hinsicht untersucht. In dieser Arbeit wurde das Verhalten myenterischer Neurone der Ratte in einer Zellkultur mit der Patch-Clamp-Methode weiter charakterisiert.

Zur Differenzierung myenterischer Neurone wurde ihr basales Verhalten nach ihrem maximalen Einwärtsstrom während einer Depolarisation der Zellmembran dargestellt. Es ergab sich eine Verteilung in zwei Hauptgruppen, von der die erste Gruppe einen maximalen Einwärtsstrom bei einer Depolarisation der Zellmembran bei -40mV , die zweite Gruppe bei -10mV zeigte (siehe III.1). Vorherige Untersuchungen an enteralen Nervenzellen ergaben auch eine Verteilung in zwei verschiedene Typen (siehe Wood, 1992):

1. S-Neurone (Typ/1), die repetitiv nach einer Depolarisation Aktionspotentiale auslösen, welche durch TTX (Tetrodotoxin), einen selektiven Na^+ -Kanal-Blocker, hemmbar sind. Die Aktionspotentiale werden durch einen Na^+ -Einstrom getragen.

2. AH-Neurone (Typ/2), die nach Auslösen eines Aktionspotentials eine langdauernde Hyperpolarisation aufwiesen. Die Aktionspotentiale werden durch einen Ca^{2+} - und Na^+ -Einstrom vermittelt und sind TTX-resistent.

AH-Neurone (Typ/2) konnten in den hier durchgeführten Experimenten nicht bestimmt werden, da alle kultivierten Neurone des Plexus myentericus durch das Nervengift Tetrodotoxin (TTX;

siehe Catterall, 1980) des Kugelfischs in ihrer Erregbarkeit gehemmt werden konnten (siehe III.1.1). Tetrodotoxin ist ein Nervengift, das von der extrazellulären Seite an den Na⁺-Kanal bindet und somit einen Natriumeinstrom in die Zelle verhindert. Die Bindung erfolgt über eine positiv geladene Guanidingruppe des Neurotoxins an negativ geladene Domänen des Na⁺-Kanals. Dies ließ vermuten, dass entweder bei neugeborenen Ratten, von denen die Primärkulturen stammen, dieser Neurontyp noch nicht entwickelt ist oder dass es alternativ zu einer Veränderung der elektrischen Eigenschaften der Zellen in Kultur, z.B. Verlust TTX-resistenter Einwärtsströme, kommt. Versuche an nativen Plexus-Myentericus-Präparaten (siehe Abb.II-2) ergaben die gleichen Resultate wie an Neuronen der Primärkultur. Eine TTX-Resistenz konnte auch an diesen nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

In einigen wenigen Versuchen konnte hingegen ein Neurontyp gemessen werden, der eine atypische Inaktivierung der schnellen Einwärtsströme zeigte (siehe III.1.3). Dieser Neurontyp zeigte eine frühe, geringe Aktivierung der schnellen Einwärtsströme und nachfolgend eine stärkere, maximale Aktivierung, gefolgt von einer Inaktivierung (siehe Abb.III-9). Neuere Untersuchungen an AH – Neuronen (Typ/2) zeigten auch ein zweigeteiltes Verhalten der Einwärtsströme, die nicht komplett durch TTX gehemmt werden konnten. Diese Einwärtsströme wurden durch einen Ca²⁺- und einen Na⁺-Strom getragen (siehe Zholos et al., 1999). Es ist fraglich, ob es sich bei dem in dieser Arbeit gemessenen atypischen Neurontyp um einen AH – Neuron (Typ/2) handeln könnte, da keine Versuche mit dem Neurotoxin TTX durchgeführt wurden und für eine statistisch gesicherte Aussage mehr Zellen gemessen werden müssten. Auch

sollte die Art der Präparation und der Kultivierung überprüft werden, da es denkbar ist, dass während der enzymatischen Dissoziation dieser Zelltyp verloren gehen könnte. Wird ein Vergleich zwischen dem enteralen Nervensystem und dem Zentralnervensystem angestellt, zeigt sich eine ähnliche Verteilung von Neuronen. Es wurden an Spinalganglien wie an enterischen Nervenzellen TTX-sensitive und TTX-resistente Typen gemessen (siehe Scholz et al., 1998). Weitere Charakteristika myenterischer Neurone sind ein negatives Ruhemembranpotential von -30 bis -80mV , das durch einen K^+ -Auswärtsstrom erzeugt wird (siehe III.1.5), und eine typische Inaktivierung der schnellen Na^+ -Einwärtsströme.

Die Mehrzahl der Neurone des Plexus myentericus zeigte bei Depolarisation der Zellmembran einen typischen Einwärtsstrom in die Zelle, der nach 1 bis 2ms inaktiviert wurde. Die Inaktivierung ist auf spannungsabhängige Na^+ -Kanäle zurückzuführen, die sich nach einer Aktivierung, d.h. nach Depolarisation der Zellmembran, öffnen und durch einen Na^+ -Einstrom Aktionspotentiale auslösen können. Die Aktivierung ist spannungsabhängig. Zeitabhängig wird die Zellmembran über die Inaktivierung wieder undurchlässig für Na^+ -Ionen (siehe Hodgkin & Huxley, 1952 und Patlak, 1991). Spannungsabhängige Na^+ -Kanäle sind Proteinstrukturen in der Zellmembran mit verschiedenen funktionellen Anteilen und Aufgaben. Die Pore des Kanals wird aus der α -Untereinheit (α -subunit) gebildet, die aus vier sich wiederholenden transmembranen Regionen (I – IV) aufgebaut ist. Eines der mutmaßlich membrandurchspannenden Segmente, S4, hat ein auffallendes Muster von positiv geladenen Aminosäuren. Solch eine

Ladungsverteilung spricht für den Spannungssensor des Kanals. Die Aktivationspartikel werden in den S6-Segmenten vermutet. Die Inaktivierung scheint sich zwischen den transmembranen Regionen III und IV zu befinden (siehe Übersicht bei Yellen, 1998).

Struktur eines Natrium-Kanals

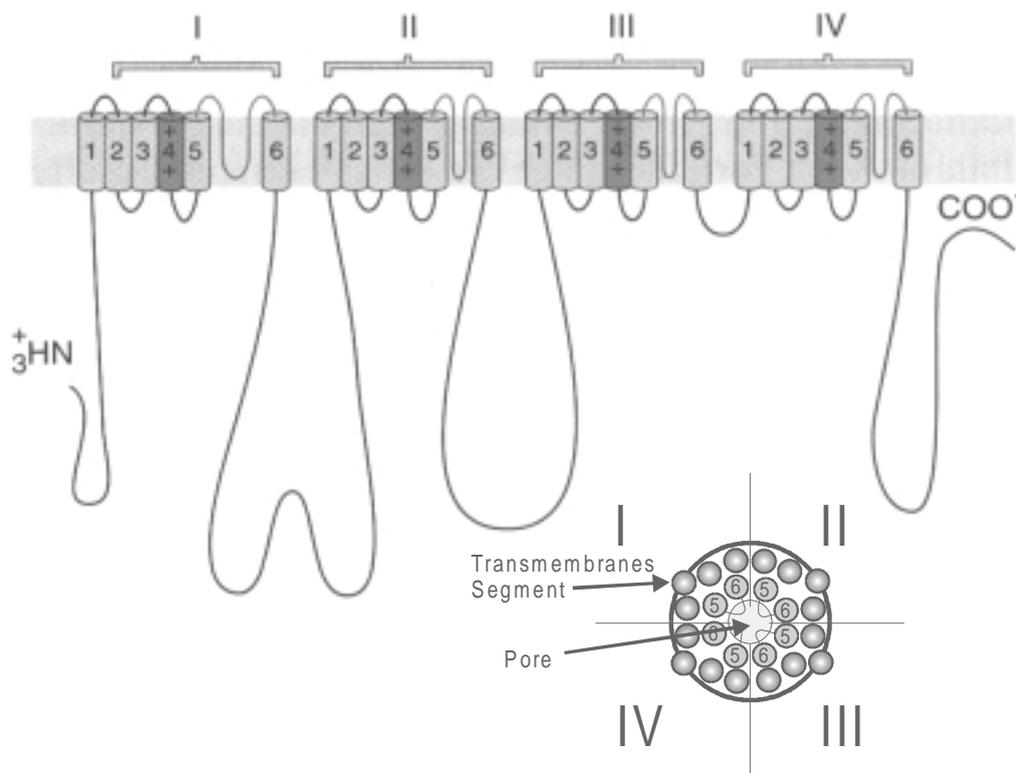


Abb.IV-1 Struktur eines spannungsabhängigen Na⁺-Kanals. Polypeptide bilden eine Pore (α-subunit). Diese α-subunit besteht aus vier (I-IV) sich wiederholenden transmembranen Regionen (S1 - S6).

Die Aktivationspartikel sind zur extrazellulären Seite orientiert und öffnen die Pore nach einer Depolarisation durch eine Konformationsänderung. Nahe der intrazellulären Seite in der Membran befindet sich das Inaktivationspartikel, welches bei negativen Potentialen von -80 bis -60mV geöffnet ist und sich nach

einer Depolarisation zeitabhängig schließt und somit den Kanal inaktiviert. Die Prozesse der Aktivierung und Inaktivierung werden nach Hodgkin und Huxley als unabhängig voneinander betrachtet (siehe Hodgkin & Huxley, 1952). Diese Zustände des Na⁺-Kanals lassen sich mit verschiedenen mathematischen Modellen beschreiben, die auf Voltage-Clamp- und Patch-Clamp-Versuchen basieren (siehe Abb.IV-2; Animation SODIUM.EXE auf beiliegender CD-ROM).

Kinetisches Modell eines Natrium-Kanals Modifiziert nach Hodgkin & Huxley

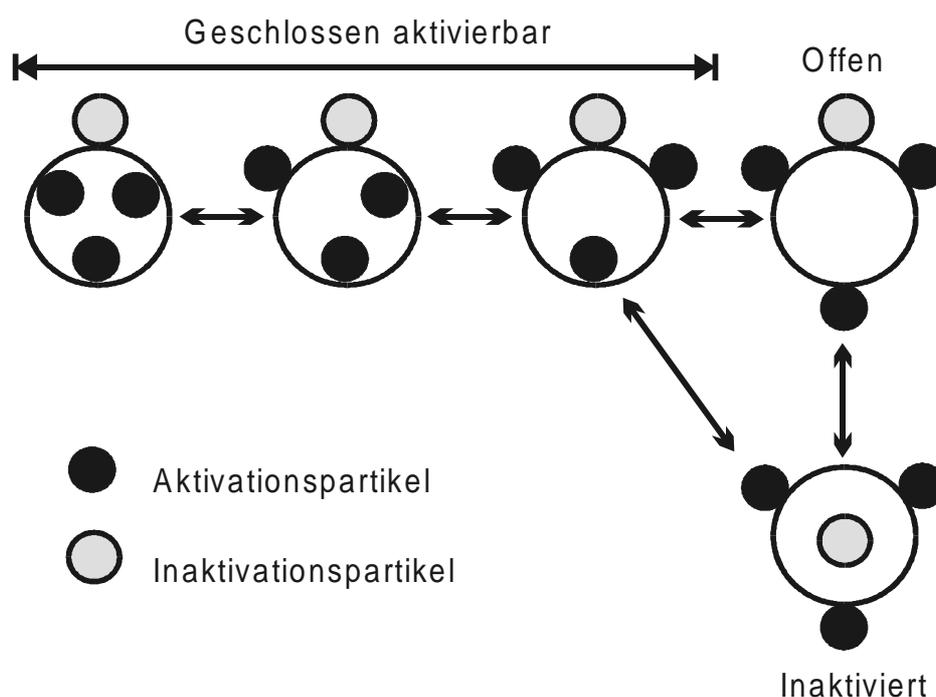


Abb.IV-2 Kinetik eines Natrium-Kanals, modifiziert nach Hodgkin & Huxley (1952) und Patlak (1991). Es wird in diesem Modell von drei Aktivationspartikeln und einem Inaktivationspartikel ausgegangen. Der große offene Kreis steht für die Pore des Natrium-Kanals. Die Pfeile symbolisieren Wahrscheinlichkeiten eines Übergangs von einem zu einem anderen Zustand.

IV.2 Butyrat, ein bekannter Stimulus des Magen-Darm-Trakts

Kurzkettige Fettsäuren (SCFAs, short-chain fatty acids) werden in großer Menge im Dickdarm und Dünndarm der Säugetiere durch bakterielle Fermentation von Kohlenhydraten gebildet. Sie stellen den höchsten Anteil von Anionen im Dickdarm dar (Übersicht bei Bugaut, 1987). Die Aufnahme der kurzkettigen Fettsäuren an Epithelien erfolgt in ihrer protonierten Form (HA) per Diffusion und in anionischer Form (A^-) mittels eines spezifischen Transporters, der Bikarbonat gegen SCFAs austauscht (Übersicht bei Sellin, 1999).

In den letzten Jahren wurden viele Wirkungen von kurzkettigen Fettsäuren auf Epithelien und Neuronen des Magen-Darm-Trakts beschrieben. So induziert z. B. Butyrat an Epithelzellen von Krypten eine Absenkung des intrazellulären pH-Werts durch Protonenfreigabe in der Zelle (siehe Diener et al., 1993). Ein weiterer Einfluss von kurzkettigen Fettsäuren ist die Erhöhung des intrazellulären Volumens, welches durch eine Na^+ - und Cl^- -Aufnahme in die Zelle aufgebaut wird (siehe Binder & Mehta, 1989).

Eine weitere Eigenschaft von SCFAs ist eine direkte Wirkung auf enterale Neurone, die nachfolgend glatte Muskelzellen und Epithelzellen des intestinalen Trakts beeinflussen. Untersuchungen zeigten neuronal vermittelte kontraktile Effekte der SCFAs auf die longitudinale Muskulatur des Kolons. Diese Kontraktionen konnten durch das Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) und Atropin aufgehoben werden. Dies legt den Einfluss eines enterischen Reflexes über sensorische Neurone nahe sowie eine Beteiligung cholinergischer Neurone (siehe Yajima, 1985). Andere Untersuchungen zeigten, dass es nach Applikation von SCFAs in das Lumen des Enddarms zu einer

systemisch vermittelten Proliferation von Epithelzellen des Darmtrakts kommt (siehe Sakata, 1987). Weiterführende Experimente konnten auch an isolierten Darmsegmenten durchgeführt werden, die vom Mesenterium und den dort vorhandenen Nerven getrennt waren und den trophischen Effekt weiter zeigten (siehe Sakata, 1989). Die Beobachtungen ließen Sakata vermuten, dass myenterische Neurone und das endokrine System den trophischen Effekt von kurzkettigen Fettsäuren vermitteln. Werden hingegen kultivierte Epithelzellen einer butyrathaltigen Umgebung ausgesetzt, zeigen sich keine trophischen Effekte, im Gegenteil, die Zellen differenzieren aus (siehe Sakata & Yajima, 1984). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass der systemische Stimulus nicht auf eine direkte Wirkung von Butyrat auf die Epithelien zurückzuführen ist, sondern über eine vermittelnde Komponente geschieht, wie z.B. über Rezeptoren auf enteralen Neuronen (siehe Yajima, 1985). Aufgrund dieser Untersuchungen wurden kurzkettige Fettsäuren in klinischen Studien als therapeutische Mittel genutzt. So konnte an Patienten mit einer distalen ulcerativen Kolitis erfolgreich die trophische Wirkung der SCFAs eingesetzt und eine Besserung der klinischen Symptome erzielt werden (siehe Scheppach et al., 1992).

In dieser Arbeit wurde die Änderung des elektrischen Verhaltens kultivierter myenterischer Neurone der Ratte in Gegenwart von Butyrat untersucht. An Epithelzellen des Darms induziert Butyrat eine intrazelluläre Protonenfreigabe, die mit einer Erniedrigung des pH-Werts einhergeht. Die Zelle ihrerseits aktiviert auf diesen Stimulus einen $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher, der die Protonen aus der Zelle herustransportiert und im Gegenzug Na^+ in der Zelle anreichert. Diese erhöhte Na^+ -Konzentration führt zu einer

keine Effekte auf die Hyperpolarisation zeigten. Da an Epithelien des Darm-Trakts durch eine Zellschwellung volumensensitive K^+ -Kanäle geöffnet werden, stellte sich in dieser Arbeit die Frage, ob die Hyperpolarisation der myenterischen Neurone auf den oben beschriebenen Mechanismus zurückgeht. Eine Schwellung der Neurone wurde mit einer hypotonen 70NaCl-Lösung ausgelöst (siehe III.3). Es konnte jedoch keine Hyperpolarisation induziert werden und es muss davon ausgegangen werden, dass an Plexus-Myentericus-Neuronen keine volumenregulatorischen K^+ -Kanäle vorhanden sind.

Nach Aufnahme von Butyrat in Epithelzellen des Darms kommt es neben der Zellschwellung zu einer Abnahme des intrazellulären pH-Werts. Diese hat jedoch keine Auswirkung auf das Membranpotential der Neurone. Wurden die Zellen nämlich mit einem sauren Perfusionsmedium (pH 6.4 bzw. 6.9) überspült, von dem man annehmen kann, dass es eine intrazellulär Acidifizierung auslöst (siehe z.B. Schäfer et al. 1991), änderte sich das Membranpotential in keinsten Weise (siehe Abb.III-20).

Da weder eine Zellschwellung noch eine Ansäuerung den Butyrat-Effekt auf das Membranpotential nachahmen können, kann man am ehesten als Erklärung für die Wirkung der SCFA auf Kaliumströme eine Stimulation von Rezeptoren für diese Substanzen auf den enterischen Nervenzellen vermuten, so wie es bereits von Yajima (1985) aufgrund von systematischen Studien zur Strukturabhängigkeit des SCFA-Effektes auf die glatte Muskulatur des Darmes postuliert wurde (siehe Abb.IV-4).

Die Messung der schnellen Einwärtsströme enteraler Neurone ergab nach Zugabe von Butyrat einen verringerten Einstrom für

Natrium in die Zelle (siehe III.2.2). Dasselbe Verhalten konnte auch nach einer Erniedrigung des pH-Werts auf 6,9 gezeigt werden. Ein weiteres Absenken des pH-Werts auf 6,4 verstärkte den Effekt nochmals (siehe Abb.III-21). Bei einer Zellschwellung hingegen konnte keine Änderung der Einwärtsströme gemessen werden. Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass die durch Butyrat intrazellulär freigesetzten Protonen spannungsabhängige Na^+ -Kanäle beeinflussen und die Leitfähigkeit für Natrium herabsetzen (siehe Abb.IV-4).

Modell eines myenterischen Neurons unter Einfluss von Butyrat

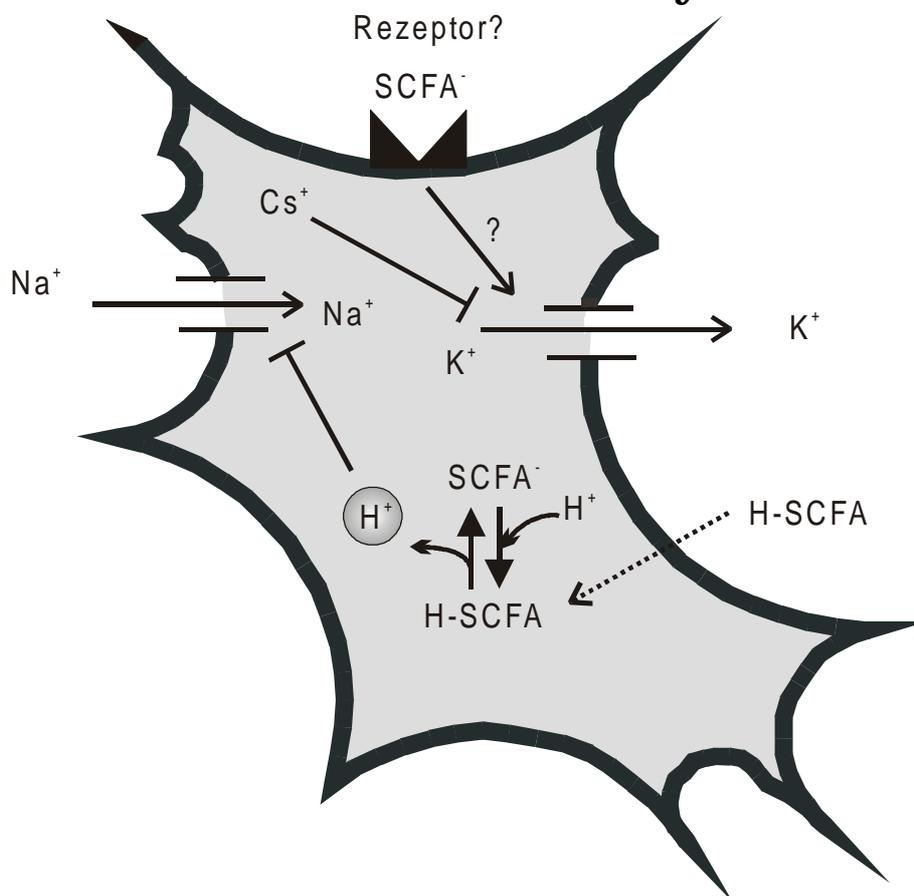


Abb.IV-4 Schematisches Modell eines myenterischen Neurons. Butyrat (SCFA, short-chain fatty acid) setzt Protonen frei und erniedrigt den intrazellulären pH-Wert. Der Einwärtsstrom für Natrium wird durch eine erhöhte Protonenkonzentration verringert. Eventuell wirkt Butyrat direkt über einen Rezeptor, der über K⁺-Kanäle eine Hyperpolarisation der Zellmembran auslöst.

Anhand dieser Untersuchungen kann man von einer vermittelnden Funktion des enterischen Nervensystems bei den gastrointestinalen Wirkungen von SCFA ausgehen, da die Erregbarkeit der Neurone direkt durch Butyrat geändert wurde, das bedeutet, dass Butyrat modulierend auf eine Signalkette des intrinsischen Nervensystems einwirken kann.

IV.3 Die Zellkultur des Plexus myentericus der Ratte als Modell

Die Versuche an kultivierten Neuronen des Plexus myentericus der Ratte konnten erstmals zur Charakterisierung des basalen Verhaltens und zur Messung des Einflusses eines biologischen Stimulus (Butyrat) eingesetzt werden. Vergleiche zu isolierten nativen myenterischen Neuronen zeigten keine Änderungen im elektrischen Verhalten dieser Zellen. Damit bietet sich die Primärkultur aus dem Plexus myentericus der Ratte an, um ein einfaches Modell für in vitro Untersuchungen zur Funktion des enterischen Nervensystems zu etablieren. So können damit z.B. die Wirkungen von Transmittern, Entzündungsmediatoren, parakrinen Substanzen oder gastrointestinalen Hormonen auf das Darmnervensystem getestet werden. Es gibt eine große Anzahl von pathologischen Veränderungen im Magen-Darm-Trakt, bei denen eine Beteiligung des enteralen Nervensystems bewiesen ist, bzw. vermutet wird wie z.B. Motilitätsstörungen (Morbus Hirschsprung, Megacolon der Katze, Koliken der Pferde usw.) sowie ideopathische Enteritiden. Sollte es gelingen, enterische Nervenzellkulturen von Patienten mit solchen Krankheitsbildern zu gewinnen, böte sich die Chance, die zellulären Ursachen für solche Erkrankungen, bzw. die beteiligten pathophysiologischen Mechanismen, besser zu verstehen (siehe Abb.IV-5).

Modell Plexus myentericus in einer Zellkultur

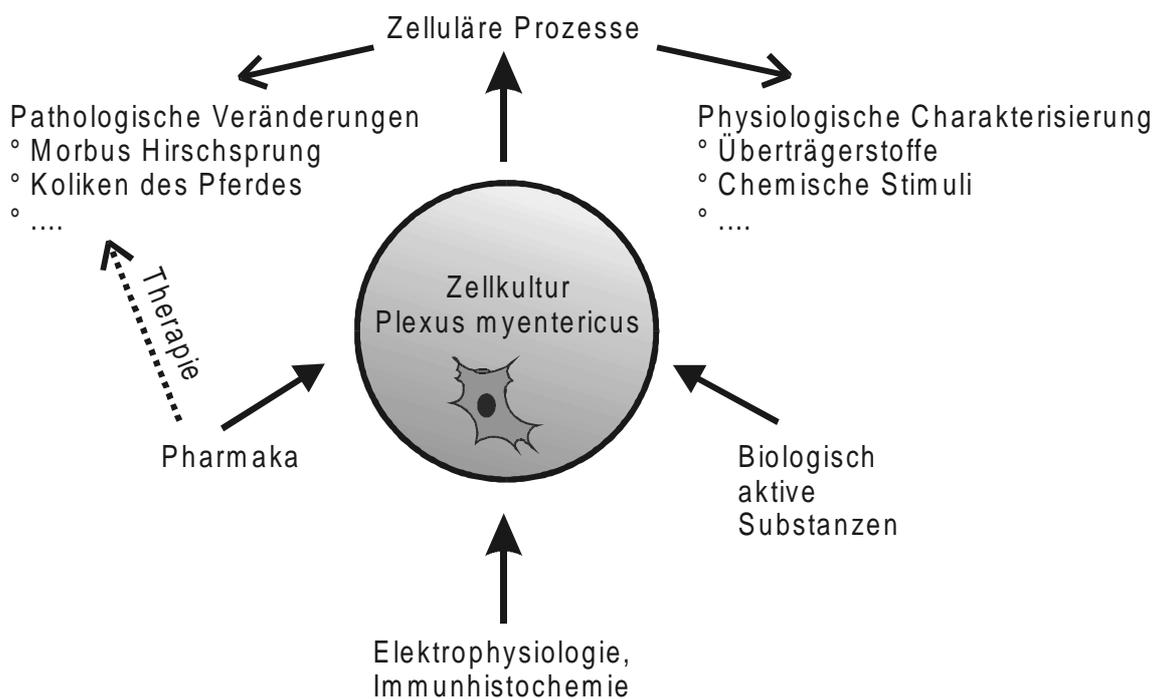


Abb.IV-5 Modell der Zellkultur Plexus myentericus der Ratte zur Charakterisierung zellulärer physiologischer Prozesse.

V Zusammenfassung

Myenterische Neurone von 1 bis 10 Tage alten Ratten wurden aus dem Dünn- und Dickdarm enzymatisch mit Kollagenase und einer nachfolgenden kurzen Trypsinierung isoliert. Einzelne Zellen und/oder vereinzelt Ganglien wurden aufgesammelt und für 1 Woche in Kultur gehalten. Nach 1 bis 5 Tagen in Kultur wurden Membranpotential und Ionenströme mit der Patch-Clamp-Technik gemessen. Die Eigenschaften dieser Zellen wurden mit frisch isolierten Ganglienzellen verglichen.

Das basale Membranpotential lag in einem Bereich von -30 bis -60mV . Es konnten 2 Hauptgruppen von Zellen nach ihrem Einwärtsstrom bestimmt werden. Die erste Gruppe der Zellen zeigte einen starken Einwärtsstrom in die Zelle, der durch das Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) unterdrückt werden konnte, was auf das Vorhandensein von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen in diesen Neuronen hinweist. In der zweiten Gruppe konnten keine Einwärtsströme gemessen werden; diese Zellen wurden als mutmaßliche Glia-Zelle angesehen. Qualitativ gleiche Ergebnisse wurden an frisch isolierten Ganglienzellen erhalten. Innerhalb der myenterischen Neurone konnten 2 Populationen nach dem Potential unterschieden werden, bei dem ein maximaler Einwärtsstrom auftrat.

Butyrat ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) induzierte eine reversible Hyperpolarisation myenterischer Neurone um ca. 10mV . Diese Hyperpolarisation ging mit einer Erniedrigung der TTX-sensitiven Na^+ -Einwärtsströme einher. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass funktionsfähige myenterische Neurone in Kultur gehalten werden können und auf chemische Stimuli antworten.

Summary

Myenteric neurons from 1 - 10 days old rats were isolated from the small and large intestine by an enzymatic digestion with collagenase followed by a short trypsination. Single cells and/or individual ganglia were collected and kept in culture for up to 1 week. After 1 - 5 days in culture, membrane potential and ionic currents were measured with the whole-cell patch-clamp technique. The properties of these cells were compared with those of cells located in freshly isolated ganglia.

Basal membrane potentials amounted to -30 to -60mV. With respect to ionic currents, two main types of cells could be distinguished. The first group of cells exhibited large inward currents, which were inhibited by the neurotoxin, tetrodotoxin (TTX), indicating the presence of voltage-sensitive Na⁺ channels in these neurons. In the second group of cells, no inward currents were observed; these cells were classified as presumptive glial cells. Qualitative similar results were obtained with cells located in freshly dissected ganglia. Within the myenteric neurons two populations could be distinguished with respect to the voltage at which they activated a maximal TTX-sensitive Na⁺ current.

Butyrate (50mmol·l⁻¹) induced a reversible hyperpolarization of the myenteric neurons by about 10mV. This hyperpolarization was concomitant with an inhibition of TTX-sensitive Na⁺ current. The results demonstrate that functional myenteric neurons can be kept in culture and respond to chemical stimuli.

VI Literaturverzeichnis

- Auerbach L (1862).** *Über einen Plexus gangliosus myogastricus.* 39er Jahrbuch u. Abh. d. Schlesischen Gesellsch. f. Vaterländ. Cult. 103-104.
- Barajas-López C, Espinosa-Luna R, Zhu YH (1998).** *Functional interactions between nicotinic and P2X channels in short-term cultures of guinea-pig submucosal neurons.* J. Physiol. (London) 513: 671-683.
- Bertrand PP, Kunze WAA, Bornstein JC, Furness JB, Smith ML (1997).** *Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa.* Am. J. Physiol. 273: G422-G435.
- Binder HJ, Mehta P (1989).** *Short-chain acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in rat distal colon.* Gastroenterology 96: 989-996.
- Brown DR, Miller RJ (1991).** *Neurohormonal control of fluid and electrolyte transport in intestinal mucosa.* In: Handbook of Physiology. Section 6, Vol. 4. Gastrointestinal Physiology: Absorptive and Secretory Processes in the Intestines, Hrsg: Field M, Schutz SG, Frizzell RA, Bethesda, MD, USA, Am. Physiol. Soc. 527-589.
- Bugaut M (1987).** *Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals.* Comp. Biochem. Physiol. 86B: 439-472.
- Catterall WA (1980).** *Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes.* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20: 15-43.
- Cherubini E, Morita K, North RA (1985).** *Opioid inhibition of synaptic transmission in the guinea-pig myenteric plexus.* Br. J. Pharmacol. 85: 805-817.
- Cook NS, Quast U (1990).** Potassium channel pharmacology. Aus Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential. Cook NS (Herausgeber). Ellis, Horwood. 181-231.
- Diener M, Helmle-Kolb C, Murer H, Scharrer E (1993).** *Effects of short-chain-fatty acids on cell volume and intracellular pH in rat distal colon.* Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 424: 216-223.
- Diener M, Scharrer E (1994).** *The effect of short-chain fatty acids on Cl⁻ and K⁺ conductance in rat colonic crypts.* Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 426: 472-480.

- Diener M, Vujcic Z, Scharrer E (1996).** *Neuronally mediated anion secretion induced by short-chain fatty acids in the rat small intestine.* Acta Physiol. Scand. 157: 33-40.
- Dogiel AS (1899).** *Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase der Menschen und der Säugetiere.* Arch. Anat. Physiol. Leipzig Anat. Abt. 130-158.
- Frieling T, Cooke JH, Wood JD (1994).** *Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after sensitization to milk antigen.* Am. J. Physiol. 267: G1087-G1093.
- Furness JB, Costa M (1980).** *Types of nerves in the enteric nervous system.* Neuroscience 5: 1 – 20.
- Furness JB, Costa M (1987).** *The enteric nervous system.* Churchill Livingstone.
- Gerlach D (1985).** *Das Lichtmikroskop.* 2. Auflage, Thieme, Stuttgart. 199-208.
- Gershon MD, Erde SM (1981).** *The nervous system of the gut.* Gastroenterology 80: 1571-1594.
- Goldman DE (1943).** *Potential, impedance, and rectification in membranes.* J. Gen. Physiol. 27: 37-60.
- Hanani M, Xia Y, Wood JD (1994).** *Myenteric ganglia from the adult guinea-pig intestine in tissue culture.* Neurogastroenterol. Motil. 6: 103-118.
- Henderson G, North RA (1975).** *Presynaptic action of 5-hydroxytryptamine in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum.* Proc. of the B.P.S. 265P.
- Hille B (1992).** *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Sunderland, Sinauer.
- Hirai K, Browning KN, Lees GM (1997).** *Neuropeptide Y hyperpolarizes submucosal neurones of the guinea-pig descending colon.* Neurosci. Lett. 227: 212-214.
- Hirst GDS, Silinsky EM (1975).** *Some effects of 5-hydroxytryptamine, dopamine and noradrenaline on neurones in the submucous plexus of guinea-pig small intestine.* J. Physiol. (London) 251: 817-832.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952).** *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.* J. Physiol. (London) 117: 500-544.

- Jessen KR (1982).** *Removal of the ganglionated plexuses from the gut wall: Advantages for studies of the enteric nervous system.* Scand. J. Gastroenterol. 71: 91-102.
- Jessen KR, Mirsky R, Hills JM (1987).** *GABA as an autonomic neurotransmitter: studies on intrinsic GABAergic neurons in the myenteric plexus of the gut.* Trends Neurosci. 10: 255-262
- Johnson SM, Katayama Y, North RA (1980).** *Multiple actions of 5-hydroxytryptamine on myenteric neurones of the guinea-pig ileum.* J. Physiol. (London) 304: 459-470.
- Katayama Y, North RA (1978).** *Does substance P mediate slow synaptic excitation within the myenteric plexus?* Nature 274: 387-388.
- Langley JN (1921).** *The autonomic nervous system Part 1.* W. Heffer and Sons, Cambridge.
- Meissner G (1857).** *Über die Nerven der Darmwand.* Z. Ration. Med. N. F. 8: 364-366.
- Mihara S, Katayama Y, Nishi S (1985).** *Slow postsynaptic potentials in neurones of the submucous plexus of guinea-pig caecum and their mimicry by noradrenaline and various peptides.* Neuroscience 16: 1057-1068.
- Morita K, North RA, Tokimasa T (1982).** *Muscarinic agonists inactivate potassium conductance of guinea-pig myenteric neurones.* J. Physiol. (London) 333: 125-139.
- Nemeth PR, Zafirov DH, Wood JD (1985).** *Effects of cholecystokinin, caerulein and pentagastrin on electrical behavior of myenteric neurons.* Eur. J. Pharmacol. 116: 263-269.
- Neunlist M, Dobрева G, Schemann M (1999).** *Characteristics of mucosally-projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon.* J. Physiol. (London) 517: 533-546.
- Neunlist M, Frieling T, Rupprecht C, Schemann M (1998).** *Polarized enteric submucosal circuits involved in secretory responses of the guinea-pig proximal colon.* J. Physiol. (London) 506: 539-550.
- Ngu MC (1983).** *The effect of cholecystokinin octapeptide on guinea pig enteric neurones.* Austral. New Zealand J. Med. 13:316.
- North RA, Slack BE, Suprenant AJ (1985).** *Muscarinic M1 and M2 receptors mediate depolarization and presynaptic inhibition in guinea-pig enteric nervous system.* J. Physiol. (London) 368: 435-452.

- North RA, Tonini M (1977).** *The mechanism of action of narcotic analgesics in the guinea-pig ileum.* Br.J. Pharamcol. 61: 541-549.
- Odgen D, Stanfield P (1994).** *Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording.* Odgen D (Herausgeber). Microelectrode techniques. The Plymouth Workshop Handbook. The Company of Biologists Limited, Cambridge. 53-78.
- Palmer JM, Schemann M, Tamura K, Wood JD (1986).** *Galanin mimics slow synaptic inhibition in myenteric neurons.* Eur. J. Pharamcol. 124: 379-380.
- Palmer JM, Wood JD, Zafirov DH (1987).** *Purinergic inhibition in the small intestinal myenteric plexus of the guinea-pig.* J. Physiol. (London) 387: 357-369.
- Patlak J (1991).** *Molecular kinetics of voltage-dependent Na⁺-channels.* Physiol. Rev. 71: 1047-1080.
- Sakata T (1987).** *Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors.* Br. J. Nutr. 58: 95-103.
- Sakata T (1989).** *Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation of isolated and denervated jejunal segment of the rat.* Scand. J. Gastroenterol. 24: 886-890.
- Sakata T, Yajima T (1984).** *Influence of short-chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract.* Quart. J. Exp. Physiol. 69: 639-648.
- Schäfer C, Westphale HJ, Oberleithner H (1991).** *Contrasting action of H and Ca on K transport in the diluting segment of frog kidney.* Cell Physiol. Biochem. 1: 286-293.
- Schäfer KH, Saffrey MJ, Burnstock G, Mestres-Ventura P (1997).** *A new method for the isolation of myenteric plexus from newborn rat gastrointestinal tract.* Brain Res. Prot. 1:109-113.
- Schemann M (1990).** *Neurophysiologie des enterischen Nervensystems.* Verdauungskrankheiten 8: 183-192.
- Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G, Kasper H (1992).** *Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis.* Gastroenterology 103: 51-56.

- Scholz A, Appel N, Vogel W (1998).** *Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na⁺ channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockage by halothane.* Eur. J. Neurosci. 10: 2547-2556.
- Scholz A, Kuboyama N, Hempelmann G, Vogel W (1998).** *Complex blockage of TTX-resistant Na⁺ currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons.* J. Neurophysiol. 79: 1746-1754.
- Sellin JH (1999).** *SCFAs: Enigma of Weak Electrolyte Transport in the Colon.* News Physiol. Sci. 14: 58-64.
- Shen KZ, Surprenant A (1992).** *Somatostati-mediated inhibitory postsynaptic potential in sympathically denervated guinea-pig submucosal neurones.* J. Physiol. (London) 470: 619-635.
- Stach W (1988).** *A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system.* In: Singer MV u. Goebell H (Hrsg.), Nerves and the Gastrointestinal Tract. MTP press limited, Lancaster. 29-45.
- Surprenant A (1994).** *Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons.* Annu. Rev. Physiol. 56: 117-140.
- Tamura K, Palmer JM, Winkelmann CK, Wood JD (1988).** *Mechanism of action of galanin on myenteric neurons.* J. Neurophysiol. 60: 966-979.
- Tamura K, Palmer JM, Wood JD (1987).** *Galanin suppresses nicotinic synaptic transmission in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine.* Eur. J. Pharmacol. 136: 445-446.
- Tamura K, Palmer JM, Wood JD (1988).** *Presynaptic inhibition produced by histamine at nicotinic synapses in enteric ganglia.* Neuroscience 25: 171-179.
- Tokimasa T, Cherubini E, North RA (1983).** *Nicotinic depolarization activates calcium dependent gK in myenteric neurons.* Brain Res. 263: 57-62.
- Willard AL (1990).** *A vasoactive intestinal peptide-like cotransmitter at cholinergic synapses between rat myenteric neurons in cell culture.* J. Neurosci. 10: 1025-1034.
- Williams JT, Katayama Y, North RA (1979).** *The action of neurotensin on single myenteric neurones.* Eur. J. Pharmacol. 59: 181-186.
- Wood JD (1987).** *Physiology of the enteric nervous system.* In: Johnson LR (Hrsg.), Physiology of the Gastrointestinal Tract. 1. Aufl., Raven press, New York. 67-111.

- Wood JD (1992).** *Functions of AH / Dogiel II and S / Dogiel I neurons in the enteric microcircuits.* Holle GE, Wood JD (Hrsg.), *Advances in the innervation of the gastrointestinal tract.* Exerta Medica, Amsterdam. 125-145.
- Wood JD (1994).** *Physiology of the enteric nervous system.* In: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3. Aufl., Hrsg: Johnson LR, New York, Raven Press. 423-482.
- Wood JD, Mayer CJ (1979).** *Slow synaptic excitation mediated by serotonin in Auerbach's plexus.* *Nature* 276: 836-837
- Yajima T (1985).** *Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat.* *J. Physiol. (London)* 368: 667-678.
- Yajima T (1988).** *Luminal propionate-induced secretory response in the rat distal colon in vitro.* *J. Physiol. (London)* 403: 559-575.
- Yellen G (1998).** *The moving parts of voltage-gated ion channels.* *Quart. Rev. Biophys.* 3: 239-295.
- Zafirov DH, Palmer JM, Nemeth PR, Wood JD (1985).** *Bombesin, gastrin releasing peptide and vasoactive intestinal peptide excite myenteric neurons.* *Eur. J. Pharmacol.* 115: 103-107.
- Zholos AV, Baidan LV, Starodub AM, Wood JD (1999).** *Potassium channels of myenteric neurons in guinea-pig small intestine.* *Neuroscience* 89: 603-618.

VII Danksagung

Allen sei herzlich gedankt, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle sei **Prof. Dr. Martin Diener** genannt für die Überlassung des Themas, die unermüdliche Beantwortung aller Fachfragen und die intensive und freundliche Betreuung bei der Versuchsdurchführung und der Erstellung dieser Dissertation,

Dank an *Prof. Dr. Peter Rudas* (Budapest, Ungarn), der mich sehr förderte und für die Physiologie & Multi-Media-Techniken begeisterte,

an *Dr. Karl-Herbert Schäfer* (Homburg, Saar), *Dr. Gerhard Schultheiß* und *Monika Frings* für die ständige Unterstützung und Diskussionsbeiträge,

an *Brigitta Brück*, *Eva Haas*, *Alice Metternich*, *Jolanta Murgott* und *Bärbel Schmidt*, die mir im Labor und bei der Zellkultur tatkräftig zur Seite standen und ohne deren Hilfe die Versuche noch heute andauern würden,

an **meine Eltern**, die mich während des ganzen Studiums und der Promotion in jeder Hinsicht unterstützt haben,

und natürlich an **meine Frau Renata**, dass sie alles ertragen hat.

An dieser Stelle sei auch Herrn Sandor Fekete (Prof. der Tierernährung, Budapest, Ungarn) sehr gedankt, der mir einen freien Zeitraum in Ungarn bescherte, damit ich mich mit interessanten Themen beschäftigen konnte.