

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

(Kommissarischer Direktor: Univ.-Prof. Dr. Drs. h.c. (Univ. Istanbul / Türkei, UMF Iassy, Univ. Athen) M. Classen (i.R.))

Nitric Oxide Mechanismen im Gastrointestinaltrakt:
NOS-positive Neurone in Primärzellkultur
und
NO-abhängige Modulation des Calciumsignalstoffwechsels in
humanen Colonmuskelzellen

Ralph Fritsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. H.-D. Allescher
2. Univ.-Prof. (Komm. Direktor) Dr. Drs. h.c. (Univ. Istanbul/Türkei, UMF Iassy, Univ. Athen) M. Classen (i.R.)

Die Dissertation wurde am 15.10.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.01.2002 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	4
2.1 Präparationstechnik	4
2.1.1 Versuchstiere	4
2.1.2 Isolierung der longitudinalen Dünndarmmuskulatur mit dem myenterischen Plexus (LMMP-Streifen)	4
2.1.2.1 Entnahme des Dünndarms	4
2.1.2.2 Abpräparation der longitudinalen Muskelschicht mit anhängendem myenterischen Plexus	5
2.1.2.3 Mikroskopie der LMMP-Streifen	5
2.1.3 Isolierung myenterischer Ganglienkomplexe	6
2.1.3.1 Enzymatische Behandlung der LMMP-Streifen	6
2.1.3.2 Mechanische Dissoziation des Gewebes	6
2.1.3.3 Aufnahme der Ganglienkomplexe	6
2.1.4 Isolierung myenterischer Neurone	7
2.1.4.1 Enzymatische Andauung isolierter myenterischer Ganglien	7
2.1.4.2 Mechanische Dissoziation der Ganglienkomplexe in Einzelzellen und Zellaggregate	7
2.1.4.2 Trypanblaufärbung	7
2.2 Zellkulturtechnik	8
2.2.1 Primärkultivierung myenterischen Nervengewebes	8
2.2.1.1 Kulturmedium und Lösungen	8
2.2.1.2 Beschichtung der Zellkulturslides	8
2.2.1.3 Kultivierung frisch isolierter Ganglienkomplexe	9
2.2.1.4 Kultivierung frisch isolierter Einzelzellen	9
2.2.2 Kultivierung humaner Colonmuskelzellen	9
2.2.2.1 Zellmaterial	9
2.2.2.2 Kulturmedium und verwendete Lösungen	10
2.2.2.3 Aussäen der Muskelzellen	11
2.2.2.4 Passagieren, Ernten und Kryopräservierung humaner Colonmuskelzellen	11
2.3 Immunfluoreszenzfärbungen an kultivierten enterischen Neuronen und Gliazellen	12
2.3.1 Fixierung der Kulturen	12
2.3.1.1 Fixierung mit Paraformaldehydlösung	12
2.3.1.2 Fixierung mit Methanol/Aceton	12
2.3.1.3 Permeabilisierung fixierter Zellen	12

2.3.2 Immunhistochemischer Nachweis neuron- und gliaspezifischer Antigene und der neuronalen NO-Synthase	13
2.3.2.1 Verwendete Antikörper	13
2.3.2.2 Immunreaktion	14
2.3.2.3 Detektionsreaktion	14
2.3.3 Verwendete Lösungen	14
2.4 Fluoreszenzmikroskopische Calciummessung an kultivierten humanen Colonmuskelzellen	15
2.4.1 Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff	15
2.4.2 Digitalisierte fluorimetrische Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationsänderungen	16
2.4.3 Versuchsaufbau und Durchführung der Experimente	16
2.4.3.1 Beladung der Zellen mit Fura-2 AM	16
2.4.3.2 Aufbau des Superfusionskammersystems	17
2.4.3.3 Konfiguration des digitalen Videofluoreszenzsystems	18
2.4.3.4 Versuchsprotokoll	18
2.4.4 Datenauswertung und -präsentation	19
2.4.4.1 Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitätsquotienten	19
2.4.4.2 Abschätzung der molaren intrazellulären Calciumkonzentration	19
2.4.4.3 Pseudocolor-Images	19
2.4.4.4 Statistik	20
2.5 Immunologischer Proteinnachweis in kultivierten humanen Colonmuskelzellen	20
2.5.1 Proteinextraktion	20
2.5.1.1 Zellernte und –zählung	20
2.5.1.2 Zellyse	21
2.5.2 Quantitative Proteinbestimmung	21
2.5.3 Western Blot Analyse	22
2.5.3.1 Verwendete Lösungen	22
SDS Gelelektrophoresese	22
Elektrotransfer und Immunreaktion	22
2.5.3.2 Proteinauftrennung in der eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese	23
2.5.3.3 Elektrotransfer von Proteinen aus SDS Polyacrylamid-Gelen auf PVDF-Membranen	24
2.5.3.4 Antikörperbindung	25
2.5.3.5 Nachweis gebundener Antikörper mittels ECL-Detektion	25
2.6 Verwendete Substanzen	26

3. Ergebnisse	27
3.1 Isolierung myenterischen Nervengewebes aus dem Dünndarm der adulten Ratte	27
3.1.1 Art und Konzentration der Verdauungsenzyme	27
3.1.2 Mechanische Gewebedissoziationstechnik	29
3.1.3 Aufsammeln muskelfreier myenterischer Ganglien	30
3.1.4 Aufspaltung myenterischer Ganglien in Einzelzellen	30
3.2 Primärzellkulturen aus myenterischem Nervengewebe	32
3.2.1 Zellkulturtechnik	32
3.2.2 Morphologie der Kulturen	33
3.2.2.1 Kultivierung intakter myenterischer Ganglien und Ganglienaggregate	33
3.2.2.2 Kultivierung frisch isolierter Einzelzellen und Zellaggregate	34
3.3 Immunfluoreszenzstudien an kultiviertem myenterischen Nervengewebe	37
3.3.1 Identifikation von enterischen Neuronen	37
3.3.2 Identifikation von enterischer Glia	40
3.3.3 Identifikation nNOS-positiver Neurone in Zellkultur	42
3.4 Charakterisierung der NO-abhängigen Modulation des intrazellulären Calciumstoffwechsels in humanen Colonmuskelzellen	44
3.4.1 Kultivierung humaner Colonmuskelzellen	44
3.4.2 Videofluorimetrische Messung von intrazellulären Calciumsignalen in kultivierten Colonmuskelzellen	47
3.4.2.1 Wahl der Methodik	47
3.4.2.2 Etablierung der Methodik	47
3.4.2.3 Spontane Calciumsignale	48
3.4.2.4 Basale Calciumionenkonzentration in humanen kultivierten Colonmuskelzellen	48
3.4.3 Charakterisierung der NO-abhängigen Modulation der IP₃-abhängigen Calciumfreisetzung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen	49
3.4.3.1 Stimulus-induzierter transienter Calciumanstieg	49
3.4.3.2 Abhängigkeit des Stimulus-induzierten Calciumsignals von IP ₃ -sensitiven intrazellulären Calciumspeichern	50
3.4.3.3 Inhibition durch exogenes NO	53
3.4.3.4 Abhängigkeit der NO-vermittelten Inhibition von der löslichen Guanylatzyklase	54
3.4.3.5 Abhängigkeit der NO-vermittelten Inhibition der von der Proteinkinase G	56
3.4.2 Immunologischer Nachweis wichtiger Funktionsproteine der Stickstoffmonoxid-abhängigen Signaltransduktion in humanen Colonmuskelzellen	59
3.4.1 Nachweis der cGK 1 β	59
3.4.2 Nachweis von IRAG (IP ₃ -receptor-associated cGMP kinase substrate)	60

4 Allgemeine Diskussion	62
4.1 Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des enterischen Nervensystem	62
4.1.1 Anatomische Grundlagen	62
4.1.1.1 Sonderstellung des enterischen Nervensystems innerhalb des autonomen Nervensystem	62
4.1.1.2 Aufbau des enterischen Nervensystems	63
Subseröser Plexus	63
Myenterischer Plexus	63
Tiefer muskulärer Plexus	64
Submuköser Plexus	64
Plexus der Muscularis mucosae	65
Mukosaler Plexus	65
4.1.2 Zellarten im enterischen Nervensystem	67
4.1.2.1 Differenzierung enterischer Neurone	67
Morphologische Differenzierung	67
Funktionelle und elektrophysiologische Differenzierung	67
Immunologische Differenzierung	72
4.1.2.2 Enterische Glia	77
4.1.2.3 Interstitielle Zellen	78
4.1.3 Physiologie des enterischen Nervensystems	80
Regulation von Motilität	80
Regulation von Perfusion und Sekretion	82
4.1.4 Pathophysiologie des enterischen Nervensystems	82
4.1.4.1 Entwicklung des enterischen Nervensystems	82
4.1.4.2 Motilitätsstörungen	83
Achalasie	83
Infantile hypertrophe Pylorusstenose	84
Morbus Hirschsprung	84
4.1.4.3 Sekretionsstörungen	85
4.1.4.4 Die Rolle des enterischen Nervensystems bei Entzündungsvorgängen	85
4.2 Zellkulturmodelle für das Studium des enterischen Nervensystems	87
4.2.1 Kultivierung enterischen Nervengewebes	87
4.2.1.1 Notwendigkeit enterischer Ganglienzellkulturen	87
4.2.1.2 Präparationstechniken und untersuchte Spezies	88
4.2.2 Wachstums- und Differenzierungsstudien	90
4.2.2.1 Verschiedene Zelltypen in Primärzellkulturen myenterischen Nervengewebes	90
4.2.2.2 Immunzytochemische Differenzierung	91

4.2.2.3 Proliferation und Neuritenaussprossung	93
4.2.3 Funktionelle Studien	94
4.2.4.1 Elektrophysiologische Eigenschaften	94
4.2.4.2 Signaltransduktion und Neurotransmitterfreisetzung	95
4.2.4.3 Intrazelluläre Calciumsignale	97
4.2.4 Transplantationsstudien	98
4.3 Calciumsignalstoffwechsel intestinaler Muskelzellen und dessen Modulation durch Stickstoffmonoxid	99
4.3.1 Calciumsignalstoffwechsel in intestinalen Muskelzellen	99
4.3.1.1 Physiologische Charakteristika glatter Muskelzellen	99
Calcium in glatten Muskelzellen	99
Regulation der Kontraktilität glatter Muskelzellen	100
4.3.1.2 Calciumeinstrom durch Ionenkanäle in der Plasmamembran	102
Spannungsabhängige Calciumkanäle	102
Nichtselektive Kationenkanäle	102
Mechanosensitive Calciumkanäle	103
Kapazitiver Calciumeinstrom	103
4.3.1.3 Calciumfreisetzung aus Ryanodine-sensitiven Calciumspeichern	104
4.3.1.4 Calciumfreisetzung aus IP ₃ -sensitiven Calciumspeichern	105
4.3.1.5 Calciumextrusion und Calciumaufnahme in intrazelluläre Speicher	107
Calciumaufnahme in sarkoplasmatische Speicher	107
Calciumextrusionsmechanismen	108
4.3.1.6 Räumliche und zeitliche Heterogenität von Calciumsignalen	108
Oberflächliche Pufferbarriere	108
Calcium-„sparks“	109
Calcium-„puffs“	110
4.3.2 NO-abhängige Signaltransduktion in der glatten Muskulatur des Verdauungstrakts	111
4.3.2.1 NO-Synthese im Verdauungstrakt	111
Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid	111
Mechanismen der NO-Synthese	112
Lokalisation der NOS im Gastrointestinaltrakt	113
4.3.2.2 Lösliche Guanylatzyklen	115
cGMP-Synthese	115
cGMP-regulierte und cGMP-spezifische Phosphodiesterasen	116
cGMP-regulierte Kationenkanäle (cyclic nucleotide-gated cation channels, CNG)	118
4.3.2.3 cGMP-abhängige Proteinkinasen	119
Expression von cGK-Isoformen	119

Zielstrukturen und Funktionen der cGK I	120
4.3.2.4 Wechselwirkung zwischen der NO-abhängigen Signaltransduktion und dem Calciumsignalstoffwechsel in intestinalen Muskelzellen	121
Wechselwirkung zwischen NO und DHP-sensitiven Calciumkanälen	122
NO-abhängige Modulation der SERCA-Funktion	122
cGMP-abhängige Modulation Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanäle	123
Wechselwirkung zwischen der Proteinkinase G und der IP ₃ -sensitiven Calciumfreisetzung	123
5 Spezielle Diskussion	125
5.1 Isolation und Kultivierung myenterischen Nervengewebes aus dem Dünndarm der adulten Ratte	125
5.1.1 Isolation myenterischer Ganglien	125
5.1.2 Etablierung einer Primärzellkultur aus myenterischem Nervengewebe	126
5.1.3 Immunologische Charakterisierung kultivierten myenterischen Nervengewebes	128
5.2 Modulation der intrazellulären Calciumfreisetzung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen durch Stickstoffmonoxid	130
5.2.1 Humane Colonmuskelzellen in Zellkultur	130
5.2.2 Fluorimetrische Calciummessung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen	131
5.2.3 Stimulus-induzierte Calciumsignale	132
5.2.4 Abhängigkeit der Calciumsignale von IP ₃ -sensitiven Calciumspeichern	133
5.2.5 Einfluß von exogenem NO auf Stimulus-induzierte Calciumsignale	134
5.2.6 Rolle der Guanylatzyklase	135
5.2.7 Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase	135
6 Zusammenfassung	137
6.1 Isolation und Kultivierung myenterischen Nervengewebes aus der adulten Ratte	137
6.2 Stickstoffmonoxid-abhängige Modulation der IP₃-abhängigen Calciumfreisetzung in humanen Colonmuskelzellen	138
7 Literaturverzeichnis	140
8 Danksagung	164
9 Lebenslauf	165

<u>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</u>	Seite
<u>Abb. 1:</u> Isolation myenterischer Ganglien aus dem Dünndarm der adulten Ratte	31
<u>Abb. 2:</u> Primärzellkultur myenterischer Ganglien am 7. Tag nach Isolation in der Phasenkontrastmikroskopie (10x)	35
<u>Abb. 3:</u> Kultiviertes myenterisches Ganglion am 4. Tag nach Explantation	36
<u>Abb. 4:</u> Myenterisches Neuron am 7. Tag in Zellkultur	36
<u>Abb. 5:</u> Immunfluoreszenzdarstellung myenterischer Neurone in Primärzellkultur	39
<u>Abb. 6:</u> Immunfluoreszenzfärbung gegen saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) zur Identifikation enterischer Gliazellen in Primärzellkulturen myenterischen Nervengewebes	41
<u>Abb. 7:</u> nNOS-positive myenterische Neurone in Primärzellkultur	43
<u>Abb. 8:</u> Kultivierte humane Colonmuskelzellen in der 5. Passage nach Isolierung	46
<u>Abb. 9:</u> Carbachol-induzierte Calciumsignale in humanen Colonmuskelzellen	51
<u>Abb. 10:</u> Effekt von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB, 75 μ M), einem membranpermeablen Inhibitor der Ca^{2+} -Freisetzung aus IP_3 -sensitiven Speichern, auf die CCH-induzierte Calciummobilization	52
<u>Abb. 11:</u> SNP inhibiert die CCH-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung in humanen Colonmuskelzellen. Pseudocolour-Aufnahmen zum Zeitpunkt der maximalen Stimulation in einem typischen Experiment	53
<u>Abb. 12:</u> Effekt von ODQ, einem selektiven Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase auf die SNP-induzierte Inhibition des Calciumkonzentrationsanstiegs	55

<u>Abb. 13:</u> Effekt von KT5823 (10^{-6} M), einem membranpermeablen Inhibitor der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK), auf die SNP-vermittelte Inhibition der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung	57
<u>Abb. 14:</u> Effekt von Rp-8-pCPT-cGMPs (5×10^{-4} M), einem membranpermeablen Inhibitor der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK), auf die SNP-vermittelte Inhibition der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung	58
<u>Abb. 15:</u> Western Blot Analyse zum Nachweis der cGK I β -Expression in kultivierten humanen Colonmuskelzellen	61
<u>Abb. 16:</u> Western Blot Analyse zum Nachweis der IRAG-Expression in kultivierten humanen Colonmuskelzellen	61
<u>Abb. 17:</u> Anatomischer Aufbau des enterischen Nervensystems	66
<u>Abb. 18:</u> Wechselwirkung zwischen dem NO/cGMP/cGK I-Signaltransduktionssystem und dem Calciumsignalstoffwechsel in glatten Muskelzellen	124
<hr/>	
<u>Tabelle 1:</u> Menge des verwendeten Kulturmediums bei der Kultivierung humaner Colonmuskelzellen in Abhängigkeit der Zelldichte	10
<u>Tabelle 2:</u> Bei der immunzytochemischen Charakterisierung kultivierten myenterischen Nervengewebes verwendete Primärantikörper	13
<u>Tabelle 3:</u> Westernblot zum Nachweis der cGK I β und von IRAG: Elektroforese- und Blotbedingungen	24
<u>Tabelle 4:</u> Westernblot zum Nachweis der cGK I β und von IRAG: Verwendete Antikörper	25
<u>Tabelle 5:</u> Zusammensetzung der verschiedenen getesteten Chargen roher Collagenase Typ 2	28
<u>Tabelle 6:</u> Getestete Beschichtungsverfahren zur Optimierung der Anhaftung des frisch isolierten myenterischen Nervengewebes in Zellkultur	32

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

(soweit nicht im Text erläutert oder allgemein gebräuchlich)

ACh	Acetylcholin
AchE	Acetylcholin-Esterase
ANP	Atrial natriuretic polypeptide
BNP	Brain natriuretic polypeptide
BOM	Bombesin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholezystokinin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin Gene-related peptide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DYN	Dynorphin
ENK	Enkephalin
GABA	γ -Aminobutyrat
GAL	Galanin
5-HT	5-Hydroxytryptamin (=Serotonin)
kDA	Kilodalton
M	Molar (mol/l)
MEN	Multiple endokrine Neoplasien
NK(-A)	Neurokinin (A)
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NPY	Neuropeptid Y
ODQ	H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
RNA	Ribonukleinsäure
SOM	Somatostatin
SP	Substanz P
TK	Tachykinin
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid

1 Einleitung

Das enterische Nervensystem (ENS) nimmt innerhalb des autonomen Nervensystems eine Sonderstellung ein. Auf mehr als 100 Millionen enterische Neurone treffen nur einige Tausend sympathische und parasympathische Nervenfasern, die von außen in den Verdauungskanal einziehen, um die vielschichtigen Funktionsabläufe im Verdauungskanal zu modulieren und mit dem ZNS zu verknüpfen (Hoffman und Schnitzlein, 1969, S. 429). Die Struktur enterischer Ganglien, die vielschichtige und im gesamten Nervensystem einzigartige morphologische und funktionelle Differenzierung enterischer Nervenzellen sowie der komplexe Aufbau der anatomisch und funktionell eng verflochtenen Plexus verleihen dem enterischen Nervensystem die Fähigkeit, komplexe Regulationsvorgänge und multiple Funktionsabläufe eigenständig in weitgehender Unabhängigkeit vom zentralen Nervensystem initiieren und steuern zu können (Furness und Costa, 1982, S. 4). Zahlreiche Strukturelemente des ENS wie die Ganglienstruktur oder die Gliazelldifferenzierung zeigen dementsprechend auch größere Ähnlichkeit mit dem ZNS als mit den Strukturen des peripheren Nervensystems (Jessen und Mirsky, 1983, S. 2206). Einige Charakteristika wie die strukturelle und funktionelle Integration interstitieller Zellen (ICCs) in die neuromuskuläre Signalübertragung sind bislang nur im ENS beobachtet worden (Ward und Sanders, 2001, S. 125).

Eine zentrale Aufgabe des enterischen Nervensystems liegt in der Steuerung gastrointestinaler Motilität, die die Grundlage für Aufnahme, Passage, Verdauung und Resorption der Nahrung, für die Exkretion stuhlpflichtiger Substanzen und für die Aufrechterhaltung der Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase des Organismus darstellt (Kunze und Furness, 1999, S. 117). Darüber hinaus reguliert das ENS die intestinale Sekretion sowie die regionale, bedarfsadaptierte Durchblutung des Verdauungstrakts und ist im Rahmen neuroimmunologischer Vorgänge an der Abwehr von Krankheitserregern und an Entzündungsprozessen beteiligt. Angeborene Defekte im Bereich des ENS führen zu einer Reihe definierter Krankheitsbilder (z.B. kongenitales Megacolon), erworbene Schädigungen treten entweder isoliert (z.B. Achalasie) oder im Rahmen einer Mitbeteiligung bei Systemerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) auf (Goyal und Hirano, 1996, S. 1106). Die Rolle des ENS bei der Entstehung und Aufrechterhaltung chronisch-

entzündlicher Darmerkrankungen sowie die pathophysiologische Relevanz des ENS in der Genese funktioneller Magen-Darm-Erkrankungen (funktionelle Dyspepsie, irritable Colon) sind Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

Enterische Neurone und Gliazellen stellen die kleinsten Funktionseinheiten des enterischen Nervensystems dar, doch die Erforschung ihrer Struktur und Funktion ist durch die komplexe strukturelle Organisation des ENS und die feste Integration dieser Strukturen in die Wandstruktur des Verdauungskanals erschwert. Die Herauslösung enterischen Nervengewebes aus den Umgebungsstrukturen und die Entwicklung von Zellkulturmodellen ermöglichte in einzigartiger Weise, Struktur, Entwicklung, Physiologie und Pathophysiologie enterischer Neurone und Gliazellen *in vitro* zu studieren (Saffrey et al., 1992, S. 93). Die meisten bislang etablierten Zellkulturmodelle griffen dabei, meist aus technischen Überlegungen, auf das Gewebe neugeborener Versuchstiere zurück, was aber die Übertragbarkeit experimenteller Befunde auf die Verhältnisse im adulten Organismus einschränkt (Schäfer und Mestres, 1997, S. 1171). Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Präparationstechnik, die die Isolierung myenterischen Nervengewebes aus dem Dünndarm der adulten Ratte und die Etablierung und Charakterisierung einer Primärzellkultur aus adultem myenterischen Nervengewebe erlaubt.

Die Charakterisierung des gasförmigen Radikals Stickstoffmonoxid als ubiquitär im Organismus verbreiteter Botenstoff hat auch zur Entdeckung seiner zentralen Funktion in der Physiologie und Pathophysiologie des Gastrointestinaltrakts geführt (Sanders und Ward, 1992, S. 379). Im enterischen Nervensystem fungiert NO als Überträgerstoff der nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC) Inhibition und Relaxation. Zielstrukturen der NO-Wirkung sind enterische Neurone, interstitielle Zellen nach Cajal und die glatte Muskulatur des Verdauungstrakts (Shuttleworth et al., 1993; Ward und Sanders, 2001, S. 125). NO wird in enterischen Neuronen von einer Reihe von Isoenzymen (Saur et al., 2000, S. 849), den neuronalen NO-Synthasen (nNOS), synthetisiert und entfaltet seine spezifische Wirkung durch Aktivierung des cGMP/cGK-Signaltransduktionssystems. Von zentraler Bedeutung für die Motilität im gesamten Gastrointestinaltrakt ist die NO-vermittelte Relaxation glatter Muskulatur. Fehlende NO-Synthese oder Defekte in der NO-abhängigen Signaltransduktionskaskade sind mit schweren Funktionsstörungen (z.B. Achalasie,

hypertrophe Pylorusstenose) assoziiert, die durch die mangelnde Erschlaffung gastrointestinaler Muskulatur zustande kommen (Pfeifer et al., 1998, S. 3045).

Entscheidend für Tonus und Kontraktilität glatter Muskulatur ist die intrazelluläre Konzentration freier Calciumionen (Sanders, 2001, S. 1438). Kontrahierende Stimuli führen zu einem meist rezeptorvermittelten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration, wodurch der kontraktile Apparat aktiviert wird. Die relaxierende Wirkung von NO auf glatte Muskelzellen beruht in erheblichem Maße auf einer Beeinflussung des intrazellulären Calciumsignalstoffwechsels. Ziel dieser Arbeit war es, an kultivierten humanen Colonmuskelzellen die fluorimetrische Messung der intrazellulären Calciumkonzentration zu etablieren, Stimulus-induzierte Calciumsignale zu charakterisieren und den Effekt von NO auf die Stimulus-induzierte Calciumfreisetzung und die darin involvierten Signaltransduktionsmechanismen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1. Präparationstechnik

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere für die Präparation myenterischen Nervengewebes dienten weibliche CD-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 150 – 200 g, was einem Alter von etwa 8 Wochen entspricht. Die Ratten wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten und 12h vor der Organentnahme nur noch mit Wasser ernährt. Die Tiere wurden schließlich durch Einleiten von Kohlendioxid in den Käfig betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Für sämtliche Tierversuche lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor.

2.1.2 Isolierung der longitudinalen Dünndarmmuskulatur mit dem myenterischen Plexus (LMMP-Streifen)

2.1.2.1 Entnahme des Dünndarms

Für die Präparation myenterischer Ganglien wurden jeweils 2 Ratten verwendet. Nach sorgfältiger Desinfektion der Bauchwand mit 70%-igem Ethanol wurde die Bauchhöhle durch einen abdominellen Längsschnitt eröffnet. Das Duodenum wurde mit einer Präparationsschere vom Pylorus abgetrennt und der gesamte Dünndarm bis zum Caecum unter sorgfältiger Durchtrennung des Mesenteriums freipräpariert. Nach Abtrennung circa 2 cm proximal der Ileocoecalklappe wurde das Präparat entnommen und in Stücke von jeweils etwa 5-8 cm Länge zerteilt. Die Darmstücke wurden bis zur weiteren Verwendung in eiskaltem Präparationspuffer aufbewahrt, dessen pH-Wert auf 7.4 eingestellt war.

Präparationspuffer

0.1 M PBS (Apotheke des Klinikums Rechts der Isar)

1 g/l Glukose (Sigma, München)

25 mM Hepes (Merck)

Phosphate buffered saline (PBS)

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	1,44 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,20 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

2.1.2.2 Abpräparation der longitudinalen Muskelschicht mit anhängendem myenterischen Plexus

Zur Abpräparation der Muskelschicht mit longitudinalem Faserverlauf, die in der Lamina muscularis propria des Dünndarm den äußeren, der Serosa zugewandten Anteil darstellt, wurden die einzelnen Darmstücke mit der Serosa nach außen über eine geeignete Glaspipette gestülpt. Durch vorsichtiges Einritzen der Darmwand entlang des ehemaligen Mesenterialansatzes wurde die Serosa und die Längsmuskelschicht durchtrennt, ohne daß die Darmwand komplett einriß. Durch vorsichtige Manipulation mit einem in Präparationspuffer getauchten, fusselfreien Präzisionswischtuch (Kimberley-Clark) wurde dann die Längsmuskelschicht mit anhängendem myenterischen Plexus zirkulär als dünnes Gewebshäutchen von der Außenfläche der Darmsegmente abpräpariert und in eiskalten Präparationspuffer aufgenommen.

2.1.2.3 Mikroskopie der LMMP-Streifen

Zur Kontrolle des Präparationserfolgs wurden kurze Segmente der frisch abpräparierten LMMP-Streifen als Häutchenpräparat auf einem Objektträger ausgespannt und für 4 Minuten in Acetonlösung (-20°C) fixiert. Nach Auswaschung der Fixierlösung mit 0,1 M PBS wurden die Präparate dann für 10 Minuten in 0,1% Methylenblaulösung (Sigma) gefärbt, in PBS gewaschen und in Ethanollösung ansteigender Konzentration entwässert. Schliesslich wurden die Präparate mit einem Deckglas versehen und lichtmikroskopisch (Zeiss Axioplan) beurteilt.

2.1.3 Isolierung myenterischer Ganglienkomplexe

2.1.3.1 Enzymatische Behandlung der LMMP-Streifen

Um den myenterischen Plexus aus den frisch abpräparierten LMMP-Streifen herauszulösen, wurde das Gewebe zunächst einem Verdauungsschritt unterzogen. Dazu wurden die LMMP-Streifen in 10 ml vorgewärmte Verdauungslösung (1 mg/ml Collagenase CLS 2, Worthington Biochemicals; 1 mg/ml DNase Typ II, Boehringer Mannheim; 1 M PBS, pH 7.4) übertragen und unter sanftem Schütteln im Wasserbad bei 37° C für insgesamt 45 Minuten inkubiert.

2.1.3.2 Mechanische Dissoziation des Gewebes

Um eine optimale Abtrennung der Muskulatur von den neuronalen Strukturen des myenterischen Plexus zu erzielen, wurde die Gewebesuspension während des Enzymverdaus nach 15 und 30 Minuten Inkubationszeit für jeweils 2 s und am Ende der Inkubation für 20 s bei mittlerer Geschwindigkeit auf einem Reagenzglasschüttler durchmischt. Um größere, unverdaute Gewebstücke zu eliminieren, wurde die Gewebssuspension danach durch ein Präzisionsstahlsieb (Sigma, München) mit einer Maschenweite von 500 µm gegossen. Der Filtrerrückstand, der unvollständig dissoziierte LMMP-Fragmente enthielt, wurde verworfen, das Filtrat bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Die Verdauungslösung im Überstand wurde abgenommen und verworfen, die Pellets wurden in eiskaltem Präparationspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 10 ml Präparationspuffer in einer Petrischale resuspendiert.

2.1.3.3 Aufnahme der Ganglienkomplexe

Zu diesem Zeitpunkt enthielt die Pufferlösung einzelne Ganglien sowie grössere Fragmente des myenterischen Plexus. Die Zellkomplexe wurden nun in der Übersichtsvergrößerung unter einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiovert) aufgrund ihrer typischen Morphologie identifiziert und unter mikroskopischer Sicht nacheinander mit einer 35 µl-Mikropipette (Clay Adams) aspiriert und in auf Eis lagernde Cups (Eppendorf) übertragen. Das auf diese Weise gewonnene Nervengewebe wurde entweder sogleich für die Zellkulturexperimente verwendet oder zunächst durch weitere enzymatische Dissoziation in Einzelzellen und Zellaggregate gespalten.

2.1.4 Isolierung myenterischer Neurone

2.1.4.1 Enzymatische Andauung isolierter myenterischer Ganglien

Für die weitere enzymatischen Aufspaltung der frisch isolierten myenterischen Ganglien wurde die Gangliensuspension zunächst in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf) bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtiger Abnahme der Überstände wurden die Pellets in insgesamt 1 ml vorgewärmter 0.05% Trypsinlösung (Gibco, pH 7.4) resuspendiert, in ein steriles Cup übertragen und bei 37°C im Wasserbad für 15 min inkubiert.

2.1.4.2 Mechanische Dissoziation der Ganglienkomplexe in Einzelzellen und Zellaggregate

Nach dem Verdau wurde das Cup für einige Sekunden auf einem Reagenzglasschüttler (Vortexer, Heidolph) durchmischt und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Trypsinlösung wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in 1ml Präparationspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert, um die Trypsinlösung vollständig auszuwaschen. Das Pellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Suspension zur mechanischen Dissoziation der Zellaggregate mehrmals langsam durch eine 25 G-Kanüle in eine 3 ml Spritze gesaugt. Die entstandene Zellsuspension wurde umgehend für die Primärkultivierung verwendet.

2.1.4.2 Trypanblaufärbung

Zur Optimierung der einzelnen enzymatischen und mechanischen Dissoziationsschritte sowie zur Überwachung des Präparationserfolgs wurde die Vitalität der Ganglienzellen auf verschiedenen Präparationsstufen mit einer konventionellen Trypanblaulösung überprüft. Dazu wurden 50 µl der jeweiligen Zellsuspension mit 50 µl Trypanblaulösung 0.16% (Gibco) vermischt und nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Transmissionslicht mikroskopiert. Der Anteil lebender Zellen wurde durch Erfassung des Färbeverhaltens der jeweils ersten 100 mikroskopierten Zellen abgeschätzt.

2.2 Zellkulturtechnik

2.2.1 Primärkultivierung myenterischen Nervengewebes

2.2.1.1 Kulturmedium und Lösungen

Für die Primärkultivierung enterischen Nervengewebes wurde mit fetalem Kälberserum supplementiertes Medium 199 der Firma GibcoBRL verwendet. Alle Medien, Zusätze und Reagenzien wurden entweder autoklaviert (121°C, 20 min, 2 bar) oder sterilfiltriert (Sterilfilter, 0.2 µm, NUNC).

Kulturmedium Nervengewebe

Medium 199 (GibcoBRL) mit folgenden Zusätzen:

4 g/l Glucose

10% Fetal Bovine Serum (GibcoBRL).

1% N₂-Supplement (GibcoBRL)

10 µg/ml DNase (Boehringer Mannheim)

100 E/ml Penicillin G (GibcoBRL)

100 µg/ml Streptomycin (GibcoBRL)

2.5 µg/ml Amphotericin (GibcoBRL)

Für die Primärkultivierung frisch isolierten myenterischen Nervengewebes wurden collagenbeschichtete gläserne Mikroskopiergläser der Stärke 0 verwendet, die in sterile Zellkulturschalen (Ø 60 mm, NUNC) eingelegt wurden. Pro Schale wurden 4 ml Kulturmedium zugegeben. Das Medium wurde alle 48 h durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium ersetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37° C, gesättigter Luftfeuchte und einem CO₂-Gehalt von 5% in Raumluft in einem CO₂-Inkubator.

2.2.1.2 Beschichtung der Zellkulturslides

Myenterisches Nervengewebe wurde als adhärentes Gewebe kultiviert. Um die Anhaftung des frisch isolierten Gewebes an die Glasoberfläche der verwendeten Mikroskopiergläser zu verbessern, wurden diese vorbeschichtet. Als optimal erwies sich eine Beschichtung mit Collagen Typ 1 (rat tail collagen type I, Collaborative Biomedical Products). Die Collagenlösung wurde dazu in steriler 0,05% Essigsäure auf eine Endkonzentration von 0.20 mg/ml verdünnt, auf die Anhaftungsfläche aufgetragen (1ml pro Mikroskopierglas) und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Um

Essigsäurereste zu entfernen wurden die Kulturschalen danach mit sterilem Aqua dest. gespült und unter sterilen Bedingungen getrocknet.

2.2.1.3 Kultivierung frisch isolierter Ganglienkomplexe

Für die Anlage einer Primärzellkultur aus frisch isolierten myenterischen Ganglien und größeren isolierten Fragmenten des myenterischen Plexus wurde die Pufferlösung, die die aufgesammelten Ganglienkomplexe enthielt, zunächst für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und die Pellets in Kulturmedium resuspendiert. Je 750 µl der Gewebesuspension wurde nun auf insgesamt sechs kollagenbeschichtete Mikroskopiergläser aufgetragen und umgehend in den Inkubator eingestellt. Nach fünf Stunden wurden die Kulturschalen auf insgesamt 4 ml Kulturmedium aufgefüllt, 24 Stunden nach der Aussaat wurde die Nährlösung erstmals ausgetauscht.

2.2.1.4 Kultivierung frisch isolierter Einzelzellen

Für die Anlage einer Primärzellkultur aus frisch dissoziierten myenterischen Einzelzellen und Zellaggregaten wurden jeweils 100 µl der gewonnenen Zellsuspension umgehend auf die mit Collagen vorbeschichteten, in Zellkulturschalen eingebrachte Zellkulturslides aufgetragen, vorsichtig verteilt und zum Anwachsen in den Inkubator eingestellt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden wurden die Kulturschalen vorsichtig mit jeweils 3,5 ml vorgewärmten Kulturmedium aufgefüllt. 24 Stunden nach Aussaat der Zellen wurde das Medium erstmals ausgetauscht. Weitere Mediumwechsel schlossen sich nach jeweils 48h an.

2.2.2 Kultivierung humaner Colonmuskelzellen

2.2.2.1 Zellmaterial

Für die Untersuchung der Stickstoffmonoxid-abhängigen Signaltransduktionsmechanismen in der glatten Muskulatur des Verdauungskanals auf zellulärer und subzellulärer Ebene wurde eine kommerziell erhältliche Zellkultur humaner Colonmuskelzellen verwendet. Die kryopräservierten Zellen wurden von der Firma Clonetics Normal Human Cell Systems bezogen und stammen aus dem Colon eines einzelnen humanen Spenders. Die Auslieferung erfolgt nach der dritten Passagierung nach der Primärkultivierung. Da es sich nicht um eine immortalisierte Zelllinie, sondern um primärkultivierte humane Zellen handelt, die durch eine spezielle Zusammensetzung des Kulturmediums für eine begrenzte Anzahl an Passagen in differenziertem Zustand gehalten werden (nach Firmenangabe für 15

Verdoppelungszyklen nach initialer Aussaat), wurden für alle Experimente Zellen aus der 4. und 5. Passage verwendet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den in-vivo-Verhältnissen beim Menschen zu gewährleisten.

2.2.2.2 Kulturmedium und verwendete Lösungen

Humane Colonmuskelzellen wurden in einem den Empfehlungen der Herstellerfirma entsprechendem Kulturmedium gezüchtet.

Kulturmedium Muskelzellen

SmBM (smooth muscle basal medium, Bio Whittaker) mit folgenden Zusätzen (Bio Whittaker):

5% Fetal Bovine Serum

0,5 µg/l Human Recombinant Epidermal Growth Factor (hEGF)

5 mg/l Insulin

0,39 mg/l Dexamethasone,

50 mg/l Gentamicine

50µg/l Amphotericin B

Das Kulturmedium wurde 24h nach der Aussaat aus der Kryopräservation und danach alle 48 h ausgetauscht. Die Menge des verwendeten Mediums wurde in Abhängigkeit von der Konfluenz der Zellen gewählt.

Kulturmedium pro cm² Wachstumsfläche	Grad der Konfluenz kultivierter humaner Colonmuskelzellen
1 ml pro 5 cm ²	< 25% Konfluenz
1,5 ml pro 5 cm ²	25 – 45% Konfluenz
2 ml pro 5 cm ²	> 45% Konfluenz

Tabelle 1: Menge des verwendeten Kulturmediums bei der Kultivierung humaner Colonmuskelzellen in Abhängigkeit der Zelldichte

2.2.2.3 Aussäen der Muskelzellen

Humane Colonmuskelzellen wachsen in vitro als adhärenente Kulturen in Form eines an Zellkulturplastik gebundenen, konfluierenden Monolayers. Die auf Trockeneis ausgelieferten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -200°C aufbewahrt und vor der Aussaat innerhalb weniger Minuten im Wasserbad über den Gefrierpunkt erwärmt. Die absolute Zellzahl wurde durch Auszählung eines Aliquots in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat in vier äußeren Quadranten der Zählkammer ermittelt und die Zellzahl pro μl Zellsuspension durch Multiplikation mit dem Faktor 10 errechnet. Die Zellen wurden schließlich in einer Dichte von etwa 3500 Zellen pro cm^2 Anwachfläche in vorgewärmtem Kulturmedium in sterilen Zellkulturflaschen (NUNC) ausgesät.

2.2.2.4 Passagieren, Ernten und Kryopräservierung humaner Colonmuskelzellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 90% gezüchtet, bevor sie einer erneuten Passagierung unterzogen wurden. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit HEPES Balanced Salt Solution (HBSS, Bio Whittaker) gespült und mit etwa 0.12 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Bio Whittaker) pro cm^2 Kulturoberfläche solange inkubiert, bis die Zellen durch leichtes Schütteln des Kulturgefäßes abzulösen waren.

Trypsin / EDTA – Lösung

0,025% Trypsin

0,01% EDTA in HBSS

Der Andauungsprozeß wurde durch Zugabe von gleichen Mengen „Trypsin Neutralizing Solution“ (TNS, Bio Whittaker) gestoppt, die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert.

Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl pro μl in der Zählkammer ermittelt und die Zellen erneut ausgesät.

Für eine erneute Kryopräservierung der Zellen wurden die Pellets in Einfriermedium resuspendiert, in sterile Spezialröhrchen (Cryogenic Vials, Nalgene) überführt und für

einige Stunden bei -70°C tiefgefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff konserviert wurden.

Einfriermedium

Kulturmedium unter Zusatz von
10% DMSO (Merck)
10% Fetal Bovine Serum (Gibco)

2.3 Immunfluoreszenzfärbungen an kultivierten enterischen Neuronen und Gliazellen

2.3.1 Fixierung der Kulturen

Für die Durchführung immunhistochemischer Experimente wurde frisch isoliertes myenterisches Nervengewebe wurde 5-7 Tage in Kultur gehalten, bevor es für die weitere Bearbeitung fixiert wurde. Für die Fixierung wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet.

2.3.1.1 Fixierung mit Paraformaldehydlösung

Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Kulturen mit PBS gespült, um Mediumrückstände vollständig zu entfernen. Danach wurden die Kulturen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in frisch zubereiteter 4% Paraformaldehydlösung (in PBS, pH 7.4) inkubiert. Die Paraformaldehydlösung wurde verworfen und die Präparate gründlich mit PBS gespült.

2.3.1.2 Fixierung mit Methanol/Aceton

Eine anteilsgleiche Mischung aus Methanol und Aceton wurde auf -20°C vorgekühlt. Nach Entfernung des Kulturmediums und Waschen in PBS wurden die Kulturen für 10 Minuten bei -20°C mit der Aceton-/Methanollösung inkubiert und anschließend gründlich mit PBS gespült.

2.3.1.3 Permeabilisierung fixierter Zellen

Nach gründlichem Auswaschen der Fixierlösungen mit PBS wurden die fixierten Zellen vor der Durchführung der Immunreaktionen permeabilisiert, um eine optimale Zugänglichkeit zu den antigenen Determinanten zu gewährleisten. Dazu wurden die

Präparate für 15 Minuten mit einer Detergenz-haltigen Permeabilisierungslösung inkubiert. Nach gründlicher Auswaschung mit PBS wurden die fixierten und permeabilisierten Kulturen bis zur weiteren Verwendung mit 0.1% NaN₃ in PBS bedeckt und bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3.2 Immunhistochemischer Nachweis neuronen- und gliaspezifischer Antigene und der neuronalen NO-Synthase

2.3.2.1 Verwendete Antikörper

Primärantikörper

Für die immunochemische Identifizierung myenterischer Neurone in der vorliegenden Mischkultur aus den verschiedenen Zelltypen eines myenterischen Ganglions wurde entweder ein gegen die Neuron-spezifische Enolase gerichteter, monoklonaler Antikörper aus der Maus verwendet (Dako MAB Anti-NSE, 1:40 in Blockierlösung) oder ein gegen Neurofilament gerichteter monoklonaler Mausantikörper (Alexis;1:40 in Blockierlösung) verwendet.

Zur Identifizierung enterischer Glia wurde ein gegen GFAP (glial fibrillary acidic protein) gerichteter, polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen verwendet (Dianova; 1:100 in Blockierlösung)

Für den immunhistochemischen Nacheis der neuronalen NO-Synthase wurde ein monoklonaler, gegen die n-terminale Domäne der Proteinkette gerichteter, monoklonaler Antikörper aus der Maus verwendet (Transduction laboratories;1:20 in Blockierlösung).

Antikörperspezifität	Verdünnung	Spezies	Herstellerfirma
Neurofilament	1:40	Maus (monoklonal)	Alexis
Neuron-spez. Enolase	1:40	Maus (monoklonal)	Dianova
GFAP	1:100	Kaninchen (polyklonal)	Dianova
nNOS	1:20	Maus (monoklonal)	Transduction

Tabelle 2: Bei der immunzytochemischen Charakterisierung kultivierten myenterischen Nervengewebes verwendete Primärantikörper

Sekundärantikörper

Für den Nachweis Antigen-gebundener Primärantikörper aus der Maus wurde ein FITC-konjugierter Donkey-anti-mouse-IgG-Antikörper der Firma Dianova verwendet. Für den Nachweis antigengebundener Kaninchenantikörper wurde ein LRSC-konjugierter Donkey-anti-rabbit-IgG-Antikörper herangezogen. Beide Sekundärantikörper waren gegen Immunglobulin der Ratte präabsorbiert.

2.3.2.2 Immunreaktion

Die gegen die nachzuweisenden antigenen Determinanten gerichteten Primärantikörper wurden in Blockierlösung verdünnt und auf die fixierten Kulturen aufgetragen. Nach 24h Inkubation im Kühlschrank bei 4° C wurden die Präparate gründlich mit PBS gespült und standen für die Detektionsreaktion zur Verfügung.

2.3.2.3 Detektionsreaktion

Zur immunologischen Detektion Antigen-gebundener Primärantikörper und zum fluoreszenzoptischen Nachweis der Zielantigene wurden an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper der Firma Dianova verwendet, die gegen Immunglobulin G (H+L-Ketten) der Spenderspezies des verwendeten Primärantikörpers gerichtet waren. Die Sekundärantikörper wurden in Blockierlösung verdünnt und unter Lichtabschluß für 1 Stunde auf die Präparate aufgetragen. Nach Spülen mit PBS wurden die Mikroskopiergläser mit dem fixierten und gefärbten Gewebe mit einem Tropfen „Anti-fade mounting medium“ (Sigma) versehen und mit einem Mikroskopierdeckglas eingedeckt, dessen Ränder mit Nagellack fixiert wurden.

Die fluoreszenzoptische Detektion erfolgte bei Exzitationswellenlängen von 488 nm (FITC) und 580 nm (LRSC) mit einem Zeiss Axiovert Mikroskop, das mit Zeiss-Fluar und -Neofluar Fluoreszenzobjektiven ausgerüstet war. Dokumentiert wurden die Ergebnisse mit einer Nikon Spiegelreflexkamera auf handelsüblichem Film.

2.3.3 Verwendete Lösungen

Paraformaldehydfixierung

4g Paraformaldehyd (Merck)

ad 100 ml PBS

unter Rühren bei ca. 70°C gelöst

Methanol/Ethanol-Fixierung

50ml Aceton

bei -20°C

Permeabilisierungslösung

0,2% Triton X-100 (Biorad)

in PBS

Blockierlösung

10% Normal Donkey Serum (NDS, Dianova)

0.1% Natriumazid

in PBS

2.4 Fluoreszenzmikroskopische Calciummessung an kultivierten humanen Colonmuskelzellen

2.4.1 Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff

Die Abschätzung der intrazellulären Konzentration von Calciumionen sowie die Quantifizierung und Visualisierung deren relativer Veränderung im Rahmen von Signaltransduktionsprozessen in vitalen und stoffwechselaktiven kultivierten Colonmuskelzellen wird durch die Verwendung des fluoreszierenden Calciumchelators Fura-2 in dessen membranpermeabler Form als Acetoxymethylester (Fura-2 AM) möglich. Der Ester penetriert die Zellmembran und wird von intrazellulären unspezifischen Esterasen unter Freisetzung von Fura-2 gespalten. Fura-2 bindet freie intrazelluläre Calciumionen und ändert dabei sein Fluoreszenzexcitationsmaximum von 380 nm auf 340 nm bei unverändertem Fluoreszenzemissionsmaximum bei 510 nm, was videofluorimetrisch durch sequentielle Exzitation mit beiden Wellenlängen gemessen werden kann. Der Quotient aus den beiden gemessenen Intensitäten (ratio 340/380) ist der intrazellulären Calciumkonzentration direkt proportional. Nach Kalibrierung dieses Meßsystem läßt sich im Bereich typischer intrazellulärer Calciumkonzentrationen relativ genau die absolute Konzentration freier Calciumionen ermitteln.

2.4.2 Digitalisierte fluorimetrische Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationsänderungen

Die fluorimetrische Messung relativer Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration in kultivierten humanen Colonmuskelzellen wurde mit einem Zeiss Axiovert Inversionsmikroskop, das mit einem Zeiss Neofluar Fluoreszenzobjektiv (40x) und einer digitalen Videofluoreszenzkamera ausgestattet war, durchgeführt. Die registrierten Fluoreszenzemissionsintensitäten wurden digitalisiert auf ein angeschlossenes Rechnersystem übertragen, quantifiziert und in Form zweidimensionaler, intensitätsanaloger Darstellungen auf Bildschirm übertragen. Die verwendete Software (Attofluor Digital Imaging System, Rockville) ermöglicht die interaktive Umrandung der Bereiche (regions of interest, ROI), deren Meßpunkte für die Auswertung herangezogen werden sollen. Die durchschnittlichen Fluoreszenzemissionsintensitäten innerhalb der einzelnen markierten Bereiche während der unmittelbar nacheinander erfolgenden Exzitation mit Fluoreszenzlicht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm werden gemessen, zueinander ins Verhältnis gesetzt (ratio 340/380) und in Abhängigkeit von der Zeitachse graphisch dargestellt. Die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Wertepaarmessungen waren in Sekundenschritten frei wählbar. Um aus den so gewonnenen Fluoreszenzintensitätsquotienten (ratios) die absolute intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) berechnen zu können, wurde das System am Ende eines Versuches kalibriert.

2.4.3 Versuchsaufbau und Durchführung der Experimente

2.4.3.1 Beladung der Zellen mit Fura-2 AM

Für die Durchführung der Calcium-Imaging Versuche wurden humane Colonmuskelzellen für einige Tage in Kulturmedium auf runden gläsernen Objektträgern (\varnothing 42 mm) der Stärke O gezüchtet. Nach dem Erreichen einer mittleren Zelldichte wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mehrmals mit vorgewärmten Superfusionspuffer gespült.

Superfusionspuffer

118 mmol NaCl

4,7 mmol KCl

1,8 mmol CaCl₂

10 mmol Hepes

15 mmol NaHCO₃

11 mmol Glucose

0.9 mmol NaH₂PO₄

0,8 mmol MgSO₄

ad 1000 ml aquam dest., pH 7,4

Zur Beladung der Zellen mit Fura-2 AM wurde der Fluoreszenzfarbstoff in DMSO gelöst und in Superfusionspuffer auf 5 µmol/l verdünnt. Die Zellen wurden unter Lichtabschluß bei 37° C für 30 Minuten mit der Farbstofflösung inkubiert, gespült und für weitere 30 Minuten mit Superfusionspuffer inkubiert, um die vollständige intrazelluläre Hydrolyse des Esters zu gewährleisten.

2.4.3.2 Aufbau des Superfusionskammersystems

Nach Beladung der kultivierten Zellen mit Fura-2 AM wurden die Objektträger mit dem Zellmaterial nach oben in eine 3 ml Pufferlösung fassende Superfusionskammer aus Aluminium montiert und in den Strahlengang des Videofluoreszenzmikroskopes eingestellt. An die Superfusionskammer wurde eine zu- und eine abführende Schlauchleitung angeschlossen, die beide mit einer nichtpulsatilen Schlauchpumpe verbunden waren. Der zuführende Ast wurde aus einem auf 37° C erwärmten Pufferreservoir gespeist. Die kultivierten Zellen wurden während der Versuche kontinuierlich mit auf 37° C vorgewärmten Superfusionspuffer überspült. Die Flußgeschwindigkeit betrug konstant 5 ml pro Minute, die Flüssigkeitsmenge in der Superfusionskammer wurde während eines Versuches auf 2 ml Puffer eingestellt, damit die gewünschten Stoffkonzentrationen in der Kammer in kurzer Zeit erreicht werden. Die getesteten biochemischen Stimuli und Modulatoren waren in der gewünschten Konzentration in Superfusionspuffer gelöst und wurden während der Stimulationsphasen anstelle des Superfusionspuffers verabreicht.

2.4.3.3 Konfiguration des digitalen Videofluoreszenzsystems

Nach adäquater Fokussierung der kultivierten Zellen im Strahlengang des Mikroskops wurde ein geeigneter Bildausschnitt eingestellt und eine erste zweidimensionale Fluoreszenzintensitätsabbildung auf den Arbeitsbildschirm übertragen. Anhand dieser ersten Probemessung wurden mit Hilfe der Software Meßparameter wie Signalintensitätsverstärkung und Hintergrundsubtraktion festgelegt und die Meßbereiche (ROIs) markiert. Dazu wurden die fluoreszierenden Zelloberflächen mit einem interaktiven Cursor umrandet, wobei Sorgfalt darauf verwendet wurde, die Meßbereiche vollständig innerhalb der Zelloberflächen anzulegen.

2.4.3.4 Versuchsprotokoll

Nach Einbringen der Zellen in die Superfusionskammer wurden die Zellen zunächst für 15 Minuten mit Superfusionspuffer äquilibriert, bevor die Messung gestartet wurde. Der Abstand zwischen den einzelnen Wertepaarmessung betrug 1s. Nach 300 s wurde die erste Stimulation durchgeführt. Dabei wurden die Zellen für 60 s dem zu testenden biochemischen Agens ausgesetzt. Alle Zellen wurden mehrmals stimuliert, wobei zwischen den einzelnen Stimulationen jeweils für 300 s mit leerem Superfusionspuffer gespült wurde. Für Experimente, bei denen stimulationsmodulierende Substanzen wie Rezeptorblocker oder Enzymmodulatoren eingesetzt wurden, wurden diese für insgesamt 5 Minuten verabreicht, wobei die Applikation 2 Minuten vor der Stimulation begonnen wurde. Für Versuche in calciumfreien Milieu wurde CaCl_2 – freier Superfusionspuffer verwendet, dem 1 mM EGTA zugesetzt war.

Am Ende eines Versuches wurde die Systemkalibrierung durchgeführt. Dazu wurde der Pufferlösung unter Fortführung der Messung zunächst 10 μM Ionomycin (Calbiochem) zugesetzt und diese nach 2 Minuten durch calciumfreien, 100 mM EDTA enthaltenden Puffer ersetzt.

2.4.4 Datenauswertung und -präsentation

2.4.4.1 Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitätsquotienten

Das Verhältnis der Fluoreszenzemissionsintensitäten nach sequentieller Stimulation bei 340 nm und 380 nm (ratio 340/380) ist zur tatsächlichen Konzentration freier intrazellulärer Calciumionen direkt proportional. Die Kalibrierung des Fura-2 Meßsystems nach der Zweipunkt–Standardisierungsgleichung ermöglicht die Angabe molarer Konzentrationen intrazellulären Calciums als Annäherung an die tatsächlichen Verhältnisse. Da die Kalibrierung auch eigenen Erfahrungen nach zahlreichen Störfaktoren unterliegt, wurde für die graphische und statistische Auswertung der Versuche die Angabe der Fluoreszenzintensitätsquotienten bevorzugt und in den Graphen die Zeitachse gegen die ratio 340/380 aufgetragen. Dargestellt wurden für die jeweiligen Versuchsreihe repräsentative Kurvenverläufe, für die statische Auswertung und für die Darstellung in Säulendiagrammen wurde der jeweils maximal erreichte Fluoreszenzintensitätsquotient (peak ratio) in den Kurvenverläufen einzelner Zellen herangezogen.

2.4.4.2 Abschätzung der molaren intrazellulären Calciumkonzentration

Zur näherungsweisen Berechnung der molaren intrazellulären Konzentration freier Calciumionen wurde die Zweipunkt – Kalibrierungsformel verwendet.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{LO}) / (R_{HI} - R)] \beta,$$

wobei K_d = Dissoziationskonstante des Fura-2 - Calciumkomplexes (225 nm),

$R = F_{334} / F_{380}$ (Quotient der Fluoreszenzintensitäten),

R_{LO} = Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 0 mM Calcium in Anwesenheit von 1 mM EGTA,

R_{HI} = Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei maximaler Calciumsättigung, bestimmt nach Zugabe des Calciumionophores Ionomycin (10^{-5} M),

$\beta = F_{380}(0 \text{ mM Calcium}) / F_{380}(\text{gesättigt mit Calcium})$.

2.4.4.3 Pseudocolor-Images

Mit Hilfe der verwendeten Software wurden die videofluoreszenzmikroskopisch gemessenen Fluoreszenzintensitätsquotienten eines Gesichtsfeldes auf dem Arbeitsbildschirm als zweidimensionales Abbild dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung der Meßwerte innerhalb der Zelloberflächen wurden für die

Bildschirmdarstellung Farbskalen verwendet, wobei den gemessenen Fluoreszenzratios kontinuierlich ineinander übergehende Farben zugeordnet werden, so daß die Zelloberflächen als Pseudofarbabbildungen erscheinen und Konzentrationsänderungen des intrazellulären Calciums optisch nachvollzogen werden können.

2.4.4.4 Statistik

Alle Daten wurden Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Anzahl untersuchter Einzelzellen wurde mit n angegeben. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der Student's t-test für gepaarte Stichproben verwendet. Als signifikant wurden Werte von $p < 0.05$ betrachtet. Jede Zelle wurde mehrfach stimuliert und diente als ihre eigene Kontrolle. Parallelexperimente ohne das untersuchte Agens wurden in der gleichen Population durchgeführt, um Effekte, die allein auf repetitiver Stimulation beruhen, auszuschließen. Die Zellen eines Objektträgers wurden nur für jeweils einen Versuch verwendet. In die Auswertung wurden die Zellen einbezogen, die durch die verwendeten Stimuli in typischer Weise mit einem transienten Anstieg des intrazellulären Calciums reagierten.

2.5 Immunologischer Proteinnachweis in kultivierten humanen Colonmuskelzellen

2.5.1 Proteinextraktion

2.5.1.1 Zellernte und -zählung

Für den immunologischen Proteinnachweis in kultivierten humanen Colonmuskelzellen wurden Zellen der fünften Passage in 75 cm² Zellkulturflaschen bis zu etwa 90% Konfluenz gezüchtet, bis das Kulturmedium entfernt wurde, die Zellen in PBS gewaschen und schließlich in 5 ml PBS aufgenommen wurden. Dazu wurden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Plastikboden der Kulturflaschen abgelöst und in sterile Zentrifugationsröhrchen überführt. Aus einem

Aliquot der Zellsuspension wurde durch Zählung in der Neubauerkammer die Gesamtzellzahl ermittelt.

2.5.1.2 Zelllyse

Für die Extraktion löslicher und membrangebundener Proteine aus den geernteten humanen Colonmuskelzellen wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und das Pellet in Lysispuffer (50 µl / 5 x 10⁶ Zellen) resuspendiert.

Lysispuffer

0,5 mM EDTA

0,5 mM EGTA

25 mM Tris-HCl

0,5% Triton X-100

2,5% Protease-Inhibitorcocktail (Calbiochem)

Die Zellsuspension wurden zur Unterstützung des Lyseprozesses mehrmals durch eine 25G-Kanüle in eine sterile Einmalspritze gezogen, für 30 Minuten bei – 70° C eingefroren und abschließend einer pulsativen Ultraschallquelle ausgesetzt. Die so gewonnene Proteinlösung wurde bis zur Weiterverarbeitung bei – 70° C aufbewahrt. In einem Aliquot wurde die Proteinkonzentration der Lösung ermittelt.

2.5.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat humaner Colonmuskelzellen wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Systems (BCA Protein Assay Kit, Pierce, USA) durchgeführt, das die Reduktion von Kupferionen durch Protein in alkalischem Medium ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$, Biuret-Reaktion) mit der colorimetrischen Detektion der entstandenen Kupferionen verbindet. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin (Pierce) erstellt. Sämtliche Proben wurden mit dem BCA-Reagenz versetzt und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Intensität der entstandenen Färbung wurde in einem Bio-Rad Microplate-reader quantifiziert. Nach Erstellung einer Standardkurve wurde die Proteinkonzentration im Lysat abgelesen.

2.5.3 Western Blot Analyse

2.5.3.1 Verwendete Lösungen

SDS Gelelektrophoresese

Lösung A

30% Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (Verhältnis 29/1, Roth)

Lösung B

2 M Tris pH 8,8	75 ml
10 % SDS	4 ml
H ₂ O	21 ml

Lösung C

1 M Tris pH 6.8	50 ml
10 % SDS	4 ml
H ₂ O	46 ml

Sammelgel

Lösung A	0,67 ml
Lösung C	1.0 ml
H ₂ O	2.3 ml
10% APS (Fluka)	40 µl
TEMED (Sigma)	10 µl

Trenngel (X%)

Lösung A	X/3 ml
Lösung B	2.5 ml
H ₂ O	7.5 – (X/3) ml
10 % APS	50µl
TEMED	10 µl

4-fach Probenpuffer, pH 6,8

Tris	0,24 g
SDS	0,50 g
β-Mercaptoethanol	2 ml
Bromphenolblau 1 %	400µl
Glycerol	4 ml

5-fach Laufpuffer, pH 8,3

Tris	9,0 g
Glycine	43,2 g
SDS	3,0 g
H ₂ O	ad 10 ml

Elektrotransfer und Immunreaktion

Transferpuffer

Tris	5,8 g
Glycine	29 g
SDS	0,5 g
Methanol	200 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

TBST, pH 7,6

Tris	2,4 g
NaCl	8 g
H ₂ O	1000 ml
Tween 20 (Fluka)	10 ml

<u>Coomassie Blau Lösung</u>		<u>Entfärbelösung</u>	
Coomassie Bau R 250	1,5 g	Essigsäure	100 ml
Methanol	455 ml	Methanol	300 ml
Essigsäure	90 ml	H ₂ O	ad 1000 ml
H ₂ O	ad 1000 ml		

2.5.3.2 Proteinauftrennung in der eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese

In der Western Blot Analyse werden Proteine immunologisch nachgewiesen, die zuvor elektrophoretisch größenfraktioniert aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen worden sind. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-Page) unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli. Durch das anionische Detergens SDS werden alle nichtkovalenten Bindungen werden gespalten, so daß die Proteine in denaturiertem Zustand vorliegen. Zur Auflösung der Disulfidbrücken, die die Quartärstruktur von Proteinen stabilisieren, enthält der Probenpuffer zusätzlich β -Mercaptoethanol als reduzierendes Agens. Die denaturierten Proteine tragen eine stark negative Gesamtladung, so daß sie im elektrischen Feld parallel auf die Anode zulaufen und die relative Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel nur von der Größe der einzelnen Proteinketten abhängt. Die absolute Wanderungsgeschwindigkeit der denaturierten Proteinketten im Gel hängt von der Konzentration der einzelnen Gelbestandteile, insbesondere des Polyacrylamidanteils ab.

Für den Nachweis der cGK 1 β (MW 75000 Da) und von IRAG (MW 125000 Da) wurde jeweils ein 7,5% Polyacrylamidgel verwendet, um eine optimale Proteinauftrennung im Bereich dieser Proteingrößen zu erreichen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem Minigelsystem (Bio-Rad) mit 10 Laufspuren pro Gel. Neben den untersuchten Proteinextrakten wurden eine Mischung vorgefärbter Proteine bekannten Molekulargewichts (9-194kDa) als Größenstandard (Benchmark, Gibco) und das nachzuweisende Protein als Positivkontrolle aufgetragen. Sämtliche Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, 3 Minuten im Heizblock auf 97°C erhitzt und nach Abkühlung auf einem 3% Sammelgel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 60 Minuten bei 200 V in

Laufpuffer. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel vorsichtig aus dem Elektrophoresesystem entfernt und bis zum Elektrotransfer in Transferpuffer äquilibriert. Die Auftrennung der Proteine wie auch die Bloteffizienz wurde durch Färbung der Gele und Membranen mit Coomassielösung (30 Minuten) und anschließender Entfärbung in Entfärbelösung (4h) kontrolliert.

2.5.3.3 Elektrotransfer von Proteinen aus SDS Polyacrylamid-Gelen auf PVDF-Membranen

Nach erfolgreicher elektrophoretischer Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte der elektrische Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran (Bio-Rad). Dazu wurde eine PVDF-Membran zunächst für 10 Minuten in Methanol und danach für 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert und im Sandwichverfahren in speziellen Blotkassetten (Bio-Rad) auf das Gel gelegt und, flankiert von Filterpapier und Faserkissen, im Sandwichhalter in die Transferkammer eingestellt. Der Elektrotransfer erfolgte bei 4 °C in Transferpuffer. Nach erfolgreichem Transfer wurden die Membranen über Nacht in 5 % Milchpulver in TBST bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der aufgetrennten, auf der Membran immobilisierten Proteine zu blockieren.

Protein	Molekulargewicht (Da)	Elektrophorese- bedingungen	Blotbedingungen
cGK 1β	75000	7,5% Gel, 200 V, 1h	180 mA, 1,5 h
IRAG	125000	7,5% Gel, 200 V, 1h	220 mA, 2,5 h

Tabelle 3: Westernblot zum Nachweis der cGK 1β und von IRAG. Elektrophorese- und Blotbedingungen.

2.5.3.4 Antikörperbindung

Nach Blockierung der Proteinbindungsstellen mit Magermilchpulver wurden die Membranen nach gründlichem Waschen in TBST für 2 h mit der Antikörperlösung inkubiert.

Antikörperlösung

5 % BSA

0,05% NaN₃ in TBST

Antikörper	Spezies	Konzentration
Anti-cGK 1β	Kaninchen	1:1000
Anti-IRAG	Kaninchen	1:4000

Tabelle 4: Westernblot zum Nachweis der cGK 1β und von IRAG. Verwendete Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden uns freundlicherweise vom Institut für Pharmakologie der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt, wo sie synthetisiert und für die Verwendung in Western Blots getestet worden sind (Schlossmann et al., 2000; Ruth et al., 1993).

2.5.3.5 Nachweis gebundener Antikörper mittels ECL-Detektion

Nach gründlichem Waschen in TBST erfolgte der immunologische Nachweis des membrangebundenen Primärantikörpers durch Anbindung eines Anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Firma Amersham, der mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert war. Der Sekundärantikörper wurde 1:2500 in 1% Milchpulver in TBST verdünnt und für 2 h mit der Membran inkubiert. Nach Waschen in TBST erfolgte nun der optische Nachweis der membrangebundenen Peroxidaseaktivität mit dem ECL-Detektionssystem der Firma Amersham, das auf der Oxidation von Luminol in alkalischer Lösung in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und HRP beruht. Die dabei entstehende Chemilumineszenz ist in der Lage, einen entsprechend empfindlichen Röntgenfilm zu schwärzen. Dazu wurde die Membran für 2 Minuten mit dem ECL-Reaktionsgemisch inkubiert und danach für 15 Minuten auf einen geeigneten Röntgenfilm aufgelegt (Hyperfilm ECL, Amersham).

2.6 Verwendete Substanzen

Trisaminomethan (Tris), NaCl, KCl, CaCl₂, Hepes, HCl, NaOH, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, MgSO₄, EGTA, EDTA, NaHCO₃, Glukose, NaN₃, Methanol, Ethanol; Essigsäure, SDS, Glycine, Glycerol, 2-Mercaptoethanol, Aceton, DMSO und Bromphenolblau wurden von der Firma Merck bezogen.

BSA, Carbachol wurden von der Firma Sigma bezogen.

Bradykinin, KT 5823; H 89, SNP und ODQ wurden von der Firma Calbiochem bezogen. 2-APB wurde von der Firma Tocris bezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung myenterischen Nervengewebes aus dem Dünndarm der adulten Ratte

3.1.1 Art und Konzentration der Verdauungsenzyme

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer Präparationstechnik, die die Isolierung vitalen myenterischen Nervengewebes aus der Dünndarmwand der adulten Ratte ermöglicht. Dazu musste ein Weg gefunden werden, Segmente des myenterischen Plexus aus der engen strukturellen Verflechtung mit der glatten Muskulatur und den Bindegewebsstrukturen der Darmwand herauszulösen, ohne die dreidimensionalen Strukturen innerhalb eines myenterischen Ganglions zu zerstören. Dazu wurde in Anlehnung an unterschiedliche Präparationstechniken in Vorarbeiten an ähnlichen Modellen (Schäfer et al., 1997, S 1631) eine Kombination aus enzymatischem Verdau, mechanischer Dissoziation des angedauten Gewebes und Aspiration der freigesetzten Segmente des myenterischen Plexus etabliert. Als Gewebespender wurden weibliche CD-Ratten im Alter von etwa 8 Wochen verwendet.

Von der Zirkumferenz der Dünndarmwand wurde zunächst die Längmuskelschicht mit anhängendem myenterische Plexus (siehe 2.1.2.2) abpräpariert. Mit Methylenblau gefärbte Häutchenpräparate (siehe 2.1.2.3) zeigten, daß der auf diese Weise abpräparierte Anteil der Lamina muscularis propria die gesamte Längsmuskulatur, die Strukturen des myenterischen Plexus und, medialwärts gerichtet, eine relativ dünne Schicht zirkulär ausgerichteter Muskelzellen enthielt .

Entscheidend für die qualitative und quantitative Ausbeute der Präparation war die Auswahl einer geeigneten Collagenase. Es wurden mehrere Chargen von Collagenase Typ 2 der Firma Worthington Biochemicals, die sich aus quantitativ unterschiedlichen Anteilen verschiedener Enzymaktivitäten zusammensetzen, in der Etablierungsphase eingesetzt (Tabelle 5).

BATCH	M6H402	M6H400	F5B221	S6B108	M3N214
CLS (U/mg)	243	202	291	338	144
CAS A (U/mg)	1106	892	1123	1258	534
CLOS A (U/mg)	6.80	4.70	0.27	9.90	0.25
TA (U/mg)	0.25	0.17	5.40	0.57	3.40

Tabelle 5: Zusammensetzung der verschiedenen getesteten Chargen roher Collagenase Typ 2 (alle Worthington Biochemicals); Abk.: CLS: Collagenase, CAS A: Caseinase A, TA: Trypsin Aktivität, CLOS A: Clostripain Aktivität

Diese Collagenasen wurden in den Konzentrationen 0.5, 1, 2 und 4 mg/ml Verdauungslösung getestet. Verdauungszeiten bei 37° C betragen jeweils 30, 45, 60, 90 und 120 min. Unter allen getesteten Collagenasen ließ sich mit der Collagenase M6H400 das beste Resultat erzielen (hohe Ganglienausbeute, lichtmikroskopisch gute Abtrennung der glatten Muskulatur). Gute Ergebnisse wurde mit Verdauungszeiten zwischen 30 und 60 min erzielt, wobei bei einer Verdauungszeit von 45 Minuten eine gute Ganglienausbeute und zudem ein sehr geringer Anteil toter Zellen pro Ganglion am Ende der Präparation erreicht wurde, so daß diese Zeitspanne beibehalten wurde.

Als Puffersubstanz für die Verdauungsphase wurde Ca²⁺- und Mg²⁺-freie PBS, die mit Glukose und Hepes supplementiert (siehe 2.1.2.1) war, verwendet. Bei Verwendung calciumhaltiger Puffer (Krebs-Ringer-Lösung) zeigte sich ein deutlich schlechteres Verdauungsergebnis. Als zweites Verdauungsenzym wurde der Verdauungslösung ähnlich wie in Vorgängerarbeiten (Schäfer et al., 1997, S. 1631) Desoxyribonuklease II (Boehringer) in der Konzentration 1 mg/ml zugesetzt, was empirisch zu einer weiteren Verbesserung der Präparationsausbeute führte.

Der Präparationserfolg wurde durch phasenkontrastmikroskopische Beurteilung der Abtrennung glatter Muskelzellen von den Strukturen des MP, durch orientierende Abschätzung der quantitativen Präparationsausbeute und durch Durchführung einer

Trypanblaufärbung im Anschluss an die Isolation beurteilt. Durch Optimierung der Präparations-, Verdauungs- und Dissoziationsbedingungen ließ sich der Anteil abgestorbener Zellen sehr niedrig halten (1-2-Zellen pro Ganglion).

3.1.2 Mechanische Gewebedissoziationstechnik

Um Fragmente des myenterischen Plexus aus der Darmwand herauszulösen, wurde das angedaute Gewebe mechanisch behandelt. In der Literatur sind dafür verschiedene Techniken angewandt worden, die je nach Spezies und Alter der Versuchstiere erheblich variierten (Saffrey et al., 1992, S. 93). Im Rahmen der Etablierung dieser Präparation am Dünndarm der adulten Ratte wurde zunächst mit wiederholter Aspiration der angedauten Gewebsfragmente in Glaspipetten verschiedener Innendurchmesser gearbeitet, die weitaus besten Resultate wurden jedoch mit der Abwandlung der von Schäfer (Schäfer et al., 1997, S. 1631) beschriebenen Dissoziationstechnik erzielt. Die Gewebesuspension wurde während der 45 minütigen Verdauungszeit zweimal kurz und im Anschluß an den Verdau für 20 s auf einem Vortexer bei einer festgelegten mittleren Geschwindigkeit durchmischt, wobei die dabei auftretenden mechanischen Kräfte zu einer makroskopisch fast vollständigen Auflösung der zuvor zahlreich sichtbaren angedauten Gewebsfragmente und zur Abtrennung der glatten Muskelzellen von den Ganglien des myenterischen Plexus führte. Anschließend wurde die Gewebesuspension durch ein Maschengitter gesiebt, wobei bei einer Maschenweite von 500 µm die Fragmente des myenterischen Plexus neben dissoziierten Muskelzellen und Zelldetritus im Filtrat schwammen und im Sieb größere, unvollständig verdaute Fragmente der LMMP-Streifen zurückblieben. Durch Zentrifugation des Filtrats bei niedriger Geschwindigkeit konnten die Ganglien pelletiert werden, die Muskelzellen konnten mit dem Überstand verworfen werden. Die unvollständig verdauten Fragmente des Siebrückstandes konnten grundsätzlich einem erneuten Verdauungsschritt unterzogen werden, doch zeigte sich dabei eine insgesamt nur geringe Verbesserung der Gesamtausbeute an Ganglien mit erheblichem Zeitverlust für die Weiterverarbeitung des Materials, so daß darauf verzichtet wurde.

3.1.3 Aufsammeln muskelfreier myenterischer Ganglien

Die durch Verdauung und mechanische Dispersion isolierten Fragmente des myenterischen Plexus wurden mit einer 35µl-Mikropipette einzeln aufgesammelt. Dabei zeigten sich bei mittlerer Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop zum überwiegenden Teil vollständig muskelfreie Aggregate aus einem bis zu etwa fünf Ganglien, die durch interganglionäre Verbindungssträngen verbunden waren. Insgesamt konnten bei einer Präparation aus zwei Rattendünndärmen mehr als 1000 Ganglien gewonnen werden. Die aufgesammelten Ganglien wurden entweder für die Primärkultivierung eingesetzt oder in einem weiteren Präparationsschritt in Einzelzellen aufgespaltet.

3.1.4 Aufspaltung myenterischer Ganglien in Einzelzellen

Die frisch isolierten Fragmente des myenterischen Plexus konnten durch Trypsinierung und mechanische Bearbeitung (siehe 2.1.4) in Einzelzellen und kleinere Ganglienfragmente aufgespalten werden. Von entscheidender Bedeutung für den Präparationserfolg war dabei die Wahl einer sehr niedrigen Trypsinkonzentration (0,05%) und einer kurzen Inkubationszeit (15 min). Die Vitalität der gewonnenen Einzelzellen wurde durch Trypanblaufärbung überprüft, wobei sich unter den beschriebenen Bedingungen ein Anteil vitaler Zellen von etwa 60 % erreichen ließ. (Eine genaue Ermittlung des Anteils vitaler Zellen in der Trypanblaufärbung war methodisch nicht möglich, da die Zählung ungefärbter Zellen schwierig war). Bei Verwendung höherer Trypsinkonzentrationen, längerer Verdauungszeiten oder aggressiverer mechanischer Dissoziation sank der Anteil vitaler Zellen am Ende der Präparation deutlich ab (z.B. bei 0.1 % Trypsin und 30 min auf < 30 % vitale Zellen). In der Phasenkontrastmikroskopie zeigten sich nach der Dissoziation bei starker Vergrößerung zahlreiche einzelne Zellen und Zellaggregate, deren Größe etwa der von 2-5 zusammengelagerten Zellen entsprach.

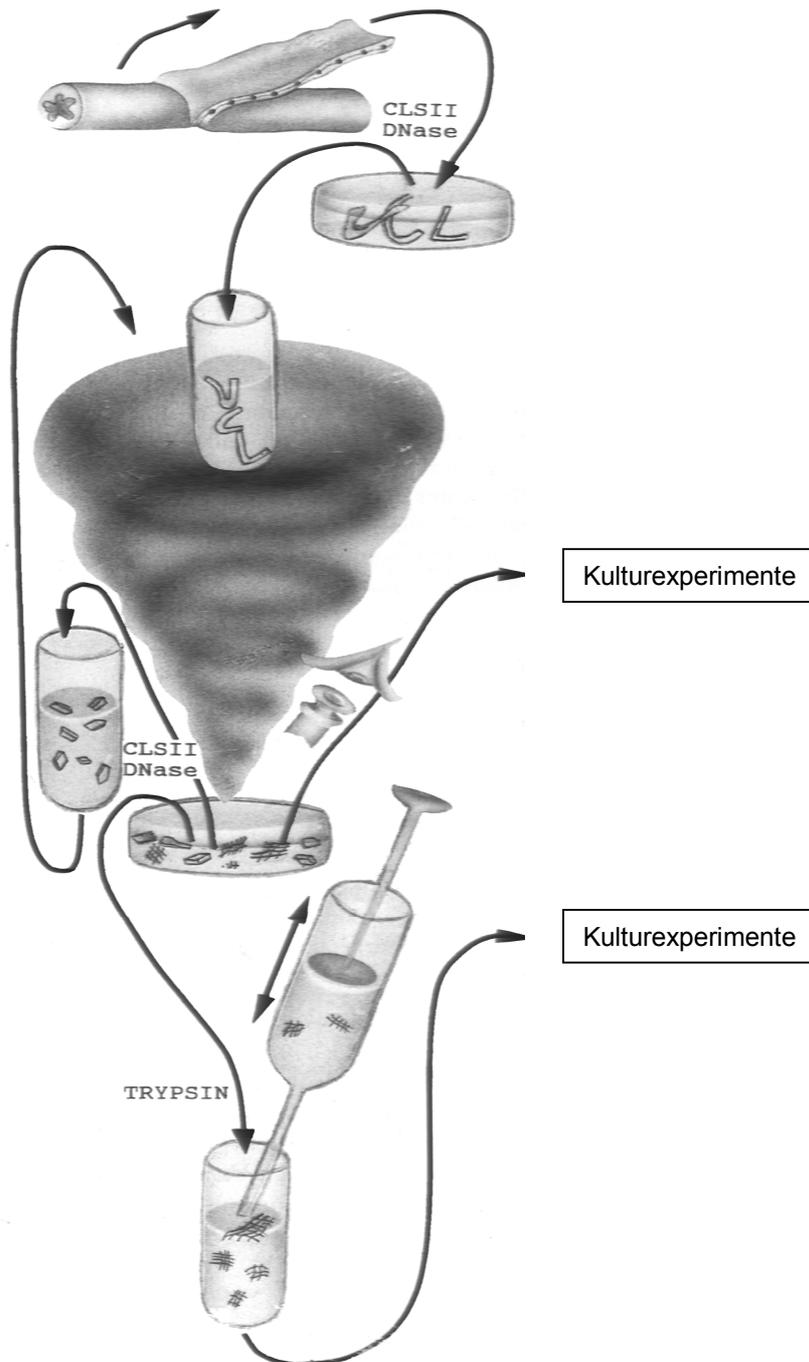


Abb. 1 (modifiziert nach Schäfer et al, 1997) Isolation myenterischer Ganglien aus dem Dünndarm der adulten Ratte.

Nach Abpräparation der LMMP-Streifen von der Dünndarmwand werden die Segmente in Collagenaselösung verdaut, anschließend in einem Reagenzglas auf dem Vortexer mechanisch dissoziiert und zur Entfernung größerer unverdauter Segmente durch ein Metallsieb gegossen (nicht dargestellt). Unter mikroskopischer Kontrolle werden die muskelfreien Plexusfragmente mit einer Mikropipette aspiriert und für die weitere Verwendung asserviert. Unverdaute Gewebsfragmente können die einzelnen Schritte erneut durchlaufen. Alternativ können die muskelfreien Ganglien durch Trypsinierung weiter aufgespalten werden (siehe Text).

3.2 Primärzellkulturen aus myenterischem Nervengewebe

3.2.1 Zellkulturtechnik

Für die Anlage von Primärzellkulturen aus myenterischem Nervengewebe wurden entweder frisch isolierte Ganglienkomplexe (siehe 3.1) oder die Einzelzellpräparationen verwendet. Als Wachstumsfläche wurden gläserne Objektträger verwendet. Um die Anhaftung des frisch isolierten Gewebes unter Kulturbedingungen zu verbessern, wurden verschiedene Beschichtungsverfahren getestet (Tabelle 5). Die besten Ergebnisse wurden durch Verwendung von Collagen Typ I (rat tail collagen type I, Collaborative Biomedical Products) erzielt.

Produkt:	Hersteller:
Celltak	Collaborative Biomedical Products
Collagen Typ IV	Sigma, München
Poly-l-lysine	Sigma, München
Rat tail collagen Typ I	Collaborative Biomedical Products

Tabelle 6: Getestete Beschichtungsverfahren zur Optimierung der Anhaftung des frisch isolierten myenterischen Nervengewebes in Zellkultur.

Das Zellmaterial wurde nach der Isolierung in serumhaltigem Kulturmedium resuspendiert und zu jeweils 750 µl auf die vorbereiteten, beschichteten Kulturslides aufgetragen. Nach fünfstündiger Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Kulturschalen vorsichtig mit weiterem vorgewärmtem Kulturmedium überschichtet. Wurden wesentlich längere Anhaftungszeiten gewählt, verschlechterte sich die Ausbeute an vitalem Zellmaterial deutlich. Kürzere Anwachsperioden führten ebenfalls zu geringerer Zellausbeute. Insgesamt zeigten insbesondere die frisch isolierten Ganglienkomplexe eine schlechte Anhaftungstendenz, so daß auch nach Optimierung sämtlicher Parameter (Trägermaterial, Beschichtung, Inkubationszeit, Medium) nur ein geschätzter Anteil von etwa 20 % des frisch isolierten Gewebes am Trägermaterial anhaftete und sich kultivieren ließ.

Als Nährlösung (siehe 2.2.1.1) wurde Medium 199 der Firma Gibco gewählt, dem 10% fetales Kälberserum und ein speziell auf die Bedürfnisse neuronaler Zellen ausgerichtetes Supplement zugesetzt wurde. Da es sich um eine Primärkultivierung handelte, war die Verwendung von Antibiotika unvermeidlich. Allerdings konnten diese ab dem dritten Tag in Kultur problemlos weggelassen werden.

3.2.2 Morphologie der Kulturen

3.2.2.1 Kultivierung intakter myenterischer Ganglien und Ganglienaggregate

In den ersten zwölf Stunden nach dem Anhaften der frisch isolierten Ganglien auf dem Kulturplastik zeigten sich bei mittlerer Vergrößerung in der Phasenkontrastmikroskopie zunächst keine wesentlichen morphologischen Veränderungen. In den darauffolgenden 24 Stunden trat eine zunehmende Abflachung und Verbreiterung der explantierten Ganglien auf, im Randbereich begannen Zellen mit der typischen Morphologie kultivierter myenterischer Glia (polygone, sich flach und irregulär ausbreitenden Zellen mit rundem Kern mit deutlichem Nucleolus) radiär in die Peripherie auszuwachsen. Etwa 48 Stunden nach Anlage der Kultur begannen diese Gliazellen sich rasch zu teilen. Zu diesem Zeitpunkt war an der Stelle des ursprünglich anhaftenden Ganglions nur noch eine dichte Anhäufung von eng miteinander vernetzten Zellen zu identifizieren. Neben den beschriebenen Gliazellen konnten jetzt kleinere, kompakte Zellen mit ovalem Zellkörper als myenterische Neurone identifiziert werden. Deren Zellkörper erschien in der Phasenkontrastoptik im Gegensatz zu den durchweg dunklen Gliazellen hell und war bei stärkerer Illumination von einem angedeuteten Halo umgeben (Abb. 2). Der Anteil dieser neuralen Zellen an der Gesamtpopulation betrug zu diesem Zeitpunkt etwa 10 – 15%. In den darauffolgenden Tagen bildeten die Gliazellen

allmählich ein dichtes, die gesamte Kulturplatte nach und nach einnehmendes Netzwerk aus, dem die Neuronen, die im wesentlichen auf ihrer ursprünglichen Position verharrten, aufgelagert waren. Die Neurone bildeten etwa ab dem dritten Tag in Kultur multiple dünne, radiär von den Zellkörpern auswachsende Fortsätze aus, die zu den Gliazellen in Kontakt traten (Abb 3). Etwas kräftigere, einzeln und teilweise verzweigt wachsende Fortsätze (Axone ?) verbanden einzelne Neurone auch über weitere Strecken hinweg untereinander, so daß zwischen den Neuronen ein verzweigtes Netzwerk aus Fortsätzen entstand.

Der relative Anteil der Neurone an der Gesamtpopulation nahm im weiteren Verlauf deutlich ab, da Zellteilungen von Neuronen nicht beobachtet wurden und die Anzahl der Gliazellen ständig zunahm. Je nach initialer Dichte konnte das myenterische Gewebe auf diese Weise für 10 bis 14 Tage kultiviert werden, bis die Gliazellen schließlich zu 100 % Konfluenz heranwuchsen und sich die aufgelagerten Neuronen nach und nach ablösten.

3.2.2.2 Kultivierung frisch isolierter Einzelzellen und Zellaggregate

Frisch isolierte Einzelzellen zeigten nach dem Anwachsen auf dem Zellkulturplastik in den ersten 12 h kaum eine Änderung ihrer Morphologie. Aufgrund der quantitativ geringeren Zellausbeute bei der Präparation von Einzelzellen gestaltete es sich als schwierig, eine adäquate Zelldichte auf den Objektträgern zu erreichen. Im weiteren Verlauf begann die sich auszubreiten und die typische, oben beschriebene Gliazellmorphologie zu entwickeln. Neurone konnten nur vereinzelt beobachtet werden. Diese zeigte die typische Phasenkontrastmorphologie mit hellen ovalen Zellkörpern. Die Ausbildung von Fortsätzen konnte bei isoliert stehenden Neuronen gar nicht, bei Neuronen in engerer Nachbarschaft zu Gliazellen in ähnlicher Weise wie bei der Kultivierung ganzer Ganglien beobachtet werden.

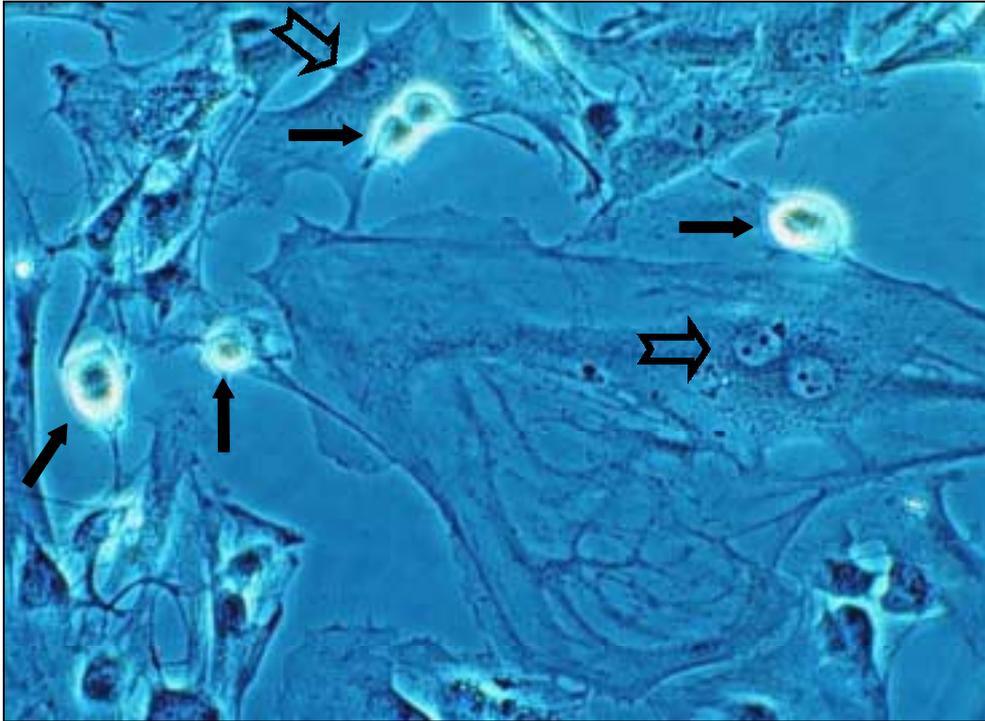


Abb. 2: Primärzellkultur myenterischer Ganglien am 7. Tag nach Isolation in der Phasenkontrastmikroskopie (10x). Die strukturelle Organisation des Ganglions ist nicht mehr zu erkennen. Zwischen flach und irregulär auslaufenden Gliazellen mit runderlichen Zellkernen mit dichten Nukleoli (offene Pfeile) myenterische Neurone mit heller Struktur (phase-bright), die radiär zahlreiche Fortsätze ausgebildet haben (geschlossene Pfeile).

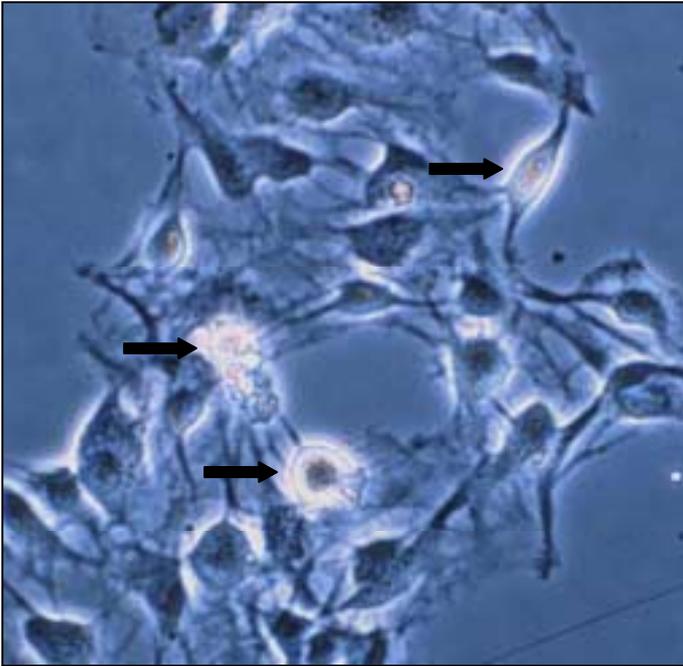


Abb. 3: Kultiviertes myenterisches Ganglion am 4. Tag nach Explantation. Die Ganglienstruktur ist noch teilweise erhalten, die Neurone (geschlossene Pfeile) liegen in der umgebenden Glia eingebettet und zeigen die typische helle Morphologie in der Phasenkontrastmikroskopie mit angedeutetem Halo. (10x)

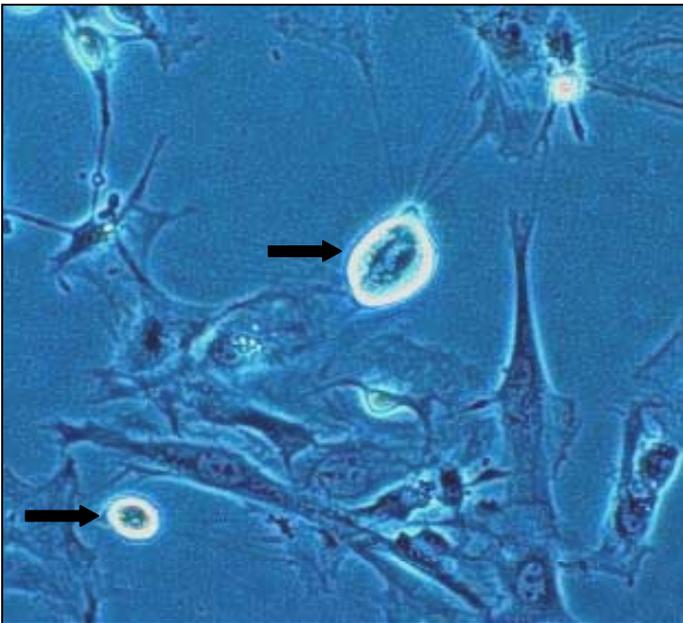


Abb. 4: Myenterisches Neuron am 7. Tag in Zellkultur. Von dem ovalen, phasenkontrastmikroskopisch hellen Neuronen (geschlossene Pfeile) strahlen radiär zahlreiche Fasern in die Peripherie und treten in Kontakt zu den umliegenden Zellen.

3.3 Immunfluoreszenzstudien an kultiviertem myenterischen Nervengewebe

3.3.1 Identifikation von enterischen Neuronen

Um den Nachweis zu erbringen, daß myenterisches Nervengewebe aus dem Rattendünndarm unter in-vitro-Bedingungen nicht nur in vitalem Zustand erhalten werden kann, sondern daß auch wesentliche Differenzierungsmarker von Neuronen und Gliazellen erhalten bleiben, wurden die Kulturen am 5.-7. Tag nach Isolierung des Gewebes fixiert und für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet (siehe 2.3). Zu diesem Zeitpunkt hatten die Neuronen in Kultur erste Fortsätze gebildet, die Gliazellen begannen, ein den Objektträger überspannendes Netzwerk auszubilden, ohne daß die Architektur der einzelnen Ganglien bereits völlig aufgelöst war.

Für die Identifikation myenterischer Neurone in Zellkultur wurden zwei verschiedene, gegen Neuronen-spezifische Antigene gerichtete Antikörper verwendet, deren Anbindung am Zielantigen durch einen FITC-markierten Sekundärantikörper, fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen wurde. Kontrollexperimente in Abwesenheit des Primärantikörpers zum Ausschluß unspezifischer Bindung wurden parallel durchgeführt.

In der Immunfluoreszenzfärbung gegen die Neuron-spezifische Enolase zeigte sich eine deutliche Anfärbung zahlreicher Zellen, wobei das Fluoreszenzsignal die Perikaryen dieser Zellen gleichmäßig ausfüllte und auch Zellfortsätze zur Darstellung kamen (Abb. 5). Sämtliche NSE-positiven Zellen befanden sich im Bereich der explantierten Ganglien. Die morphologisch als Gliazellen identifizierten, aus den Ganglien ausgewachsenen Zellen zeigten keine Anfärbung. Soweit bei unterschiedlicher Vergrößerung und fixierten Kulturen beurteilbar, entsprachen die NSE-positiven Zellen im wesentlichen den in der Phasenkontrastmikroskopie als Neurone identifizierten Zellen. Der Anteil NSE-positiver Zellen an der Gesamtpopulation der zu diesem Zeitpunkt in Kultur befindlichen Zellen betrug etwa 10-15 %.

In der Immunfluoreszenzfärbung gegen Neurofilamente zeigte sich ein der NSE-Färbung sehr ähnliches Ergebnis (Abb. 5). Auch hier stellten sich etwa 10 % aller Zellen dar, färbten sich sowohl Zellkörper als auch Zellfortsätze, lagen die gefärbten

Zellen im Bereich explantierter Ganglien und entsprachen den phasenkontrastmikroskopisch als Neuronen identifizierten Zellen.

Der immunzytologische Nachweis der Expression dieser beiden typischen und spezifischen neuronalen Markerproteine in kultivierten myenterischen Neuronen zeigt, daß frisch isolierte myenterische Neurone aus dem Dünndarm der adulten Ratte unter den etablierten Bedingungen für längere Zeit in Kultur überleben und in guter Differenzierung erhalten bleiben.

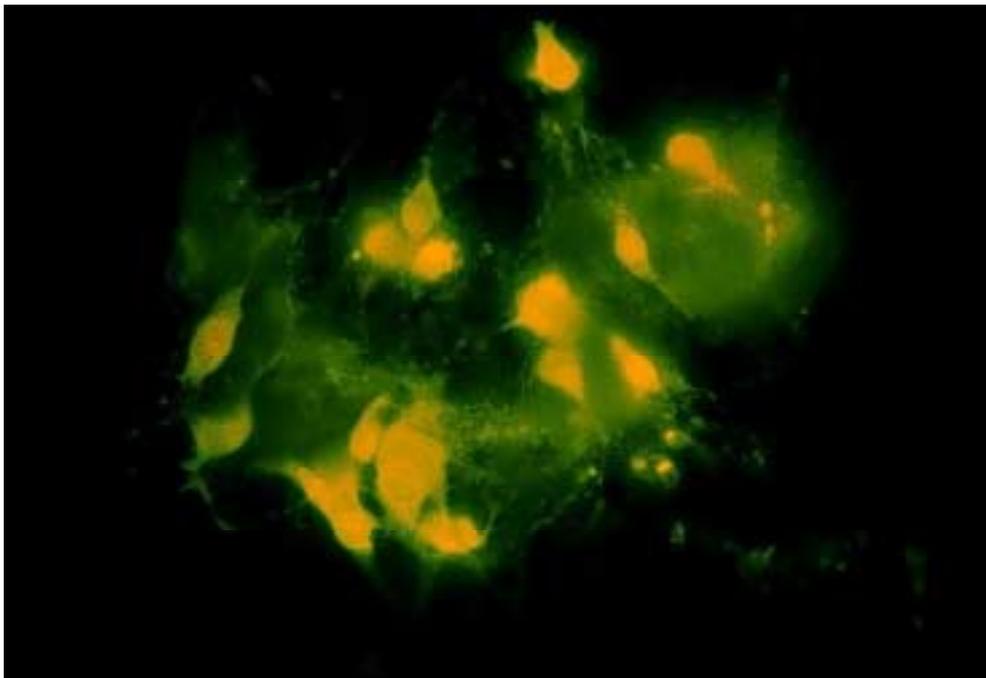
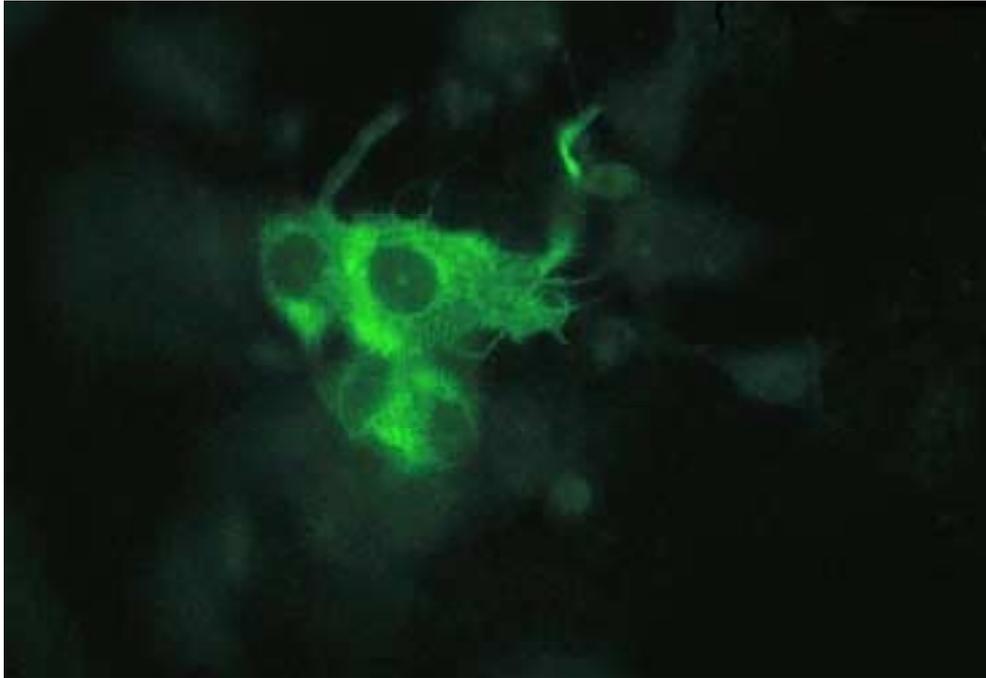


Abb. 5: Immunfluoreszenzdarstellung myenterischer Neurone in Primärzellkultur

A Anfärbung einer Gruppe myenterischer Neruone in einem 48 h zuvor isolierten und kultivierten Ganglion mit einem Anti-Neurofilament-Primärantikörper und einem FITC-markiertem Sekundärantikörper. Insgesamt vier Neurone unterschiedlicher Größe und mit polygonalem Zytoplasma und ovalen Kernen mit deutlichem Nukleolus kommen zur Darstellung.

B Anti-NSE-Immunfluoreszenzfärbung 5 Tage alter Primärkulturen myenterischer Ganglien. Zahlreiche vitale Neurone mit typisch birnenförmigen Zellkörper und auswachsenden Fortsätzen neben hintergrundgefärbten Gliazellen. Die Ganglionstruktur ist bereits kaum mehr nachvollziehbar.

3.3.2 Identifikation von enterischer Glia

Myenterische Gliazellen stellen die zahlenmäßig größte Zellpopulation innerhalb eines myenterischen Ganglions dar. Der Nachweis differenzierter Gliazellen in der vorliegenden Mischkultur aus explantierten myenterischen Ganglien erfolgte durch immunzytologische Fluoreszenzfärbung von saurem Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP). Der Nachweis proteingebundener Primärantikörper erfolgte mittels LRSC-markierter Immunglobuline, die gegen die Fc-Fragmente des Primärantikörpers gerichtet waren. Kontrollexperimente ohne Primärantikörper wurden parallel durchgeführt.

In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine kräftige Anfärbung einer großen Mehrzahl der in Kultur befindlichen Zellen, wobei die gesamte Zelloberfläche unter Aussparung des Zellkerns zur Darstellung kam (Abb.6). Das Fluoreszenzsignal ging dabei nicht von homogen das gesamte Zytoplasma einnehmenden Strukturen aus, sondern zeigte eine feinfaserige Struktur, die vom Aspekt her an Watte erinnerte, was auf eine spezifische Anfärbung des Zytoskeletts hinweist. Die als myenterische Glia identifizierten Zellen waren ubiquitär auf den Objektträgern nachweisbar, was sich mit den phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen deckte.

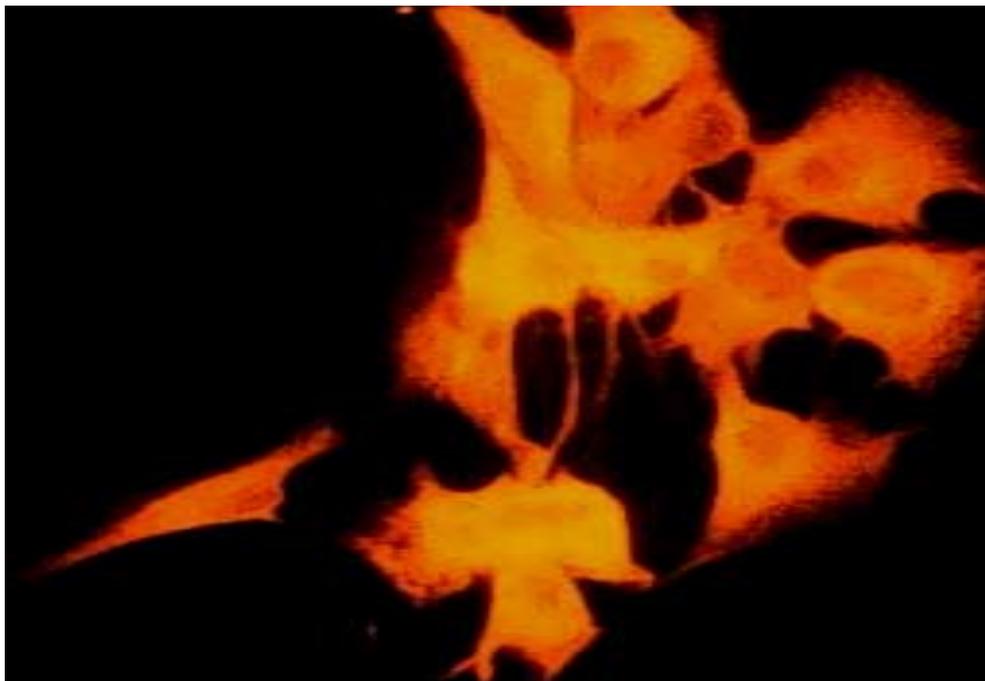


Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbung gegen saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) zur Identifikation enterischer Gliazellen in Primärzellkulturen myenterischen Nervengewebes. Fluoreszenzmarkierung durch LRSC-markierten Sekundärantikörper.

A GFAP-positive Zellen am 5. Tag nach Isolation und Kultivierung myenterischer Ganglien in Übersichtsvergrößerung: Typischer Polymorphismus enterischer Glia, Ausbildung zahlreicher Fortsätze und Zellkontakte

B Ausschnittsvergrößerung: Negative Darstellung des ovalen Zellkerns, watteartige Struktur angefärbter Zytoskelettfasern

3.3.3 Identifikation nNOS-positiver Neurone in Zellkultur

Etwa die Hälfte aller zur Zirkulärmuskulatur projizierenden Motoneurone ist im Colon des Menschen NOS-positiv (Porter et al., 1997, S. 1916). Das Fehlen NOS-positiver Neurone in spezifischen Regionen des Verdauungskanal führt zur Ausbildung bekannter Krankheitsbilder wie der Achalasie oder der infantilen hypertrophen Pylorusstenose. Im myenterischen Plexus des Rattendünndarms sind etwa 15 % der myenterischen Neurone NOS-positiv (Huber et al.; 1998, S. 1146). Der Nachweis nNOS-positiver Neuronen in 5-7 Tagen alten Primärzellkulturen aus myenterischen Ganglien erfolgte unter Verwendung eines monoklonalen, gegen das N-terminale Ende der nNOS-Proteinkette gerichteten Primärantikörpers und durch Fluoreszenzdetektion des proteingebundenen Erstantikörpers mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper. Kontrollexperimente ohne Primärantikörper wurden parallel durchgeführt.

In den Kulturen färbten sich im Bereich der explantierten Ganglien einzelne Zellen mit der typischen Morphologie myenterischer Neurone homogen mit dem nNOS-Antikörper an (Abb. 7). Auch die Fortsätze dieser Zellen waren NOS-positiv. Eine Anfärbung myenterischer Glia wurde nicht beobachtet. Der Anteil nNOS-positiver Neurone an der Gesamtpopulation kultivierter Zellen lag deutlich unter dem Anteil NSE-bzw. Neurofilament-positiver Zellen und betrug etwa 1 nNOS-positives Neuron auf etwa 40 – 60 Zellen in Kultur. Der genaue Anteil nNOS-positiver Neuronen an der Gesamtzahl kultivierter Neuronen ließ sich unter Fluoreszenzbedingungen nicht sicher ermitteln, im Parallelvergleich mit den am analogen Ausgangsmaterial durchgeführten NSE-Färbungen liegt der Anteil etwa bei einem nNOS-positiven Neuron pro 6 - 8 myenterischen Neuronen.

Der Nachweis der nNOS-Expression in kultivierten myenterischen Neuronen zeigt, daß nNOS-positive Neuronen über mehrere Tage in guter Differenzierung in Zellkultur gehalten werden können.

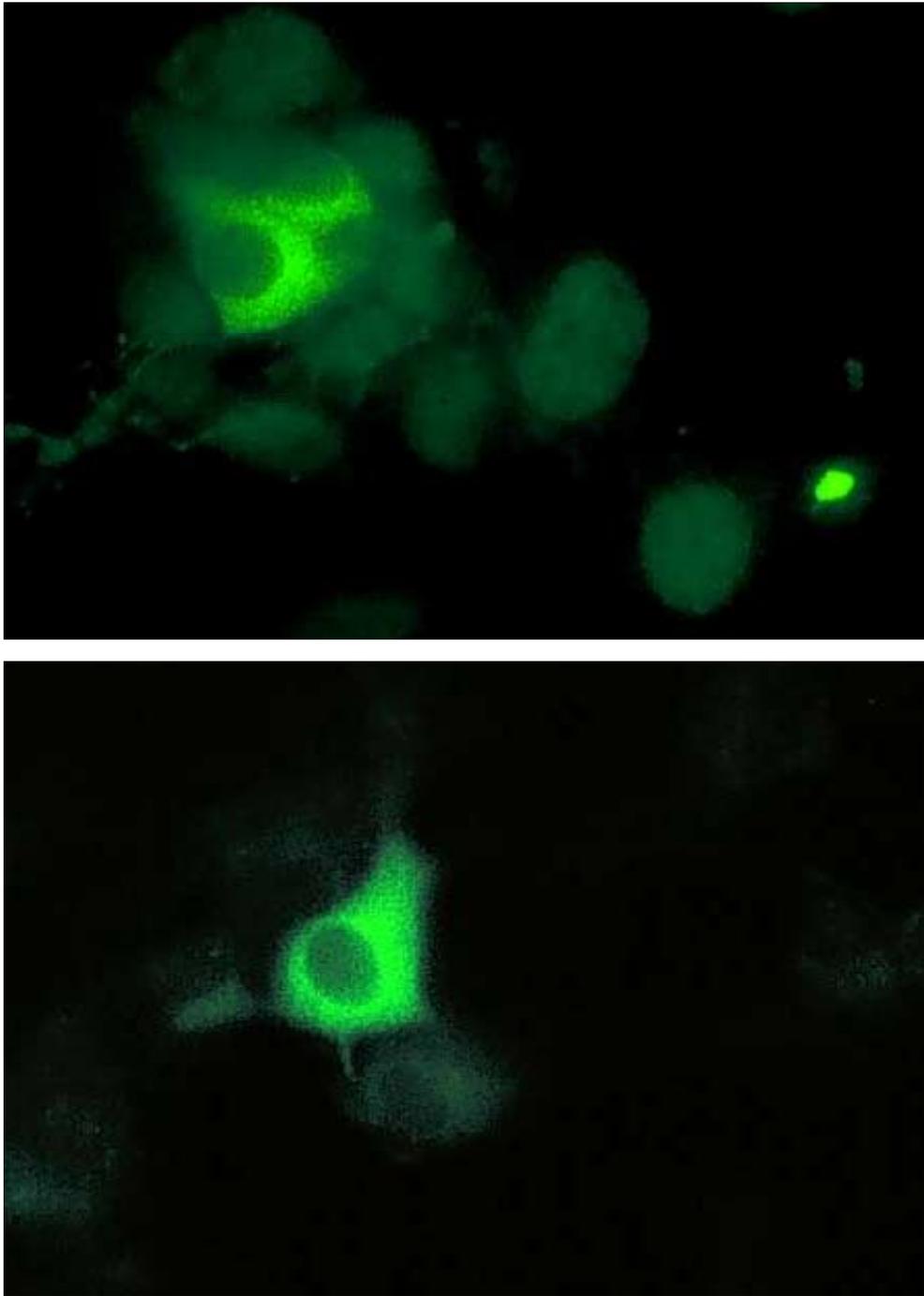


Abb. 7: NOS-positive myenterische Neurone in Primärzellkultur
A und **B** Myenterische Neurone, 72 h nach Anlage der Zellkultur, deren Zytoplasma sich mit dem gegen die N-terminale Domäne der neuronalen NO-Synthase gerichteten Primärantikörper homogen und unter Aussparung des Zellkerns anfärbt.

3.4 Charakterisierung der NO-abhängigen Modulation des intrazellulären Calciumstoffwechsels in humanen Colonmuskelzellen

3.4.1 Kultivierung humaner Colonmuskelzellen

Humane Colonmuskelzellen wurden in kryopräserviertem Zustand von der Firma Clonetics Normal Human Cell System bezogen. Die Zellen wurden vom Hersteller aus dem Colon eines Einzelspenders isoliert, in Primärkultur gebracht, auf dem dritten Passagelevel unter Zusatz von DMSO und fetalem Kälberserum eingefroren und auf Trockeneis verschickt (siehe 2.2.2.1). Nach adäquatem Auftauen und Aussaat der Zellen in der empfohlenen Dichte von etwa 3500 Zellen pro cm² Wachstumsoberfläche haftete ein Großteil der Zellen auf der Unterlage fest und entwickelte innerhalb weniger Stunden die typische Morphologie glatter Muskelzellen mit einem spindelförmigen, langgestreckten Zellkörper und einem zentral gelegenen, rundlich bis ovalen Kern (Abb. 8). Zahlreiche Zellkerne ließen zudem Mitosefiguren erkennen. Unter adäquater Bebrütung und regelmäßiger Erneuerung der Nährlösung erreichten die Zellen nach etwa 5-7 Tagen in Kultur 90% Konfluenz, wobei sich bis zu diesem Zeitpunkt ein dichter Monolayer aus monomorphen, langgestreckten und in der Ebene parallel ausgerichteten Zellen ausgebildet hatte, der bei Betrachtung in Übersichtsvergrößerung an ein Längsschnittpräparat aus glatter Darmmuskulatur erinnerte (Abb. 8).

Nach dem Erreichen einer Konfluenz von etwa 90% wurden die Zellen geerntet und erneut ausgesät. Die Zellen konnten je nach Bedarf auch unter kryokonservierenden Bedingungen erneut eingefroren und vor weiterer Verwendung neu ausgesät werden.

Nach Angaben des Herstellers bleiben kultivierte humane Colonmuskelzellen unter den vorliegenden, speziell auf die Bedürfnisse glatter Muskelzellen ausgerichteten Bedingungen für mindestens 15 Verdoppelungszyklen in guter Differenzierung, was von der Firma durch den immunologischen Expressionsnachweis von „smooth muscle α -Actin“ als positiven Marker für glatte Muskelzellen und den gleichzeitig fehlenden Nachweis von von-Willebrand-Faktor VIII definiert wurde. In unseren Experimenten zeigte sich ebenfalls eine morphologisch und funktionell gut erhaltene Differenzierung der glatten Muskelzellen bis etwa zur 7. Passage. Danach entwickelten die Zellen in Kultur allerdings eine deutliche Anisozytose mit Ausbildung

einzelner sehr großer spindelförmiger Zellen und zahlreicher kleinerer, rautenförmiger Zellen mit deutlich unscharf begrenztem Zytoplasma. Ferner trat eine phasenkontrastmikroskopisch zunehmende Inhomogenität des Zytoplasmas mit Ausbildung zahlreicher Vakuolen auf, so daß die Zellen ab etwa der 9. Passage ihre typische Muskelzellmorphologie nach und nach einbüßten.

Für sämtliche Versuche wurden daher Zellen aus der 4. und 5. Passage nach Primärkultivierung verwendet, bei denen neben der typischen Morphologie glatter Muskelzellen auch zentrale funktionelle Charakteristika wie die Ausbildung typischer intrazellulärer Calciumkonzentrationsverläufe nach cholinergem Stimulation und die Expression glattemuskulärer Funktionsproteine wie cGK I β und IRAG (siehe 3.4.2) nachweisbar waren. Insgesamt erwies sich, auch unter Berücksichtigung von Literaturberichten (Ennes et al., 1992, S. 365) über frühzeitige Entdifferenzierungstendenzen frisch isolierter glatter Muskelzellen aus dem Verdauungskanal von Nagetieren das verwendete humane Zellsystem als vorteilhaft und zuverlässig.



Abb. 8 Kultivierte humane Colonmuskelzellen in der 5. Passage nach Isolierung
A Konfluente Zellen mit paralleler Ausrichtung und typischer Spindelform in Übersichtsvergrößerung
B Humane Colonmuskelzelle, 8h nach der Aussaat mit typischer Muskelzellmorphologie: spindelförmig langgestreckter Zellkörper, zentral gelegener, rundlicher Kern

3.4.2 Videofluorimetrische Messung von intrazellulären Calciumsignalen in kultivierten Colonmuskelzellen

3.4.2.1 Wahl der Methodik

Veränderungen in der intrazellulären Konzentration freier Calciumionen stellen ein zentrales Signalsystem in der Regulation von Funktion, Wachstum, Differenzierung und Absterben in den meisten Zellarten dar. In der glatten Muskelzelle stellt der durch physiochemische Stimuli oder elektrische Signale induzierte schnelle Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ein entscheidendes Signal für die Initiierung und Aufrechterhaltung von Kontraktionsvorgängen dar. Ein wichtiger physiologischer Mechanismus in der Regulation der Kontraktilität glatter Muskelzellen besteht in der quantitativen Modulation dieser Calciumsignale. Die fluoreszenzmikroskopische Messung von Veränderungen der intrazellulären Calciumionenkonzentration in kultivierten humanen Colonmuskelzellen ermöglicht einen direkten experimentellen Zugriff auf diesen zentralen Schritt in der Signaltransduktionskaskade glatter Muskelzellen und ermöglicht damit die Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen und intrazellulären Signalmechanismen, die modulierend auf den intrazellulären Calciumsignalstoffwechsel wirken.

3.4.2.2 Etablierung der Methodik

Für die Durchführung der Versuche wurden Colonmuskelzellen in der 4. oder 5. Passage nach initialer Kultivierung mit Fura-2 AM beladen (siehe 2.4.3.1). Initial durchgeführte Experimente zur Ermittlung der optimalen Furakonzentration und der optimalen Inkubationszeit zeigten, daß eine Inkubation der Zellen mit 5 µM Fura-2 für 30 Minuten eine gleichmäßige, ausreichend starke und während der Experimente stabile Fluoreszenzintensität hervorrief, ohne daß relevante zytotoxische Effekte beobachtet wurden. Sämtliche Experimente wurden bei mittlerer Dichte der Zellen auf den Mikroskopiergläsern durchgeführt, um möglichst zahlreiche Zellen innerhalb eines Mikroskopiefeldes gleichzeitig untersuchen zu können, ohne daß störende Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Zellen die Resultate verfälschten. Nach Montage der Zellträger in die Superfusionskammer wurden die Zellen mit 5 ml Pufferlösung pro Minuten überspült, wobei Zu- und Ablauf so montiert wurden, daß sich während der Experimente nicht mehr als etwa 2 ml Flüssigkeit in der Kammer

befand, um ein rasches Erreichen der maximalen Stoffkonzentration am Wirkort zu gewährleisten. Während der Versuche wurde jede Sekunde ein Meßwertepaar registriert, da bei größeren Meßabständen der für die Versuchsauswertung verwendete Maximalwert (peak ratio) nur unzureichend genau registriert werden konnte. Die Stimulationsdauer von 60 s wurde empirisch festgelegt.

3.4.2.3 Spontane Calciumsignale

Während der Versuchsdurchführung, in verstärktem Maße aber in der initialen Äquilibrierungsphase, traten während der Superfusion mit Kontrollpuffer sporadische Calciumssignale auf, die sich durch einen weniger einheitlichen Kurvenverlauf mit geringerer Höhe und Dauer von den durch die verwendeten Stimuli induzierten Calciumsignalen unterschieden. Besonders auffällig war eine deutliche Häufigkeitszunahme dieser spontanen Aktivität bei Verwendung höherer Superfusionsgeschwindigkeiten, wie sie in der Etablierungsphase der Experimente zur Optimierung der Pufferaustauschgeschwindigkeit getestet worden waren. Ein mögliches physiologisches Korrelat dieser durch mechanischen Streß auslösbarer Calciumsignale stellen mechanosensitive Calciumkanäle dar, die kürzlich in der glatten Muskulatur des humanen Dünndarms nachgewiesen und charakterisiert worden sind (Farrugia et al., 1999).

3.4.2.4 Basale Calciumionenkonzentration in humanen kultivierten Colonmuskelzellen

Die Meßgenauigkeit der fluorimetrischen Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationen in vitalen Zellen durch Verwendung von Fura-2 als Fluoreszenzfarbstoff ist im physiologischen Bereich intrazellulärer Calciumkonzentrationen sehr hoch, im Bereich höherer Konzentrationen, wie sie bei Anwendung der Zweipunktkalibrierungsmethode (siehe 2.4.4.2) durch Zugabe von Ionomycin als Calciumionophore künstlich erzeugt werden, dagegen nur gering. Die Kalibrierung des Meßsystems zur Berechnung molarer Calciumionenkonzentrationen aus den gemessenen Fluoreszenzintensitätsquotienten beinhaltet daher große Ungenauigkeiten, weshalb für die statistische und graphische Auswertung der Videofluoreszenzversuche die vom System errechneten Fluoreszenzintensitätsquotienten (siehe 2.4.4.1) verwendet wurden. Zur Veranschaulichung wurde dennoch am Ende der Versuche die Systemkalibrierung durchgeführt und für einen Teil der Experimente die basale und die stimulusinduzierte

Calciumkonzentration berechnet. Die basale intrazelluläre Konzentration freier Calciumionen in kultivierten humanen Colonmuskelzellen betrug demnach 86 ± 27 nmol/l ($n = 34$).

3.4.3 Charakterisierung der NO-abhängigen Modulation der IP₃-abhängigen Calciumfreisetzung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen

3.4.3.1 Stimulus-induzierter transientser Calciumanstieg

Für die Untersuchung Stimulus-induzierter Veränderungen des intrazellulären Calciumspiegels in kultivierten humanen Colonmuskelzellen wurden der cholinerge Agonist Carbamylchlorid (Carbachol) und das Neuropeptid Bradykinin verwendet.

Carbachol ist ein unselektiv wirkender Agonist an Muskarinrezeptoren, der gegenüber Cholinesterasen resistent ist und an der glatten Muskulatur vornehmlich durch Aktivierung von M₃-Rezeptoren zur Aktivierung der Phospholipase C mit sukzessiver Hydrolyse von Phosphatidylcholin unter Bildung von Diacylglycerol (DAG) und D-myo-inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃) führt (Shehnaz et al., 2001). Verwendet wurden Carbacholkonzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-4} M. Bereits bei der niedrigsten Konzentration (10^{-6} M) ließ sich in 20% der Zellen ein typisches Calciumsignal hervorrufen ($n=20$). Unter Stimulation mit 10^{-4} M Carbachol betrug der Anteil stimulierbarer Zellen pro Meßausschnitt 47% ($n=32$). Die Morphologie der einzelnen Kurven blieb dabei unverändert, weshalb für alle weiteren Versuche 10^{-4} M Carbachol als Stimulus verwendet wurde (10^{-4} M). Die Stimulation kultivierter glatter Colonmuskelzellen mit Carbachol führte zu einem raschen Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration, gefolgt von einem fast ebenso raschen, im weiteren Verlauf leicht verzögerten Rückgang in den Bereich des Basalwerts. Die Zellen konnten unter Einhaltung von 300 s Pause zwischen den einzelnen Stimuli mindestens dreimal repetitiv stimuliert werden, ohne daß es zu signifikanten Veränderungen des maximal erreichten Fluoreszenzintensitätsquotienten kam ($n=7$, $p<0.05$).

Bradykinin ist ein Neuropeptid aus neun Aminosäuren, das in glatten Muskelzellen über Anbindung an Bradykininrezeptoren zu einer Aktivierung der Phospholipase C unter Bildung von IP₃ führt und die glatte Muskulatur des Colons kontrahiert (Hyman et al., 1992). Stimulation kultivierter glatter Muskelzellen mit Bradykinin (10^{-6} M) führte zu einem raschen Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration, gefolgt von einem leicht verzögerten Rückgang auf Ausgangswerte. Die Kurvenmorphologie war von den Carbachol-induzierten Calciumsignalen nicht zu

unterscheiden. Insgesamt reagierten auf die Stimulation mit Bradykinin 10^{-6} M 58 % (n=36) der gemessenen Zellen mit einem typischen Anstieg des intrazellulären Calciumsspiegels. Die Stimulation war mindestens dreimal unter standardisierten Bedingungen wiederholbar, ohne daß sich signifikante Veränderungen der Meßwerte ergeben hätten (n=8, $p>0.05$).

Aufgrund des bei beiden Stimuli vergleichbaren Anteils reagierender Zellen und der größeren physiologischen Relevanz muskarinerges Stimulation glatter Muskulatur im Gastrointestinaltrakt wurde für die weiteren Versuche Carbachol (10^{-4} M) als Stimulus eingesetzt.

3.4.3.2 Abhängigkeit des Stimulus-induzierten Calciumsignals von IP_3 -sensitiven intrazellulären Calciumspeichern

Carbachol führt über die Stimulation membranständiger Rezeptoren auf glatten Muskelzellen zur Bildung des intrazellulären Botenstoffes D-myo-inositol 1,4,5-triphosphat (IP_3), der als second messenger an spezifische Rezeptoren (IP_3 -R) auf den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) bindet und zur Freisetzung von Calciumionen aus dem IP_3 -sensitiven Calciumspeichern des sarkoplasmatischen Retikulums führt (Ohta et al., 1994). Um nachzuprüfen, ob diese Mechanismen im vorliegenden Modell für den Stimulus-induzierten Calciumionenkonzentrationsanstieg verantwortlich sind, wurden Versuche in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} durchgeführt. Carbachol rief auch in Abwesenheit von extrazellulären Calciumionen typische Calciumspikes hervor, die von den Calciumsignalen unter Kontrollbedingungen nicht zu unterscheiden waren (n=8, $p<0.05$, Abb. 9).

Zur Klärung der Bedeutung des IP_3 -sensitiven Pools intrazellulärer Calciumspeicher wurden die Zellen mit 2-Amino-ethoxydiphenyl-borate (2-APB), einem membranpermeablen Inhibitor der IP_3 -sensitiven Calciumfreisetzung aus dem SR, vorinkubiert und unter Standardbedingungen stimuliert. 2-APB (8×10^{-5} M) blockierte den Stimulus-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration auf 11 % des Kontrollwertes (n=12, $p<0,001$, Abb. 10), was eine Carbachol-induzierte Freisetzung von Calciumionen aus IP_3 -sensitiven sarkoplasmatischen Calciumspeichern belegt.

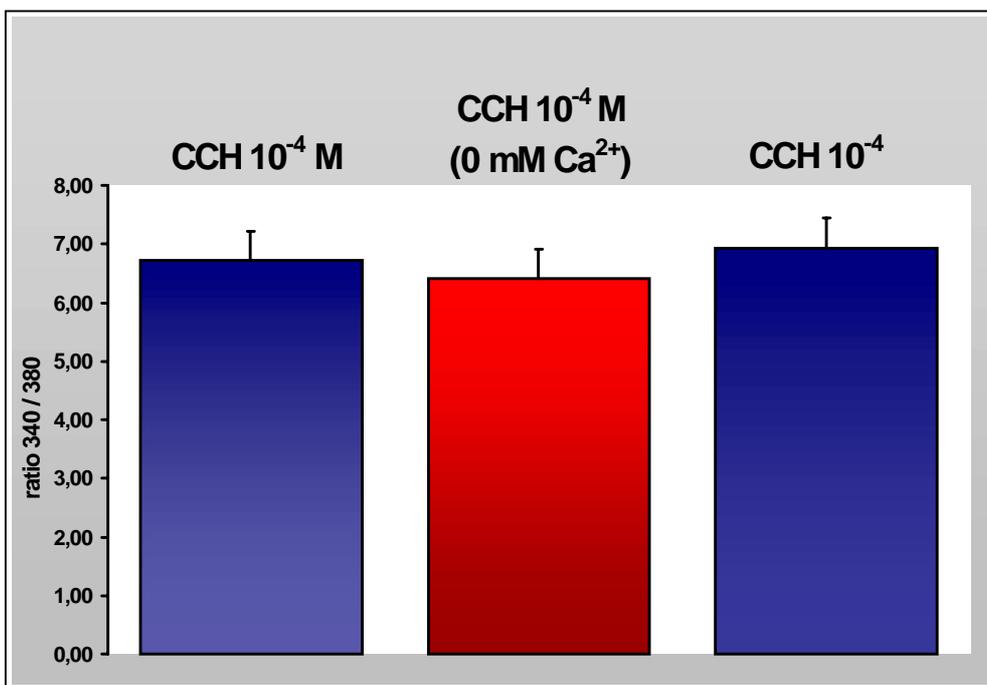
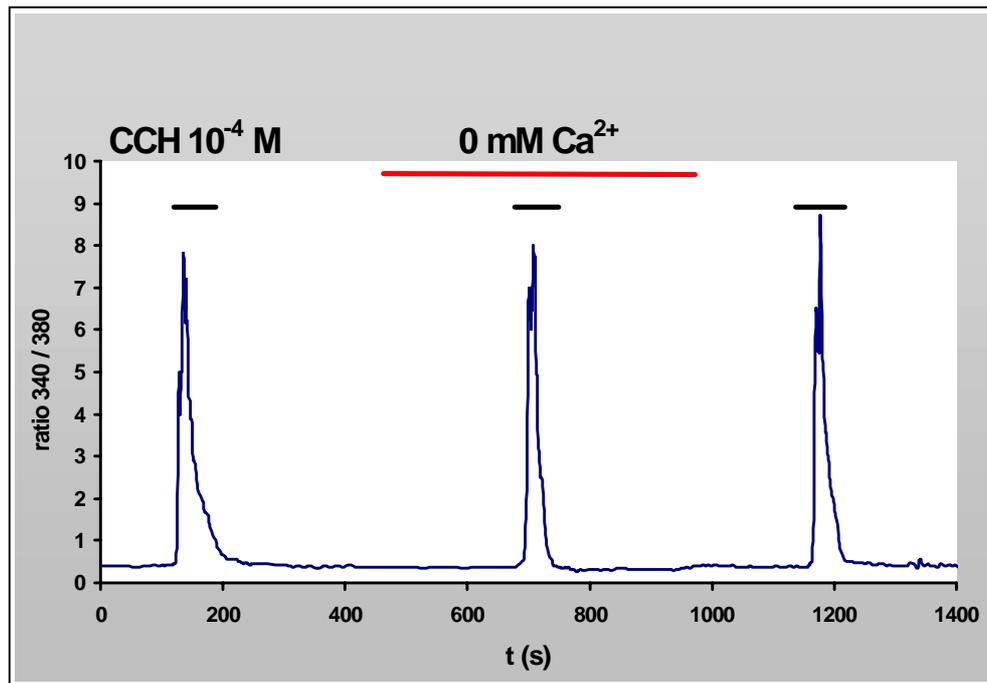


Abb. 9: Carbachol-induzierte Calciumsignale in humanen Colonmuskelzellen.

A Typischer Kurvenverlauf mit drei aufeinanderfolgenden Stimulationsepisoden von jeweils 60 s Dauer. Der Kurvenverlauf in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} ohne erkennbare Veränderung.

B Wiederholte Stimulation mit Carbachol ohne signifikante Veränderung des maximal erreichten Fluoreszenzintensitätsquotienten. Weglassen von Calciumionen aus dem Superfusionspuffer ohne signifikanten Effekt (\pm SEM, n=8).

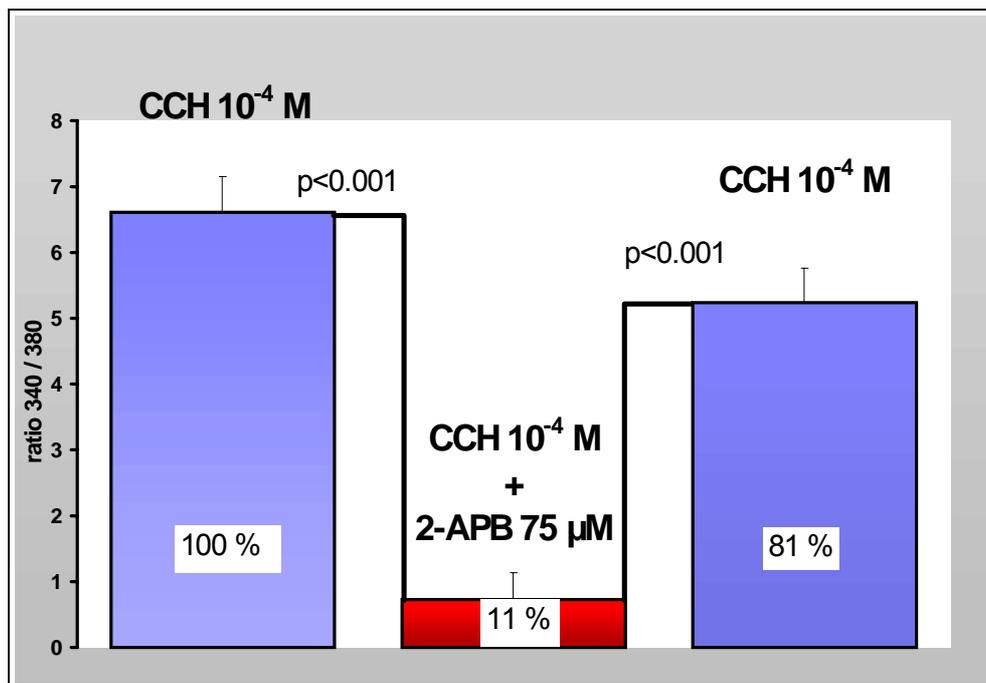
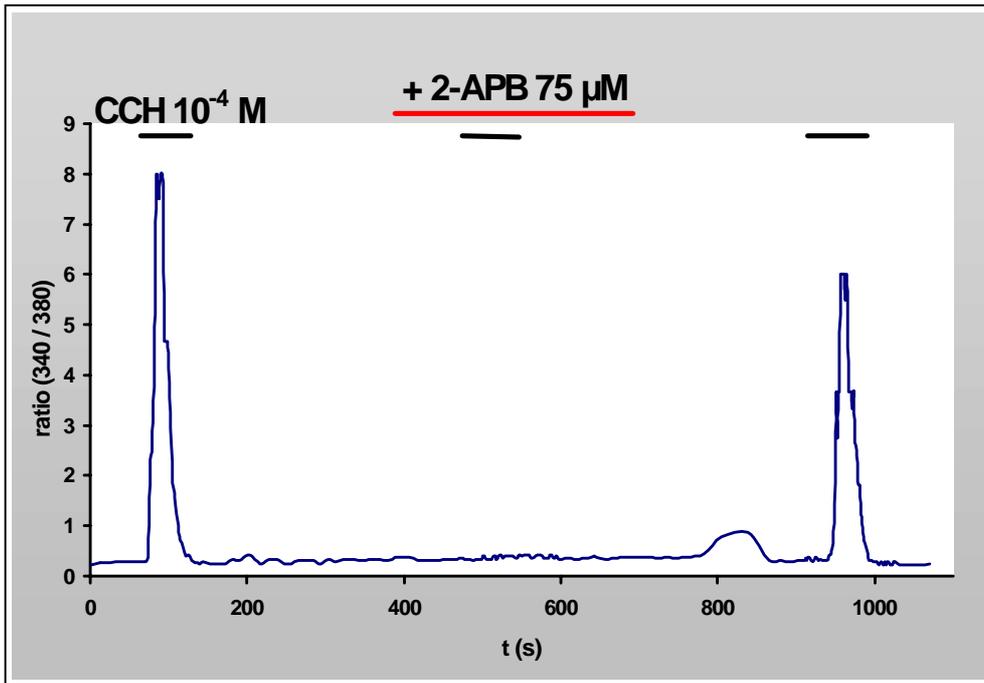


Abb. 10 Effekt von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB, 75 μ M), einem membranpermeablen Inhibitor der Ca^{2+} -Freisetzung aus IP_3 -sensitiven Speichern, auf die CCH-induzierte Calciummobilization.

A Typischer Kurvenverlauf mit vollständiger und voll reversibler Inhibition der CCH-induzierten Ca^{2+} -Mobilisation durch 2-APB

B Reversible Inhibition der CCH-induzierten Ca^{2+} -Mobilisation auf 11% der Kontrolle durch 2-APB (75 μ M) als Hinweis auf eine Ca^{2+} -Mobilisation aus IP_3 -sensitiven Speichern. (+/-SEM, n=12).

3.4.3.3 Inhibition durch exogenes NO

Stickstoffmonoxid spielt in der Vermittlung der Relaxation glatter Muskulatur im Gastrointestinaltrakt eine zentrale Rolle. Ein wichtiger Mechanismus hierbei liegt in der Modulation Stimulus-induzierter Kontraktion durch die Wechselwirkung zwischen NO-abhängigen Signaltransduktionmechanismen und dem intrazellulären Calciumsignalstoffwechsel der glatten Muskelzelle (Hofmann et al.,). An kultivierten humanen Colonmuskelzellen führte der NO –Donor Natriumnitroprussid (SNP, 5×10^{-4} M) zu einer Inhibition des Stimulus induzierten Calciumanstiegs auf 30% des Kontrollwertes ($n=33$, $p < 0.001$, Abb. 11). Diese Inhibition war nach Auswaschen des NO-Donors voll reversibel.

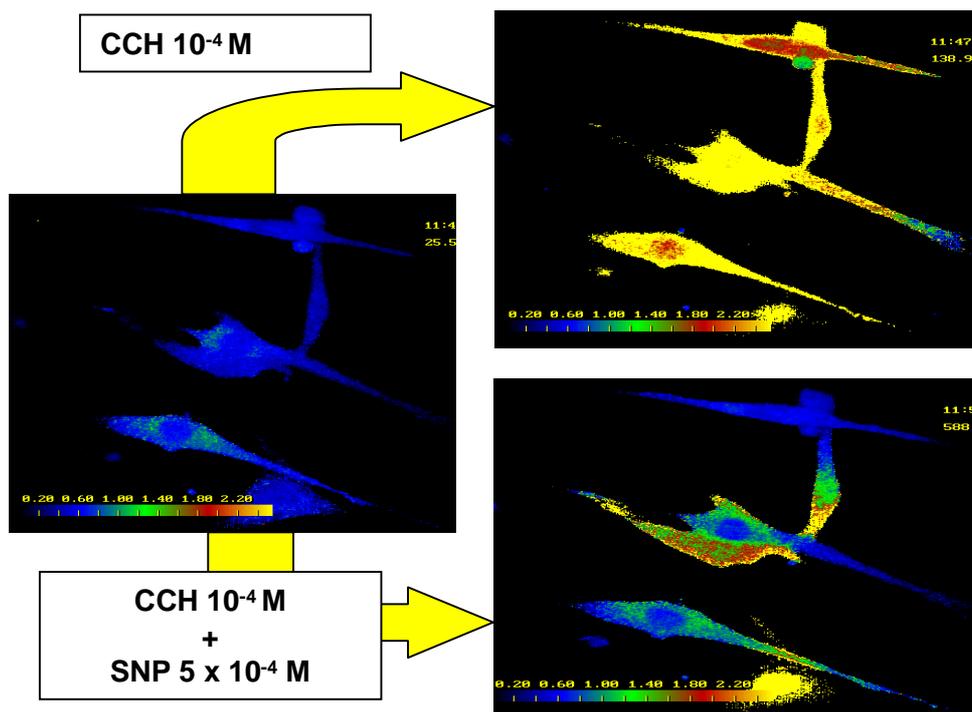


Abb. 11: SNP inhibiert die CCH-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung in humanen Colonmuskelzellen. Pseudocolour-Aufnahmen zum Zeitpunkt der maximalen Stimulation in einem typischen Experiment ($n=33$, $p < 0.001$).

3.4.3.4 Abhängigkeit der NO-vermittelten Inhibition von der löslichen Guanylatzyklase

Stickstoffmonoxid entfaltet seine Wirkung als Überträgerstoff in der glatten Muskulatur vornehmlich durch Bindung und Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC), was zu einer vermehrten Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und dadurch zur Aktivierung cGMP-abhängiger Signalwege führt. Um zu untersuchen, ob es sich bei der demonstrierten NO-vermittelten Inhibition der IP₃-abhängigen Calciumfreisetzung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen um einen durch cGMP vermittelten Effekt handelt, wurde mit ODQ ein selektiver und membranpermeabler Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase (cGC) eingesetzt. In Anwesenheit von ODQ ($2,5 \times 10^{-6}$ M) ließ sich die SNP-induzierte Inhibition des Carbachol-induzierten intrazellulären Calciumkonzentrationsanstiegs vollständig antagonisieren (28% → 131 %, n=11, p<0.01). Die Stimulus-induzierten Calciumsignale wurden in dieser Versuchsserie durch Anwesenheit von 5×10^{-4} M SNP auf 28% der Kontrolle inhibiert (n=11, p<0.01). Unter gleichzeitiger Anwesenheit von SNP und ODQ ($2,5 \times 10^{-6}$ M) waren die Carbachol induzierten Calciumspikes im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich (131%, n=11, p>0.05, Abb.12). Diese Untersuchung belegt eine vollständig cGMP-abhängige Vermittlung der NO-induzierten Inhibition der IP₃-sensitiven Calciumfreisetzung in humanen Colonmuskelzellen.

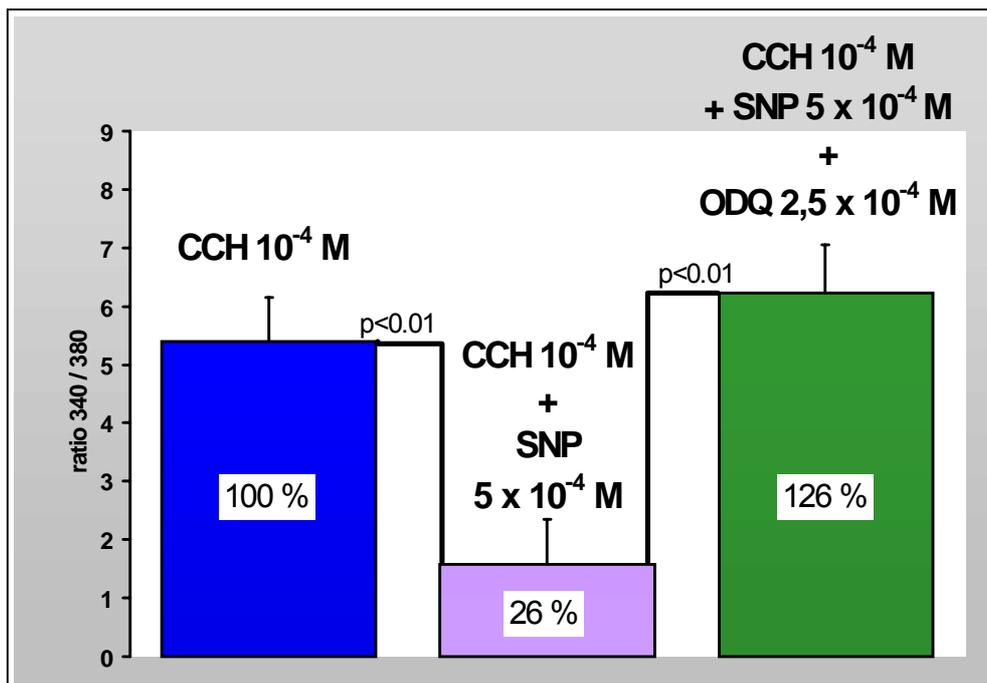
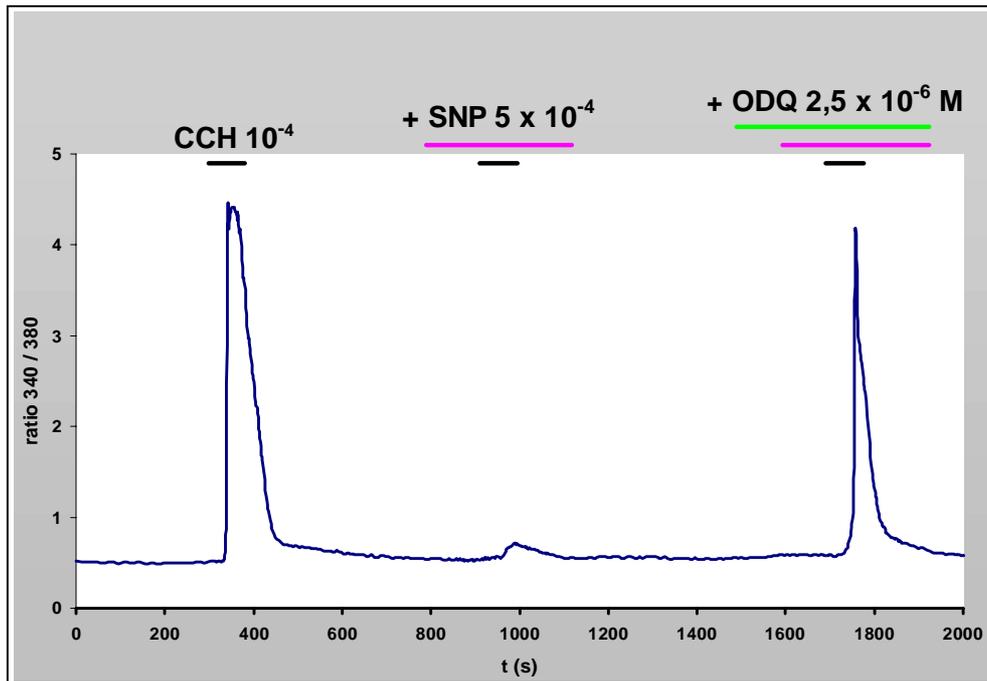


Abb. 12: Effekt von ODQ, einem selektiven Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase auf die SNP-induzierte Inhibition des Calciumkonzentrationsanstiegs.

A Typischer Kurvenverlauf mit der Aufhebung der SNP-induzierten Inhibition durch $2,5 \mu\text{M}$ ODQ

B Vergleich der peak ratios nach Stimulation mit 10^{-4} M Carbachol, wobei SNP den Calciumanstieg auf 26 % des Kontrollwerts reduziert und ODQ diesen Effekt komplett aufhebt (\pm SEM, $n=11$).

3.4.3.5 Abhängigkeit der NO-vermittelten Inhibition der von der Proteinkinase G

Der nächste Schritt in der NO-abhängigen Signaltransduktion nach der Aktivierung der Guanylatzyklase durch NO stellt die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen (cGK) durch zyklisches Guanosinmonophosphat dar. Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß die Hemmung der Stimulus-induzierten Calciumfreisetzung durch SNP in humanen Colonmuskelzellen durch Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase vermittelt wird, wurden mit KT 5823 und Rp-pCPT-cGMPs zwei spezifische und membranpermeable Inhibitoren der cGK eingesetzt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von KT 5823 (10^{-6} M) und SNP (5×10^{-4} M) ließ sich der Carbachol-induzierte intrazelluläre Calciumkonzentrationsanstieg nur noch auf 84,0% des Kontrollwertes inhibieren (84%, n=11, p<0.05), bei alleiniger Anwesenheit von 5×10^{-4} M SNP dagegen auf 34,5% (n=11, p<0.01, Abb.12). In Anwesenheit von Rp-pCPT-cGMPs inhibierte SNP die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung noch auf 70% der Kontrolle (n=11, p<0.05), während SNP alleine in dieser Versuchsreihe eine Hemmung auf 31% induzierte (n=11, p<0.01). Diese Versuche belegen eine weitgehende, aber nicht vollständige Vermittlung der cGMP-abhängigen Inhibition der IP₃-sensitiven Calciumfreisetzung durch die cGK.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Experimente an kultivierten humanen Colonmuskelzellen eine deutliche Hemmung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus IP₃-abhängigen Calciumspeichern durch Stickstoffmonoxid, die vollständig durch die lösliche Guanylatzyklase und zum überwiegenden Anteil durch die Proteinkinase G vermittelt wird.

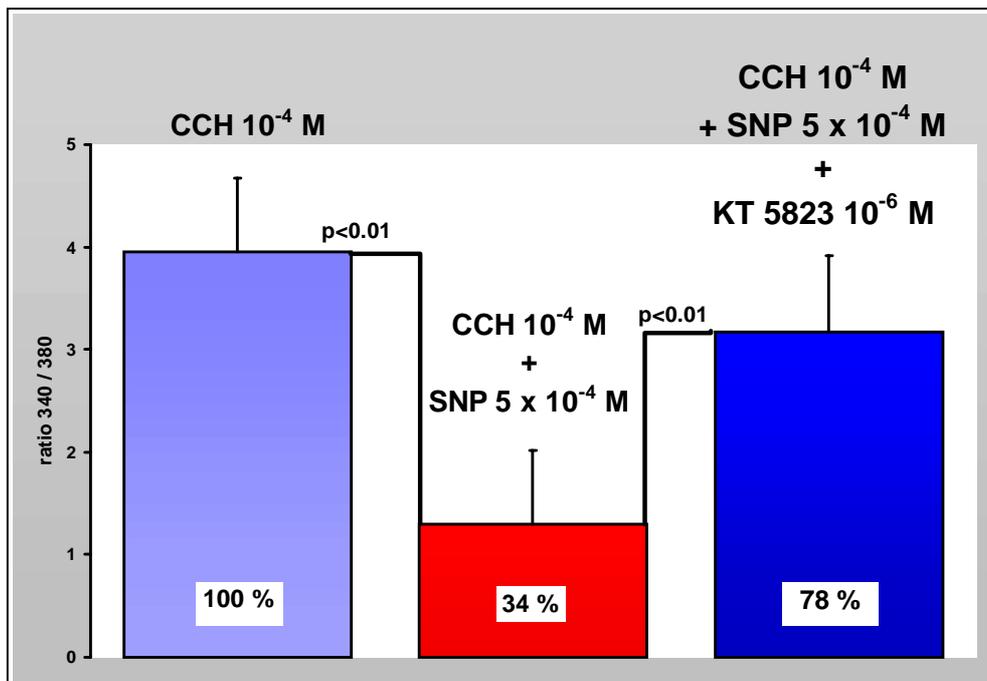
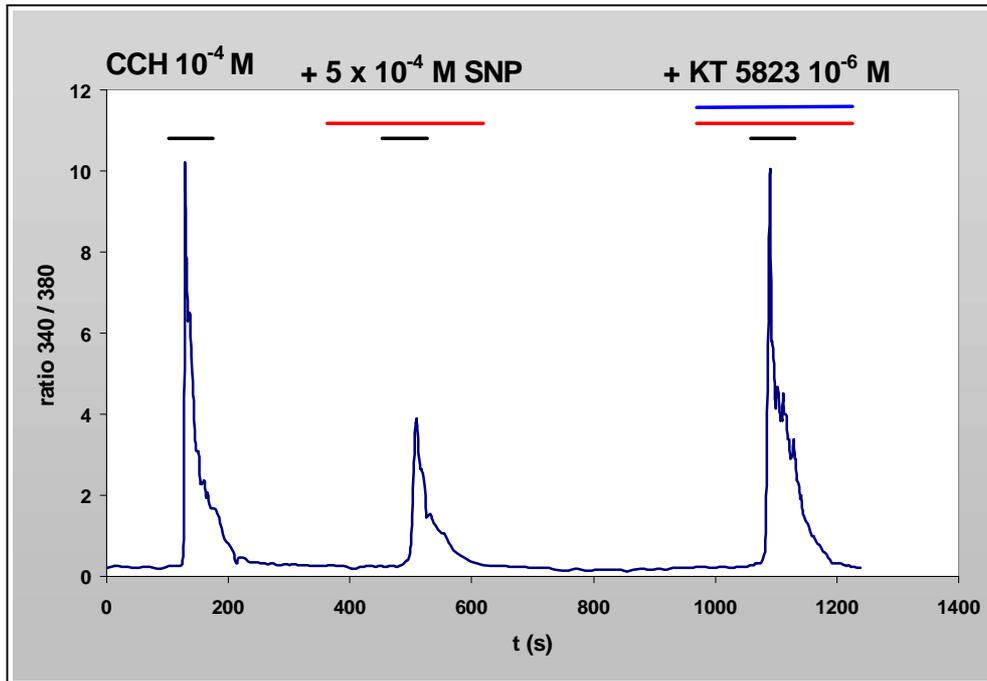


Abb. 13 Effekt von KT5823 (10^{-6} M), einem membranpermeablen Inhibitor der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK), auf die SNP-vermittelte Inhibition der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung.

A Typischer Kurvenverlauf mit Inhibition der Ca^{2+} -Mobilisation durch SNP (5×10^{-4} M) und beinahe kompletter Aufhebung des Effekts durch KT5823 (10^{-6} M)

B Vergleich max. erreichter Fluoreszenzintensitätsquotienten, wobei die SNP-vermittelte Hemmung der Calciumfreisetzung durch KT5823 (10^{-6} M) von 34 % auf 78 % der Kontrollwerts verringert wird (\pm SEM, $n=11$).

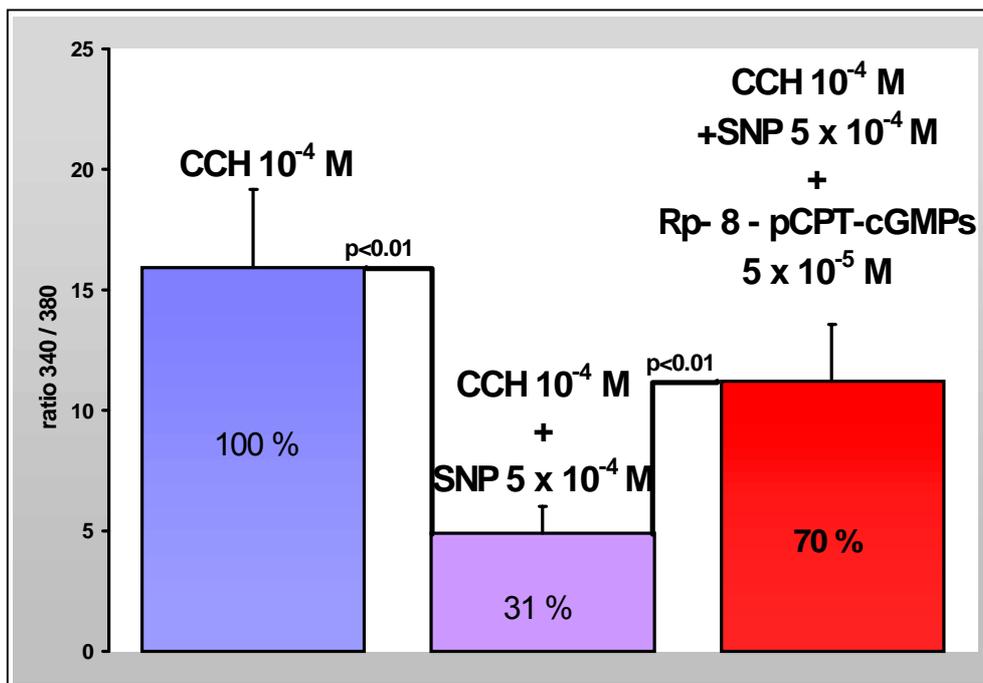
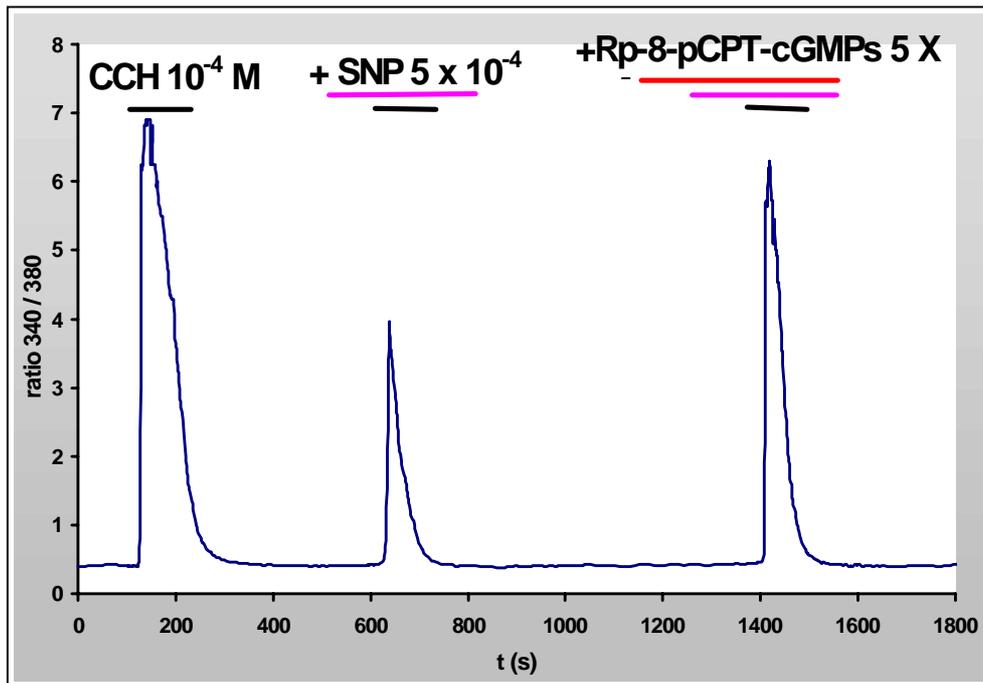


Abb. 14: Effekt von Rp-8-pCPT-cGMPs (5×10^{-4} M), einem membranpermeablen Inhibitor der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK), auf die SNP-vermittelte Inhibition der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung.

A Typischer Kurvenverlauf mit Inhibition der Ca^{2+} -Mobilisation durch SNP 5×10^{-4} M und beinahe kompletter Aufhebung des Effekts durch Rp-8-pCPT-cGMPs.

B Vergleich max. erreichter Fluzoreszenzintensitätsquotienten (Inhibition durch SNP auf 31%, Verringerung d. Inhibition auf 70% durch Rp-8-pCPT-cGMPs (5×10^{-4} M) (+/- SEM, n=11)

3.4.2 Immunologischer Nachweis wichtiger Funktionsproteine der Stickstoffmonoxid-abhängigen Signaltransduktion in humanen Colonmuskelzellen

3.4.1 Nachweis der cGK 1 β

NO entfaltet seine spezifische Wirkung als vorwiegend inhibitorisch wirksamer Überträgerstoff in der glatten Muskulatur durch Aktivierung einer spezifischen Signaltransduktionskaskade, deren einzelne Elemente vielfältige modulatorische Aufgaben in der glatten Muskelzellen übernehmen. Die cGMP-abhängige Proteinkinase nimmt damit eine zentrale Position in der NO-abhängigen Signaltransduktion ein. Von den drei bisher beschriebene Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK I α , cGK I, cGK II) wurde in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts vornehmlich die cGK I β -Isoform nachgewiesen (Huber et al., 1998, S. 629). Zum Nachweis der Expression der cGK I β in kultivierten humanen Colonmuskelzellen wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Verwendet wurde ein gegen die NH₂-terminale Domäne der cGK I β gerichteter polyklonaler Antikörper, als Positivkontrolle wurde reines, synthetisch hergestelltes cGK I β - Protein (von Prof. Ruth, Institut für klinische Pharmakologie der Technischen Universität München, freundlicherweise zur Verfügung gestellt) verwendet. Nach Extraktion der Proteinfraction aus kultivierten humanen Colonmuskelzellen, elektrophoretischer Größenauftrennung, Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran, Immunreaktion und Detektion der membrangebundenen Antikörper mit dem ECL-Detektionssystem (siehe 2.5) zeigte sich in der Laufspur des Muskelzellproteinextrakts eine kräftige Proteinbande, der im Vergleich zu den parallel aufgetragenen Molekulargewichtsstandards ein Molekulargewicht von 75 kDa zugeordnet wurde. In der Laufspur der Positivkontrolle zeigte sich auf gleicher Höhe eine ebenso kräftige Bande, so daß von einem spezifischen Nachweis der cGK I β aus dem Proteinextrakt glatter Muskelzellen ausgegangen werden muß.

3.4.2 Nachweis von IRAG (Ins(1,4,5)P₃-receptor-associated cGK I substrate)

Die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase durch vermehrte Produktion von cGMP setzt eine Reihe von Phosphorylierungsreaktionen in Gang, die in den letzten Jahren in zunehmendem Maße identifiziert werden konnten (Hofmann et al., 2000, S. 197). Eine zentrale Funktion der cGK in der Signaltransduktion glatter Muskelzellen liegt in der Vermittlung der Wechselwirkung zwischen der NO-abhängigen Signalkaskade und der IP₃-abhängigen Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Als zentrales Element dieser Wechselwirkung wurde vor kurzem ein Protein mit einem Molekulargewicht von 125 kDa identifiziert und funktionell charakterisiert, das die Bezeichnung IRAG (IP₃-receptor-associated cGMP kinase substrate) erhielt (Schlossmann et al., 2000, S. 197). Nachdem die gezeigte Daten eine cGK-abhängigen Hemmung der IP₃-abhängigen Calciumfreisetzung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen demonstrieren, stellte sich die Frage nach einer Expression von IRAG in humanen Colonmuskelzellen. Unter Verwendung eines gegen IRAG gerichteten polyklonalen Antikörpers und einer Positivkontrolle aus pulmonalen Membranen (beides von J. Schlossmann, Institut für Pharmakologie der Technischen Universität München) zeigte sich im Western Blot aus dem Proteinextrakt kultivierter humaner Colonmuskelzellen eine deutliche Proteinbande auf Höhe eines Molekulargewichts von 125 kDa, die der Proteinbande der parallel aufgetragenen Positivkontrolle entsprach, was die IRAG-Expression in kultivierten humanen Colonmuskelzellen belegt.

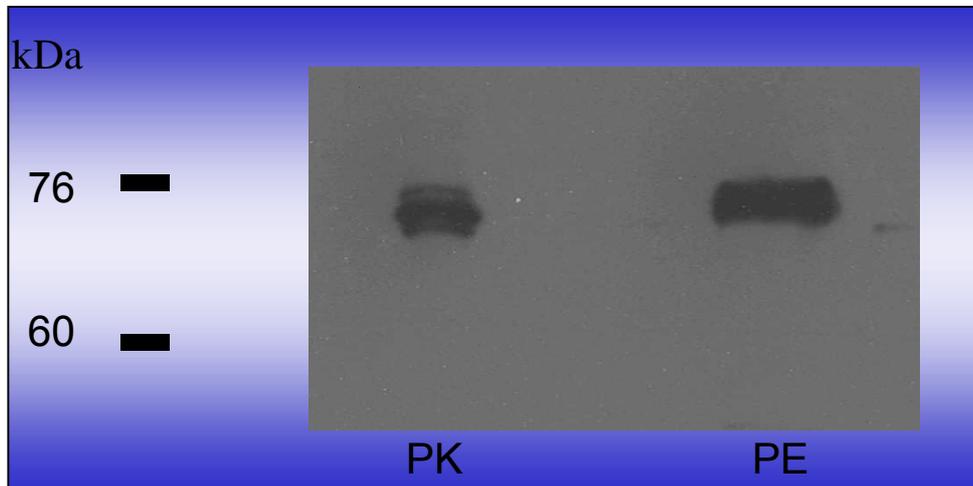


Abb. 15: Western Blot Analyse zum Nachweis der cGK I β -Expression in kultivierten humanen Colonmuskelzellen. PK= gereinigte cGK I β , PE= Proteinisolat aus humanen Colonmuskelzellen.

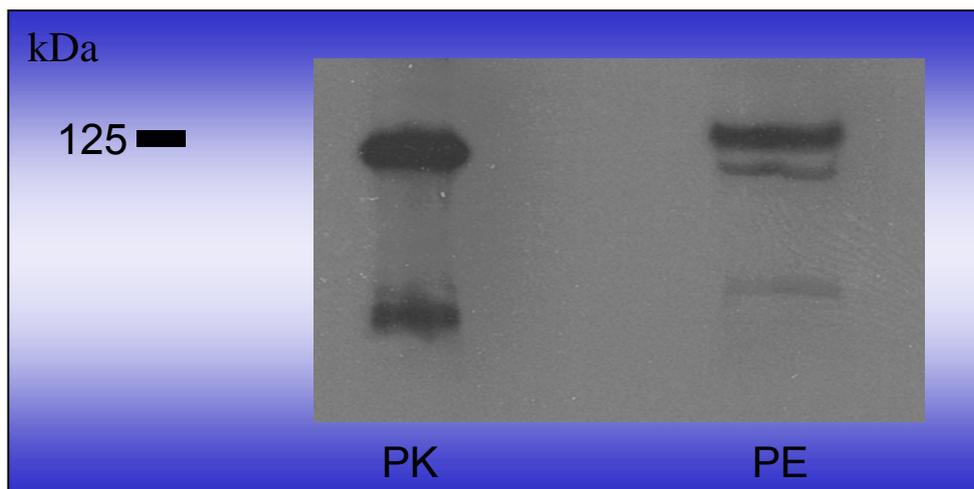


Abb. 16: Western Blot Analyse zum Nachweis der IRAG-Expression in kultivierten humanen Colonmuskelzellen. PK=Positivkontrolle, PE= Proteinisolat aus humanen Colonmuskelzellen.

4 Allgemeine Diskussion

4.1 Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des enterischen Nervensystem

4.1.1 Anatomische Grundlagen

4.1.1.1 Sonderstellung des enterischen Nervensystems innerhalb des autonomen Nervensystem

Das enterische Nervensystem (ENS) bildet nach dem klassischen Konzept von Langley (Langley, 1921) neben dem sympathischen und parasympathischen Nervensystem die dritte Komponente des autonomen Nervensystems (Furness und Costa, 1982). Die Sonderstellung des enterischen Nervensystems innerhalb des autonomen Nervensystems erklärt sich nicht nur durch seine einzigartige anatomische Struktur, sondern auch aufgrund der Beobachtung, daß komplexe Reflexmuster und integrale Funktionsabläufe im Verdauungskanal weitgehend unabhängig von sympathischen und parasympathischen Einflüssen ablaufen können und von extrinsischen Einflüssen allenfalls moduliert werden. Die funktionelle Autonomie des ENS läßt sich auch anhand von Zahlen verdeutlichen. Allein in der Wand des Dünndarms von Säugetieren wurden mindestens 2×10^8 Nervenzellen gefunden, so daß das ENS in etwa genauso viele Nervenzellen enthält wie das gesamte Rückenmark. Die beiden Nervi vagi, die die parasympathische Innervierung des gesamten Dünndarms vermitteln, führen auf Zwerchfellhöhe beim Menschen dagegen durchschnittlich nur 56138 afferente und gerade einmal 1736 efferente Fasern (Hoffman und Schnitzlein, 1969), was einem ungefähren Zahlenverhältnis von einer afferenten Faser pro 3500 enterischen Neuronen und einer efferenten Faser pro 115 000 Neuronen entspricht (Wood, 2001). Darüber hinaus unterscheiden sich zahlreiche anatomische und funktionelle Charakteristika des enterischen Nervengewebes von den Strukturen des übrigen autonomen Nervensystems. Die charakteristische morphologische und funktionelle Differenzierung enterischer Neurone und die vielfache Vernetzung zwischen einzelnen enterischen Neuronen, die in sagittaler und longitudinaler Projektion auch über weite Strecken miteinander kommunizieren und Regelkreise bilden, haben dazu geführt, das enterische Nervensystem in seiner Gesamtheit als „Brain in the gut“ oder als „little brain“ zu betrachten (Baidan et al., 1995).

4.1.1.2 Aufbau des enterischen Nervensystems

Die Neuronen des enterischen Nervensystems sind zum überwiegenden Teil in enterischen Ganglien organisiert, die durch Nervenfaserbündel vernetzt sind und auf diese Weise charakteristische Plexus formen. Die Gesamtheit aller Nervenzellsomata innerhalb des Verdauungskanals und ihre Nervenzellfortsätze werden als intrinsische Nerven bezeichnet. Sie stehen einem wesentlich kleinerem Anteil von extrinsischen Nervenfasern gegenüber, die von den vegetativen Ganglien außerhalb des Verdauungskanals in das enterische Nervensystem einstrahlen. Die ersten Beschreibungen ganglienhaltiger Plexus in der Wand des Verdauungstrakts stammen bereits aus der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts von Meißner (1857), Billroth (1858) und Auerbach (1862). Die bei weitem größte Anzahl an Ganglien und Fasern führen die beiden größten und auch funktionell wichtigsten Plexus, der submuköse Plexus (Meißner - Plexus) und der myenterische Plexus (Auerbach - Plexus) (Costa et al., 1987). Die übrigen Plexus werden in ihrer Gesamtheit auch als nicht ganglionierte Plexus bezeichnet (Costa et al., 1987). Charakteristischerweise liegen die Strukturen der einzelnen intramuralen Plexus jeweils in einer bestimmten Ebene in der Wandschichtung des Verdauungskanals. Dieses Verteilungsprinzip lässt sich mit hoher Konstanz über sämtliche Abschnitte des Verdauungskanals verfolgen. Von der äußeren, der Serosa zugewandten Oberfläche nach innen in Richtung Mukosa lassen sich im einzelnen folgende Plexus unterscheiden:

Subseröser Plexus

Der subseröse Plexus liegt der Bindegewebsschicht der Serosa von innen und den äußersten Schichten der Längsmuskulatur von außen an. Er enthält kaum Ganglien und besteht aus dünnen Nervenfaserbündeln, die unter anderem extrinsische Fasern enthalten, die von außen in den Verdauungskanal einziehen (Furness und Costa, 1982).

Myenterischer Plexus

Der myenterische Plexus besteht aus Ganglien und Nervenfasern, die in der Ebene zwischen äußerer Zirkulärmuskulatur und innerer Longitudinalmuskulatur über die Länge des gesamten Verdauungskanals und um dessen gesamte Zirkumferenz ein dichtes Netzwerk formen. Morphologie, Dichte und strukturelle Anordnung der Ganglien unterscheiden sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies und dem

jeweiligen Abschnitt des Verdauungskanal. Innerhalb des myenterischen Plexus werden drei strukturelle Komponenten unterschieden: der primäre, sekundäre und tertiäre Plexus (Furness und Costa, 1982) Die myenterischen Ganglien und die kräftigen Verbindungsstränge zwischen ihnen werden als die primäre Komponente des myenterischen Plexus oder als primärer Plexus bezeichnet. Aus der Ebene des primären Plexus ziehen zahlreiche dünnere Nervenfaserbündel, die aus den Ganglien oder den Verbindungssträngen hervorgehen, nach innen und bilden zwischen Zirkulärmuskulatur und Primärplexus ein dichtes, ganglienfreies Fasernetzwerk aus, das als sekundärer Plexus bezeichnet wird. Als tertiären Plexus bezeichnet man dagegen die Gesamtheit dünner Nervenfaserbündel, die den Raum zwischen den Netzstrukturen des primären und sekundären myenterischen Plexus ausfüllen (Furness und Costa, 1982).

Tiefer muskulärer Plexus

Innerhalb der inneren Schichten der Zirkulärmuskulatur von Dün- und Dickdarm findet sich ein Netz aus Nervenfasern, das eine dünne Schicht Zirkulärmuskelzellen von der restlichen zirkulären Muskelschicht abzutrennen scheint. Diese praktisch ganglienfreien Nervenfasern, die das Darmrohr in seiner gesamten Zirkumferenz umgeben, wurden erstmals von Cajal (1895) beschrieben und tiefer muskulärer Plexus genannt.

Submuköser Plexus

Der submuköse (Meißnersche) Plexus bildet ein dichtes Netzwerk aus Ganglien und Verbindungsfasersträngen und stellt damit den zweiten großen, ganglienhaltigen Plexus des ENS dar. Die Ganglien des submukösen Plexus sind in Durchschnitt kleiner, die Faserbündel dünner und noch dichter als im myenterischen Plexus. So enthält ein Ganglion des submukösen Plexus des Meerschweinchenileums beispielsweise durchschnittlich 8 Nervenzellen, ein myenterisches Ganglion der gleichen Region dagegen 40 Neurone pro Ganglion (Wilson et al., 1981) Die Ganglien des submukösen Plexus sind über weite Strecken zweischichtig angeordnet, weshalb eine innere und äußere Schicht unterschieden wird (Furness und Costa, 1982).

Plexus der Muscularis mucosae

Innerhalb der oft irregulär angeordneten, relativ dünnen Muskelschicht der Lamina muscularis mucosae befindet sich ein zartes Netzwerk von Nervenfasern, das als „Plexus der Muscularis mucosa“ bezeichnet wird.

Mukosaler Plexus

Innerhalb der Lamina propria mucosae findet sich ein dichtes Netzwerk von Nervenfasern, die in ihrer Gesamtheit als „Mukosaler Plexus“ bezeichnet werden und je nach anatomischer Nachbarschaft in weitere Subgruppen differenziert werden können (subglandulär, periglandulär, subepithelial). Innerhalb der Mukosa wurden ferner einzelne Nervenzellgruppen identifiziert (Furness und Costa, 1982).

Zwischen den einzelnen Plexus, insbesondere zwischen myenterischem und submukösem Plexus existieren dichte Querverbindungen. So wurden insbesondere VIP- und SP-positive Neurone identifiziert, die direkte Verbindungen zwischen beiden Netzwerken herstellen (Jessen et al., 1980). Aus den Plexus entspringen ferner die zahllosen Nervenfasern, die mit interstitiellen Zellen, Muskel-, Mukosa- und Drüsenzellen in Kontakt treten und somit ihre Wirkung an den Zielstrukturen des enterischen Nervensystems entfalten.

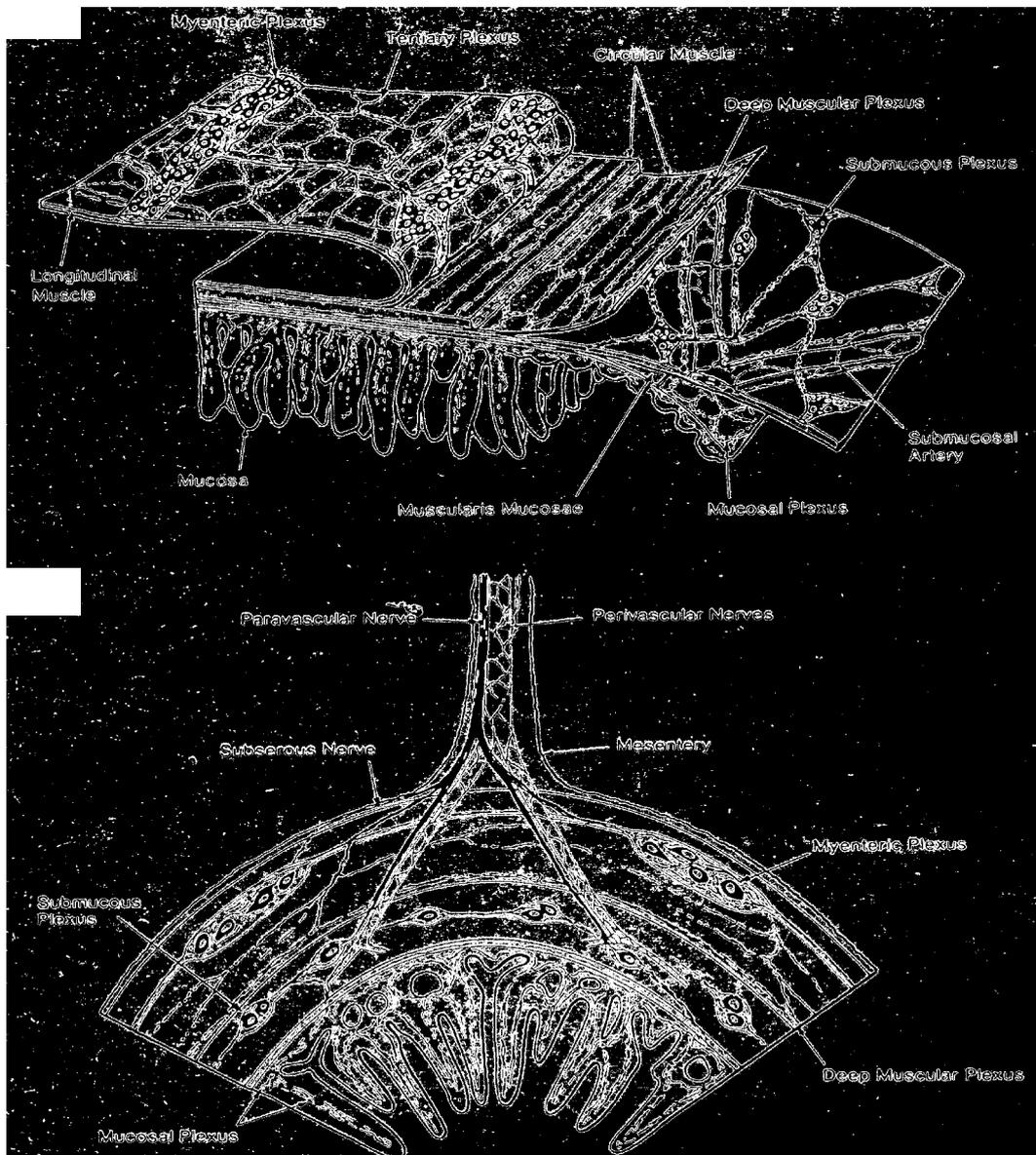


Abb. 17: Anatomischer Aufbau des enterischen Nervensystems (nach Furness et. al, 1982)
Lokalisation der einzelnen im Text erläuterten Strukturen im systematischen Längs- und Querschnitt

4.1.2 Zellarten im enterischen Nervensystem

4.1.2.1 Differenzierung enterischer Neurone

Morphologische Differenzierung

Die erste morphologische Klassifizierung enterischer Neurone stammt von A.H. Dogiel (Dogiel, 1899) und ist bis heute gebräuchlich. Anhand morphologischer Kriterien auf der Basis von Methylenblau-Färbungen und Silberimprägnation unterscheidet er drei verschiedene Typen von Neuronen im ENS:

Dogiel-Typ-I-Zellen besitzen einen flachen Zellkörper, aus dem ein einzelner langer Fortsatz -mutmaßlich das Axon- und zahlreiche (4 bis >20) kurze, flache, lamellenähnliche Dendriten hervorgehen. Das Axon verläuft zunächst über weite Strecken in interganglionären Faserbündeln, durchzieht bis zu vier weitere Ganglien, bevor es in der Zirkulärmuskelschicht endet, was früh zu der Annahme führte, daß es sich bei diesen Zellen um Motoneurone handeln müsse (Wood, 1994; Furness und Costa, 1982).

Dogiel-Typ-II-Zellen sind durch einen glatten, spindel- oder sternförmigen Zellkörper gekennzeichnet, aus dem – häufig von einer konischen Ausstülpung entspringend - ein Axon und 3 bis 10 Dendriten, die sich weiter verzweigen und in langen, dünnen Fortsätzen enden, hervorgehen.

Dogiel-Typ-III-Zellen tragen nach Dogiels Beschreibung ebenfalls ein Axon, welches allerdings kaum Verzweigungen aufweist. Die Dendriten sind vergleichsweise kurz und projizieren nur innerhalb des Ursprungsganglions.

Darüber hinaus wurden enterische Neurone beschrieben, die sich keiner der drei Dogiel-Gruppen eindeutig zuordnen lassen (Furness und Costa, 1982).

Funktionelle und elektrophysiologische Differenzierung

Im enterischen Nervensystem existieren entgegen früherer Theorien, in denen sämtliche Neurone des ENS als postsynaptische Neurone des autonomen Nervensystems aufgefasst wurden, alle drei wesentlichen funktionellen Kategorien von Neuronen, nämlich sensorische Neurone, Motoneurone und Interneurone (Wood, 1994). Diese drei Klassen von Neuronen unterhalten zahllose synaptische

Verbindungen untereinander, die den Informationsfluß innerhalb der Strukturen des ENS, beispielsweise vom mukosalen sensorischen Neuron bis hin zu den Axonen myenterischer Motoneurone in der Zirkulärmuskulatur, ermöglichen.

Einen zentralen Beitrag für das Verständnis der Physiologie des enterischen Nervensystems lieferten und liefern elektrophysiologische Untersuchungen. Während die ersten elektrophysiologischen Studien Messungen mit extrazellulären Elektroden beschreiben, wurden die entscheidenden Basisarbeiten in den siebziger Jahren mit intrazellulären Ableitungstechniken (Nishi und North, 1973; Hirst et al., 1974) und neuere Arbeiten mit Patch-clamp Technik (Baidan et al., 1992; Hanani et al., 2000) veröffentlicht. Die meisten dieser Untersuchungen sind am myenterischen Plexus des Meerschweinchendünn- und -dickdarms durchgeführt worden. Grundsätzlich können mindestens vier unterschiedliche Neuronenpopulationen nach ihrem unterschiedlichen Potentialverhalten charakterisiert werden.

Die erste Gruppe wurde als S(synaptic)-Neurone (Hirst et al., 1974) bzw. als Typ1-Neurone (Nishi und North, 1973) bezeichnet. S-Neurone reagieren auf elektrische Nervenfasernstimulation mit einem schnellen exzitatorischen postsynaptischen Potential (fast EPSPs), das maximal 20 ms andauert und sich damit deutlich von langsamen exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (slow EPSPs) unterscheidet, die zwischen 5 und 20 s andauern. Ausgelöst werden schnelle EPSPs durch die präsynaptische Freisetzung von Acetylcholin, das an postsynaptische nikotinerge Acetylcholinrezeptoren bindet. Dem Aktionspotential in S-Neuronen folgt eine kurze Hyperpolarisation, die durch eine Amplitude von 15 mV und eine Dauer von 15-20 ms charakterisiert ist und auf eine überschießende Repolarisation durch geöffnete Kaliumkanäle zurückgeführt wird. Die elektrophysiologischen Charakteristika von S-Neuronen im ENS entsprechen denen typischer Effektorneurone (z.B. Motoneurone), wie sie überall im autonomen Nervensystem vorkommen.

Charakteristisch für das enterische Nervensystem sind die elektrophysiologischen Eigenschaften der zweiten Gruppe enterischer Neurone, der AH-/Typ 2-Neurone, die zunächst nur im ENS gefunden wurden (Furness und Costa, 1982), mittlerweile aber auch in motorischen und sensorischen Neuronen des N. vagus und im ZNS nachgewiesen wurden (Vogalis et al., 2001).

Dem Aktionspotential in AH(afterhyperpolarisation)-Neuronen folgen zwei aufeinanderfolgende Hyperpolarisationsereignisse, zunächst – ähnlich wie in S-Neuronen - eine schnelle Hyperpolarisation, dann aber eine zweite, sich langsam entwickelnde und bis zu 20s anhaltende Hyperpolarisation, die auf die Aktivierung Calcium-abhängiger Kaliumkanäle zurückzuführen ist und das Neuron vor repetitiver Depolarisation schützt. Ein weiteres Charakteristikum von AH-Neuronen besteht im Aktionspotential selbst. Während durch intrazelluläre Stimulation in einem S-Neuron bis zu 200 repetitive Aktionspotentiale mit einer Frequenz von 70-150/s ausgelöst werden können, feuern AH-Neuronen nur ein- bis dreimal. Während der sich anschließenden langsamen Hyperpolarisation ist die Reizschwelle deutlich erhöht (Dogiel, 1899; Nishi und North, 1973). Das Ruhepotential in AH-Neuronen ist zudem höher, der Eingangswiderstand geringer als in S-Neuronen. Spontandepolarisationen werden im Gegensatz zu S-Neuronen kaum beobachtet.

Während das Aktionspotential in S-Neuronen allein durch Aktivierung spannungsabhängiger Na^+/K^+ -Kanäle generiert wird und durch Tetrodotoxin (TTX) komplett blockbar ist, besitzt das Aktionspotential in AH-Neuronen dagegen eine zweite, Calciumkanal-abhängige Komponente (Furness und Costa, 1982), die TTX-insensitiv ist. Bivalente Ionen wie Mn^{2+} oder Cd^{2+} , die den Einstrom von Calciumionen über die Zellmembran blockieren, führen dagegen zu einer repetitiven Depolarisation von AH-Neuronen, die an das Verhalten von S-Neuronen erinnert (Vogalis et al., 2001).

Interessanterweise weisen die meisten AH-Neuronen eine typischen Dogiel-Typ-II-Morphologie, die meisten S-Neuronen dagegen eine Dogiel- Typ-I-Morphologie auf (Hodgkiss und Lees, 1983). Als charakteristisch für AH-Neuronen gilt der immunzytochemische Nachweis von Calbindin in einem Dogiel-Typ-II-Neuron (Wood, 1994). Im Meerschweinchencolon zeigten in einer kürzlich veröffentlichten Studie 29 von 78 untersuchten Neuronen Dogiel-Typ-II-Morphologie, 25/29 waren Calbindin-positiv und 24/29 zeigten die typische prolongierte Hyperpolarisation der AH-Neuronen (Lomax et al., 1999). In kombiniert elektrophysiologischen und immunzytochemischen Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß S-Neurone typischerweise entweder Motoneuronen oder Interneuronen, AH-Neurone dagegen sensorischen Neuronen oder Interneuronen entsprechen (Wood, 1994; Bornstein et al., 1991)

Darüber hinaus wurden Neurone beschrieben, die weder in die S- noch in die AH-Kategorie einzuordnen waren und als Typ 3- und Typ 4-Neurone charakterisiert wurden.

Typ 3-Neurone sind durch eine weitgehende elektrische Unerregbarkeit und ein sehr hohes Ruhepotential, das durch eine hohe Kaliumleitfähigkeit entsteht, gekennzeichnet.

Typ 4-Neurone zeigen ähnliche Charakteristika wie AH-Neuronen mit dem Unterschied, daß die Aktionspotentiale TTX-sensitiv sind und daß keine AH-typischen Hyperpolarisationen auftreten (Wood, 2001).

Eine weitere, bislang nicht beschriebene Neuronenpopulation mit hoher Spontanaktivität, hoher Erregbarkeit, TTX-insensitivem Aktionspotential und fehlender prolongierter Hyperpolarisation wurde vor kurzem im submukösen Plexus des Meerschweinchencolons identifiziert (Lomax et al., 2000).

Im Bereich neuronaler Synapsen in ENS lassen sich mit Hilfe intrazellulärer Ableitungsexperimente vier unterschiedliche Signalmuster identifizieren. Neben den bereits erwähnten schnellen und langsamen EPSPs sind dies langsame inhibitorische postsynaptische Potentiale (slow IPSPs) und die präsynaptische Inhibition.

Schnelle EPSPs finden sich typischerweise an S-Neuronen der beiden ganglienhaltigen Plexus, in geringerem Umfang und mit geringeren Amplituden auch an AH-Neuronen und Typ 3-Neuronen. Vermittelt werden schnelle EPSPs durch nikotinerge Signaltransduktion (siehe oben). Die Funktion der schnellen EPSPs in S-Neuronen liegt in der schnellen Signalübertragung, beispielsweise zur Generierung einer motorischen Antwort.

Langsame EPSPs sind sowohl an S-Neuronen als auch an AH-Neuronen nachweisbar (Katayama und North, 2001), werden durch die präsynaptische Freisetzung von Neurotransmittern hervorgerufen und sind damit abhängig von extrazellulärem Calcium (Johnson et al., 2001). Als mögliche Transmitterkandidaten wurden SP und 5-HT, diskutiert (Wood, 2001; Katayama und North, 2001). Insgesamt zeigen langsame EPSPs sowohl in ihrer Morphologie als auch im Hinblick auf Auslösbarkeit eine ausgeprägte Variabilität, so daß – in Abhängigkeit von Zelltyp und Lokalisation - von mehr als einem einzigen Mechanismus der slow EPSP-Auslösung ausgegangen werden muß. Weitere Botenstoffe, für die die Auslösung

von langsamen EPSPs gezeigt werden konnte, sind Histamin, Acetylcholin, Bombesin, Cholezystokinin, VIP, Somatostatin und Caerulein (Wood, 2001). Auch intrazellulär appliziertes cAMP bzw. Substanzen, die zu einer Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration führen, riefen langsame EPSPs hervor (Wood, 2001). Ferner wurde gezeigt, daß die Auslösung von langsamen EPSPs in Neuronen von Pertussistoxin insensitive G-Proteinen und Aktivierung der Phospholipase C mit subsequenter Proteinkinaseaktivierung abhängig ist (Bertrand und Galligan, 1995). Auf ionaler Ebene führt die Transmitterfreisetzung zur Aktivierung eines Chloridkanals und zur Inhibition von zwei Kaliumkanälen, von denen einer spannungsabhängig ist und auf allen Neuronen vorkommt, der andere Calcium-aktiviert ist, nur auf AH-Neuronen vorkommt (Bertrand und Galligan, 1995).

Als Mechanismus für die prolongierte, sich dem Aktionspotential anschließende Hyperpolarisation konnte ein Calciumeinstrom durch Omega-Conotoxin-sensitive Calciumkanäle während des Aktionspotentials identifiziert werden, in dessen Folge es zur Freisetzung von Calcium aus membrannahen Coffein-sensitiven Calciumspeichern kommt, was wiederum zu einer prolongierten Aktivierung eines Ca^{2+} -aktivierten K^{+} -Kanals führt, der für die Hyperpolarisation verantwortlich ist (Vogalis et al., 2001).

Die prolongierte Hyperpolarisation ist für die Signaltransduktion im ENS von entscheidender Bedeutung, da durch sie die Geschwindigkeit der Erregungsfortleitung in sensorischen Neuronen und Interneuronen gesteuert werden kann (Vogalis et al., 2001). Dauer und Ausprägung der Nachhyperpolarisation stehen zudem unter dem modulierenden Einfluß zahlreicher Neurotransmitter, die von benachbarten, axo-axonale Synapsen bildenden Neuronen freigesetzt werden.

Langsame inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) entsprechen in ihren Charakteristika weitgehend dem inversen Bild langsamer EPSPs. Sie lassen sich sowohl an S-Neuronen als auch an AH-Neuronen nachweisen. Als Neurotransmitter werden vor allem Katecholamine, aber auch Opiode, CCK, Adenosin und Somatostatin diskutiert. Die Funktion der IPSPs in der Erregungsübertragung im ENS liegt am ehesten in einer Verzögerung der Exzitation descendierender cholinergischer Motorneurone im Rahmen des peristaltischen Reflexes (Wood, 2001).

Das Phänomen der präsynaptischen Hemmung beruht auf der präsynaptischen Inhibition der Neurotransmitterfreisetzung, entweder durch präsynaptische axo-

axonale Synapsen oder durch rezeptorvermittelte Autoinhibition der Transmitterfreisetzung durch den Transmitter selbst im Sinne einer Feedbackhemmung (Wood, 2001). Im ENS ist eine präsynaptische Hemmung durch Nordadrenalin sowohl an schnellen (fast EPSPs) als auch an langsamen Synapsen (slow EPSPs) des myenterischen Plexus nachgewiesen worden. Auch für Serotonin via 5HT₃-Rezeptoren (Galligan, 1996), GABA, und Acetylcholin (via muskarinerge Rezeptoren) sind präsynaptische inhibitorische Effekte beschrieben (Wood, 2001).

Immunologische Differenzierung

Eine wichtige zur funktionellen Charakterisierung enterischer Neurone liegt im Nachweis von Neurotransmittern, Neuropeptiden, Enzymen der Neurotransmittersynthese und Signaltransduktion und in der Identifikation spezifischer Rezeptoren und Rezeptorsubtypen auf und innerhalb von enterischen Neuronen. Neben den Methoden der klassischen Immunzytochemie, Rezeptorbindungstudien und dem funktionelle Nachweis von Enzymaktivitäten bsp. durch Umsatz radioaktiver Substrate, verwenden neuere Studien in zunehmendem Maße die Möglichkeiten der hochauflösenden konfokalen Mikroskopie (Li und Furness, 1998; Hens et al., 2000) und molekularbiologische Techniken zum Nachweis von Enzymen und Rezeptoren (Huber et al., 1998; Saur et al., 2000) in enterischen Neuronen. Eine Errungenschaft neuerer Studien an verschiedenen Regionen des myenterischen und submukösen Plexus war zudem die Korrelation morphologischer, elektrophysiologischer und immunzytochemischer Befunde, was durch Injektion eines geeigneten Farbstoffs (z.B. Neurobiotin, DIL) in das elektrophysiologisch untersuchte Neuron und die anschließende Fixierung und Immunfärbung des markierten Gewebes ermöglicht wird (Lomax et al., 2000; Lomax et al., 1999; Clerc et al., 1998; Neunlist et al., 1999).

Erschwerend für das Verständnis der unterschiedlichen Expressionsmuster von biochemischen Markern in enterischen Neuronen ist sowohl die große Variabilität der Befunde in unterschiedlichen Regionen des Verdauungskanals einer Spezies als auch die zum Teil erheblichen Abweichungen im Bereich anatomisch vergleichbarer Regionen verschiedener untersuchter Spezies. An humanem Gewebe liegen kaum Untersuchungen vor. Die meisten Untersuchungsergebnisse stammen von

Meerschweinchengewebe, wobei alleine im Meerschweinchendünndarm bisher 18 verschiedene Neuronensubgruppen identifiziert worden sind (Brookes, 2001).

Myenterische Motoneuronen mit Projektion zur Zirkulärmuskulatur

Bei retrogradem Tracing von myenterischen Neuronen des humanen Colons, deren Axone in die Zirkulärmuskulatur projizierten und zu 98% Dogiel-Typ-I-Morphologie zeigten, konnten zwei in etwa gleich große Neuronenpopulationen abgegrenzt werden. Die eine Population wurde durch Nachweis von Cholinacetyltransferase (ChAT) als cholinerg identifiziert und projizierte vorwiegend über 11 mm nach oral, während die andere Population von Motoneuronen NOS (NO-Synthase)-positiv war (19% in Colokalisation mit VIP) und über bis zu 19 mm nach aboral projizierte. Eine kleine Subpopulation von Neuronen exprimierte sowohl ChAT als auch NOS und konnte als Gruppe myenterischer Interneuronen ohne Projektion zur Zirkulärmuskulatur identifiziert werden (Porter et al., 1997). Im myenterischen Plexus des Meerschweinchencolons wurden 7 von 15 nach aboral projizierenden S-Neuronen als NOS-positiv identifiziert (Lomax et al., 1999), in einer anderen Studie (Furness et al., 1994) wurden im Bereich des gesamten Verdauungskanals NOS-positive myenterische Neuronen mit besonders hoher Dichte in Ileum, Colon und Rektum beschrieben, wobei sich die höchste Dichte NOS-positiver Nervenfasern wiederum in der Zirkulärmuskulatur fand. In zahlreichen myenterischen ChAT-positiven S-Neuronen fand sich zudem eine Colokalisation mit SP (Lomax et al., 1998), so daß sich zusammenfassend postulieren läßt, daß zumindest in Dünn- und Dickdarm verschiedener Spezies ChAT/SP-positive Motoneurone des MP nach oral und NOS-positive Neurone in teilweiser Coexpression mit VIP nach aboral in die Zirkulärmuskulatur projizieren, was unter vereinfachender funktioneller Betrachtung zu einer proximalen Kontraktion mit gleichzeitiger distaler Relaxation der Zirkulärmuskulatur und damit zu propulsiver Peristaltik führt.

Im Magenantrum des Meerschweinchens sind ebenfalls ChAT/SP- und NOS/VIP- bzw. NOS/NPY-positive Motoneurone nachgewiesen worden, wobei jeweils Subgruppen mit Enkephalin kolokalisiert waren, was eine funktionelle Rolle für endogene Opiode in der Steuerung der Magenmotilität nahelegt (Pfannkuche et al., 1998), wie sie im Ösophagus bereits funktionell nachgewiesen wurde (Storr et al., 2000).

Myenterische Motoneurone mit Projektion zur Longitudinalmuskulatur

Im Meerschweinchendünndarm projizieren 24 % aller myenterischen Motoneurone zur Longitudinalmuskulatur. Diese Neuronensubgruppe besteht aus sehr kleinen Neuronen, die häufig in Gruppen im Bereich der Einmündung der Internodalstränge im Randbereich myenterischer Ganglien lokalisiert sind und deren Axone dichte, aber kurze Verzweigungen im tertiären Plexus ausbilden (Brookes, 2001). Fast alle Neurone mit Projektion zur Longitudinalmuskulatur sind cholinerg, die Hälfte davon immunoreaktiv für SP und bei 87 % dieser Neurone läßt sich zudem Calretinin nachweisen (Brookes, 2001). Zudem lassen sich im Bereich des tertiären Plexus, der der Longitudinalmuskulatur dicht anliegt, Neurone mit VIP/NOS- und vereinzelt GABA-Immunoreaktivität nachweisen.

Aszendierende Interneurone

Aszendierende Interneurone zeigen als typische S-Neurone Dogiel-Typ-I-Morphologie, projizieren bis zu 14 mm in oraler Richtung und sind im Meerschweinchendarm auf den myenterischen Plexus beschränkt, wo ihre Axone mehrere Ganglien durchlaufen und dabei zahlreiche Querverbindungen aufweisen. Aszendierende Interneurone weisen im Meerschweinchendünndarm Immunoreaktivität für ChAT/Calretinin/SP und ENK auf (Brookes, 2001). Im Meerschweinchencolon wurden zwei weitere Populationen aszendierender filamentöser Interneurone identifiziert, eine mit SOM-/ ChAT-/VIP-Immunoreaktivität, eine andere mit TK(Tachykinin)-/SOM-/Calretinin-Immunoreaktivität (Lomax und Furness, 2000). Insgesamt verkörpern aszendierende Interneurone etwa 5 % aller myenterischen Neurone (Costa et al., 1996).

Deszendierende Interneurone

Mindestens fünf Gruppen von Neuronen, die analwärts auf myenterische Neuronen projizieren, sind im Meerschweinchendarm identifiziert worden (Costa et al., 1996). Neben AH-Neuronen, die im myenterischen Plexus teilweise als Interneurone

fungieren und die typische ChAT/Calbindin-Immunreaktivität aufweisen, wurden vier weitere Klassen deszendierender Interneurone nachgewiesen. Neben gut charakterisierten Subgruppen mit Immunreaktivität für Somatostatin und Serotonin existieren eine Vielzahl VIP-positiver Neurone mit unterschiedlicher Kodierung, deren Einteilung derzeit nicht einheitlich ist (Brookes, 2001)

Somatostatin-positive Interneurone sind ChAT-positiv und damit cholinerg. Sie entsenden zahlreiche filamentöse Dendriten, die über bis zu 70 mm innerhalb des myenterischen Plexus und über bis zu 60 mm vom myenterischen in den submukösen Plexus nach aboral projizieren (Song et al., 1996). Innerhalb eines myenterischen Ganglions nehmen sie häufig grüppchenweise eine zentrale Stellung ein.

Ein kleiner Teil Serotonin-positiver Interneurone sind Somatostatin-positiv. Eine zweite Gruppe 5-HT-positiver Interneurone zeigt Dogiel-Typ-I-Morphologie und ist cholinerg (Costa et al., 1996). Insgesamt bilden diese Interneurone eine recht kleine Fraktion von etwa 2 % aller myenterischer Neurone im Meerschweinchendarm.

VIP-positive Nervenfasern sind im Meerschweinchendünndarm zahlreich (Costa et al., 1987). Zu wie vielen unterscheidbaren Neuronenpopulationen sie zuzuordnen sind, ist noch unklar. Ein größerer Anteil VIP-positiver Nervenfasern im myenterischen Ganglion ist ChAT-positiv und damit von den inhibitorischen Motoneuronen, die nach aboral zur Zirkulärmuskulatur ziehen (siehe oben) zu unterscheiden. Die meisten VIP-positiven Interneurone sind NOS- und NPY-positiv. Eine Subgruppe enthält zudem Bombesin-ähnliche Immunreaktivität. In funktionellen Studien an isolierten Nervenendigungen aus dem Rattendünndarm konnte eine differenzierte NO-abhängige Modulation der VIP- und Bombesinfreisetzung nachgewiesen werden und damit ein funktionelles Korrelat für diese morphologischen Befunde identifiziert werden (Kurjak et al., 1999).

Sensorische Neurone

Primäre intrinsische sensorische Neuronen zeigen die Charakteristika von AH-Neuronen, sind Calbindin-positiv und verkörpern innerhalb eines intrinsischen Reflexbogen das erste Neuron (Li und Furness, 1998). Alle diese Neurone projizieren zur Mukosa (Song et al., 1994) und entspringen dem inneren Anteil des submukösen Plexus und dem myenterischen Plexus, wo ihre Zellkörper mit zahlreichen Dendriten dicht verzweigt liegen. Aktiviert werden diese sensorischen

Neurone durch mechanische Dehnung der Darmwand und durch mechanische und chemische Reize an der Mukosaoberfläche (Kunze et al., 1998), wobei in mehreren Experimenten gezeigt wurde, daß die Perikaryen mechanosensitiver Neurone im submukösen Plexus, die Nervenzellkörper chemosensitiver und dehnungssensitiver Neurone dagegen im myenterischen Plexus liegen. Fast alle dieser Neurone sind cholinerg (Li und Furness, 1998). Am Schweinedünndarm wurden für diese Neurone Subpopulationen mit ChAT/CGRP/SP-Immunoreaktivität, ChAT/SP-Immunoreaktivität, VIP-Immunoreaktivität und ChAT/Somatostatin-Immunoreaktivität beschrieben (Hens et al., 2000). Am Dünndarm des Menschen wurden primär afferenter Neurone mit SOM-, SP-, SP/SOM- und VIP-Immunoreaktivität identifiziert (Hens et al., 2000). Große Unterschiede zwischen einzelnen Spezies wurden in der relativen Verteilung retrograd von der Mukosa dargestellter Neurone beobachtet. So waren im Meerschweinchendünndarm die Mehrzahl der zur Mukosa projizierenden Neurone im inneren Anteil des submukösen Plexus und nur etwa je zehn Prozent im myenterischen Plexus und im äußeren Anteil des submukösen Plexus lokalisiert, während im humanen Dün- und Dickdarm 54% aller retrograd gefärbten Neurone im äußeren submukösen Plexus und 24% im myenterischen Plexus zu finden waren (Hens et al., 2000; Timmermans et al., 2001).

Viszerofugale Neurone

Eine Subpopulation enterischer Neurone projiziert zu vegetativen prävertebralen Ganglien und dient der Kommunikation zwischen ENS und dem extrinsischen vegetativen Nervensystem (Brookes, 2001). Im Meerschweinchendünndarm entsprechen diesen Neuronen kleine Dogiel-Typ-I-Zellen, die VIP/ChAT/GRP-positiv sind. Im Schweinedickdarm sind zudem NOS-positive Neurone im äußeren submukösen Plexus identifiziert worden, die zum Ganglion mesentericum inferius projizieren (Barbier et al., 1994). Die Gruppe viszerofugaler enterischer Neuronen ist insgesamt klein (1%) und nimmt in ihrer relativen Dichte von proximal nach distal zu (Costa et al., 1996).

Submuköse Neurone

Die Neurone des submukösen Plexus lassen sich zum überwiegenden Teil in vier Subgruppen aufteilen. Im Meerschweinchendünndarm projiziert ein Drittel aller submukösen Neurone zur Mukosa und den mukosalen Drüsen und ist immunoreaktiv

für NPY/ChAT/CCK/CGRP/SOM/GAL/DYN. (Song et al., 1992). Im Dünndarm des Schweins wurden zwei Populationen submuköser cholinergischer Sekretomotorische Neurone identifiziert, die SP oder SOM koexprimierten.

Etwa 12% der submukösen Neurone im Meerschweinchendünndarm ist immunoreaktiv für ChAT/Calretinin und projiziert zur Mukosa und – als cholinerge vasodilatatorische Neurone – zu submukösen Gefäßen (Song et al., 1992).

Eine weitere Gruppe besteht aus Dogiel-Typ-II-Zellen und ist immunoreaktiv für SP/ChAT und Calbindin. Daneben finden sich im submukösen Plexus primär afferente Neurone (siehe oben).

4.1.2.2 Enterische Glia

Der strukturelle Aufbau des enterischen Nervensystems und insbesondere der ganglienhaltigen Plexus ist in zahlreichen Merkmalen dem ZNS ähnlicher als den Elementen des peripheren Nervensystems (Jessen und Mirsky, 1983). Während Nervenfasern und Nervenzellkörper im peripheren Nervensystem von collagenhaltigen Bindegewebsstrukturen eingehüllt sind, fehlen diese im ENS ebenso wie im ZNS (Glabella, 1987). Auch die Struktur und Funktion enterischer Glia zeigt mehr Parallelität zur Astroglia des ZNS als zu den Schwannschen Zellen des peripheren Nervensystems. Enterische Gliazellen zeigen meist irreguläre Formen mit zahlreichen Fortsätzen, die von einem zentralen Zellkörper ausgehen und in kleinen Auftreibungen enden, die miteinander in Kontakt treten. Daraus resultiert eine dichte, barrierenartige Gliaschicht, die die myenterischen Neurone von der Umgebung abgrenzt (Gershon und Rothman, 1991). Nervenfasern und auch Nervenzellkörper erstrecken sich durch Öffnungen in dieser Gliazellhülle. Im Gegensatz zu den Gliahüllen peripherer Nerven werden hierbei nicht einzelne Fasern, sondern ganze Faserbündel von einer Gliazellhülle umgeben (Gabella, 1981). Die Gliazellbarrieren tragen auch zu einer funktionellen Kompartimentierung von Nervenzellen innerhalb eines myenterischen Ganglions bei (Gershon und Rothman, 1991).

Ultrastrukturelle Untersuchungen haben eine hohe Konzentration von 10 nm Intermediärfilamenten in enterischer Glia nachgewiesen, die mit sauren Gliafaserprotein (GFAP) assoziiert sind (Jessen und Mirsky, 1980), was als gängiger Marker zur immunochemischen Identifikation enterischer Glia verwendet wird. Andere Marker, die in enterischer Glia nachgewiesen wurden, sind Glutaminsynthetase, Apolipoprotein E und das Calcium bindende Protein S-100

(Gershon und Rothman, 1991), wobei letzteres auch in Zellkulturmodellen zur Identifikation enterischer Glia Verwendung gefunden hat (Bannerman et al., 1988). Die Bedeutung enterischer Glia für die Entwicklung und Funktion des enterischen Nervensystems ist vergleichsweise wenig untersucht. In einigen, auf Zellkulturmodellen beruhenden Arbeiten wurden der enterischen Glia - ähnlich der zentralen Glia - nutritive und andere supportive Funktionen zugeschrieben (Broussard et al., 1993). Enterische Gliazellen exprimieren MHC II Antigene und produzieren nach Zytokinstimulation Interleukine, was eine Rolle enterischer Glia in der intestinalen Entzündungsreaktion nahelegt (Rühl et al., 2001) Darüber hinaus wurde in neueren Untersuchungen auch eine aktive Rolle enterischer Glia in der Signaltransduktion diskutiert (Zhang et al., 1998). Enterische Gliazellen treten über dichte Zellkontakte zueinander in Kontakt (siehe oben) und reagieren auf zahlreiche physiologische Stimuli mit einem intrazellulären Calciumsignal (Kimball und Mulholland, 1996). Die Expression von Phospholipase C-gekoppelten Endothelin B-Rezeptoren wurde nachgewiesen (Zhang et al., 1998). In einer elektrophysiologischen Studie konnten spannungsabhängige Kalium- und Natriumkanäle nachgewiesen werden (Broussard et al., 1993). Ein weiteres Charakteristikum enterischer Glia ist die dichte interzelluläre Vernetzung über gap junctions. Injektion des Farbstoffes „Lucifer yellow“ führte zur Ausbreitung des Farbstoffes über die Zellverbindungen hinweg. Elektrophysiologisches Korrelat dieser „Farbstoffkopplung“ enterischer Glia ist ein sehr niedriger Eingangswiderstand (Hanani et al., 1989).

4.1.2.3 Interstitielle Zellen

Cajal beschrieb als erster eine neben Neuronen, Glia- und Muskelzellen vierte, eigenständige Zellpopulation im Gastrointestinaltrakt, die er auf Grund ihrer Anordnung in den Zwischenräumen der glatten Muskulatur als interstitielle Zellen (ICCs) bezeichnete (Cajal, 1893). Bereits von Cajal wurde die enge Lagebeziehung zwischen interstitiellen Zellen, glatten Muskelzellen und Nerventerminalen beschrieben und eine mögliche Rolle interstitieller Zellen in der Generierung von Motilitätsvorgängen postuliert. In neueren Untersuchungen konnte anhand von Experimenten an Tiermutanten und Entwicklungsstudien eine zentrale Rolle interstitieller Zellen bei der Generierung von „slow waves“ und in der neuromuskulären Signaltransduktion nachgewiesen werden (Ward et al., 1999; Ward und Sanders, 2001; Burns et al., 1996; Ward et al., 1998). ICCs sind

entwicklungsgeschichtlich mesenchymalen Ursprungs und wachsen bereits in enger räumlicher und funktioneller Assoziation zu neuronalen Vorläuferzellen in den Verdauungskanal ein (Torihashi et al., 1997). Entscheidend für die enormen Fortschritte in der ICC-Forschung in den letzten zehn Jahren war die Entdeckung, daß interstitielle Zellen das Proto-Onkogen „c-Kit“ exprimieren, das für den Tyrosinkinase-Rezeptor „Kit“ kodiert (Ward et al., 1994). Damit war ein zuverlässiger immunhistochemischer Marker zur weitgehend selektiven Anfärbung von interstitiellen Zellen gefunden und zugleich ein Angriffspunkt für die Manipulation der ICC-Funktion gefunden, da die Entwicklung und vor allem die Differenzierung interstitieller Zellen von der Expression von „Kit“ als Wachstumsfaktor-Rezeptor abhängt.

Topographisch liegen sämtliche ICCs innerhalb der Tunica muscularis des Verdauungskanals, wo sie sich vom Ösophagus bis hin zum Anus ausbreiten. Aufgrund von räumlicher Anordnung und physiologischen Charakteristika lassen sich mehrere Gruppen von ICCs unterscheiden (Sanders, 1996).

Im Bereich des myenterischen Plexus gelegene ICCs (IC-MY) umgeben netzartig die myenterischen Ganglien und sind über gap junctions untereinander und an die umgebende Schicht glatter Muskelzellen gekoppelt. IC-MY generieren rhythmische, lang anhaltende elektrische Wellen, die passiv in die umgebende glatte Muskulatur fortgeleitet werden. Diese „pacemaker“-Funktion führt im Zusammenspiel mit der umgebenden glatten Muskulatur zur Entstehung von charakteristischer „slow wave“-Aktivität (Barajas-Lopez et al., 1989).

Dem gegenüber stehen intramuskulär lokalisierte interstitielle Zellen (IC-IM), die die Muskelzellschichten durchziehen und dabei ein dichtes intramuskuläres Netz bilden. Ihnen wird eine zentrale Rolle als strukturelles und funktionelles Bindeglied zwischen ENS und glatter Muskulatur zugeschrieben. Zwischen Nervenfasereindigungen und Muskelzellen bestehen in den Muskelschichten des Verdauungskanals auffällig lose räumliche Verbindungen mit neuromuskulären Abständen von bis zu mehreren 100 nm, was eine direkte Neurotransmission nur schwer möglich erscheinen läßt. Dagegen bestehen sehr enge Kontakte zwischen exzitatorischen wie inhibitorischen Nervenfasern und ICCs einerseits und enge Zellkontakte sowie gap junctions zwischen ICCs und Muskelzellen andererseits (Glabella, 1987). Ferner konnte gezeigt werden, daß ICCs zahlreiche Rezeptoren für Neurotransmitter einschließlich muskarinergen Rezeptoren (Epperson et al., 2000), Somatostatin-(Sternini et al.,

1997), VIP- und NK₁-Rezeptoren (Portbury et al., 1996) exprimieren und zudem auf extrinsische oder intrinsische nitric oxide Stimulation mit gesteigerter cGMP-Bildung reagieren und somit eine Zielstruktur für neuronales NO darstellen (Shuttleworth et al., 1993). In Mäusen mit verringerter Tyrosinkinaseaktivität (natürliche Mutante mit Blockierung des „Kit“-abhängigen Pathways), wo IC-IM u.a. im Bereich des Magens fehlen, wurde eine deutliche Verringerung inhibitorischer postsynaptischer Potentiale nach elektrischer Stimulation und eine deutliche Abschwächung der durch exogenes NO hervorgerufenen Hyperpolarisation glatter Muskulatur gemessen (Burns et al., 1996), was auf eine zentrale Rolle interstitieller Zellen in der inhibitorischen Neurotransmission hinweist.

Auch exzitatorische, ChAT- oder SP-positive Nervenfasern stehen in engem, synapsenähnlichem Kontakt zu intramuskulären interstitiellen Zellen (Wang et al., 1999). Trotz unveränderter Nervenfaserdichte waren in den Tyrosinkinasemutanten durch cholinerge Stimulation kaum mehr exzitatorische postsynaptische Potentiale nachweisbar (Ward und Sanders, 2001), so daß auch in der exzitatorischen neuromuskulären Signalübertragung IC-IM eine entscheidende Rolle einzunehmen scheinen.

Eine dritte Gruppe interstitieller Zellen findet sich innerhalb des „deep muscular plexus“ des Dünndarms und wird daher als IC-DMP bezeichnet. Funktionell entsprechen diese ICCs weitgehend dem intramuskulären Typ (IC-IM).

In Zusammenschau deuten die derzeit vorliegenden Ergebnisse auf eine zentrale Rolle interstitieller Zellen in der Generierung und Modulation gastrointestinaler Motilitätsvorgänge hin. Über eine evt. pathophysiologische Bedeutung interstitieller Zellen bei der Entstehung verschiedenster Motilitätsstörungen kann bislang nur spekuliert werden.

4.1.3 Physiologie des enterischen Nervensystems

Regulation von Motilität

Eine zentrale Aufgabe des enterischen Nervensystems besteht in der Steuerung gastrointestinaler Motilität. Der Verdauungskanal besteht aus einer Abfolge spezialisierter Hohlräume mit Transport-, Reservoir-, Verdauungs- und

Resorptionsfunktion, durch die der Speisebrei durch koordinierte Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur der Darmwand hindurchbewegt wird. Das enterische Nervensystem steuert dabei eine Vielzahl komplexer Abläufe vom Schluckakt und der Passage durch den Ösophagus bis hin zu Erbrechen und Defäkation. Zwei grundsätzlich unterschiedliche gastrointestinale Funktionszustände sind zu unterscheiden, nämlich die interdigestive Motilität und die postprandiale Aktivitätszustand.

Die interdigestive Phase ist vom Auftreten des wandernden myoelektrischen Komplexes („migrating myoelectrical complex“, „MMC“) gekennzeichnet, der den humanen Verdauungstrakt alle etwa 80–110 Minuten innerhalb von jeweils 6-10 Minuten von oral nach aboral durchwandert (Kunze und Furness, 1999). Der MMC setzt sich aus mehreren Phasen zusammen. Die Phase III besteht aus intensiven rhythmischen Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur mit propulsiver Wirkung. Dem steht eine Phase relativer Ruhe (Phase I) und eine Phase mit Auftreten irregulärer Kontraktionen gegenüber (Phase II) (Kunze und Furness, 1999).

Diese interdigestiven Motilitätsmuster weichen nach Nahrungsaufnahme einem postprandialem Aktivitätszustand mit Auftreten persistierender, irregulärer phasischer Kontraktionsaktivität mit einer Frequenz von etwa 12-15 Kontraktionen pro Minute.

Beide beschriebenen Funktionszustände werden vom enterischen Nervensystem und von extrinsischen Nervenfasern gesteuert. Sowohl MMCs als auch postprandiale Aktivitätsmuster treten auch nach totaler extrinsischer Denervierung, nicht jedoch nach Blockierung der neuronalen Signalübertragung durch Tetrodotoxin auf (Sarna et al., 1981).

Ein wichtiges Basismodell propulsiver postprandialer gastrointestinaler Motilität stellt der peristaltische Reflex dar. Lokale Dehnungsreize auf die intestinale Mukosa durch einen Nahrungsbolus, aber auch die Applikation hypertoner Salzlösung, kurzkettiger Fettsäuren oder von Gallensalzen führt zu einer lokalen propulsiven Bewegung, die durch orale Kontraktion („aszendierender exzitatorischer Reflex“) und Relaxation aboral des intraluminalen Bolus („deszendierender inhibitorischer Reflex“) entsteht. Vermittelt werden dies Bewegungsmuster durch einen neuronalen Regelkreis innerhalb des enterischen Nervensystems, der die Aktivierung intrinsischer, primär afferenter Neurone, Interneurone und Motoneurone (siehe oben) beinhaltet.

Regulation von Perfusion und Sekretion

Die gleichen Arten endoluminaler Stimuli (Dehnung, mukosale Scherkräfte und chemische Reize), die Motilitätsantworten hervorrufen, führen auch zur Modulation des mukosalen Blutflusses und der intestinalen Sekretion, was als „sekretomotorischer Reflex“ bezeichnet werden kann (Kunze und Furness, 1999). Beispiele neuronal vermittelter Reflexe sind die Stimulation der Dünndarmsekretion durch endoluminale Glukose oder vermehrte Bicarbonatsekretion durch Absinken des endoduodenalen pH-Werts (Flemström, 1994). Sekretomotorische Reflexe werden über neuronale Regelkreise vermittelt, deren afferenter Schenkel mit Nervenfaserverendigungen eines primär afferenten Neurons in der Mukosa beginnt und nach Signalausbreitung im submukösen (v.a. mechanische Reize) und myenterischen Plexus zur Aktivierung von Sekretomotoneuronen führt, welche entweder cholinerg oder VIPerg sind und die epitheliale Chloridionensekretion in das Darmlumen stimulieren (Cooke und Reddix, 1994).

Mechanische wie chemische Reize am mukosalen Epithel rufen eine über einen neuronale Reflexkreisläufe vermittelte Vasodilatation im Bereich der submukösen Arteriolen, deren Tonus das wichtigste Regulativ für die mukosale Perfusion darstellt, hervor („vasodilatatorischer Reflex“). Der afferente Schenkel dieses Reflexmusters ist bisher nicht ausreichend charakterisiert (Kunze und Furness, 1999). Cholinerge und nicht-cholinerge Vasomotoneuronen, deren direkte Stimulation zu einer submukösen Vasodilatation führen, wurden im submukösen Plexus (Vanner und Surprenant, 1996) sowie kürzlich auch im myenterischen Plexus identifiziert (Vanner, 2000). Immunhistochemische Studien deuten schließlich daraufhin, daß vasodilatatorische und sekretomotorische Reflexbahnen dieselben Motoneurone benützen, deren Aktivierung gleichzeitig die mukosale Perfusion und die intestinale Sekretion fördert (Kunze und Furness, 1999).

4.1.4 Pathophysiologie des enterischen Nervensystems

4.1.4.1 Entwicklung des enterischen Nervensystems

Das enterische Nervensystem leitet sich von den vagalen Segmenten der Neuralleiste ab, von wo aus Vorläuferzellen die kranialen Anteile des

Verdauungstrakts besiedeln und innerhalb definierter Wandschichten nach kaudal wandern und das gesamte Darmrohr besiedeln. Anteile des kaudalen Darms erhalten zudem Ganglienvorläufer aus dem sakralen Segment der Neuralleiste. Mehrere Tyrosinkinase-Rezeptoren sind für die Wanderung und Differenzierung intestinaler Neuroblasten von zentraler Bedeutung. Dabei ist Aktivität von „Ret“ für die Entwicklung enterischer Ganglien essentiell und gezielte Mutation des RET-Gens führt u.a. zum Fehlen enterischer Ganglien (Edery et al., 1994) . Beim Menschen führen RET-Mutationen zur Ausbildung eines Megacolons (Romeo et al., 1994). „Kit“, ein anderer Tyrosinkinaserzeptor ist unentbehrlich für die Entwicklung interstitieller Zellen (siehe oben) und KIT-defiziente Mäuse zeigen abnorme Motilität (Burns et al., 1996).

Große Relevanz für Entwicklung und Migration enterischer Neurone wurde auch für Endothelin-3 und Endothelin-B-Rezeptoren nachgewiesen, deren funktionelle Ausschaltung ein aganglionäres Megacolon zur Folge hat (Baynash et al., 1994; Puffenberger et al., 1994).

4.1.4.2 Motilitätsstörungen

Die Steuerung von Motilitätsvorgängen ist die klinisch wohl wichtigste Funktion des enterischen Nervensystems. Funktionsstörungen oder Fehlen enterischer Neuronen oder neuronaler Subgruppen führt zu einer Reihe definierter Krankheitsbilder.

Achalasie

Die Achalasie ist durch einen tonisch kontrahierten unteren Ösophagussphinkter charakterisiert, der im Rahmen des Schluckakts nicht adäquat relaxiert und daher zu einer funktionellen Obstruktion des distalen Ösophagus führt. Charakteristisch ist ferner eine stadienabhängige Störung der Ösophagusperistaltik im mittleren und distalen Ösophagusdrittel (Goyal und Hirano, 1996). Ursächlich für die Entstehung der Achalasie ist entweder der Verlust sämtlicher myenterischer Neurone der betroffenen Region oder der selektive Verlust VIP/NOS-positiver inhibitorischer Neurone im Bereich des unteren Ösophagussphinkters, was bei relativ gut erhaltener cholinergischer Innervation auch zu einem erhöhten Ruhedruck des unteren Ösophagussphinkters führen kann, wie er bei einem Teil der Achalasiepatienten gemessen wird (Goyal und Hirano, 1996). Die gut erhaltene cholinerge Innervation stellt auch die pathophysiologische Grundlage einer symptomatischen

Achalasiebehandlung durch Injektion von Botulinumtoxin in die Muskulatur des unteren Ösophagussphinkter dar (Pasricha et al., 1995). Die Ätiologie der meisten Achalasiefälle ist unklar. Sekundäre Formen treten im Rahmen von paraneoplastischen Syndromen, bei Parkinsonsyndromen und bei der Chagas-Krankheit auf (Goyal und Hirano, 1996).

Infantile hypertrophe Pylorusstenose

Die infantile hypertrophe Pylorusstenose ist durch eine funktionelle Magenausgangsobstruktion charakterisiert, die sich klinisch in den ersten Lebenswochen manifestiert. Bei morphologisch weitgehend normal ausgebildetem myenterischen Plexus der Pylorusregion wurde ein Mangel an inhibitorischen, NOS-positiven myenterischen Motoneuronen, die in die Zirkulärmuskulatur des Pylorus projizieren, nachgewiesen (Goyal und Hirano, 1996). Die Ursache dieser Entwicklungsstörung ist ebenso unbekannt wie der Entstehungsmechanismus charakteristischen Verdickung der Tunica muscularis in der betroffenen Region.

Morbus Hirschsprung

Beim Morbus Hirschsprung handelt es sich um eine ätiologisch heterogene Gruppe von angeborenen Störungen der Entwicklung des enterischen Nervensystem, deren gemeinsames Merkmal das Fehlen enterischer Neurone in einem unterschiedlich langen Bereich des distalen Colons und Rektums ist. Dadurch fehlt in diesem aganglionären Segment die tonische neuronale Inhibition, die im funktionsfähigen Darm vor allem durch NOS/VIP-positive Motoneurone des myenterischen Plexus vermittelt wird. Das segmentale Fehlen hemmender Einflüsse auf die glatte Muskulatur führt zu einer Obstruktion im betroffenen Bereich und zu einer ausgeprägten prästenotischen Dilatation, was zum klinischen Bild eines kongenitalen Megacolons führt (Goyal und Hirano, 1996). Bei einem Teil der betroffenen Neugeborenen liegt eine Vererbung dieses Krankheitsbildes mit autosomal-dominanten Erbgang vor. Beschrieben wurden Mutationen im RET-Gen (Edery et al., 1994), aber auch eine Mutation innerhalb der für den Endothelin-B-Rezeptor kodierenden DNS-Sequenz (Puffenberger et al., 1994).

Diesen charakteristischen, hauptsächlich das ENS betreffenden Krankheitsbildern steht eine Vielzahl angeborener oder erworbener Erkrankungen gegenüber, die mit strukturellen oder funktionellen Störungen im Bereich des ENS einhergehen, beispielsweise das MEN-2B –Syndrom, die Neurofibromatosen, paraneoplastische Syndrome, autonome Neuropathien, die Chagas-Krankheit und neurodegenerative Erkrankungen wie die myotonische Dystrophie oder auch Parkinsonsyndrome.

4.1.4.3 Sekretionsstörungen

Eine Vielzahl endoluminaler Chemikalien (z.B. Ethanol, Gallensalze) wie auch die Toxine nichtinvasiver Erreger (*E. coli*, *V. Cholerae*) führen über Stimulierung mukosaler Rezeptoren zur Aktivierung von sekretomotorischen Reflexen (siehe oben) und damit zu einer indirekten, über neuronale Regelkreise vermittelten, mukosalen Hypersekretion, die klinisch als sekretorische Diarrhoe in Erscheinung tritt (Goyal und Hirano, 1996).

Seit längerem ist bekannt, daß das Cholera-toxin (CTX) durch Bindung an Rezeptoren im Bereich des Bürstensaums zu einer Aktivierung der epithelialen Adenylatzyklase und damit zu vermehrter Chloridsekretion in das Darmlumen führt. Daneben sind auch neuronal vermittelte Mechanismen der Cholera-toxin-induzierten Hypersekretion identifiziert worden, die eine zentrale pathophysiologische Rolle sekretomotorischer Reflexe bei der Cholera-toxin-induzierten Diarrhoe nachweisen. So ließ sich die CTX-induzierte Hypersekretion bei Ratten *in vivo* durch Blockierung der neuronalen Erregungsfortleitung mit Tetrodotoxin, durch Hemmung der nikotinergen Signalübertragung durch Hexamethonium sowie durch 5-HT₂ und 5-HT₃-Antagonisten inhibieren. Selektive Depletion extrinsischer Afferenzen durch Capsaicin blieb ohne Effekt und schließlich führte lokale Applikation von Cholera-toxin im Jejunum zu einer Hypersekretion bis hinab in das distale Colon, was auf eine weitreichende Aktivierung intrinsischer Reflexbahnen hinweist (Goyal und Hirano, 1996; Nocerino et al., 1995).

4.1.4.4 Die Rolle des enterischen Nervensystems bei Entzündungsvorgängen

Ein bekanntes Beispiel für die pathophysiologische Bedeutung des enterischen Nervensystems bei intestinalen Entzündungsprozessen ist die Clostridium-difficile-Toxin-assoziierte Colitis. Clostridium difficile Toxin A führt im Colon zu einer

nekrotisierenden Entzündung, die klinisch unter dem Bild einer pseudomembranösen Colitis verläuft. Initial verursacht das Toxin eine mukosale Mastzelldegradation und die Freisetzung zahlreicher Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Histamin und 5-HT in den Interzellularraum. Diese Mediatoren erregen freie Nervenendigungen primär afferenter Neurone und initiieren damit sekreto- und vasomotorischer Reflexe, die zur Dilatation submuköser Arteriolen und der damit verbundenen mukosalen Hyperämie führen, die eine wesentliche pathophysiologische Voraussetzung für die Entwicklung der Entzündung ist (Castagliuolo et al., 1994). Diese Abläufe sind durch Blockade der neuronalen Erregungsübertragung inhibierbar und im Gegensatz zum bereits erläuterten Wirkungsmechanismus des Choleratoxins ist die Clostridium-difficile-Toxinwirkung auch durch funktionelle Ausschaltung extrinsischer Afferenzen mittels Capsaicin oder durch Vorinkubation mit einem Substance P-Antagonisten blockierbar, was die Involvierung extrinsischer Nervenfasern in der Pathogenese der pseudomembranösen Colitis nahelegt (Pothoulakis et al., 1994).

Seit annähernd fünfzig Jahren wird eine Rolle des enterischen Nervensystems in der Pathogenese und Aufrechterhaltung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen postuliert. Es existieren zahlreiche Belege für das Vorliegen von strukturellen und funktionellen Veränderungen des ENS im Zustand chronischer Entzündung (Sharkey und Kroese, 2001). Unklar bleibt, inwieweit es sich bei den gezeigten Phänomenen um pathogenetisch relevante Ereignisse oder in erster Linie um adaptive Vorgänge im Rahmen des entzündlichen Geschehens handelt. Gesichert ist eine enge Wechselwirkung zwischen immunologischen und neuromodulatorischen Vorgängen im Bereich des Verdauungskanals. So wurde eine Beeinflussung der Immunreaktion durch Neurotransmitter ebenso wie eine Modulierung der Neurotransmitterfreisetzung durch Entzündungsmediatoren nachgewiesen (Cooke und Wang, 1994; Cooke, 1994; Wood, 1992).

Zahlreiche strukturelle Veränderungen des enterischen Nervensystem in entzündlich alterierten Regionen des Verdauungstrakts sind bekannt. So wurde im Dünndarm bei Morbus Crohn eine Hypertrophie und Hyperplasie enterischer Neurone, Nervenzell- und Axondegeneration sowie Proliferation von Gliazellen mit gesteigerter Expression von MHC-II-Antigenen als Indiz für vermehrte immunologische Aktivität beschrieben (Belai et al., 1997; Geboes und Collins, 1998). In der gleichen Untersuchung wurde

eine Zunahme der Neurofilament-Immunoreaktivität sowie eine vermehrte Expression von 5-HT, NPY, NOS und PACAP im myenterischen Plexus und in den zur Zirkulärmuskulatur projizierenden Fasern des Ileums beschrieben (Belai et al., 1997). Als unspezifisches Indiz vermehrter Zellaktivierung wurde eine Zunahme der nukleären Fos-Expression in myenterischen Neuronen in der Initialphase chemisch evozierter Entzündung (Miampamba und Sharkey, 1999) und nach mukosaler Zytokinexposition berichtet (Sharkey und Kroese, 2001).

Sowohl unter klinischen Bedingungen wie auch in experimentellen Colitismodellen wurde eine vermehrte NO-Produktion in der entzündlich veränderten Darmwand gemessen (Miller und Sandoval, 1999). In einer molekularbiologischen Untersuchung der NOS-Expression in einem experimentellen Colitismodell wurde ein unverändertes Expressionsmuster der bekannten Isoformen der neuronalen NOS, dagegen eine Induktion der Expression der induzierbaren NOS in myenterischen Neuronen beschrieben (Miampamba und Sharkey, 1999).

Schließlich existieren zahlreiche Berichte über eine unter Entzündungsbedingungen veränderte Expression von Substance P, wobei eine vermehrte mukosale SP-Expression vor allem bei der Colitis ulcerosa beschrieben wurde und die Datenlage beim Morbus Crohn weitaus weniger eindeutig ist (Sharkey und Kroese, 2001).

Zusammenfassend liegen derzeit zahlreiche Belege für einen wichtigen Betrag des enterischen Nervensystems für das typische klinische und pathoanatomische Gesamtbild chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen vor, ohne daß bisher eine sichere Bedeutung des ENS für Ätiologie, kausale Pathogenese, Verlauf oder Therapie chronischer Darmerkrankungen nachgewiesen worden ist.

4.2 Zellkulturmodelle für das Studium des enterischen Nervensystems

4.2.1 Kultivierung enterischen Nervengewebes

4.2.1.1 Notwendigkeit enterischer Ganglienzellkulturen

Enterische Ganglien sind die Grundbausteine des enterischen Nervensystems und für dessen Erforschung von zentraler Wichtigkeit. Fast alle der über 100 Millionen Neurone und die gesamte Glia des enterischen Nervensystems ist in Ganglien organisiert, während extraganglionäre Anteil der komplexen dreidimensionalen Struktur des ENS fast ausschließlich aus Nervenfasernstrukturen besteht. Im Gegensatz zu den meisten Regionen des ZNS sind enterische Ganglien fest in das

Gefüge nichtneuronaler Darmwandstrukturen eingegettet und stehen einem direkten experimentellen Zugriff nicht zur Verfügung. Eine weitere Schwierigkeit bei der Erforschung enterischer Ganglien liegt in der schwierigen Unterscheidbarkeit von extrinsischen und intrinsischen Faserstrukturen innerhalb eines Ganglions beispielweise bei immunhistochemischen Studien (Saffrey et al., 1992). Noch wesentlich schwieriger gestaltet sich die Charakterisierung einzelner Neurone und Gliazellen des enterischen Nervensystems, die in der dicht gepackten strukturellen Organisation eines enterischen Ganglions mit Zellabständen von nur 15-20 nm (Jessen et al., 1983a) und zahllosen Faser- und Zellkontakten anatomisch und funktionell kaum abgrenzbar sind. Aufgrund dieser Schwierigkeiten war die Entwicklung von Zellkulturmodellen für die ENS-Forschung von fundamentaler Bedeutung (Jessen et al., 1983a). Die präparatorische Isolation enterischer Ganglien aus dem Darmwandgefüge und die anschließende Primärkultivierung unter Bedingungen, die die Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung gewährleisten, ermöglicht einen direkten experimentellen Zugriff auf die Strukturen enterischer Ganglien in kompletter Abwesenheit extrinsischer Nervenfasern und erlaubt unter bestimmten Bedingungen das Studium einzelner enterischer Neurone und Gliazellen ohne Interferenzen durch Zellkontakte oder neuro-neuronale Synapsen. Ferner können unter definierten Bedingungen Entwicklungs-, Wachstums- und Differenzierungsvorgänge nachvollzogen werden, Signaltransduktionsstudien und elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt werden und immunzytochemische, molekularbiologische und funktionelle Studien an Neuronen und Gliazellen unternommen werden.

4.2.1.2 Präparationstechniken und untersuchte Spezies

Die erste Beschreibung einer Präparationstechnik zur Isolierung und anschließender Kultivierung myenterischer Ganglien stammt aus den später siebziger Jahren (Jessen et al., 1982) und verwendete als Spendergewebe das Colon neugeborener Meerschweinchen, vom dem die zu Taenien geraffte Längsmuskulatur mit anhängendem Plexus myentericus abpräpariert, mit Collagenase angedaut, Plexusfragmente in Mikrodissektionstechnik freipräpariert und primärkultiviert wurden. Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde diese Präparationstechnik in den Folgejahren auch am Colon neugeborener Ratten, am Dünndarm neugeborener Meerschweinchen und am Zoekum neugeborener Kaninchen angewendet (Baluk et al., 1983; Jessen et al., 1983a; Jessen et al., 1983b).

Unter Umgehung der schwierigen und zeitaufwendigen Mikrodissektionstechnik wurde Anfang der achtziger Jahre in Boston eine Präparationstechnik am Dünndarm neugeborener Ratten etabliert, die nach Abpräparation der Längsmuskulatur mit myenterischen Plexus und einem Enzymverdauungsschritt erstmals eine mechanische Gewebebehandlung durch wiederholte Pipettenaspiration, gefolgt von einem erneuten Verdau und der Abtrennung von Muskelzellen und Zelldetritus durch mehrere Zentrifugationsschritte beinhaltete (Nishi und Willard, 1985; Willard und Nishi, 1985a; Willard und Nishi, 1985b). Durch die starken Scherkräfte, die während der Präparation auf das Gewebe einwirkte, zeigten sich im Ergebnis keine intakten Ganglien mehr, sondern einzelne Neuronen und Gliazellen, die sich in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen und unter Zugabe von Zytostatika zur Hemmung der Gliaproliferation bis zu drei Monaten kultivieren ließen.

Anfang der neunziger Jahre wurde schließlich erstmals eine Präparationstechnik am Colon neugeborener Meerschweinchen beschrieben, die die Isolierung größerer Plexusfragmente nach der von Jessen etablierten Mikrodissektionstechnik (Jessen et al., 1982) mit einem nachgeschalteten Trypsinanda und einer sanften mechanischen Dissoziation verband und als Ergebnis einzelne Neurone, Gliazellen und kleinere Zellaggregate erzielte (Saffrey et al., 1991).

In einer ersten Beschreibung einer erfolgreichen Trennung von primärkultivierten Neuronen und Gliazellen wurde zur Gewinnung einer relativ reinen Neuronenkultur ein Komplement-aktivierender, an die Oberfläche von Gliazellen bindender Antikörper verwendet, der nach Zugabe von Komplementfaktoren zur selektiven Gliazelllyse führte. Für die Etablierung reiner Gliazellkulturen wurden, nach einigen Tagen in Mischkultur, als proliferierende Glia den ursprünglichen Ganglienbezirk verlassen hatte, die neuronenhaltigen Bezirke im Bereich der Ganglienexplantate schlicht herausgeschnitten (Bannerman et al., 1988).

Bis zu diesem Zeitpunkt war in sämtlichen Studien das Gewebe neugeborener Versuchstiere verwendet worden, wohl weil die Herauslösung intakten myenterischen Plexus mit zunehmendem Alter der Versuchstiere schwieriger wird (Schäfer et al., 1997), die Anzahl an Neuronen pro Ganglion nach der Geburt abnimmt (Schafer und Mestres, 1997; Johnson et al., 1998) und auch die Anhaftung am Objektträger und die Wachstumstendenz in Kultur bei Explantaten neugeborener Tiere besser ist (Schäfer und Mestres, 1997). Studien am ENS unreifer Tiere lassen sich jedoch nur bedingt auf die Verhältnisse am erwachsenen Tier übertragen. Eine

erste Beschreibung der Isolation und Kultivierung myenterischer Ganglien aus dem Dünndarm von adulten Ratten führte lediglich zur Kultivierung größerer Zellaggregate, die relativ stark mit Muskelzellen kontaminiert waren. Intakte Ganglien konnten ebensowenig isoliert werden wie einzelne Zellen (Jaeger, 1995), so daß bis zum jetzigen Zeitpunkt keine zufriedenstellende Methodenbeschreibung zur Isolation und Kultivierung myenterischer Ganglien aus der adulten Ratte vorlag.

Eine wesentlich vereinfachte Präparationstechnik zur Isolierung von myenterischem Plexus wurde von Schäfer beschrieben (Schäfer et al., 1997), der den limitierenden Schritt der Mikrodissektion durch genau definiertes Vortexen der Gewebelösung nach dem Collagenaseverdau ersetzte und dabei ein vergleichbares qualitatives Ergebnis bei weitaus besserer quantitativer Ausbeute erzielte (Schäfer et al., 1997; Schäfer et al., 1995). Diese Abwandlung der Präparationstechnik wurde für die vorliegende Methodenbeschreibung übernommen.

Vom gleichen Autor stammen auch erste Beschreibungen über die Primärkultivierung von myenterischen Ganglien aus dem neugeborenen und adulten humanen Colon (Schäfer und Mestres, 1997).

4.2.2 Wachstums- und Differenzierungsstudien

4.2.2.1 Verschiedene Zelltypen in Primärzellkulturen myenterischen Nervengewebes

Primärzellkulturen myenterischer Ganglien sind Mischkulturen und die Identifikation und Charakterisierung der unterschiedlichen Zelltypen und ihrer Entwicklung in Zellkultur wurde an mehreren Kulturmodellen ausführlich beschrieben (Jessen et al., 1982; Nishi und Willard, 1985; Jessen et al., 1983a). Nach dem Aufbringen des isolierten Nervengewebes auf das Zellkulturplastik wird eine innerhalb weniger Tage eintretende Umwandlung der komplexen dreidimensionalen Ganglienstruktur in eine zweidimensional, am Objektträger ausgerichtete, aufgelockerte Zellanordnung beobachtet, die detaillierte phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen an einzelnen vitalen Zellen ermöglicht. Die lichtmikroskopischen Studien wurden in einigen Untersuchungen durch die Elektronenmikroskopie ergänzt (Baluk et al., 1983; Nishi und Willard, 1985; Schäfer und Mestres, 1997; Song et al., 1995). Typischerweise wurden drei Zelltypen identifiziert, nämlich enterische Neurone, Gliazellen und Fibroblasten. Interstitielle Zellen vom myenterischen Typ (IC-MY), die in situ die Ganglien des myenterischen Plexus netzwerkartig umspannen (siehe

oben) wurden im Rahmen dieser Studien nicht identifiziert, doch scheint in Anbetracht der morphologischeren Ähnlichkeit eine Verwechslung von Fibroblasten und ICCs durchaus denkbar (Saffrey et al., 1992).

Enterische Neurone bewahren in Kultur ihre typische morphologische und ultrastrukturelle Heterogenität mit deutlich unterschiedlicher Zellgröße (15-40 µm Durchmesser) und -form (Jessen et al., 1982). Injektion von Meerrettichperoxidase in kultivierte myenterische Neurone offenbarte deren typische Dogiel-Typ-I,II und III-Morphologie, die unter Kulturbedingungen weitgehend erhalten blieb (Hanani et al., 1982). Auch die Ultrastruktur kultivierter Neurone zeigte wesentliche Elemente der bekannten in-situ-Morphologie myenterischer Neurone (Baluk et al., 1983). Das Zytoplasma enthielt typische Zytoskelettbausteine wie Neurofilamente und Neurotubuli, zahlreiche Mitochondrien und viel rauhes endoplasmatisches Retikulum als Kennzeichen hoher metabolischer Aktivität sowie zahlreiche granulierte Vesikel. Die Zellkerne waren fein granuliert mit mehreren deutlich abgrenzbaren Nucleoli (Song et al., 1995). Aufgrund von Morphologie und Organellengehalt konnten zwei Gruppen von Nervenzellfortsätzen unterschieden werden, die als Axone bzw. Dendriten identifiziert wurden. Synapsenstrukturen wurden beobachtet, die Nerventerminalen enthielten auch in Kultur typische kleine, agranuläre, große granulierte oder flache Vesikel (Song et al., 1995).

Myenterische Gliazellen zeigten auch in Kultur einen ausgeprägten Polymorphismus mit zahlreichen, irregulär geformten Fortsätzen, die zu benachbarten Gliazellen und Neuronen in Kontakt traten. Charakteristisch für die Situation in Kultur war dagegen die flache, beetartige Ausbreitung der Glia auf dem Trägermaterial, was den aussprossenden Neuriten als Unterlage und Leitstruktur zu dienen schien (Baluk et al., 1983).

4.2.2.2 Immunzytochemische Differenzierung

Primärzellkulturen aus myenterischem Nervengewebe eignen sich nach adäquater Fixierung des Gewebes als Ausgangsmaterial für immunzytochemische Studien, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. In mehreren Studien wurden dabei zunächst die Expression charakteristischer Markerproteine zur Identifikation unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen und damit die Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung unter Kulturbedingungen gezeigt.

Myenterische Neurone wurden unter anderem durch Nachweis des neuronspezifischen Markers „protein gene product 9.5“ (PGP 9.5) (Eaker und Sallustio, 1998; Eaker et al., 1995; Schafer et al., 1995; Saffrey et al., 1991), mit Antikörpern gegen Neurofilamentproteine (Eaker et al., 1995), Neuron-spezifische Enolase (NSE) (Mulholland et al., 1994; Grider und Bonilla, 1994), Acetylcholinesterase (AChE) (Jaeger, 1995), α -Tubulin (Mulholland et al., 1994), das Oberflächenglykoprotein Thy (Broussard et al., 1993) und ChAT als Marker cholinerge Neurone (Nishi und Willard, 1985) identifiziert. Vergleichsstudien zur Aussagekraft der einzelnen Marker existieren unter Kulturbedingungen nicht, doch zeigten die beiden am häufigsten verwendeten immunhistochemischen Marker PGP 9.5 und NSE in einer Vergleichsuntersuchung an Schnittpräparaten vergleichbare Ergebnisse (Karaosmanoglu et al., 1996).

Gliazellen wurden in der Literatur entweder durch immunzytochemische Anfärbung von saurem Gliafaserprotein (GFAP) (Jaeger, 1995; Jessen und Mirsky, 1980; Ruhl et al., 2001) oder mit einem gegen das Calcium-bindende Protein S100 gerichteten Antikörper (Bannerman et al., 1988; Broussard et al., 1993) identifiziert.

Neben diesen zur Basischarakterisierung myenterischer Primärzellkulturen durchgeführten Immunfärbungen wurden immunzytochemische Techniken vor allem zur neurochemischen Charakterisierung kultivierter Neurone herangezogen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden im ENS über 20 verschiedene Neuropeptide und –transmitter als funktionell relevante Botenstoffe diskutiert (Goyal und Hirano, 1996), wobei bisher nur ein Teil in Kultur nachgewiesen worden ist. Cholinerge Neurone wurden durch Nachweis der Cholinacetyltransferase (Nishi und Willard, 1985) identifiziert. Durch Autoradiographie wurden auf 10 – 20 % kultivierter myenterischer Neurone muskarinerge Rezeptoren nachgewiesen. Durch gleichzeitige Immunfärbung gegen SP, ENK, SOM und VIP zeigte sich eine deutliche Koexpression von VIP und Muskarinrezeptoren, während SP, ENK und SOM keine Kolokalisation zeigten (Buckley und Burnstock, 1986).

Die erste Identifikation von GABA als Neurotransmitter außerhalb des zentralen Nervensystems erfolgte an kultivierten myenterischen Neuronen durch immunzytochemischen Nachweis des GABA-Syntheseenzym Glutamatdecarboxylase und durch die Demonstration der GABA-Aufnahme und Freisetzung (Jessen et al., 1979). Kürzlich wurden GABA-A-Rezeptoren auf

kultivierten myenterischen Neuronen des Meerschweinchendünndarms nachgewiesen (Zhou und Galligan, 2000).

Die Expression von 5-HT, SOM, SP, VIP, ENK, CCK und BOM wurde mehrfach in regional unterschiedlicher, innerhalb eines Systems jedoch konstanter Häufigkeitsverteilung nachgewiesen (Nishi und Willard, 1985; Saffrey und Burnstock, 1988; Jessen et al., 1983b). Mit zunehmendem Alter der Kulturen wurden typische Verschiebungen im Neurotransmitterexpressionsmuster beobachtet. So nahm die Fraktion SP-exprimierender Neurone bei gleichzeitig starkem Rückgang der VIP-Expression zu (Grider und Bonilla, 1994).

NOS-positive myenterische Neurone sind von zentraler Bedeutung für die inhibitorische Signaltransduktion und die Relaxation gastrointestinaler Muskulatur. Die Expression neuronaler NOS-Isoformen in myenterischen Neuronen wurde an Gewebeschnitten durch Nachweis der NOS-assoziierten NADPH-Diaphorase (Aoki et al., 1993) und durch immunhistochemischen Nachweis der NOS (Porter et al., 1997) gezeigt. Unter Kulturbedingungen wurde die Coexpression der NOS mit der NADPH-Diaphorase am Meerschweinchencoecum (Saffrey et al., 1992) nachgewiesen. Nikotinerge Dauerstimulation führte in kultivierten myenterischen Ganglien zu einer relativen Zunahme nNOS-positiver Zellen (Nakamura et al., 1998). Als Hinweis auf ein funktionsfähiges induzierbares NOS-System (iNOS) in kultivierten myenterischen Neuronen kann der Nachweis Zytokin-induzierter NO-Produktion in kultivierten myenterischen Ganglien mit der Luminol/Peroxidreaktion gewertet werden (Wiklund et al., 1999).

In kultivierten myenterischen Neuronen aus dem Schweinedünndarm wurde die Expression von κ - und δ -Opioidrezeptoren, CB(1)-Cannabinoidrezeptoren und Typ 1 Vanilloidrezeptoren nachgewiesen (Kulkarni-Narla und Brown, 2001).

4.2.2.3 Proliferation und Neuritenaussprossung

Das enterische Nervensystem unterliegt während seiner Entwicklung dem Einfluß wachstumsregulierender Faktoren. Mehrere Wachstumsfaktoren, die zunächst im ZNS identifiziert worden waren, sind mittlerweile im ENS charakterisiert worden (Saffrey und Burnstock, 1994). Primärzellkulturen myenterischen Nervengewebes bieten die einzigartige Möglichkeit, Wachstum und Entwicklung enterischen Nervengewebes in vitro zumindest teilweise nachzustellen und deren Beeinflussung zu untersuchen, was in mehreren Studien durch Modifikation der Kulturbedingungen und die Quantifizierung von Proliferation und Neuritenaussprossung erfolgte. Die

meisten Wachstumsstudien wurden unter serumfreien Kulturbedingungen unter Supplementierung definierter Zusätze durchgeführt (Saffrey und Burnstock, 1984). Der Mechanismus der Neuritenausprossung wurde in Kulturen myenterischer Ganglien neugeborener Meerschweinchen charakterisiert, wobei sowohl das Neurotrophin „nerve growth factor“ (NGF) als auch biochemische Stimulierung der Adenylatzyklase zu einer deutlichen Beschleunigung des Neuritenwachstums führte (Simeone et al., 1994). Ausgangspunkt für die Entstehung von Neuriten auf molekularer Basis ist die vermehrte Synthese von Mikrotubuli, die durch Heterodimerisierung aus α - und β -Tubulin und Quervernetzung durch Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAPs) entstehen. Die mRNA-Synthese für α -Tubulin und MAP war im gleichen Modell durch Aktivierung cAMP-abhängiger Mechanismen und davon unabhängig durch NGF stimulierbar (Mulholland et al., 1994). Neben NGF fördern weitere neurotrophe Faktoren das Neuritenwachstum in Kultur. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) stimulierte ebenso wie ein Interleukin-6/Interleukin-6-Rezeptorkomplex das Auswachsen von Nervenfasern in kultivierten myenterischen Ganglien des neonatalen Rattendünndarms und steigerte die Überlebensrate von Neuronen und die Gliaproliferation in Kultur (Schäfer und Mestres, 2000; Schafer et al., 1999). Der wachstumsfördernde Effekt von GDNF in diesem Modell zeigte eine deutliche Abschwächung mit zunehmendem Alter der Spendertiere (Schafer und Mestres, 1999). Die Expression von Neurotrophin-3 (NT-3) und dessen Rezeptor Tyrosinkinase(Trk) C wurde am gleichen Modell nachgewiesen und ein stimulatorischer Effekt von NT-3 auf das Neuritenwachstum und die relativ Anzahl vitaler Neurone in Kultur aufgezeigt (Saffrey et al., 2000). Schließlich steigerte auch bFGF (basic fibroblast growth factor) Neuronenanzahl und Neuritenwachstum in Kultur (Schäfer et al., 1995).

4.2.3 Funktionelle Studien

4.2.4.1 Elektrophysiologische Eigenschaften

Die Herauslösung myenterischer Ganglien aus ihrer muskulären Umgebung und insbesondere die Primärkultivierung dissoziierter myenterischer Ganglien ermöglichen die elektrophysiologische Charakterisierung myenterischer Neurone und Gliazellen ohne Interferenzen durch intakte Regelkreise, extrinsische Fasern oder Nerv-Muskel-Interaktion. Die elektrophysiologischen Basischarakteristika kultivierter myenterischer Neurone zeigen große Ähnlichkeit mit den in situ erhobenen Befunden

(siehe 4.1.2.1) (Jessen et al., 1982; Hanani und Burnstock, 1985). In mehreren Studien zeigten 35–40 % aller untersuchten Neurone typische S-Typ-Charakteristika, bei nur maximal 25 % aller kultivierten Neurone ließen sich die für AH-Neurone typischen Nachhyperpolarisationen nachweisen, die in situ bei etwa 40 % aller Neurone gemessen wurden (Hanani et al., 1982; Willard und Nishi, 1985a; Vogalis et al., 2000).

Ein großer Vorteil kultivierten myenterischen Nervengewebes gegenüber den häufig für elektrophysiologische Studien verwendeten Nerv-Muskel-Präparationen (LMMP-Streifen) ist der direkte Zugriff auf die Zellmembran und das Fehlen von muskulären Bewegungsartefakten, was myenterische Neurone und Gliazellen erst für Patch-clamp-Studien zugänglich machte (Broussard et al., 1993; Baidan et al., 1992; Franklin und Willard, 1993). In einer Reihe aktueller Studien wurden Patch-clamp-Untersuchungen an zuvor durch Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen (Dil, Lucifer yellow) morphologisch charakterisierten myenterischen Neuronen durchgeführt und teilweise mit fluorimetrischen intrazellulären Calciummessungen und nachgeschalteten immunzytochemischen Techniken verbunden (Hanani et al., 2000; Vogalis et al., 2000).

4.2.4.2 Signaltransduktion und Neurotransmitterfreisetzung

Die Neurotransmitterfreisetzung unterliegt im enterischen Nervensystem komplexen Regelkreisen, deren morphologisches Korrelat die zahllosen Quervernetzungen enterischer Neurone innerhalb und außerhalb eines Ganglions darstellen. Der experimentelle Zugriff auf die für das Verständnis funktioneller Abläufe im ENS elementaren Regulations- und Modulationsvorgänge im Bereich präsynaptischer Membranen wurde durch Etablierung verschiedener Modelle ermöglicht. Die meisten Studien zur Modulation der Neurotransmitterfreisetzung im ENS wurden an isolierten Nervenendkörperchen (Synaptosomen) durchgeführt. So wurde an Synaptosomen des Rattendünndarms die Freisetzung von Bombesin, Somatostatin und VIP nachgewiesen und funktionell näher charakterisiert (Allescher et al., 1996; Kurjak et al., 1996; Kurjak et al., 1995; Kurjak et al., 1994). Darüberhinaus eignen sich Synaptosomen für die funktionelle und molekularbiologische Charakterisierung von präsynaptischen Rezeptoren (Kurjak et al., 1999; Christofi et al., 1990), zum Studium intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen (Kurjak et al., 1999; Kurjak et al., 2001) und für funktionelle Untersuchung neuronaler Enzymsysteme wie der NO-Synthese (Kurjak et al., 1999). Ein Nachteil enterischer Synaptosomen liegt in der

nur relativen Anreicherung neuronaler Membranen gegenüber muskulären Strukturen, was die Aussagekraft dieses Modells für die Differenzierung neuronaler und muskulärer Strukturen und Effekte stark einschränkt.

Neurotransmitterstudien liegen auch an konventionellen Nerv-Muskelpräparationen vor (Yau et al., 1986; Yau et al., 1986; Hebeiss und Kilbinger, 1996) wobei die vollständig intakten intrinsischen Regelkreise aber kaum Rückschlüsse auf einzelne Regulationsvorgänge an der präsynaptischen Membran zulassen.

Dagegen erwies sich die Verwendung isolierter enterischer Ganglien und kultivierten enterischen Nervengewebes für die Charakterisierung von Neurotransmitterfreisetzung und Signaltransduktionsprozessen als vorteilhaft, da muskuläre Elemente praktisch vollständig fehlen und funktionelle Untersuchungen durch morphologische und molekularbiologische Techniken ergänzt werden können.

An frisch isolierten myenterischen Ganglien des Meerschweinchendünndarms wurde eine Stimulation der Freisetzung von Tritium-markiertem Acetylcholin ($[^3\text{H}]\text{-ACH}$) durch SP, VIP, 5-HT und durch Stimulation der Adenylatzyklase durch Forskolin berichtet (Yau et al., 1989). Die Bombesin-induzierte ACH-Freisetzung war an kultivierten myenterischen Ganglien des Meerschweinchencolons durch Blockade spannungsabhängiger L-Typ- und N-Typ-Calciumkanäle und durch Inhibition der Proteinkinase C hemmbar (Mulholland und Simeone, 1993). Prostaglandin E_2 stimulierte die ACH-Freisetzung am gleichen Modell durch Aktivierung cAMP-abhängiger Signaltransduktionswege (Mulholland und Simeone, 1993). Nikotinerge Stimulation führte in isolierten myenterischen Ganglien des Meerschweinchendünndarms zu einer Freisetzung von Acetylcholin und Somatostatin in Abhängigkeit von N-Typ-Calciumkanälen (Takahashi et al., 1992). Die Somatostatinfreisetzung aus isolierten myenterischen Ganglien des Meerschweinchendünndarms (Grider, 1989) und aus kultivierten submukösen Neuronen des humanen Dünndarms (Accili et al., 1993) wurde genauer charakterisiert. Adenosin inhibierte die SP-Freisetzung an isolierten, perfundierten myenterischen Ganglien des Meerschweinchendünndarms (Moneta et al., 1997). Die Stimulation der Freisetzung von VIP durch exogenes und endogen synthetisiertes NO über einen cGMP-abhängigen Mechanismus wurde in isolierten myenterischen Ganglien des Meerschweinchendünndarms nachgewiesen (Grider und Jin, 1993). In der gleichen Arbeit wurde erstmals der direkte biochemische Nachweis der NO-Produktion in myenterischen Ganglien erbracht.

Die Abwesenheit interferierender muskulärer Strukturen ermöglicht die quantitative Messung der cAMP-Produktion in isolierten enterischen Ganglien (Xia et al., 1991). So wurde die Suppression der cAMP-Produktion durch Adenosin (Xia et al., 1997) und deren Stimulierung durch 5-HT (Fiorica-Howells et al., 1993; Xia et al., 1994), SP und CGRP (Baidan et al., 1992) nachgewiesen. Interessanterweise scheinen Gliazellen in relevantem Umfang zu den in myenterischen Kulturen gemessenen cAMP-Spiegeln beizutragen (Christofi et al., 1993).

4.2.4.3 Intrazelluläre Calciumsignale

In erregbaren Geweben, insbesondere in Nervenzellen, kommt der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration besondere Bedeutung zu. Generalisierte oder lokale Calciumkonzentrationsänderungen induzieren oder steuern zahlreiche zellphysiologische Abläufe wie Neurotransmitterfreisetzung, Wachstum, Differenzierung, aber auch Zellschädigung und Apoptose (Berridge et al., 1998; Ghosh und Greenberg, 1995). Durch die Etablierung von Primärzellkulturen aus myenterischem Nervengewebe wurden auch enterische Neurone und Gliazellen für fluoreszenzmikroskopische Calciumstudien zugänglich. Mehrere Studien trugen zur Charakterisierung der Effekte wichtiger Neurotransmitter und -peptide auf den Calciumsignalstoffwechsel kultivierter Neurone bei. So erzeugte Bombesin in kultivierten myenterischen Neuronen aus dem Colon neonataler Meerschweinchen konzentrationsabhängig intrazelluläre Calciumsignale, die von extrazellulärem Calcium unabhängig waren, jedoch durch Depletion intrazellulärer endoplasmatischer Calciumspeicher mit dem Ca^{2+} -ATPase-Inhibitor Thapsigargin ebenso wie durch Inhibition der Phospholipase C blockierbar waren (Simeone et al., 1995). Am gleichen Modell riefen Bradykinin, 5-HT, CCK, ATP, SP/NK-A und ACH in unterschiedlich großen Subgruppen kultivierter Neurone vergleichbare transiente Calciumkonzentrationsanstiege hervor (Kimball und Mulholland, 1995). Dabei wurde der stimulatorische Effekt von ATP unabhängig von extrazellulärem Calcium über P_{2Y} -Purinozeptoren und Aktivierung der Phospholipase C vermittelt (Kimball et al., 1996b), wogegen die Tachykinin-induzierten Calciumsignale sowohl von der Funktion intrazellulärer Calciumspeicher (Vanden Berghe et al., 2000) als auch vom Einstrom extrazellulären Calciums durch spannungsabhängige L-Typ- und N-Typ-Kanäle (Kimball et al., 1996b) abhing. Die Expression von Ryanodine-Rezeptoren (RyR) und deren funktionelle Bedeutung im Rahmen von durch Membrandepolarisation induzierten Calciumsignalen wurde am gleichen Modell

charakterisiert (Kimball et al., 1996a). Die funktionelle Unterscheidbarkeit IP_3 -abhängiger und Ryanodine-sensitiver Calciumspeicher sowie deren teilweise funktionelle Überlappung wurde kürzlich in kultivierten myenterischen Neuronen aus dem Meerschweinchendünndarm nachgewiesen (Turner et al., 2001).

Die Verbindung fluoreszenzmikroskopischer Calciummessung mit morphologischen Techniken wie der Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen oder mit immunzytochemischen Färbungen (Vanden Berghe et al., 2000) oder gleichzeitiger elektrophysiologischer Ableitung (Vogalis et al., 2000) ermöglichte erstmals eine Zuordnung von Calciumsignalcharakteristika zu einer morphologisch oder funktionell identifizierten Subgruppe kultivierter myenterischer Neurone. Durch Einsatz hochauflösender konfokaler Mikroskopie wurde die Aufzeichnung lokalisierter Calciumsignale innerhalb spezialisierter Zellregionen möglich (Vanden Berghe et al., 2000).

4.2.4 Transplantationsstudien

Bei einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise den Parkinsonsyndromen oder auch bei traumatischen Hirn- und Rückenmarksschädigungen liegt dem klinischen Erscheinungsbild ein lokalisierter Mangel funktionsfähigen Nervengewebes zugrunde. Eine Resource intakten, möglicherweise auch für eine Autotransplantation verfügbaren Nervengewebes stellen kultivierte myenterische Ganglien dar (Jaeger et al., 1993; Tew et al., 1994).

Die bislang zu dieser Fragestellung durchgeführten Studien beschränken sich auf die Implantation von zuvor aus speziesgleichen Spendertieren isolierten und kurzzeitig kultivierten myenterischen Nervengewebe in traumatisch erzeugte Läsionshöhlen in Rückenmark und Corpus striatum. So wurden bei Ratten in traumatisch erzeugte Rückenmarkshöhlen über 48h kultiviertes myenterisches Nervengewebe implantiert, das sich bei nur zwei von vier Tieren noch nach 8 Wochen identifizieren ließ und in dem es zudem zum Einwachsen von Blutgefäßen, Einwandern aktivierter Makrophagen und zur Ausbildung von Bindegewebssepten als Zeichen der Abstoßung und Vernarbung gekommen war (Jaeger et al., 1993). In einer anderen Studie wurde in das Striatum adulter Ratten myenterische Ganglien neugeborener Ratten eingepflanzt (Tew et al., 1994). Nach sechs Wochen waren die Transplantate gut erhalten, eine Gliabariere zwischen Spender- und Empfängerewebe hatte sich kaum ausgebildet und ein vermehrtes Aussprosseln catecholaminerger, teilweise myelinisierter Nervenfasern aus Empfängerneuronen wurde beobachtet (Tew et al.,

1995). In einem Kokultursystem aus striatalem und myenterischem Nervengewebe konnte diese Beobachtung nachvollzogen werden und nachgewiesen werden, daß der stimulierende Einfluß myenterischer Ganglien auf das Neuritenwachstum striataler Neuronen auf humoralem Weg und durch einen TTX-sensitiven, von Purinozeptoren und endogenem NO abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt wird (Hopker et al., 1996; Hopker et al., 1995; Hopker et al., 1994). NADPH-positive myenterische Neurone, die nach Verpflanzung in das Stiatum zahlreiche, in das Empfängergewebe einstrahlende Fasern ausbilden, wurden noch ein Jahr nach Verpflanzung wiedergefunden (Tew et al., 1993; Tew et al., 1996).

Eine näherliegende und bislang nicht untersuchte Frage ist, ob die Verpflanzung myenterisches Nervengewebe innerhalb des gleichen Organsystems, beispielsweise durch operative oder endoskopische Implantation in Neuron-defiziente Regionen des Verdauungskanals wie dem distalen Ösophagus bei der Achalasie oder dem Rektum beim kongenitalen Megacolon zur einer strukturellen und funktionellen Reintegration des implantierten Gewebes führen und therapeutische Option darstellen könnte. In einer kürzlich veröffentlichte Studie war myenterisches Nervengewebe, das Ratten autolog retroperitoneal eingepflanzt wurde bei allerdings sehr kurzem Beobachtungszeitraum in Struktur und Differenzierung vollständig erhalten geblieben (Sandgren et al., 2000), was auf mögliche Vorteile eines autologen Ansatzes hindeutet.

4.3 Calciumsignalstoffwechsel intestinaler Muskelzellen und dessen Modulation durch Stickstoffmonoxid

4.3.1 Calciumsignalstoffwechsel in intestinalen Muskelzellen

4.3.1.1 Physiologische Charakteristika glatter Muskelzellen

Calcium in glatten Muskelzellen

Der Kontraktionszustand glatter Muskelzellen wird in erster Linie von der Konzentration freier zytoplasmatischer Calciumionen reguliert. Ein generalisierter Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration führt zu einer Zunahme der Muskelzellkontraktion, ein Absinken geht mit der Abnahme der kontraktile Spannung einher (Sanders, 2001). Die Konzentration freier Calciumionen im Zytoplasma intakter Muskelzellen liegt im Bereich von etwa 100 nmol/l, während die Konzentration ionisierten extrazellulären Calciums im Bereich von 1,3 mmol/l und

damit etwa um den Faktor 10 000 höher liegt. Innerhalb der Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums werden in glatten Muskelzellen ähnliche Calciumgradienten ionisierten Calciums und durch Proteinbindung von Calciumionen Gesamtcalciumkonzentrationen von bis zu 10 – 15 mmol/l erreicht (van Breemen und Saida, 1989). Elektrische, biochemische oder geeignete mechanische Stimuli (Farrugia et al., 1999) führen über verschiedene Signaltransduktionskaskaden zu einer Aktivierung von Calciumkanälen auf der Plasmamembran oder auf den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums, deren vorübergehende Öffnung zu einem Einstrom von Calciumionen in das Zytoplasma entlang des Konzentrationsgefälles führt, was die Muskelkontraktionsmechanismen in Gang setzt. Gleichzeitig werden Mechanismen aktiviert, die die Wiederaufnahme von Calciumionen in sarkoplasmatische und mitochondriale Speicher sowie deren Exkretion in der extrazellulären Raum steuern. Dafür stehen in der glatten Muskulatur mindestens zwölf bekannte Calciumtransportproteine und Ionenkanäle zur Verfügung (Sanders, 2001).

Neben stimulus-induzierten globalen Verschiebungen der zytoplasmatischen Calciumkonzentration, die auf direktem Wege zur Muskelkontraktion führen, existieren streng lokalisierte, hochspezifische Calciumströme, die Signalcharakter für eine Reihe von Regulationsvorgänge besitzen, die Ionenleitfähigkeit spezifischer Membrankanäle modulieren oder dem Auffüllen intrazellulärer Speicher dienen (Sanders, 2001).

Regulation der Kontraktilität glatter Muskelzellen

Um den kontraktilen Apparat einer glatten Muskelzelle zu aktivieren, ist ein globaler, alle Zellkompartimente durchziehender Calciumkonzentrationsanstieg notwendig. Das über die Plasmamembran oder aus dem sarkoplasmatischen Retikulum einströmende Calcium wird durch das Calcium-bindende Protein Calmodulin gebunden und der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex führt durch Assoziation mit der katalytischen Untereinheit der Myosin-Leichtketten-Kinase (myosin light chain kinase, MLCK) zu deren Aktivierung und damit zur Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins (regulatory myosin light chain, rMLC), wodurch die Aktivierung der Myosin-ATPase durch Aktin ermöglicht wird und der Muskel sich kontrahiert (Somlyo und Somlyo, 1994). Abfall der zytoplasmatischen Calciumkonzentration führt zur Deaktivierung der MLCK und subsequenter

Dephosphorylierung der rMLC durch die Myosin–Leichtketten-Phosphatase (MLCP), wodurch die Aktomyosin-ATPase deaktiviert und die glatte Muskelzelle relaxiert wird. Der Tonus glatter Muskelzellen wird aber keineswegs ausschließlich durch Anstieg und Absinken der zytoplasmatischen Calciumionenkonzentration bestimmt, sondern unterliegt einer Reihe weiterer modulatorischer Einflüsse (Pfitzer, 2001). Am besten charakterisiert ist die Modulation der Calciumsensitivität des Kontraktionsapparats durch kontraktile oder relaxierende Stimuli. Dies wird durch Veränderung der Aktivitätsbalance zwischen der MLCK und der MLCP erreicht. Der wichtigste sensitivitätssteigernde und damit kontraktilitätsfördernde Mechanismus liegt in der G-Protein-abhängigen Inhibition der MLCP, was durch Phosphorylierung der regulatorischen MLCP-Untereinheit durch die Rho-Kinase erreicht wird (Pfitzer, 2001). Die Rho-Kinase wiederum wird von Rho, einer monomeren GTPase, aktiviert, die in permeabilisierten glatten Muskelzellen zu einer calciumunabhängigen Zunahme der Kontraktionskraft führte (Gong et al., 1996). Die Aktivität von Rho wird durch Modulation ihrer GTPase-Aktivität gesteuert. Ein anderer Mechanismus, der zur Inhibition der MLCP führt, wird über Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt. So riefen Phorbolester durch Aktivierung der PKC eine Kontraktion glatter Muskelzellen hervor, die durch Phosphorylierung von CPI-17, eines nur an der glatten Muskulatur nachgewiesenen Inhibitors der MLCP, vermittelt wurde (Somlyo und Somlyo, 2000).

Eine calciumunabhängige Verringerung der Kontraktilität glatter Muskelzellen wurde für die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP nachgewiesen, wobei die exakten Mechanismen noch unklar sind (Pfitzer, 2001). Die cAMP-abhängige Proteinkinase (Pka) phosphoryliert die MLCK, was in vitro deren Affinität zum Ca^{2+} /Calmodulinkomplex verringerte. In intakten Zellen konnte dagegen kein signifikanter Effekt durch cAMP auf die MLCK-Aktivität nachgewiesen werden (Stull et al., 1990). Für cGMP wurde eine direkte Aktivierung der MLCP ebenso nachgewiesen wie eine indirekte Aktivierung via Phosphorylierung von Telokin oder Rho (Sauzeau et al., 2000).

4.3.1.2 Calciumeinstrom durch Ionenkanäle in der Plasmamembran

Spannungsabhängige Calciumkanäle

Ein Großteil des Calciums, das in Folge von elektrisch vermittelter oder Agonist-induzierter Membrandepolarisation in die glatte Muskelzellen gelangt, tritt durch plasmamembranständige Dihydropyridine(DHP)-sensitive Calciumkanäle (L-type channels) ein. DHP-sensitive Calciumkanäle setzen sich aus mehreren Untereinheiten zusammen, von denen die porenförmige α -Untereinheit, die erhebliche genetische Vielfalt zeigt, den Calciumstrom trägt und auch für die Elektrosensitivität verantwortlich ist (Hofmann et al., 1994). Sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung DHP-sensitiver Calciumkanäle ist potentialabhängig, wobei die Inaktivierung im Bereich des aktivierenden Potentialbereichs (-60 bis -20 mV) inkomplett ist, so daß innerhalb dieses Bereichs anhaltende Öffnung und Einwärtsstrom möglich ist („window current“). Die während eines Aktionspotentials durch DHP-sensitive Kanäle in glatte Muskelzellen einströmenden Calciumionen sind auch quantitativ relevant. In Colonmuskelzellen führte der DHP-sensitive Einstrom zu einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration von mehr als 10 $\mu\text{mol/l}$, was zur Kontraktionsauslösung ausreicht (Vogalis et al., 1991).

Im Gegensatz zur glatten Gefäßmuskulatur, wo es einzelne Hinweise auf die Expression DHP-insensitiver spannungsabhängiger Calciumkanäle gibt (Sanders, 2001), wurden an der gastrointestinalen Muskulatur bisher keine weiteren Subtypen spannungsabhängiger Calciumkanäle nachgewiesen.

Nichtselektive Kationenkanäle

Neben DHP-sensitiven Calciumkanälen, die eine spezifischen und quantitativ relevante Quelle für zytosolisches Calcium darstellen, sind auch nichtselektive Kationenkanäle auf vaskulären und viszerale glatten Muskelzellen charakterisiert worden, die vor allem indirekt zu einem Anstieg oder Abfall zytosolischen Calciums beitragen. So aktiviert ACh über muskarinerge Rezeptoren an Muskelzellen des Meerschweinchenileums einen nichtselektiven Kationenkanal (I_{ACh}), durch den vor allem Natriumionen strömen und der Anteil an der durch muskarinerge Agonisten induzierten Depolarisation glatter Muskelzellen hat (Inoue und Isenberg, 1990; Inoue

und Isenberg, 1990a; Inoue und Isenberg, 1990b). Die Aktivierung des Kanals ist durch ein G-Protein und wahrscheinlich durch M_2 -Rezeptoren vermittelt. Intrazelluläres Calcium erhöht seine Öffnungswahrscheinlichkeit, so daß wohl auch die von ACh via M_3 -Rezeptoren vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit Bildung von D-myo-inositol 1,4,5-triphosphat (IP_3) unter nachfolgender IP_3 -abhängiger Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zur Kanalöffnung beiträgt. Ob und wieviel Calcium unter physiologischen Bedingungen direkt durch I_{ACh} in die Zelle eintritt wird kontrovers diskutiert (Sanders, 2001).

Auch andere Liganden wie beispielsweise SP aktivieren nichtselektive Kationenkanäle, die ähnlich, jedoch nicht identisch sind mit I_{ACh} (Lee et al., 1995).

Mechanosensitive Calciumkanäle

Glatte Muskelzellen sind in der Lage, auch in Abwesenheit von neuronalen Strukturen auf mechanische Reize zu reagieren. Als funktionelles Korrelat wurden in glatten Muskelzellen mechanosensitive Ionenkanäle identifiziert, die auf Dehnung oder Scherkräfte mit einem definierten Ionenstrom reagieren. Nachdem zunächst nur indirekte Hinweise in Form lokalisierter Calciumkonzentrationsschwankungen durch Dehnungsreize bekannt waren (Young et al., 1999), wurde im Gastrointestinaltrakt des Menschen vor kurzem ein Nifedipin-sensitiver, auf Dehnung und Scherkräfte mit Calciumeinstrom reagierender Calciumkanal identifiziert und charakterisiert (Farrugia et al., 1999).

Kapazitiver Calciumeinstrom

Die Entleerung von Calciumionen aus den Speichermembranen des sarkoplasmatischen Retikulums ist in einer Reihe untersuchter Zellarten mit einem Calciumeinstrom über die Plasmamembran gekoppelt, der als „store operated Ca^{2+} -entry“ oder als „kapazitiver Calciumeinstrom“ (CCE) bezeichnet wird (Putney und McKay, 1999). Auch in glatten Muskelzellen führt die pharmakologische Entleerung sarkoplasmatischer Calciumspeicher durch Inhibitoren sarkoplasmatischer Ca^{2+} -ATPasen (SERCAs) zu einem fluoreszenzmikroskopisch messbaren, DHP-insensitiven Calciumeinstrom. Wiederholte Agonist-induzierte Calciumfreisetzung aus IP_3 -sensitiven Speichern unter Abwesenheit extrazellulären Calciums führte bei

der Reexposition von extrazellulärem Calcium zu einem vergleichbaren Calciumeinstrom (Berridge, 1995). Der Kopplungsmechanismus zwischen der Entleerung sarkoplasmatischer Speicher und dem Calciumeinstrom ist bisher ebensowenig identifiziert wie der verantwortliche Kanal, doch wird eine sehr enge räumliche und funktionelle Assoziation zwischen Proteinstrukturen auf den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und dem CCE-Kanal angenommen (Berridge et al., 2000). Große Bedeutung für die Öffnung des „store operated channels“ (SOC) wird den IP₃-Rezeptorkanälen zugeschrieben (Broad et al., 2001), deren aminoternale Domäne groß genug ist, um die Lücke zwischen sarkoplasmatischer Membran und Plasmamembran zu überbrücken (Ma et al., 2000). Als möglicher Kandidat für die Rolle des CCE-Kanal werden Säugetieranaloga des TRP (transient receptor potential)-Kanals der Drosophila diskutiert (Putney und McKay, 1999). In einer aktuellen Studie wurde die Expression des Genprodukts des TRP 1-Gens in der Plasmamembran von Gefäßmuskelzellen nachgewiesen und dessen funktionelle Ausschaltung blockierte den kapazitiven Calciumeinstrom (Xu und Beech, 2001). Andererseits wurde auch für den humanen TRP 3-Kanal (hTRP3) eine Signalkomplexbildung mit IP₃-Rezeptoren nachgewiesen und auch die Isoformen TRP 2,4,5 zeigten bei Expression in Zellen Eigenschaften eines SOC (Berridge et al., 2000). In zwei anderen, an der glatten intestinalen Muskulatur der Maus durchgeführten Studien gelang die elektrophysiologische Charakterisierung eines durch Speicherentleerung aktivierten, nichtselektiven Kationenkanals und der gleichzeitige fluorimetrische Nachweis eines Calciumeinstroms (Wayman et al., 1999; Wayman et al., 1996). Am gleichen Modell konnte gezeigt werden, daß sowohl die Entleerung IP₃- als auch Ryanodine-sensitiver Calciumspeicher in gleicher Weise zur Aktivierung des CCE-Kanals führt (Wayman et al., 1998).

4.3.1.3 Calciumfreisetzung aus Ryanodine-sensitiven Calciumspeichern

Auf den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) glatter Muskelzellen sowie auf den Calciumspeichern des endoplasmatischen Retikulums zahlreicher Zelltypen lassen sich zwei Gruppen von Calcium-freisetzenden Kanalproteinen nachweisen, die auch funktionell weitgehend differenzierbar sind, nämlich IP₃- und Ryanodine-sensitive Ca²⁺-Kanäle (Yamazawa et al., 1992). Ryanodine-sensitive Speicher erhielten ihren Namen aufgrund ihrer Eigenschaft, das Pflanzenalkaloid

Ryanodine zu binden. Ihre Öffnungswahrscheinlichkeit steigt mit Zunahme der regionalen Calciumionenkonzentration an, weshalb sich experimentell eine Calcium-induzierte Calciumfreisetzung (CICR) nachweisen läßt, was zur der Bezeichnung „calcium-induced calcium release channels“ geführt hat. Mindestens drei Isoformen von Ryanodine-Rezeptoren (RyR) sind bislang geklont worden (RyR1-RyR3), von denen in glatten Muskelzellen RyR2 und RyR3 vorkommen, während RyR1-Kanäle vor allem in der Skelettmuskulatur gefunden werden (Berridge, 1993). Die RyR-Kanäle bestehen aus vier Monomeren, die gemeinsam den sarkoplasmatischen Calciumkanal bilden. Aktiviert werden sie durch Coffein, das zu einer Freisetzung von Calcium aus dem SR führt, aber nicht dem endogenen Liganden entspricht. Ryanodine blockiert RYR-Kanäle in geöffnetem Zustand, woraus eine selektive Entleerung RyR-sensitiver Speicher und die RyR-Kanalblockierung resultiert (Coronado et al., 1994).

Unter physiologischen Bedingungen werden RyR-Kanäle durch zytoplasmatische Calciumionenkonzentrationen im Mikromolbereich aktiviert (Kuemmerle et al., 1994), die durch lokalisierten Calciumeinström über die Plasmamembran, beispielweise durch DHP-sensitive Ca^{2+} -Kanäle in unmittelbarer Nachbarschaft der RyR-Kanäle entstehen. Eine physiologische Bedeutung dieses experimentell nachgewiesenen Mechanismus konnte allerdings in vielen untersuchten Präparationen nicht nachgewiesen werden, so daß die physiologische Bedeutung des CICR eher fraglich ist (Sanders, 2001). Am Dünndarm des Kaninchens ließ sich CICR in der Längsmuskulatur nachweisen, nicht jedoch in der Zirkulärmuskulatur (Kuemmerle et al., 1994). Ein gesicherter endogener Ligand für Ryanodine-Rezeptoren ist nicht bekannt, die physiologische Rolle des zyklischen Adeninnukleotids cADP-Ribose (cADPR) an RyR-Kanälen, wo es eine pharmakologisch vom CICR nicht unterscheidbare Calciumfreisetzung initiiert, wird kontrovers beurteilt (Dousa et al., 1996).

4.3.1.4 Calciumfreisetzung aus IP_3 -sensitiven Calciumspeichern

IP_3 -sensitive sarkoplasmatische Calciumspeicher stellen neben den beschriebenen Ryanodine-sensitiven Speichern die zweite funktionell bedeutsame Untergruppe intrazellulärer Calciumspeicher in glatten Muskelzellen dar. Aktiviert wird die Calciumfreisetzung aus IP_3 -sensitiven Speichern durch Anbindung des second messengers D-myo-inositol 1,4,5-triphosphat (IP_3) an spezifische Kanalstrukturen auf den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums, den IP_3 -Rezeptoren (Berridge,

1995). Drei Gene kodieren für drei verschiedene Rezeptorsubtypen (IP₃R1-3), die aus jeweils vier Untereinheiten als Homo- oder Heterotetramer zusammengesetzt sind (Sanders, 2001). Auch die Aktivierung von IP₃-Rezeptorkanälen durch IP₃ wird durch die zytosolische Calciumkonzentration in unmittelbarer Umgebung des Rezeptors moduliert, so daß die für Ryanodine-Rezeptoren typische Calcium-induzierte-Calciumfreisetzung sich in Anwesenheit von IP₃ auch an IP₃-Rezeptorkanälen nachweisen läßt (Bezprozvanny et al., 1991). Charakteristischerweise steigert ein Anstieg der Calciumkonzentration bis auf etwa 300 nM die IP₃-Wirkung am Rezeptor, während der weitere Anstieg der Calciumkonzentration zu einer Abnahme der IP₃-wirkung führt, so daß ein negativer Feedbackmechanismus entsteht.

Die physiologische Bedeutung IP₃-sensitiver Speichern liegt in der Generierung von globalen oder lokalisierten Calciumsignalen und der Agonist-induzierten Kontraktion. Die Rezeptoren zahlreicher physiologischer Agonisten sind an die Phospholipase C (PLC) gekoppelte G-Proteine, deren Aktivierung zur Hydrolyse von Phosphatidylinositolphosphat zu IP₃ und Diazylglyzerol (DAG) führt. Das freigesetzte IP₃ bindet an die sarkoplasmatischen IP₃-Rezeptorkanäle, durch die Calcium in das Zytosol strömt und den Muskelkontraktionsapparat aktiviert (siehe oben). So wurde in glatten Muskelzellen beispielsweise durch Stimulation mit ACh (via M₃-Rezeptoren) (Mitchell et al., 2000), CCK (Murthy und Makhlof, 1991), SP (Young et al., 1999), ATP (Shmigol et al., 2001) ein IP₃-vermittelter Calciumeinstrom hervorgerufen.

Ryanodine- und IP₃-sensitive Calciumspeicher zeigten in mehreren Studien zum Teil erhebliche funktionelle Überlappung. In einer aktuellen Untersuchung an isolierten Colonmuskelzellen ließ sich nach Depletion Coffein-sensitiver Calciumspeicher auch keine IP₃-vermittelte Calciumfreisetzung mehr provozieren, während selektive Depletion IP₃-sensitiver Speicher nur geringen hemmenden Einfluß auf die Coffein-induzierte Calciumfreisetzung zeigte, was die Existenz zweier funktionell differenzierbarer Calciumspeichern in Colonmuskelzellen belegt, von denen einer RyR und IP₃-Rezeptoren, der andere nur RyR-Kanäle zu exprimieren scheint. Wechselseitige Aktivierung der benachbart auf der Retikulummembran lokalisierten Kanäle durch CICR konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden (Flynn et al., 2001).

Eine exakte strukturelle und funktionelle Differenzierung unterschiedlicher Calciumfreisetzungsmechanismen in intakten Muskelzellen und die Klärung ihrer physiologischen Relevanz scheiterte bislang von allem am Fehlen ausreichend spezifischer biochemischer Modulatoren auf den verschiedenen Ebenen des Signalstoffwechsels (Taylor und Broad, 1998). So ist nach wie vor kein spezifischer membranpermeabler Antagonist an IP_3 -Rezeptoren verfügbar, da auch die als spezifische eingeführten Xestospongine und 2-APB an mehreren Achsen des Calciumsignalstoffwechsels anzugreifen scheinen (Gafni et al., 1997; Maruyama et al., 1997; Missiaen et al., 2001).

4.3.1.5 Calciumextrusion und Calciumaufnahme in intrazelluläre Speicher

Calciumaufnahme in sarkoplasmatische Speicher

Zur Absenkung zytoplasmatischen Calciums stehen zwei Mechanismen zur Verfügung, nämlich die Wiederaufnahme von Calciumionen in sarkoplasmatische Speicher oder die Ausschleusung aus der Zelle (Somlyo und Somlyo, 1994).

Der wichtigste intrazelluläre Calciumspeicherraum für Calciumionen in glatten Muskelzellen ist das sarkoplasmatische Retikulum (SR), welches ein dichtes Netz bildet, das die gesamte Muskelzelle mit auffälliger Betonung der Plasmamembrannahen Region durchzieht. Die Membranen des SR sind für Calciumionen undurchlässig und Ca^{2+} -spezifische ATPasen (SERCAs) pumpen Calciumionen unter Bildung eines etwa 10000-fachen Konzentrationsgefälles in das Membransystem. In den Membranen des SR werden Calciumionen teilweise an Proteine wie Calretikulin und Calsequestrin gebunden. Drei SERCA-Gene und vier Subtypen sind bislang identifiziert (SERCA1,2a,2b,3), wobei in der glatten Muskulatur vor allem SERCA2b und SERCA3 exprimiert wird (Wu et al., 1995). SERCA-Pumpen werden durch das in der Membran benachbarte Phospholamban inhibitorisch und durch Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A und G stimulatv reguliert. Für die pharmakologische Blockierung der SERCAs und der subsequenceuten Entleerung sarkoplasmatischer Speicher wurde in zahlreichen Studien Thapsigargin oder Cyclopiazonsäure (CPA) verwendet (Sanders, 2001)

Calciumextrusionsmechanismen

Zur Ausschleusung zytoplasmatischer Calciumionen in den Extrazellularraum stehen zwei Enzymsysteme zur Verfügung, membranständige Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschkanäle (Somlyo und Somlyo, 1994). Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) auf der Plasmamembran pumpen Calciumionen gegen den enormen Konzentrationsgradienten elektrisch neutral im Austausch gegen zwei Protonen aus der Zelle. Vier Isoformen von PMCA werden von mindestens vier Genen kodiert, wovon PMCA1b am weitesten verbreitet ist. Aktiviert werden PMCA durch Anbindung von Calmodulin (Marin et al., 1999).

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschkanäle benützen den elektrochemischen Natriumgradienten an der Plasmamembran für die Überwindung des entgegengerichteten Calciumgradienten. Experimentell läßt sich die funktionelle Relevanz dieser Kanäle in einer Zelle durch Nachweis der funktionellen Sensibilität der Calciumextrusion gegenüber der Verringerung der extrazellulären Natriumkonzentration nachweisen. Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschkanälen in der glatten Muskulatur führten modellabhängig zu unterschiedlichen Ergebnissen, so daß die quantitative Bedeutung dieser Kanäle in der glatten Muskulatur ungeklärt ist (Sanders, 2001).

4.3.1.6 Räumliche und zeitliche Heterogenität von Calciumsignalen

Neben den beschriebene globalen, Zellkontraktion induzierenden Calciumsignalen existiert in glatten Muskelzellen eine Vielzahl regulatorischer Calciumströme, die auf räumlich und zeitlich streng begrenzt sind und aus einem komplexen Wechselspiel zwischen Kanälen und Rezeptoren des SR und der Plasmamembran resultieren (Pabelick et al., 2001).

Oberflächliche Pufferbarriere

Die unmittelbare Nähe der Strukturen des SR zu den Calciumkanälen der Plasmamembran führte zur Postulierung einer Pufferfunktion des SR, die in einem Abpuffern in die Zelle strömender Calciumionen durch Aufnahme in die Speicher des SR besteht (Sanders, 2001). Experimentelle Hinweise auf eine Pufferfunktion membranaher Anteile des SR in glatten Muskelzellen entstammen der an mehreren Spezies und Organen gemachten Beobachtung, daß Entleerung der

Calciumspeicher des SR zu einer Verzögerung von durch Depolarisation induzierten Kontraktionen glatter Muskelzellen führte, während vorheriges Auffüllen der Speicher das Gegenteil bewirkte, was durch ein Abfangen der durch DHP-sensitive Calciumkanäle einströmenden Ca^{2+} -Ionen durch das SR erklärt wurde (Janssen et al., 1999)

Calcium-„sparks“

Calciumfreisetzung aus dem SR durch RYRs kann zu einem rapiden, lokalen Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration auf bis zu $10 \mu\text{M}$ führen. Diese transienten und räumlich begrenzten Calciumströme durch RyRs werden als Ca^{2+} -sparks bezeichnet (Jaggar et al., 2000). Da RyR in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran besonders dicht stehen, interferieren Ca^{2+} -sparks mit den zahlreichen Ca^{2+} -regulierten Membranproteinen, unter denen sich auch Ionenkanäle befinden. So führen Ca^{2+} -sparks zu einer Aktivierung von large-conductance, Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanälen (BK-channels), die zu einem Kaliumausstrom und damit insgesamt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führen. Damit wurde ein möglicher inhibitorischer Feedback-Mechanismus im Rahmen von Aktionspotentialen glatter Muskelzellen identifiziert (Perez et al., 1999). Im Gegensatz dazu können Calcium-sparks in glatten Muskelzellen auch durch die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanälen zur Depolarisation beitragen (ZhuGe et al., 1998).

Indirekte Hinweise auf eine Funktion der Calcium-sparks bei der Regulation der Membranleitfähigkeit erbrachte die Beobachtung, daß die im Rahmen der Muskeldepolarisation gemessenen spontanen transienten Auswärtsströme (spontaneous transient outward currents, STOCs) nach Entleerung sarkoplasmatischer Calciumspeicher sistierten. Durch Einführung hochauflösender konfokaler Mikroskope wurde der direkte Nachweis von Ca^{2+} -sparks möglich, die daraufhin in zahlreichen Populationen glatter Muskelzellen nachgewiesen wurden (Pabelick et al., 2001). Diskutiert wird im Rahmen der Ca^{2+} -spark-Entstehung auch eine vorherige Aktivierung von einem Cluster von RyRs durch DHP-sensitiven Calciumeinstrom. Eine ausreichend nahe Assoziation zwischen DHP-sensitiven Kanälen und RyRs findet sich in spezialisierten Membraneinbuchtungen, den Caveolae, und funktionelle Ausschaltung der Caveolae führte zu einer Abnahme von Amplitude, Frequenz und Ausdehnung der Ca^{2+} -sparks (Lohn et al., 2000).

Calcium-„puffs“

Ein Gruppe lokalisierter Calciumströme in glatten Muskelzellen läßt sich nicht mit Ryanodine blockieren, sondern wird durch Calciumfreisetzung durch den IP₃-Rezeptor initiiert (Pabelick et al., 2001). Diese transienten Calciumsignale werden als „puffs“ bezeichnet. In Colonmuskelzellen war Amplitude und Frequenz lokalisierter Calciumströme durch den IP₃-Rezeptorantagonisten Xestospongin C inhibierbar, so daß auch die IP₃-abhängige Calciumfreisetzung einen möglichen Kopplungsmechanismus zwischen der Aktivierung von G-Proteinrezeptoren und der Zunahme der Ca²⁺-abhängigen Ionenleitfähigkeit der Plasmamembran darstellt, wofür auch die Blockierbarkeit spontaner und durch ATP induzierter Calciumsignalen durch Inhibition der PLC spricht (Bayguinov et al., 2000). IP₃-abhängige Ca²⁺-puffs sind in Colonmuskelzellen sowohl an die Aktivierung von BK-Kanälen (siehe oben) als auch an small-conductance Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle (SK) gekoppelt, so daß die IP₃-abhängige Calciumfreisetzung in Colonmuskelzellen auch mit Inhibition und Relaxation assoziiert sein kann (Sanders, 2001). Stimulation mit ACh führte in diesen Zellen allerdings nur dann zu einer IP₃-vermittelten Zunahme von Ca²⁺-Puffs, wenn die gleichzeitige globale Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration verhindert wurde. Globale Zunahme der Calciumkonzentration führte dagegen zu einer Abnahme der STOC-Aktivität, was auf ein differenziertes Regulationssystem zwischen globalen und lokalisierten Calciumströmen hinweist (Bayguinov et al., 2000)

4.3.2 NO-abhängige Signaltransduktion in der glatten Muskulatur des Verdauungstrakts

4.3.2.1 NO-Synthese im Verdauungstrakt

Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid

Die physiologische Bedeutung von Synthese und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) im Organismus wurde zunächst am Gefäßendothel erkannt, wo NO als der bereits seit längerem postulierte relaxierende Faktor (endothelium derived relaxing factor, EDRF) identifiziert wurde (Palmer et al., 1987). Innerhalb kurzer Zeit wurde daraufhin die weite Verbreitung und vielseitige Funktion des kleinen, gasförmigen Moleküls im Organismus beschrieben (Moncada et al., 1991) und sein Synthese- und Wirkmechanismus als völlig neuartiger biochemischer Signaltransduktionsmechanismus identifiziert (Moncada et al., 1989). Als Botenstoff im Nervensystem wurde NO zunächst im ZNS identifiziert, wo es zentrale Funktionen in der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung, der Genexpression, im Rahmen pathophysiologischer Prozesse wie Ischämie, Entzündung und Schmerz, wie auch in komplexen integrativen Funktionen wie Verhalten und Lernen einnimmt (Dawson und Dawson, 1996). Im enterischen Nervensystem wurde NO als Botenstoff der nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Relaxation in der neuromuskulären Signalübertragung identifiziert (Allescher et al., 1992; Sanders und Ward, 1992).

Seine spezifische Wirkung in der Signaltransduktion entfaltet NO durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und der nachgeschalteten Aktivierung cGMP-abhängiger Mechanismen (siehe unten)(Ignarro, 1991).

NO ist als gasförmiges Radikal in höheren Konzentrationen zelltoxisch. Die Zytotoxizität kommt durch Hemmung von Schlüsselenzymen der Atmungskette und DNA-Synthese zustande und ist ein wichtiger Mechanismen in der Zerstörung von Tumorzellen, Bakterien und anderen Mikroorganismen durch Makrophagen und andere immunaktive Zellen (Nathan und Hibbs, 1991). Als Radikal ist NO zudem äußerst reaktionsfreudig und reagiert mit Sauerstoffradikalen zu einer Reihe toxischer Substanzen wie dem Peroxynitritanion (Beckman et al., 1990). Pathophysiologische Bedeutung kommt Stickstoffmonoxid in der Genese lokaler

oder systemischer Entzündungsreaktionen (Stark und Szurszewski, 1992) bis hin zum septischen Schock (Moncada et al., 1991) zu.

Als Vasodilatoren sind NO-Donoren seit langem in alltäglichem klinischen Gebrauch in der Behandlung von Bluthochdruck, Angina pectoris und isolierter pulmonaler Hypertonie (Roberts et al., 1997). Zahlreiche ältere und neuere Therapeutika wie beispielsweise Sildenafil (Viagra^R) oder Milrinon interferieren als Phosphodiesterasehemmer (siehe unten) mit der NO-abhängigen Signaltransduktion.

Mechanismen der NO-Synthese

NO wird unter physiologischen Bedingungen durch NADPH-abhängige Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin freigesetzt (Bredt und Snyder, 1990). Katalysiert wird dieser Schritt durch die NO-Synthase (NOS). Die NOS enthält eine Häm-Gruppe und zeigt in seiner Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten mit der Zytochrom P 450-Reduktase (Moncada et al., 1997). Drei NOS-Isoformen sind bislang geklont worden, ein induzierbares Enzym (iNOS) (Xie et al., 1992), das Ca²⁺-unabhängig aktiviert wird, und zwei durch den Ca²⁺/Calmodulin-Komplex aktivierte konstitutive Formen (cNOS), die endotheliale NOS (eNOS) (Marsden et al., 1992) und die neuronale NOS (nNOS) (Bredt und Snyder, 1990). Die NO-Synthese durch die konstitutiven NOS-Isoformen ist fest in ein regulatorisches Signalsystem eingebunden, das eine schnelle Aktivierung und Deaktivierung der NO-Synthese erlaubt, während die NO-Synthese durch die iNOS nach deren Induktion über Stunden bis Tage anhält und NO-Konzentration im mikromolaren Bereich erzeugt, was weit über die durch die cNOS-Formen zum Zweck der Signaltransduktion erreichten lokalen NO-Konzentrationen hinausgeht (Moncada et al., 1997). Alternatives Splicing der nNOS-mRNA am 5'-Ende führt zur Expression von drei, am Aminoterminus unterschiedlichen Varianten der nNOS, die zunächst im ZNS als nNOS α , nNOS β und nNOS γ charakterisiert worden sind (Eliasson et al., 1997). nNOS α enthält als einzige nNOS-Variante eine PDZ-Domäne, die die Interaktion des Enzyms mit membranständigen Strukturen im Bereich der PSD (postsynaptic density)-Region wie beispielsweise PSD-95 (post synaptic density protein 95) und α -Syntrophin ermöglicht, was und auf die Membranbindung der nNOS α hinweist, während nNOS β und nNOS γ keine geeigneten Verankerungsstrukturen besitzen und im Zytosol

lokalisiert sind. Die Anbindung der nNOS an PSD 95 durch die PDZ-Domäne, deren genetischer Code auf sich auf Exon-2 des nNOS-Gens befindet, ermöglicht beispielsweise die funktionelle Koppelung der nNOS α an NMDA-Rezeptoren, was im ZNS große pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung ischämischer Gewebsschäden hat (Garthwaite, 1991). Auch im Gastrointestinaltrakt von Ratte (Huber et al., 1998) und Mensch (Saur et al., 2000) ist die Expression der nNOS und ihrer Splice-Varianten nachgewiesen. Im Gastrointestinaltrakt des Menschen wurden insgesamt sechs 5'-Varianten der nNOS-messenger-RNA nachgewiesen, wovon drei für nNOS α , zwei für nNOS β und eine für nNOS γ kodieren (Saur et al., 2000). In der gleichen Arbeit wurde eine dritte Exon 1- Variante (Exon 1_{5'3'}) identifiziert, deren Promotorregion zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthält, deren Bedeutung für die Regulation der nNOS-Expression der Klärung bedarf.

Lokalisation der NOS im Gastrointestinaltrakt

Der immunhistochemische Nachweis der NOS im Gastrointestinaltrakt erfolgte zunächst durch Nachweis der NADPH-Diaphoraseaktivität, die ein Charakteristikum der NO-Synthase darstellt (Aoki et al., 1993). In mehreren Studien konnte die Kolo-kalisation von NADPH-Diaphoraseaktivität und NOS-Expression bestätigt werden (Furness et al., 1994). Die Lokalisation von NOS-Isoformen wurde durch die Verfügbarkeit spezifischer Antikörper möglich (Wang et al., 1998). NOS-positive Nervenzellkörper wurden in sämtlichen untersuchten Spezies einschließlich Mensch in regional unterschiedlicher Dichte sowohl in myenterischen als auch im submukösen Plexus identifiziert (Neunlist et al., 1999; Brookes, 2001). Zahllose NOS-positive Nervenfasern projizieren zur umgebenden Muskulatur, insbesondere zur Zirkulärmuskelschicht, wobei in Experimenten, die morphologisches Tracing mit NOS-Immunhistochemie verbanden, NOS-positive Neurone als nach aboral deszendierende Motoneurone identifiziert wurden (Porter et al., 1997). Auch in deszendierenden Interneuronen wurde NOS-Aktivität nachgewiesen (siehe 4.1.2.1). Molekularbiologische Untersuchungen ermöglichten die semiquantitative Zuordnung von NOS-Isoformen zu bestimmten Regionen des Verdauungstrakts (Bandyopadhyay et al., 1997; Saur et al., 2000), ohne daß bisher eine genaue

Zuordnung der erhobenen Befunde zu anatomischen Strukturen oder funktionellen Systemen innerhalb des ENS möglich ist.

Im Zustand chronischer Entzündung wurde in myenterischen Neuronen iNOS-Expression nachgewiesen. Die pathophysiologische Relevanz dieses Befundes ist allerdings noch ungeklärt (Miampamba und Sharkey, 1999; Valentine et al., 1996).

Darüber hinaus existieren zahlreiche Hinweise auf die Expression einer konstitutiven NOS-Isoform in der intestinalen glatten Muskulatur. In isolierten Muskelzellen wurde funktionell eine NOS-Aktivität nachgewiesen, die Ca^{2+} /Calmodulinabhängig war (Murthy et al., 1993), durch VIP stimuliert und durch Aktivierung der Proteinkinase C gehemmt wurde (Murthy et al., 1994), was gegen eine eventuelle NO-Produktion durch Induktion einer iNOS während der Muskelzellisolation spricht. Von der gleichen Arbeitsgruppe stammt der molekularbiologische Nachweis der Expression einer endothelialen NOS-Form in isoliertem Muskelgewebe verschiedener Lokalisation und Spezies (Teng et al., 1998). Eine nNOS-Expression ließ sich nicht nachweisen. In Widerspruch dazu konnte in kultivierten Muskelzellen der Beutelratte die mRNA-Expression einer nNOS-Isoform sowohl in Neuronen als auch in Muskelzellen nachgewiesen werden (Chakder et al., 1997). Eine Schwierigkeit bei der Interpretation molekularbiologischer Studien an Zellisolaten und -kulturen des ENS ist das hohe Kontaminationsrisiko dieser Präparationen mit unerwünschten, in situ unmittelbar benachbarten Zellarten. So könnten unter Verwendung von PCR-Amplifikationstechniken bereits relativ wenige in der Muskelzellkultur persistierende enterische Neurone den Nachweis einer nNOS oder morphologisch schwer von kultivierten Muskelzellen unterscheidbare Gefäßendothelzellen bereits einen positiven eNOS-Nachweis erklären. Eine Kontamination wurde allerdings in der eNOS-Studie ausgeschlossen (Teng et al., 1998). eNOS-spezifische Primer wurden in der nNOS-Studie nicht untersucht, so daß Klärungsbedarf bleibt. In immunhistochemischen Studien (Berezin et al., 1994) wurden in loser Verteilung nNOS-positive Zirkulärmuskelzellen und ICCs beschrieben, eine immunhistochemische Studie zur eNOS-Expression im Gastrointestinaltrakt liegt bislang nicht vor.

4.3.2.2 Lösliche Guanylatzyklen

cGMP-Synthese

Guanylatzyklen sind eine Familie von Enzymen, die die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysieren (Lucas et al., 2000). Guanylatzyklen finden sich ubiquitär im Organismus und kommen dabei als membrangebundene und lösliche Enzyme vor, wobei grundsätzliche Unterschiede in Regulation und Funktion zwischen diesen Gruppen bestehen. Die Aktivierung von Guanylatzyklase führt zu einem vermehrten Anfall von cGMP, was zu einer Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionsmechanismen führt. Die wichtigsten Zielstrukturen von cGMP sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen, cGMP-regulierte Phosphodiesterasen und cGMP-regulierte Ionenkanäle. Inaktiviert wird cGMP durch Abbau durch cGMP-spezifische Phosphodiesterasen (Phosphodiesterase 5) (Beavo, 1995). cGMP-abhängige Signaltransduktionswege spielen im Rahmen zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Regulationsprozesse eine bedeutende Rolle. So steht die Tonusregulation endothelialer und viszeraler glatter Muskulatur ebenso unter Kontrolle cGMP-abhängiger Mechanismen wie der der intestinale Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt und die retinale Phototransduktion (Lucas et al., 2000).

Während mindestens sieben Isoformen partikulärer Guanylatzyklen beschrieben sind (pGC A-G), die in einer Vielzahl von Geweben als Rezeptoren für natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP), hitze-stabiles Enterotoxin (ST) oder bislang unbekannte Liganden fungieren, kommt im Bereich des enterischen Nervensystems und der intestinalen Muskulatur des löslichen Isoformen große Bedeutung zu (Lucas et al., 2000).

Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) findet sich im Zytoplasma der meisten Säugetierzellen. Dort vermittelt sie auch klinisch wichtige Vorgänge wie Plättchenaggregation, Immunmodulation, neuronale Signaltransduktion und Relaxation glatter Muskulatur (Lucas et al., 2000). Lösliche Guanylatzyklen sind heterodimere Proteine aus einer α - und einer β -Einheit, die beide eine regulatorische und eine katalytische Domäne tragen und beide für die katalytische Aktivität vonnöten sind (Buechler et al., 1991). Zahlreiche Isoformen und Splice-Varianten

sind in unterschiedlichen Geweben beschrieben worden (Lucas et al., 2000). Jede Untereinheit enthält drei funktionell wichtige Domänen, eine Häm-bindende Domäne, die für die Aktivierbarkeit der sGC durch NO und auch Kohlenstoffmonoxid (CO) verantwortlich ist, eine Dimerisierungsdomäne und eine katalytische Domäne (Ignarro et al., 1982). Anbindung von NO steigert die cGMP-Bildungsrate um das 100 bis 200-fache, CO nur um das 6-fache des Ruheumsatzes (Stone und Marletta, 1994). NO bindet dabei an die Häm-Gruppe unter Bildung eines Nitrosyl-Häm-Komplexes. Diese Bindung verursacht eine Konformationsänderung und aktiviert in einem sehr komplexen Vorgang und unter Mitwirkung mehrerer Kofaktoren das Enzym (Hobbs, 1997).

Entscheidend für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung löslicher Guanylatzyklasen war die Entwicklung spezifischer biochemischer Inhibitoren, was erstmals mit der Entwicklung von ODQ weitgehend gelungen war, da ODQ weder mit der NO-Synthase noch mit der Aktivität der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen interferiert (Hobbs, 1997).

Im enterischen Nervensystem ist die sGC-Expression in Neuronen, Muskelzellen und interstitiellen Zellen immunhistochemisch nachgewiesen worden, wobei in enterischen Neuronen fast nie eine Kollokalisierung von cGMP und NOS beobachtet werden kann (Shuttleworth et al., 1993; Salmhofer et al, 2001).

cGMP-regulierte und cGMP-spezifische Phosphodiesterasen

Die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP sind als Botenstoffe der Signaltransduktion an zahllosen Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Ihre Konzentration innerhalb eines Zellkompartments reguliert die Aktivität der Zyklonukleotid-abhängigen Proteinkinasen die Aktivität von Ionenkanälen in der Plasmamembran, die Genexpression und vieles mehr. Neben der Modulation der Syntheserate von Adenylat-bzw. Guanylatzyklase wird die Zyklonukleotidkonzentration vor allem durch die Steuerung ihres Abbaus reguliert. Dazu existiert ein System spezifischer Phosphodiesterasen (PDEs), die wiederum komplexen Regulierungsvorgängen unterliegen. Aus der Perspektive der cGMP-abhängigen Signaltransduktion muß zwischen cGMP-spezifischen PDEs, die cGMP als Substrat abbauen und cGMP-abhängigen PDEs, deren cAMP-spezifische Aktivität durch cGMP gehemmt bzw. stimuliert wird.

Von den mindestens 9 PDE-Untergruppen (Dousa, 1999) ist die PDE 5 für den Abbau von cGMP verantwortlich, weshalb sie auch als cGMP-spezifische Phosphodiesterase bezeichnet wird (Beavo, 1995). Mit hoher Selektivität wird die PDE 5 durch Zaprinast gehemmt, was zu einem isolierten Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels führt. Von großer klinischer Bedeutung ist der PDE 5-Inhibitor Sildenafil (Viagra^R), dessen vasodilatatorischer Wirkungsmechanismus erfolgreich in der Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt wird. Auch in der Pathophysiologie des nephrotischen Syndroms, wo es zu einer Verminderung der ANP-induzierten cGMP-Akkumulation in den Glomerula kommt und bei der gesteigerten, ANP-refraktären Natriumretention bei Herzinsuffizienz und Leberzirrhose stellen PDE 5-Inhibitoren neue therapeutische Ansätze dar, um die ANP-Resistenz zu durchbrechen und die Natriurese zu steigern (Dousa, 1999). Über die Regulation der PDE 5 ist wenig bekannt. Die Anwesenheit von Zinkionen ist für die volle katalytische Aktivität vonnöten und die Anbindung von cGMP an eine hochaffine, nicht-katalytische Bindungsstelle erleichtert die Phosphorylierung des Enzyms durch die Proteinkinase G, was die PDE 5-Aktivität steigert (Dousa, 1999). An isolierten intestinalen Muskelzellen konnte eine Abnahme der cGMP-Konzentration durch Stimulation der PDE 5 durch die Proteinkinase G nachgewiesen werden (Murthy und Makhlouf, 2000). Im enterischen Nervensystem ist eine funktionelle Rolle der PDE 5 und ihre Expression gut charakterisiert (Kurjak et al., 1999; Kurjak et al., 2001) und die Hemmung des cGMP-Abbaus durch Zaprinast gehört zu den gängigen pharmakologischen Vehikeln in der Untersuchung der NO-abhängigen Signaltransduktion.

Das Charakteristikum der PDE 2 besteht in einer hochspezifischen, nicht-katalytischen cGMP-Bindungsstelle, deren Besetzung zu einer deutlichen Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit führt. Während im Ruhezustand sowohl cGMP als auch cAMP mit ähnlicher Geschwindigkeit abgebaut werden, verschiebt sich die Substratspezifität im cGMP-stimulierten Zustand in Richtung cAMP, was auch zu der Bezeichnung cGMP-aktivierte, cAMP-spezifische Phosphodiesterase geführt hat (Beavo, 1995). Die meisten Untersuchungen zu Lokalisation und Funktion der PDE 2 liegen am ZNS, an den Nieren und am Herzmuskel vor, über eine funktionelle Bedeutung der PDE 2 im Gastrointestinaltrakt ist wenig bekannt (Barnette et al., 1993).

Die zweite cGMP-regulierte Phosphodiesterase, PDE 3, setzt ebenfalls beide Zyklonukleotide um, doch ist die Geschwindigkeit des cAMP-Abbaus so viel höher, daß der begleitende cGMP-Umsatz zu vernachlässigen ist (Dousa, 1999). Charakteristisch ist, daß durch Anbindung von cGMP an die katalytische Domäne der Umsatz von cAMP absinkt, so daß eine Hemmung des cAMP-Abbaus durch cGMP resultiert. Zwei Isoformen mit unterschiedlicher Gewebeverteilung sind bekannt, PDE 3A und PDE 3B, wobei die auch in der glatten Muskulatur exprimierte PDE 3A eine höhere Sensibilität gegenüber der Hemmung durch cGMP zeigt (Dousa, 1999). Einige spezifische Inhibitoren der PDE 3, z.B. Milrinon, werden klinisch zur Behandlung der therapierefraktären Herzinsuffizienz eingesetzt. Als Wirkungsmechanismus wird eine Steigerung der cAMP-abhängigen Phosphorylierung membranständiger Calciumkanäle und eine damit einhergehende Zunahme der Kontraktionskraft angenommen (Beavo, 1995).

Im enterischen Nervensystem ist eine Rolle der PDE 3 bei der NO-induzierten Bombesinfreisetzung aus isolierten Nerventerminalen des Rattendünndarms gezeigt worden, wobei eine durch die PDE 3 vermittelte Cross-Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase durch NO/cGMP als Wirkungsmechanismus nachgewiesen werden konnte (Kurjak et al., 1999). Eine Bedeutung der cGMP-regulierten Phosphodiesterasen bei der funktionellen Verknüpfung cGMP- und cAMP-abhängiger Mechanismen konnte auch an anderen Systemen nachgewiesen werden (Tertyshnikova et al., 1998).

cGMP-regulierte Kationenkanäle (cyclic nucleotide-gated cation channels, CNG)

Neben der cGMP-abhängigen Proteinkinase und den cGMP-spezifischen/cGMP-regulierten Phosphodiesterasen stellt die Gruppe der durch zyklische Nukleotide regulierten Kationenkanäle (cyclic nucleotide-gated cation channels, CNG) die dritte wesentliche Zielstruktur von cGMP dar (Lucas et al., 2000).

CNG-Kanäle sind eine Familie zum Teil spannungs-abhängiger Kationenkanäle, die in einer Vielzahl von Zellarten nachgewiesen worden sind (Distler et al., 1994). Allen gemeinsam ist der Aufbau aus sechs transmembranären Domänen (S1-S6), die eine für Ionen durchlässige Pore zwischen der S5- und S6-Region bilden. Im Bereich des C-Terminus befindet sich eine Bindungsstelle für Zyklonukleotide, die eine weitreichende Sequenzhomologie zu denen den Bindungsstellen der Zyklonukleotid-abhängigen Proteinkinasen zeigt (Biel et al., 1999). Alle CNG-Kanäle werden

grundsätzlich von cAMP und cGMP aktiviert, doch bestehen Sensitivitätsunterschiede zwischen einzelnen Isoformen (Biel et al., 1998). CNG-Kanäle transportieren sowohl mono- wie auch divalente Kationen, wobei Ca^{2+} -Ionen gegenüber Na^+ -Ionen bevorzugt werden. Aktivierung von CNG-Kanälen führt zu einer Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration und der subsequenten Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse (Kraus-Friedmann, 2000). Im Gegensatz zur den relativ langsamen Phosphorylierungsvorgängen, die durch cGMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase G in Gang gesetzt werden, setzt die Wirkung der CNG-Kanalaktivierung durch cGMP sehr rasch ein und Hydrolyse von cGMP beendet deren Aktivität (Lincoln und Cornwell, 1993). Eine zentrale physiologische Rolle für CNG-Kanäle ist vor allem im Bereich von Photorezeptoren, olfaktorischem Epithel, Nierentubuluszellen, Herzmuskulatur und Gehirn genauer charakterisiert (Finn et al., 1996). Über die Funktion von CNG-Kanälen im Gastrointestinaltrakt ist bislang wenig bekannt. Außer dem molekularbiologischen Nachweis ihrer Expression wurde lediglich eine funktionelle Rolle beim Elektrolyttransport im Colonepithel nachgewiesen (Distler et al., 1994; Qiu et al., 2000).

4.3.2.3 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Expression von cGK-Isoformen

Spezifische Zielstruktur für cGMP sind die cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK, Proteinkinase G). Bislang sind drei cGK-Isoformen bekannt und ausführlich charakterisiert worden (Hofmann et al., 2000). Während die cGK II unter anderem in sekretorischen Epithelien, Leber, Knochen, Niere und im ZNS (Wang und Robinson, 1997) exprimiert wird, finden sich die Isoformen I α und I β in hoher Konzentration in der glatten Muskulatur, in der Herzmuskulatur, in Thrombozyten, im Zerebellum, in den Spinalganglien und an der neuromuskulären Endplatte (Lucas et al., 2000).

Zwei Gene kodieren für die bekannten cGK-Isoformen. Der Genlocus für die cGK II befindet sich auf Chromosom 4, während die beiden cGK I-Isoformen durch alternatives terminales Splicing des RNA-Transkripts des auf Chromosom 11 lokalisierten cGK I-Gens entstehen (Lohmann et al., 1997).

Die cGK I ist ein zytosolisches 76-kDa-Homodimer, dessen Isoformen sich in der N-terminalen Sequenz unterscheiden, was für die im Vergleich zur cGK I α höhere Affinität der cGK I β zu cGMP verantwortlich ist (Lucas et al., 2000).

Die cGK II ist ein 86-kDa-Homodimer, das im Gegensatz zur cGK I membrangebunden vorliegt und sich durch eine niedrigere Affinität zu cGMP und durch eine andere Substratspezifität von den cGK I-Formen unterscheidet (Pfeifer et al., 1999).

Alle cGKs setzen sich aus einer N-terminalen Domäne, einer regulatorischen und einer katalytischen Domäne zusammen, wobei die regulatorische Domäne zwei Bindungsstellen für cGMP besitzt und nur die Anbindung von zwei cGMP-Molekülen zur vollen Aktivierung des Enzyms führt. Die cGKs gehören zur Enzymfamilie der Serin/Threoninkinasen und innerhalb des katalytischen Zentrums, das Bindungstaschen für Mg²⁺-ATP und die Substratpeptide enthält, wird das γ -ständige Phosphat des ATP auf einen Serin/Threoninrest des Zielproteins übertragen (Hofmann et al., 2000).

Während die cGK II im Gastrointestinaltrakt in hohen Konzentrationen in Mukosazellen exprimiert wird, findet sich in der glatten intestinalen Muskulatur wie auch in den neuronalen Strukturen des enterischen Nervensystems bevorzugt die cGK I β -, in mindestens dreifach geringerer Konzentration auch die cGK I α -Isoform (Huber et al., 1998).

Zielstrukturen und Funktionen der cGK I

Die Erkenntnis, daß die NO-abhängige Zunahme der cGMP-Produktion für die seit langem empirisch bekannte Relaxation glatter Muskulatur durch Nitrate verantwortlich war, war der Ausgangspunkt für eine genaue Charakterisierung der cGMP-abhängigen Signaltransduktionsmechanismen in glatten Muskelzellen. Die funktionelle Relevanz der cGK in der NO-vermittelten Relaxation glatter Muskulatur konnte seither an zahlreichen Organsystemen nachgewiesen werden (Lincoln et al., 2001). Pharmakologische Blockade der cGK führte an isolierten intestinalen Muskelstreifen zur Aufhebung der NO/cGMP-induzierten Relaxation (Huber et al., 1998). cGK I-defiziente Mäuse entwickelten innerhalb weniger Wochen eine arterielle Hypertonie, eine Pylorusstenose mit massiv dilatierendem Magen und abnorme Motilitätsmuster mit ausgeprägter Passageverzögerung im Bereich von Dünn- und Dickdarm (Pfeifer et al., 1998). Die Mechanismen, durch die cGK I Kontraktilität und

Tonus glatter Muskelzellen kontrolliert, sind vielfältig. Der Kontraktionszustand glatter Muskelzellen wird durch die intrazelluläre Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen und durch Modulation der Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktilen Apparats reguliert (siehe 4.3.1). Die Proteinkinase G reguliert die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Phosphorylierung einer Reihe von zentralen Regulationsproteinen des IP_3 -abhängigen Calciumsignalstoffwechsels, DHP-sensitiver Calciumkanäle, der Ca^{2+} -abhängigen zytosolischen Phospholipase A_2 , deren Aktivierung für die Generierung von Calciumsignalen in der longitudinalen intestinalen Muskulatur von Bedeutung ist (Murthy und Makhlof, 1998) und durch Phosphorylierung Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanäle (siehe unten)(Lucas et al., 2000). In die Regulation der Calciumsensitivität des kontraktilen Apparates greift die cGK durch Phosphorylierung der MLCP (siehe 4.3.1) und möglicherweise auch durch die Phosphorylierung einiger weiterer, in ihrer Funktion noch unzureichender charakterisierter Proteine wie das „cysteine-rich Protein 2 (CRP 2) ein, die möglicherweise modulierend auf den Zytoskelettproteinstoffwechsel wirken (Huber et al., 2000).

Neben der Regulation des Tonus glatter Muskulatur greift die cGK I durch Modulation der Genexpression auch in die Regulation der Muskelzellmigration, -proliferation und -differenzierung ein. Der genaue Mechanismus, über den die zytosolische cGK in die Regulation der Genexpression eingreift, ist noch unvollständig geklärt, jedoch scheint das Resultat dieser Signaltransduktionskaskade in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und ATF-2 zu liegen (Hofmann et al., 2000).

4.3.2.4 Wechselwirkung zwischen der NO-abhängigen Signaltransduktion und dem Calciumsignalstoffwechsel in intestinalen Muskelzellen

Führt elektrische, mechanische oder biochemische Stimulierung glatter Muskelzellen zu einem globalen, das gesamte Zytoplasma erfassenden Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, so resultiert daraus die Aktivierung des Muskelzellkontraktionsapparats. Ausmaß und Dauer der sich anschließenden Kontraktion wird von der Calciumsensitivität des kontraktilen Apparates zum gegebenen Zeitpunkt (siehe 4.3.1) und vor allem durch die im Bereich des kontraktilen Apparates erreichte Calciumkonzentration bestimmt (Sanders, 2001). Der inhibitorischen Modulation von Tonus und Kontraktilität glatter Muskelzellen durch die NO/cGMP/cGK-Signaltransduktionskaskade kommt in zahlreichen biologischen Systemen zentrale funktionelle Bedeutung zu (Pfeifer et al., 1998). Auf

allen drei Ebenen des NO-abhängigen Stoffwechselweges sind unter experimentellen Bedingungen Wechselwirkungen mit dem Calciumsignalstoffwechsel glatter Muskelzellen nachgewiesen worden, die unterschiedliche quantitative Relevanz zeigen.

Wechselwirkung zwischen NO und DHP-sensitiven Calciumkanälen

Der Calciumeinstrom durch DHP-sensitive Calciumkanäle ist in der Auslösung von Aktionspotentialen und in der Generierung von Kontraktion in glatten Muskelzellen von großer funktioneller und quantitativer Bedeutung (siehe 4.3.1.2). Eine Inhibition des Calciumeinstroms durch DHP-sensitive Calciumkanäle durch den NO-Donor Natriumnitroprussid ist in elektrophysiologischen Studien an pulmonalen Gefäßmuskelzellen und am unteren Ösophagussphinkter der Beutelratte nachgewiesen worden (Clapp und Gurney, 1991; Akbarali und Goyal, 1994). Die physiologische Relevanz einer NO-vermittelten Inhibition DHP-sensitiver Calciumkanäle in glatten Muskelzellen ist unklar (Sanders, 2001).

NO-abhängige Modulation der SERCA-Funktion

Der wichtigste intrazelluläre Calciumspeicherraum für Calciumionen in glatten Muskelzellen ist das sarkoplasmatische Retikulum (SR), in das zytosolische Calciumionen konzentrationsabhängig durch Ca^{2+} -spezifische ATPasen (SERCAs) hineingepumpt werden, wodurch der zytosolische Calciumspiegel abfällt und die Muskelzelle sich relaxiert (siehe 4.3.1.5). Durch Regulation der SERCA-Aktivität ist somit eine Modulation des intrazellulären Calciumspiegels und damit auch der Muskelzellkontraktion möglich. SERCAs werden durch das benachbart lokalisierte Phospholamban inhibiert, welches wiederum durch Phosphorylierung inaktiviert wird, wodurch es zu einer Steigerung der SERCA-Aktivität im Sinne einer Enthemmung kommt. In funktionelle Untersuchungen an Gefäßmuskelzellen konnte eine Aktivierung der SERCA-Aktivität durch Phosphorylierung von Phospholamban durch die cAMP-abhängige Proteinkinase und –mit größerer Affinität– durch die cGK nachgewiesen werden (Raeymaekers et al., 1990). Die Phosphorylierung von Phospholamban durch die cGK konnte auch an einem isolierten Enzymsystem nachgewiesen und genauer charakterisiert werden (Raeymaekers et al., 1988).

cGMP-abhängige Modulation Ca²⁺-abhängiger Kaliumkanäle

Ein weiterer Mechanismus der NO/cGMP-abhängigen Absenkung der Calciumkonzentration in glatten Muskelzellen ist die direkte Phosphorylierung von large-conductance, Ca²⁺-aktivierten Kaliumkanälen (BK-channels), deren gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit zu einem Kaliumausstrom und damit insgesamt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und folglich zu einer verringerten Aktivität spannungsabhängiger Calciumkanäle und einem Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration führt (Lincoln et al., 2001). Welches cGK I-Isoenzym für die Aktivierung von BK-Kanälen verantwortlich ist, ist nicht bekannt, doch die physiologische Relevanz dieses Vorgangs wurde an cGK I-defizienten Mäusen nachgewiesen (Hofmann et al., 2000).

Wechselwirkung zwischen der Proteinkinase G und der IP₃-sensitiven Calciumfreisetzung

Initiales Signal für die Einleitung der Kontraktion glatter Muskelzellen ist in den meisten Fällen die Stimulus-induzierte Aktivierung der PLC und die daraus resultierende IP₃-abhängige Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern des SR (Hofmann et al., 2000). Die mit dem IP₃-sensitiven Calciumkonzentrationsanstieg einhergehende Membrandepolarisation führt in der Folge zur Öffnung DHP-sensitiver Calciumkanäle und zu einem zusätzlichem Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum. Das NO/cGMP/cGK-System interferiert auf mehreren Ebenen mit der Stimulus-induzierten Calciumfreisetzung aus IP₃-sensitiven Speichern. So konnte eine Inhibition der PLC-assoziierten IP₃-Produktion in CHO-Zellen nachgewiesen werden, in denen zuvor durch stabile Transfektion cGK I α exprimiert und pharmakologisch aktiviert wurde (Ruth et al., 1993). In isolierten Magenmuskelzellen führten stabile cGMP-Analoga zu einer Inhibition der IP₃-Produktion und zu einer Stimulation der Calciumaufnahme in das SR (Murthy et al., 1993).

Von großer physiologischer Bedeutung ist die Wechselwirkung des NO/cGMP/cGK-Systems mit dem IP₃-Rezeptor. Seit längerem bekannt ist, daß die cGK IP₃-Rezeptoren an zwei Stellen in vitro und auch in vivo phosphoryliert (Komalavilas und Lincoln, 1996). Der physiologische Effekt dieser Phosphorylierung ist allerdings unklar und zudem werden die gleichen Phosphorylierungsstellen auch durch die

cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert, so daß ein spezifischer cGK-abhängiger Effekt eher unwahrscheinlich erscheint.

Funktionell nachgewiesen wurde dagegen die physiologische Relevanz eines erstmals identifizierten Proteins, das in glatten Muskelzellen mit dem IP₃R-Typ 1 und der cGK I β kopräzitiert. Dieses 125-kDA Protein wurde als Ins(1,4,5)P₃-receptor-associated cGK I substrate (IRAG) charakterisiert (Schlossmann et al., 2000). Die Expression von IRAG konnte in zahlreichen Geweben und insbesondere ubiquitär in der glatten Muskulatur nachgewiesen werden (Hofmann et al., 2000) und seine Phosphorylierung durch die cGK I β inhibiert die IP₃-abhängige Calciumfreisetzung in transfizierten COS-Zellen (Schlossmann et al., 2000). IRAG bildet auf den Membranen des SR einen makromolekularen Komplex mit dem IP₃-Rezeptor und der cGK I β und die cGK I β phosphoryliert in vitro bis zu vier Serinreste des IRAG-Proteins, wobei die Phosphorylierung an S⁶⁹⁶ für die Inhibition des IP₃-Rezeptors entscheidend ist (Ammendola et al., 2001).

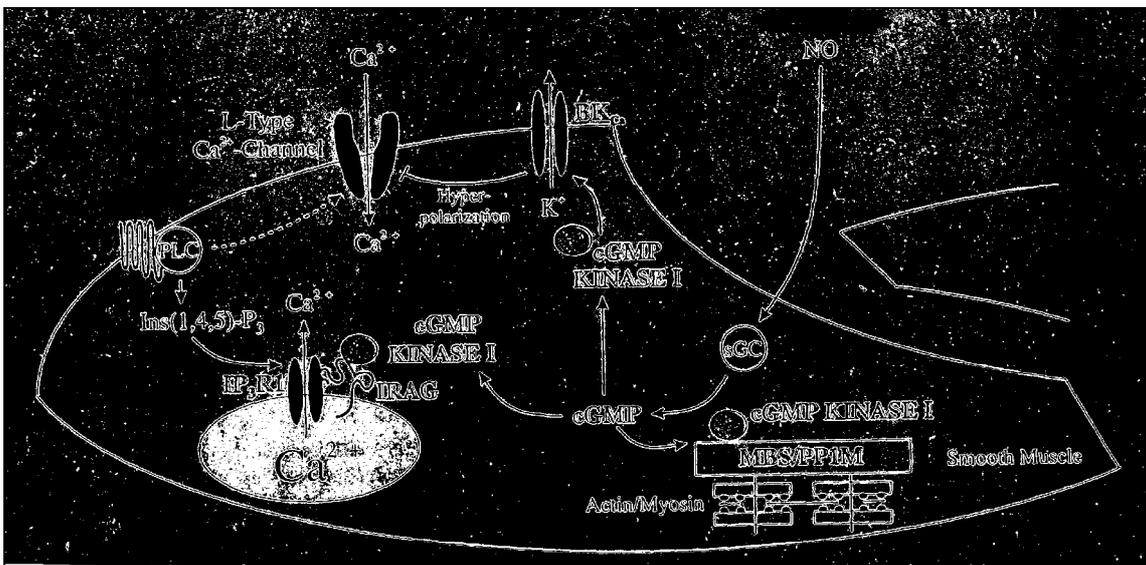


Abb. 18: (modifiziert nach Hofmann et al., 2000): Wechselwirkung zwischen dem NO/cGMP/cGK I-Signaltransduktionssystem und dem Calciumsignalstoffwechsel in glatten Muskelzellen. Erläuterungen zu den einzelnen abgebildeten Elementen im Text (MBS/PP1M im Text Myosin-Leichtketten-Phosphatase, MLCP)

5 Spezielle Diskussion

5.1 Isolation und Kultivierung myenterischen Nervengewebes aus dem Dünndarm der adulten Ratte

5.1.1 Isolation myenterischer Ganglien

Die Untersuchung zentraler morphologischer und funktioneller Charakteristika myenterischer Neurone und Gliazellen, die die kleinsten Funktionseinheiten des enterischen Nervensystems darstellen, wird durch die enge strukturelle und funktionelle Verflechtung enterischer Ganglien mit den Strukturen der Darmwand erheblich erschwert (Jessen et al., 1982). Die Entwicklung von Präparationstechniken, die die Herauslösung neuronalen Gewebes aus der Wand des Verdauungskanals ermöglichen, ohne Struktur und Vitalität der isolierten Strukturen zu beschädigen, ist daher seit über zwanzig Jahren Gegenstand der Forschungsbemühungen im Zusammenhang mit der Charakterisierung von Physiologie und Pathophysiologie des enterischen Nervensystems (Saffrey et al., 1992). Die meisten Arbeiten an isoliertem und kultiviertem enterischen Nervengewebe verwendeten Isolate aus dem Darm neugeborener Versuchstiere, was mit geringeren technischen Schwierigkeiten, doch auch mit einer nur bedingten Übertragbarkeit der beschriebenen Resultate auf die Verhältnisse bei adulten Organismen behaftet ist (siehe 4.2.1). Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Präparationstechnik, die die Isolation myenterischen Nervengewebes aus der Darmwand adulter Versuchstiere erlaubt und dabei quantitativ und qualitativ den Isolaten neugeborener Versuchstiere gleichwertige Ergebnisse ermöglicht.

Als Ausgangsmaterial wurden wie in fast allen vergleichbaren Modellen (Nishi und Willard, 1985; Schäfer et al., 1997; Jessen et al., 1983a) LMMP-Streifen verwendet (siehe 2.1.2), denen die Strukturen des myenterischen Plexus von medial anliegen, was die enzymatische Herauslösung erleichtert. Als entscheidend für den Präparationserfolg erwies sich eine optimale Kombination aus enzymatischer Andauung und mechanischer Dissoziation des Gewebes (siehe 3.1.2). Die Inkubation der Darmwandfragmente mit Verdauungsenzymen diente in erster Linie der Zerstörung der Bindegewebsstrukturen, durch die die Ganglien des myenterischen Plexus mit der Darmwand verwachsen sind. Die besten Ergebnisse sind in der Literatur durch Verwendung einer rohen, ungereinigten Collagenase erzielt worden, wobei erhebliche Unterschiede zwischen einzelnen Chargen berichtet

worden sind, die auf die quantitativ deutlich unterschiedliche Anteile verunreinigender Enzymaktivitäten zurückgeführt wurden (Schäfer et al., 1997). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Collagenase-Chargen bei jeweils 5 verschiedenen Inkubationszeiten getestet (siehe 3.1.1), bevor Collagenase und Verdauungszeit festgelegt wurden.

Zur mechanischen Herauslösung des myenterischen Plexus aus der angedauten Darmwand wurden in der Literatur verschiedene Techniken von der technisch anspruchsvollen, zeitlich aufwendigen und im quantitativen Resultat begrenzten Mikrodissektion (Jessen et al., 1983a) bis hin zur Kombination aus Pipettenaspiration und Zentrifugation, was zu relativ stark verunreinigten Isolaten führte (Nishi und Willard, 1985), beschrieben. Für diese Arbeit erwies sich die Abwandlung einer kürzlich beschriebenen Methode (Schäfer et al., 1997) als optimal, die auf einem im Hinblick auf Geschwindigkeit und Dauer standardisierten Vortexen der angedauten Gewebsfragmente beruht. Im Ergebnis ließen sich auf diese Weise Aggregate von etwa 1 bis 5 myenterischen Ganglien gewinnen, die zum Großteil von der umgebenden glatten Muskulatur völlig befreit waren und durch Aspiration unter Sicht einer zusätzlichen Selektion unterzogen wurden (siehe 3.1.3).

Die strukturelle Integrität isolierter myenterischer Ganglien erschwert den experimentellen Zugang zu einzelnen Zellen innerhalb eines Ganglions und aufgrund erhaltener funktioneller Regelkreise die Interpretation von Resultaten, die beispielsweise durch elektrophysiologische Ableitung gewonnen werden, weshalb für die Beantwortung spezieller Fragestellungen Dissoziationstechniken entwickelt worden sind, die die Gewinnung einzelner, aus ihrem strukturellen und funktionellen Verband herausgelöster Neurone und Gliazellen ermöglicht (Saffrey et al., 1991). Auch im Rahmen dieser Arbeit gelang die weitere Aufspaltung isolierter Ganglien in einzelne Zellen mit einem akzeptablen Anteil vitaler Zellen nach der Gangliendissoziation (siehe 3.1.4).

5.1.2 Etablierung einer Primärzellkultur aus myenterischem Nervengewebe

Die Primärkultivierung enterischen Nervengewebes ist die Voraussetzung für die Anwendung zahlreicher experimenteller Techniken an den zellulären Strukturen des enterischen Nervensystems (Saffrey et al., 1992) und bietet zudem die Möglichkeit, Zelltypen und deren Ultrastruktur (Baluk et al., 1983; Nishi und Willard, 1985), Wachstums- und Entwicklungsvorgänge (Simeone et al., 1994; Mulholland et al., 1994), Differenzierungsverhalten und dessen Modulation (Jessen et al., 1979;

Nakamura et al., 1998) sowie zentrale funktionelle Charakteristika enterischer Neurone und Gliazellen zu studieren (siehe 4.2). Kultiviert worden sind bislang entweder ganze, strukturell intakte Ganglien des myenterischen Plexus (Jessen et al., 1983a) oder in Einzelzellen und kleinere Zellaggregate dissoziiertes myenterisches Nervengewebe (Saffrey et al., 1991). Eine Kultivierung submuköser Ganglien wurde bislang nur einmal an humanem Gewebe berichtet (Accili et al., 1993). Die Voraussetzung für die Kultivierung myenterischen Nervengewebes ist die Anhaftung der Isolate an eine geeignete Unterlage, da enterischer Nervengewebe sich nicht in Suspensionskultur züchten läßt (eigene Beobachtung). Aufgrund der dreidimensionalen und heterogenen Oberflächenstruktur myenterischer Ganglien ist dies mit deutlich mehr Schwierigkeiten verbunden als beispielsweise die in dieser Arbeit beschriebene Kultivierung glatter Muskelzellen. Trotz Testung mehrerer Beschichtungstechniken (siehe 3.2.1), Verwendung verschiedener Trägermaterialien (Glas, Plastik, Nucleopore^R-Siebeinsätze), Optimierung der Menge des mit den Ganglien aufgetragenen Mediums und der Anwachszeit vor dem Auffüllen der Kulturschalen mit Medium ließ sich insgesamt nur eine mäßige Anhaftungsquote isolierten myenterischen Nervengewebes von etwa 20 % erreichen, was deutlich unter den in der Literatur berichteten Anteilen lag. Ein Grund für diese Diskrepanz liegt sicherlich in der Verwendung adulten Gewebes, bei dem sich auch in Vorgängerarbeiten eine deutlich schlechtere Anhaftungstendenz zeigte (Schafer und Mestres, 1997). Auch scheint die Anhaftung isolierter Ganglien aus dem Meerschweinchendünndarm weniger problematisch zu sein (J.R. Grider, persönliche Kommunikation) als bei Rattengewebe, was auf Spezies-spezifische Unterschiede hindeutet. Dennoch ließen sich myenterische Ganglien nach Optimierung sämtlicher Bedingungen in ausreichender Dichte kultivieren und in ihrem Verhalten in Kultur beurteilen.

Myenterisches Nervengewebe aus dem Dünndarm der adulten Ratte ließ sich regelmäßig über mindestens 14 Tage in Kultur halten (siehe 3.2.2.1). Während myenterische Neurone nach dem Anhaften in der Regel im Bereich des ehemaligen Ganglions verweilten, wuchsen myenterische Gliazellen ab dem dritten Tag in Kultur durch rege Teilung über den Bereich der sich strukturell zunehmend auflockernden Ganglien hinaus und bildeten mit zunehmendem Alter der Kulturen allmählich einen dichten Zellteppich, auf dem sich aus den Neuronen auswachsende Neuriten auszubreiten begannen. Wenn die gesamte Wachstumsfläche durch die

konfluierende Glia bedeckt war, begannen die Neurone sich abzulösen, wodurch der Kultivierungsprozeß zeitlich begrenzt wurde. Ähnliche Wachstumscharakteristika kultivierten myenterischen Nervengewebes wurden auch in Vorgängerarbeiten an ähnlichen Modellen berichtet (Jessen et al., 1982; Nishi und Willard, 1985; Jaeger, 1995), wobei meist über einen Beginn der Neuritenaussprossung und der Gliazellteilung innerhalb der ersten 36-48 h berichtet wurde, was vor den im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Zeitpunkt (72h) lag. Das regere Wachstum der Kulturen in den erwähnten Arbeiten dürfte am ehesten auf die Verwendung neonatalen Gewebes zurückzuführen sein, wofür auch die Ergebnisse einer Studie sprechen, die das Wachstumsverhalten kultivierten myenterischen Nervengewebes humanen Ursprungs aus dem Colon neugeborener und adulter Spender verglich und eine deutlich reduzierte, den Befunden in der vorliegenden Arbeit sehr ähnliche Proliferationstendenz bei Neuronen und Gliazellen aus adultem Gewebe ausmachte (Schafer und Mestres, 1997).

Die phasenkontrastmikroskopische Morphologie myenterischer Neurone und Gliazellen in Kultur deckte sich weitgehend mit den in der Literatur beschriebenen Charakteristika (Nishi und Willard, 1985; Jessen et al., 1983a)). Die zahlenmäßig deutlich unterlegenen Neurone hatten kompakte, helle Zellkörper und sendeten radiäre Fortsätze zu anderen Neuronen und Gliazellen aus, die Gliazellen breiteten sich flach und irregulär geformt mit zahlreichen Fortsätzen auf der Unterlage aus und zeigten ein dunkel erscheinendes Zytoplasma mit runden Kernen und deutlichen Nukleoli (siehe 4.2.2.1).

5.1.3 Immunologische Charakterisierung kultivierten myenterischen Nervengewebes

Kultiviertes enterisches Nervengewebe wurde in der Vergangenheit häufig als Ausgangsmaterial für immunzytochemische Studien herangezogen (Saffrey et al., 1992; Buckley und Burnstock, 1986; Zhou und Galligan, 2000). Zum einen konnte dadurch die Aufrechterhaltung der Differenzierung myenterischer Neurone und Gliazellen unter Kulturbedingungen nachgewiesen werden (Eaker et al., 1995; Broussard et al., 1993; Ruhl et al., 2001), zum anderen die Expression von Neurotransmittern (Jessen et al., 1979), deren Kolokalisationsverhalten (Grider und Bonilla, 1994) und die Veränderungen von Expressionsmustern unter modulierenden Bedingungen aufgezeigt werden (Nakamura et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an durchschnittlich sechs Tage alten Kulturen die Anwesenheit differenzierter, myenterischer Neurone durch immunzytochemische Anfärbung des zytosolischen Markerproteins NSE oder durch Anfärbung von Neurofilamentproteinen als Bestandteile des neuronalen Zytoskeletts mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Beide Antikörper färbten eine Subpopulation kultivierter Zellen, deren Zellkörper die typische kompakte, birnenförmig erscheinende Form kultivierter myenterischer Neurone aufwiesen (siehe 3.3.1). Der Anteil auf diese Weise als Neurone identifizierter Zellen an der Gesamtpopulation kultivierter Zellen zu diesem Zeitpunkt betrug etwa 10-15%, was etwas unter den in der Literatur berichteten Anteilen liegt (Jessen et al., 1983a).

Zur immunzytochemischen Identifikation enterischer Gliazellen in Kultur wurde ein gegen saures Gliafaserprotein (GFAP) gerichteter Antikörper verwendet. GFAP ist mit 10 nm-Intermediärfilamenten kolokalisiert, wie sie im Zytoskelett zentraler Astroglia und in der enterischen Glia, die mit jener eng verwandt ist, vorkommt (Jessen und Mirsky, 1980). Die große Mehrzahl der in Kultur befindlichen Zellen färbte sich erwartungsgemäß mit watteähnlicher Feinstruktur unter Aussparung der runden Zellkerne mit dem Anti-GFAP-Antikörper an, was den Erhalt der Differenzierung kultivierter myenterischer Glia nach etwa einer Woche unter Kulturbedingungen belegt.

Die neuronale NO-Produktion durch die nNOS hat für die physiologische Funktion des Gastrointestinaltrakts immense Bedeutung (Goyal und Hirano, 1996). Einer Reihe klinisch relevanter Krankheitsbilder wie der Achalasie, der infantilen hypertrophen Pylorusstenose und auch dem kongenitalen Megacolon liegt ein Mangel funktionell wirksamen Stickstoffmonoxids in der neuromuskulären Signaltransduktion in definierten Abschnitten des Verdauungskanals zugrunde (siehe 4.3.2.1). Die Kultivierbarkeit nNOS-positiver myenterischer Neurone wurde bislang in erst einer Studie am Meerschweinchencoecum direkt nachgewiesen (Saffrey et al., 1992). In einer zweiten Studie, in der kultivierte myenterische Ganglien homolog in das Corpus striatum verpflanzt wurden, fanden sich noch ein Jahr nach Verpflanzung NADPH-positive Fasern in der betreffenden Region (Tew et al., 1996). Diese Studien belegen, daß es zum einen möglich ist, nNOS-positive myenterische Neurone unter Kulturbedingungen in Differenzierung zu halten, und daß zum anderen kultivierte nNOS-positive myenterische Neurone nach ihrer Reimplantation in eine neue Umgebung über sehr lange Zeiträume überleben

können. Die entscheidenden Probleme der bislang an transplantierten myenterischen Neuronen veröffentlichten Studien (siehe 4.2.4) liegen im fehlenden Nachweis einer echten strukturellen und funktionellen Integration der Transplantate in die neue Umgebung, die in allen Arbeiten das ZNS war, und in den zu beobachtenden Abgrenzungs- und Abstoßungsreaktionen. Beide Probleme wären allerdings im Falle einer autologen Verpflanzung von aus gesunden Abschnitten des Verdauungstrakts eines Spenders isoliertem myenterischem Nervengewebe in eine NOS-defiziente Region desselben Individuums zu umgehen, da hierbei weder eine Abstoßungsreaktion zu befürchten ist noch ein massiv verändertes strukturelles und funktionelles Milieu das verpflanzte Gewebe erwartet.

Vor diesem Hintergrund wurde die nNOS-Expression in kultiviertem myenterischem Nervengewebe der adulten Ratte mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dabei ließ sich eine relativ kleine, aber reproduzierbare Fraktion nNOS-positiver Neurone, deren Zytoplasma sich homogen anfärbte, nachweisen.

5.2 Modulation der intrazellulären Calciumfreisetzung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen durch Stickstoffmonoxid

5.2.1 Humane Colonmuskelzellen in Zellkultur

Zahlreiche physiologische Charakteristika glatter intestinaler Muskelzellen sind an isolierten und kultivierten Muskelzellen erarbeitet worden. Dabei wurden meist glatte Muskelzellen aus dem Magen, Dünn- und Dickdarm von Meerschweinchen (Murthy et al., 1993; Murthy und Makhlouf, 1991), Kaninchen (Ennes et al., 1992; Murthy und Makhlouf, 1998), Mäusen (Bayguinov et al., 2000; Bayguinov et al., 2001) oder Hunden (Koh und Sanders, 1996) verwendet, die durch enzymatische Verfahren isoliert und über einen kurzen Zeitraum kultiviert worden sind. Die Isolation glatter Muskelzellen aus dem Verdauungstrakt des Menschen wurde bislang nur von zwei Arbeitsgruppen berichtet, die primärkultivierte glatte Muskelzellen aus dem humanen Jejunum und Colon für elektrophysiologische Experimente verwendeten (Farrugia et al., 1999; Farrugia, 1996; Xiong et al., 1995). Der Vorteil der Verwendung humanen Gewebes liegt in der besseren Übertragbarkeit der erhobenen Befunde auf die in-vivo-Verhältnisse beim Menschen, weshalb für die Charakterisierung der NO-abhängigen Modulation des Calciumsignalstoffwechsels glatter intestinaler Muskelzellen im Rahmen dieser Arbeit auf primär kultivierte humane Colonmuskelzellen zurückgegriffen wurde. Verwendet wurden kommerziell

erworbene humane Colonmuskelzellen in der 4. und 5. Passage nach Isolation. Zu diesem Zeitpunkt zeigte das Zellmaterial die typische Morphologie und zahlreiche funktionelle Charakteristika glatter Muskelzellen (siehe 3.4.1.1). Eine vergleichbare Kultur kommerziell erworbener glatter Muskelzellen aus dem humanen Dünndarm wurde in der Literatur bis zur 19. Passage nach Isolation für elektrophysiologische Ableitungsexperimente und für fluoreszenzmikroskopische Calciumsignalmessungen mit Fura-2 verwendet, wobei sich selbst auf diesem hohen Passagelevel die Aufrechterhaltung zentraler Charakteristika intestinaler Muskelzellen nachweisen ließ (Bielefeldt et al., 1997; Zholos et al., 2000). Allerdings zeigten selbst frisch isolierte und kurzzeitig kultivierte intestinale Muskelzellen bald nach der enzymatischen Isolierung quantitative Veränderung in der Expression von Neuropeptiden und Rezeptoren (Hyman et al., 1992; Ennes et al., 1992), so daß ein gewisses Maß an Ent- und Umdifferenzierungsvorgängen bei der Arbeit mit kultivierten Zellen selbst unter optimalen Bedingungen unvermeidlich zu sein scheint.

5.2.2 Fluorimetrische Calciummessung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen

Der kontraktile Apparat glatter Muskelzellen wird durch Verschiebungen in der zytosolischen Calciumkonzentration aktiviert bzw. deaktiviert (siehe 4.3.1.1). Daher existieren zahlreiche, über komplexe Regulationsmechanismen interagierende Stoffwechsellaskaden, die die intrazelluläre Konzentration freier Calciumionen regulieren (Sanders, 2001). Zur Auslösung einer Kontraktion ist ein globaler, weite Teile der glatten Muskelzelle durchziehender Anstieg der Calciumkonzentration notwendig, dessen quantitatives Ausmaß direkten Einfluß auf die zustande kommende Kontraktionskraft und die daraus resultierende Muskelzellkontraktion ausübt (Somlyo und Somlyo, 1994).

Die indirekte, fluorimetrische Messung von Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration ermöglicht die annähernd kontinuierliche, quantitative Aufzeichnung intrazellulärer Calciumsignale und erlaubt somit in einzigartiger Weise einen direkten experimentellen Zugriff auf das wichtigste physiologische Regulativ glatter Muskelzellen. Für die Aufzeichnung intrazellulärer Calciumsignale in kultivierten humanen Colonmuskelzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein konventionelles Videofluoreszenzmikroskopie-System verwendet, dessen optische und zeitliche Auflösung sich für die Messung globaler, Kontraktion auslösender Calciumverschiebungen eignet. Lokalisierte, schnelle Calciumsignale wie „puffs“ oder

„sparks“ (siehe 4.3.1.6) können mit diesem System nicht hinreichend beurteilt werden und erfordern die Verwendung eines hochauflösenden, konfokalen Mikroskops, wie es in der Literatur an mehreren experimentelle Systemen etabliert werden konnte (Perez et al., 1999; Vanden Berghe et al., 2000). Als Fluoreszenzfarbstoff wurde in Analogie zu zahlreichen an Nerven- und Muskelgewebe durchgeführten Vorgängerarbeiten (Hanani und Lasser-Ross, 1997; Young et al., 1999) Fura-2 verwendet, dessen niedrige Calciumaffinität ($K_d=0.14 \mu\text{M}$) eine hohe Messgenauigkeit im Bereich physiologischer intrazellulärer Calciumkonzentrationen gewährleistet (Shmigol et al., 2001). Die nach Kalibrierung des Systems in kultivierten humanen Colonmuskelzellen gemessenen Calciumkonzentrationen unter Ruhebedingungen lagen im Bereich vorbeschriebener typischer Konzentrationen in intestinalen Muskelzellen (van Breemen und Saida, 1989), was die funktionelle Integrität des verwendeten Zellmaterials unter den gegebenen Versuchsbedingungen belegt.

5.2.3 Stimulus-induzierte Calciumsignale

Eine Reihe physiologischer Stimuli führt *in vitro* zu einer Rezeptor-vermittelten Auslösung eines Calciumkonzentrationsanstiegs in intestinalen Muskelzellen (Hyman et al., 1992; Young et al., 1999; Shmigol et al., 2001; Ohta et al., 1994). Unter *in vivo*-Bedingungen ist im Bereich der neuro-muskulären Signalübertragung im enterischen Nervensystem vor allem Acetylcholin als Überträgerstoff exzitatorischer Motoneurone charakterisiert (Porter et al., 1997; Sanders, 2001), der über die Aktivierung membranständiger muskarinerge Rezeptoren auf der intestinalen Muskulatur einen intrazellulären Calciumkonzentrationsanstieg und die nachfolgende Kontraktion auslöst. Zweifel an der physiologischen Relevanz einer direkten muskarinergen Signalübertragung von enterischen Motoneuronen auf die glatte intestinale Muskulatur sind durch die Charakterisierung der zentralen funktionellen Bedeutung interstitieller Zellen in der neuromuskulären Signalübertragung im Verdauungstrakt aufgekommen (Ward und Sanders, 2001). So konnte gezeigt werden, daß interstitielle Zellen im Vergleich zur Muskulatur deutlich engere räumlichen Assoziation zu den Nervenfasern exzitatorischer, cholinerge und inhibitorischer, nitrerge Motoneurone unter Bildung synapsenartiger Strukturen eingehen (Ward und Sanders, 2001), Rezeptoren für ACh (M_2 - und M_3 -Rezeptoren), SP, VIP und Somatostatin exprimieren (Epperson et al., 2000; Sternini et al., 1997), und daß sie über gap junctions elektrisch und funktionell an die umgebende

intestinale Muskulatur gekoppelt sind (Glabella, 1987), so daß eine primäre Signalübertragung von enterischen Motoneuronen auf ICCs in zunehmendem Maße als gesichert gelten kann und die klassische, direkte neuromuskuläre Signalübertragung im ENS allenfalls eine Nebenrolle einzunehmen scheint, was auch mehrere Studien an Mäusenmutanten mit defekten ICCs zu belegen scheinen (Ward und Sanders, 2001) (siehe 4.1.2.3). Dennoch stellt die direkte experimentelle Stimulierung isolierter intestinaler Muskelzellen mit biochemischen Stimuli ein probates Mittel für die Erforschung intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen dar, da sie die gezielte Aktivierung definierter Signalsysteme erlaubt.

Als Stimulus für die Generierung intrazellulärer Calciumsignale in kultivierten humanen Colonmuskelzellen wurde der muskarinerge Agonist Carbachol und das Neuropeptid Bradykinin verwendet (siehe 3.4.1). Beide Agonisten sind bekannte Aktivatoren der Phospholipase C und stimulieren die IP_3 -Produktion in intestinalen Muskelzellen (Hyman et al., 1992; Ohta et al., 1994) und eignen sich daher zur Charakterisierung der IP_3 -abhängigen Calciumfreisetzung aus den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (siehe 4.3.1.4). Beide Agonisten induzierten typische, transiente intrazelluläre Calciumsignale mit einem sehr steilen Anstieg und einem leicht verzögerten Abfall auf den Ausgangswert. Die Stimulationen waren mehrfach wiederholbar, was unspezifische oder toxische Effekte der Stimuli auf die untersuchten Zellen unwahrscheinlich macht. Die Calciumsignal-Antwort auf Carbacholstimulation hatte „Alles-oder-Nichts“-Charakter, indem mit zunehmender Konzentration des Stimulus ein größerer Anteil kultivierter Muskelzellen mit einem Calciumsignal reagierten, Höhe und Dauer der Calciumkonzentrationsänderung aber unverändert blieben, was den Beobachtungen an anderen Modellen entspricht (Ohta et al., 1994). Daß selbst bei hohen Carbacholkonzentrationen nur gut die Hälfte aller kultivierten Zellen stimulierbar war, könnte durch eine Downregulation muskarinerger Rezeptoren unter Kulturbedingungen zu erklären sein, wie sie auch an anderer Stelle beobachtet wurde (Hyman et al., 1992). Auch eine teilweise Entdifferenzierung glatter kultivierter Muskelzellen kommt in Betracht.

5.2.4 Abhängigkeit der Calciumsignale von IP_3 -sensitiven Calciumspeichern

Multiple Mechanismen könne zur Generierung von Calciumsignalen in intestinalen Muskelzellen beitragen (siehe 4.3.1). Außer der Stimulus-induzierten Freisetzung aus dem Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums trägt vor allem der Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Raum über DHP-sensitive Calciumkanäle

quantitativ zur Generierung Ca^{2+} -abhängiger Kontraktionen bei (Vogalis et al., 1991). Um modulatorische Phänomene des NO/cGMP-Signaltransduktionssystem auf den Calciumsignalstoffwechsel in kultivierten humanen Colonmuskelzellen genauer lokalisieren und einem spezifischen Calciumfreisetzungssystem zuordnen zu können, wurde die Herkunft des durch Carbacholexposition freigesetzten Calcium experimentell untersucht (siehe 3.4.2). Experimente in Abwesenheit extrazellulären Calciums zeigten unveränderte Calciumsignalcharakteristika, was eine Unabhängigkeit der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung von Calciumströmen über die Plasmamembran demonstriert und eine Mobilisation aus intrazellulären Speichern nahelegt. Zur näheren Eingrenzung dieser intrazellulären Quelle wurde mit 2-APB ein weitgehend selektiver Inhibitor der IP_3 -abhängigen Calciumfreisetzung eingesetzt, der im Bereich auch in der Literatur (Maruyama et al., 1997) angegebener Konzentrationen die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung praktisch vollständig blockierte, was bereits nach kurzem Auswaschen weitgehend reversibel war. Somit lag in dieser Untersuchung ein Modell vor, an dem die Modulation der Stimulus-induzierten Calciumfreisetzung aus IP_3 -sensitiven sarkoplasmatischen Calciumspeicher durch NO untersucht werden konnte.

5.2.5 Einfluß von exogenem NO auf Stimulus-induzierte Calciumsignale

Stickstoffmonoxid ist im enterischen Nervensystem der wichtigste Überträgerstoff in der Vermittlung der nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC) Relaxation (siehe 4.3.2.1), dessen Fehlen oder dessen funktionelle Ausschaltung durch Inaktivierung seiner Zielstrukturen zu schweren Funktionsstörungen im Ablauf der gastrointestinalen Motilität führt (Pfeifer et al., 1998). Am humanen Colon wurde als morphologisches Korrelat der zentralen Bedeutung von NO für die Relaxation glatter Muskelzellen 48% der zur Zirkulärmuskulatur ziehenden myenterischen Motoneurone als NOS-positiv identifiziert, wovon fast alle nach aboral projiziert und nur eine relativ kleine Subpopulation mit VIP kolokalisiert war (Porter et al., 1997). In zahlreichen Studien an der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts und auch an der glatten Muskulatur anderer funktionell relevanter Regionen des Organismus wurden Stoffwechselwege nachgewiesen, durch die NO Tonus und Kontraktilität glatter Muskelzellen zu senken im Stande ist (siehe 4.3.2.4). Nachdem der Tonus glatter Muskelzellen entscheidend durch die zytosolische Konzentration freier Calciumionen mitbestimmt wird und das quantitative Ausmaß der einem Stimulus folgenden Kontraktion wesentlich von der Menge des durch den Stimulus

freigesetzten Calciums abhängt, ist die Calciumfreisetzung in der glatten Muskulatur der wichtigste Angriffspunkt des NO/cGMP/cGK-Systems in der Relaxation glatter Muskelzellen (Hofmann et al., 2000). Eine wichtige funktionelle Bedeutung der Inhibition der IP₃-sensitiven Calciumfreisetzung durch NO wurde an glatten Muskelzellen der Trachea (Kannan et al., 1997) und an Megakaryozyten (Tertyshnikova et al., 1998) durch fluorimetrische Calciummessung und an Magenmuskelzellen durch Verwendung von ⁴⁵Ca²⁺ (Murthy und Makhlof, 1995; Murthy et al., 1993) nachgewiesen.

Exogenes NO führte am vorliegenden Modell zu einer deutlichen und reversiblen Inhibition der Stimulus-induzierten, IP₃-sensitiven Calciumfreisetzung, was im Rahmen dieser Arbeit erstmals an glatten Muskelzellen aus dem Verdauungstrakt des Menschen gezeigt werden konnte.

5.2.6 Rolle der Guanylatzyklase

Spezifische Zielstruktur von NO in glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltrakts ist die lösliche Guanylatzyklase (sGC), deren Aktivierung durch NO zu einer 100 bis 200-fachen Steigerung der cGMP-Synthese führt (siehe 4.3.3.2). Durch pharmakologische Blockade der sGC durch ODQ ließ sich die inhibitorische Wirkung von exogenem NO auf die Carbachol-induzierten Calciumsignale in kultivierten humanen Colonmuskelzellen vollständig antagonisieren, was belegt, daß der gezeigte NO-Effekt spezifisch ist und nicht durch evt. zell- oder membrantoxische NO-Effekte verursacht ist. Dieser Befund deckt sich mit funktionellen Untersuchungen an der glatten Muskulatur des Verdauungstrakt, wo die NO-induzierte Relaxation ebenfalls cGMP-abhängig ist (Huber et al., 1998; Carvajal et al., 2000).

5.2.7 Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase

cGMP entfaltet seine Wirkung in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts durch Aktivierung der cGK I β (siehe 4.3.2.3), die in der NO-vermittelten Relaxation glatter Muskulatur die entscheidende Schaltzentrale darstellt und deren Fehlen zu schweren Funktionsstörungen im Bereich des Gastrointestinaltrakts führt (Pfeifer et al., 1998). Eine weitere relevante Zielstruktur für cGMP im Gastrointestinaltrakt stellen die cGMP-spezifischen und die cGMP-regulierten Phosphodiesterasen dar, die eine funktionelle Quervernetzung des NO/cGMP-Systems mit cAMP-abhängigen Stoffwechselwegen ermöglichen (siehe 4.3.3.2).

Für die pharmakologische Blockade der cGK wurden am vorliegenden Modell zwei spezifische Inhibitoren der cGK-Aktivität, KT 5823 und Rp-pCPT-cGMPs, eingesetzt. KT 5823 galt über mehrere Jahre als spezifischer und membranpermeabler Inhibitor der cGK I und zahlreiche Studien zur funktionellen Bedeutung der cGK im Gastrointestinaltrakt beruhen auf der Verwendung dieser Substanz (Murthy und Makhlouf, 1998; Murthy und Makhlouf, 1995). In einer kürzlich veröffentlichten Studie (Burkhardt et al., 2000) wurde allerdings die Unwirksamkeit dieser Substanz in intakten Thrombozyten und mesangialen Zellen nachgewiesen, weshalb mit Rp-pCPT-cGMPs ein anderer verfügbarer, spezifischer und ausreichend membranpermeabler cGK-Inhibitor zur Bestätigung der gefundenen Resultate eingesetzt wurde. Beide Inhibitoren führten in gleicher Weise zu einer weitgehenden Aufhebung des inhibitorischen NO-Effekts auf die IP₃-sensitive Calciumfreisetzung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen. Damit wurde in humanen Colonmuskelzellen eine NO-vermittelte Inhibition der IP₃-sensitiven Calciumfreisetzung aufgezeigt, deren Mechanismus vollständig cGMP-abhängig und zu mehr als zwei Drittel durch die cGK vermittelt ist.

Die Mechanismen, durch die cGMP-abhängige Proteinkinase durch Substratphosphorylierung auf die IP₃-abhängige Calciumfreisetzung in glatten Muskelzellen Einfluß nimmt, konnte in den letzten Jahren in zunehmendem Umfang charakterisiert werden (siehe 4.3.2.4). Der entscheidende Schritt scheint dabei durch die cGK I β -abhängige Phosphorylierung des 125 kDA-Proteins Ins(1,4,5)P₃-receptor-associated cGK I substrate (IRAG) zu erfolgen, das mit dem IP₃R und der cGK I β einen makromolekularen Komplex auf den Membranen des SR bildet und dessen isoliertes Fehlen die cGK-vermittelte Inhibition der IP₃-abhängigen Calciumfreisetzung in transfezierten COS-Zellen komplett aufhob (Ammendola et al., 2001; Schlossmann et al., 2000).

In der in dieser Arbeit verwendeten Population kultivierter humanen Colonmuskelzellen konnte durch Western Blot-Technik sowohl die Expression der cGK I β -Isoform als auch – zum ersten Mal in humanem gastrointestinalem Gewebe – die Expression von IRAG nachgewiesen werden, so daß eine Vermittlung der NO-induzierten Inhibition der IP₃-sensitiven Calciumfreisetzung in humanen Colonmuskelzellen durch cGK I β -abhängige Phosphorylierung von IRAG ein möglicher und wahrscheinlicher Mechanismus ist.

6 Zusammenfassung

6.1 Isolation und Kultivierung myenterischen Nervengewebes aus der adulten Ratte

Das enterische Nervensystem verkörpert die größte und strukturell komplexeste neuronale Organisationseinheit außerhalb des ZNS und steuert zahlreiche wesentliche Funktionsabläufe des Gastrointestinaltrakts. Das Studium des ENS auf zellulärer Ebene wird durch die feste strukturelle Integration enterischer Ganglien in der Wand des Verdauungstrakts erschwert, weshalb die Isolation und Kultivierung enterischen Nervengewebes eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung von Struktur, Entwicklung, Physiologie und Pathophysiologie des enterischen Nervensystems darstellt. Nachdem die meisten bisher an enterischem Nervengewebe etablierten Kulturmodelle auf das Gewebe neugeborener Versuchstiere zurückgriffen, was die Verhältnisse am adulten Organismus aber nur teilweise widerspiegelt, war es Ziel dieser Arbeit, ein experimentelles Modell zu etablieren, das die Isolation und Kultivierung myenterischen Nervengewebes aus dem Dünndarm der adulten Ratte erlaubt.

1. Durch enzymatische Andauung präparatorisch isolierter Längsmuskulaturstreifen mit anhängendem myenterischen Plexus (LMMP) aus dem Rattendünndarm und anschließende mechanische Gewebedissoziation, Größentrennung und Zentrifugation war es möglich, Fragmente des myenterischen Plexus aus 1 – 5 Ganglien von der umgebenden Muskulatur komplett abzutrennen.
2. Isolierte Plexusfragmente konnten durch Trypsinandau und mechanische Behandlung in einzelne Zellen und kleinere Zellaggregate gespalten werden.
3. Sowohl intakte myenterische Ganglien als auch in Einzelzellen dissoziiertes myenterisches Nervengewebe konnte unter geeigneten Bedingungen in Primärzellkultur gebracht und für mindestens 14 Tage kultiviert werden.
4. Isoliertes myenterisches Nervengewebe aus dem Dünndarm der adulten Ratte zeigte in Kultur die typische Morphologie und das charakteristische Wachstums- und Differenzierungsverhalten myenterischen Nervengewebes.
5. Kultivierte myenterische Neurone bildeten ab dem 3. Tag in Kultur Fortsätze aus, die, an der kultivierten Glia als Leitstruktur orientiert, zahlreiche Zellkontakte mit anderen Neuronen und mit Gliazellen ausbildeten.

6. Durch immunzytologische Färbungen konnte die Aufrechterhaltung der Differenzierung myenterischer Neurone und Gliazellen in Kultur nachgewiesen werden.
7. Eine Subpopulation kultivierter myenterischer Neurone aus dem Dünndarm der adulten Ratte exprimiert auch unter Kulturbedingungen nNOS und stellt somit eine mögliche Quelle nNOS-positiver Neurone für Transplantationsstudien dar.

6.2 Stickstoffmonoxid-abhängige Modulation der IP₃-abhängigen Calciumfreisetzung in humanen Colonmuskelzellen

Im humanen Colon exprimiert etwa die Hälfte aller zur Zirkulärmuskulatur projizierenden myenterischen Motoneurone nNOS. Fast alle dieser nNOS-positiven Nervenfasern projizieren nach kaudal, um dort die Relaxation der glatten Muskulatur zu bewirken. Da Tonus und Kontraktilität glatter Muskelzellen direkt von der zytosolischen Calciumkonzentration abhängen, stellt deren Modulation einen wesentlichen Mechanismus in der NO-abhängigen Relaxation glatter Muskulatur dar. Ziel dieser Arbeit war es, an isolierten und kultivierten humanen Colonmuskelzellen die NO-abhängige Modulation des intrazellulären Calciumsignalstoffwechsels zu charakterisieren.

1. Kultivierte humane Colonmuskelzellen zeigten in der 4. und 5. Passage nach Isolation typische morphologische und funktionelle Charakteristika glatter Muskelzellen.
2. Der muskarinerge Agonist Carbachol und das Neuropeptid Bradykinin riefen in kultivierten humanen Colonmuskelzellen typische transiente Calciumsignale hervor. Die Stimulation war dreimal nacheinander ohne signifikante Veränderung wiederholbar.
3. Carbachol-induzierte Calciumsignale zeigten keine Abhängigkeit von extrazellulärem Calcium und wurden durch 2-APB, einen membranpermeablen Inhibitor der Calciumfreisetzung aus IP₃-sensitiven Calciumspeichern, vollständig und reversibel blockiert.
4. Exogenes NO inhibierte die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen um etwa zwei Drittel des Kontrollwerts.
5. Die NO-vermittelte Inhibition war durch pharmakologische Blockade der löslichen Guanylatzyklase mit ODQ vollständig aufhebbar, was auf einen komplett durch

cGMP vermittelten Mechanismus in der NO-Inhibition der IP_3 -sensitiven Calciumfreisetzung in kultivierten humanen Colonmuskelzellen hinweist.

6. Die NO-vermittelte Inhibition der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung wurde durch spezifische Inhibition der cGMP-abhängigen Proteinkinase durch KT 5823 und Rp-pCPT-cGMPs um etwa zwei Drittel aufgehoben.
7. Kultivierte humane Colonmuskelzellen exprimieren cGK 1β und das 125 kDa-Protein Ins(1,4,5) P_3 -receptor-associated cGK I substrate (IRAG).

7 Literaturverzeichnis

1. Accili, E.A., McIntosh, C.H. und Buchan, A.M.: The release of somatostatin-14 from human submucosal ganglia in tissue culture. *Can J Physiol Pharmacol* 71 (1993) 619-624.
2. Akbarali, H.I. und Goyal, R.K.: Effect of sodium nitroprusside on Ca²⁺ currents in opossum esophageal circular muscle cells. *Am J Physiol* 266 (1994) G1036-G1042
3. Allescher, H.D., Kurjak, M., Huber, A., Trudrung, P. und Schusdziarra, V.: Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: evidence for a stimulatory effect of NO. *Am.J.Physiol.* 271 (1996) G568-G574
4. Allescher, H.D., Tougas, G., Vergara, P., Lu, S. und Daniel, E.E.: Nitric oxide as a putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the canine pylorus in vivo. *Am.J.Physiol.* 262 (1992) G695-G702
5. Ammendola, A., Geiselhoringer, A., Hofmann, F. und Schlossmann, J.: Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J.Biol.Chem.*2001.Apr.17.
6. Aoki, E., Takeuchi, I.K., Shoji, R. und Semba, R.: Localization of nitric oxide-related substances in the peripheral nervous tissues. *Brain Res.* 620 (1993) 142-145.
7. Baidan, L.V., Fertel, R.H. und Wood, J.D.: Effects of brain-gut related peptides on cAMP levels in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. *Eur.J.Pharmacol.* 225 (1992) 21-27.
8. Baidan, L.V., Zholos, A.V., Shuba, M.F. und Wood, J.D.: Patch-clamp recording in myenteric neurons of guinea pig small intestine. *Am.J.Physiol.* 262 (1992) G1074-G1078
9. Baidan, L.V., Zholos, A.V. und Wood, J.D.: Modulation of calcium currents by G-proteins and adenosine receptors in myenteric neurones cultured from adult guinea-pig small intestine. *Br.J.Pharmacol.* 116 (1995) 1882-1886.
10. Baluk, P., Jessen, K.R., Saffrey, M.J. und Burnstock, G.: The enteric nervous system in tissue culture. II. Ultrastructural studies of cell types and their relationships. *Brain Res.* 262 (1983) 37-47.
11. Bandyopadhyay, A., Chakder, S. und Rattan, S.: Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon-gamma and VIP. *Am.J.Physiol.* 272 (1997) C1790-C1797

12. Bannerman, P.G., Mirsky, R. und Jessen, K.R.: Establishment and properties of separate cultures of enteric neurons and enteric glia. *Brain Res.* 440 (1988) 99-108.
13. Barajas-Lopez, C., Berezin, I., Daniel, E.E. und Huizinga, J.D.: Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of the gastrointestinal tract. *Am.J.Physiol.* 257 (1989) C830-C835
14. Barbier, A.J., Timmermans, J.P., Scheuermann, D.W., Adriaensen, D., Mayer, B. und De Groodt-Lasseel, M.H.A.: Nitric oxide synthase-containing neurons in the pig large intestine: topography, morphology and viscerofugal projections. *Microsc.Res.Tech.* 29 (1994) 72-78.
15. Barnette, M.S., Manning, C.D., Price, W.J. und Barone, F.C.: Initial biochemical and functional characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes in canine colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 264 (1993) 801-812.
16. Bayguinov, O., Hagen, B., Bonev, A.D., Nelson, M.T. und Sanders, K.M.: Intracellular calcium events activated by ATP in murine colonic myocytes. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.*2000.Jul.;279.(1.):C126-35
17. Bayguinov, O., Hagen, B. und Sanders, K.M.: Muscarinic stimulation increases basal Ca(2+) and inhibits spontaneous Ca(2+) transients in murine colonic myocytes. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.*2001.Mar.;280.(3.):C689-700
18. Baynash, A.G., Hosoda, K., Giaid, A., Richardson, J.A., Emoto, N., Hammer, R.E. und Yanagisawa, M.: Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79 (1994) 1277-1285.
19. Beavo, J.A.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75 (1995) 725-748.
20. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. und Freeman, B.A.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 1620-1624.
21. Belai, A., Boulos, P.B., Robson, T. und Burnstock, G.: Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* 40 (1997) 767-774.
22. Berezin, I., Snyder, S.H., Bredt, D.S. und Daniel, E.E.: Ultrastructural localization of nitric oxide synthase in canine small intestine and colon. *Am.J.Physiol.* 266 (1994) C981-C989
23. Berridge, M.J.: Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* 365 (1993) 388-389.
24. Berridge, M.J.: Capacitative calcium entry [see comments]. *Biochem.J.* 312 (1995) 1-11.

25. Berridge, M.J.: Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 766:31-43 (1995).
26. Berridge, M.J., Bootman, M.D. und Lipp, P.: Calcium--a life and death signal [news]. *Nature* 395 (1998) 645-648.
27. Berridge, M.J., Lipp, P. und Bootman, M.D.: Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* 2000.Mar.3.;287.(5458.):1604-5.
28. Bertrand, P.P. und Galligan, J.J.: Signal-transduction pathways causing slow synaptic excitation in guinea pig myenteric AH neurons. *Am.J.Physiol.* 269 (1995) G710-G720
29. Bezprozvanny, I., Watras, J. und Ehrlich, B.E.: Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351 (1991) 751-754.
30. Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F. und Zong, X.: Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358 (1998) 140-144.
31. Biel, M., Zong, X. und Hofmann, F.: Cyclic nucleotide gated channels. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33:231-50. (1999).
32. Bielefeldt, K., Whiteis, C.A., Sharma, R.V., Abboud, F.M. und Conklin, J.L.: Reactive oxygen species and calcium homeostasis in cultured human intestinal smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 272 (1997) G1439-G1450
33. Bornstein, J.C., Furness, J.B., Smith, T.K. und Trussell, D.C.: Synaptic responses evoked by mechanical stimulation of the mucosa in morphologically characterized myenteric neurons of the guinea pig ileum. *J.Neurosci.* 11 (1991) 505
34. Bredt, D.S. und Snyder, S.H.: Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87 (1990) 682-685.
35. Broad, L.M., Braun, F.J., Lievremont, J.P., Bird, G.S., Kurosaki, T. und Putney, J.W.J.: Role of the phospholipase C-inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 2001.May.11.;276.(19.):15945-52.
36. Brookes, S.J.: Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat.Rec.* 262 (2001) 58-70.
37. Broussard, D.L., Bannerman, P.G., Tang, C.M., Hardy, M. und Pleasure, D.: Electrophysiologic and molecular properties of cultured enteric glia. *J.Neurosci.Res.* 34 (1993) 24-31.
38. Buckley, N.J. und Burnstock, G.: Localization of muscarinic receptors on cultured myenteric neurons: a combined autoradiographic and immunocytochemical approach. *J.Neurosci.* 6 (1986) 531-540.

39. Buechler, W.A., Nakane, M. und Murad, F.: Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 174 (1991) 351-357.
40. Burkhardt, M., Glazova, M., Gambaryan, S., Vollkommer, T., Butt, E., Bader, B., Heermeier, K., Lincoln, T.M., Walter, U. und Palmetshofer, A.: KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *J.Biol.Chem.*2000.Oct.27.;275.(43.):33536-41.
41. Burns, A.J., Lomax, A.E., Torihashi, S. und Sanders, K.M.: Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93 (1996) 12008-12013.
42. Cajal, S.R.: Sur les ganglions et les plexus nerveux de l'intestin. *C R Soc Biol Paris* 45 (1893) 217-223.
43. Carvajal, J.A., Germain, A.M., Huidobro-Toro, J.P. und Weiner, C.P.: Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000.Sep.;184.(3.):409-20.
44. Castagliuolo, I., LaMont, J.T. und Letourneau, R.: Neuronal involvement in the intestinal effects of Clostridium difficile toxin A and vibrio cholerae enterotoxin in rat ileum. *Gastroenterology* 107 (1994) 657-665.
45. Chakder, S., Bandyopadhyay, A. und Rattan, S.: Neuronal NOS gene expression in gastrointestinal myenteric neurons and smooth muscle cells. *Am J Physiol* 273 (1997) C1868-C1875
46. Christofi, F.L., Hanani, M., Maudlej, N. und Wood, J.D.: Enteric glial cells are major contributors to formation of cyclic AMP in myenteric plexus cultures from adult guinea-pig small intestine. *Neurosci.Lett.* 159 (1993) 107-110.
47. Christofi, F.L., McDonald, T.J. und Cook, M.A.: Adenosine receptors are coupled negatively to release of tachykinin(s) from enteric nerve endings. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 253 (1990) 290-295.
48. Clapp, L.H. und Gurney, A.M.: Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 418 (1991) 462-470.
49. Clerc, N., Furness, J.B., Bornstein, J.C. und Kunze, W.A.: Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of myenteric neurons of the duodenum in the guinea-pig. *Neuroscience* 82 (1998) 899-914.
50. Cooke, H.J.: Neuroimmune signaling in regulation of intestinal ion transport. *Am J Physiol* 266 (1994) G167-G178
51. Cooke, H.J. und Reddix, R.A.: Neural regulation of intestinal eletrolyte transport. In Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven, New York, 1994, pp.2083-2132.

52. Cooke, H.J. und Wang, Y.Z.: H3 receptors: modulation of histamine-stimulated neural pathways influencing electrogenic ion transport in the guinea pig colon. *J Auton Nerv Syst* 50 (1994) 201-207.
53. Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, M. und Vaughan, D.M.: Structure and function of ryanodine receptors. *Am.J.Physiol.* 266 (1994) C1485-C1504
54. Costa, M., Brookes, S.J., Steele, P.A., Gibbins, I.L., Burcher, E.F. und Kandiah, C.J.: Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea pig ileum. *Neuroscience* 75 (1996) 949-967.
55. Costa, M., Furness, J.B. und Llewellyn-Smith, I.J.: Histochemistry of the Enteric Nervous System. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Second edition, edited by Leonhard R. Johnson. Raven Press, New York. (1987) 1-40.
56. Dawson, V.L. und Dawson, T.M.: Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem.Int.* 29 (1996) 97-110.
57. Distler, M., Biel, M., Flockerzi, V. und Hofmann, F.: Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology* 33 (1994) 1275-1282.
58. Dogiel, A.S.: Über den Bau der Ganglien in den Flechten des Darms und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch.Anat.Physiol.Anat.* (1899) 130-158.
59. Dousa, T.P.: Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int* 55 (1999) 29-62.
60. Dousa, T.P., Chini, E.N. und Beers, K.W.: Adenine nucleotide diphosphates: emerging second messengers acting via intracellular Ca²⁺ release. *Am.J.Physiol.* 271 (1996) C1007-C1024
61. Eaker, E., Sallustio, J., Kohler, J. und Visner, G.: Endothelin-1 expression in myenteric neurons cultured from rat small intestine. *Regul.Pept.* 55 (1995) 167-177.
62. Eaker, E.Y. und Sallustio, J.E.: Myenteric plexus neurons in culture: developmental changes in neurofilament and related proteins. *Dig.Dis.Sci.* 43 (1998) 270-278.
63. Edery, P., Lyonnet, S., Mulligan, L.M., Pelet, A., Dow, E., Abel, L., Holder, S., Nihoul-Fekete, C., Ponder, B.A. und Munnich, A.: Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367 (1994) 378-380.
64. Eliasson, M.J., Blackshaw, S., Schell, M.J. und Snyder, S.H.: Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 3396-3401.

65. Ennes, H.S., McRoberts, J.A., Hyman, P.E. und Snape, W.J.J.: Characterization of colonic circular smooth muscle cells in culture. *Am.J.Physiol.* 263 (1992) G365-G370
66. Epperson, A., Hatton, W.J., Callaghan, B., Doherty, P., Walker, R.L., Sanders, K.M., Ward, S.M. und Horowitz, B.: Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 2000.Aug.;279.(2.):C529-39.
67. Farrugia, G.: Modulation of ionic currents in isolated canine and human jejunal circular smooth muscle cells by fluoxetine. *Gastroenterology* 110 (1996) 1438-1445.
68. Farrugia, G., Holm, A.N., Rich, A., Sarr, M.G., Szurszewski, J.H. und Rae, J.L.: A mechanosensitive calcium channel in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 117 (1999) 900-905.
69. Finn, J.T., Grunwald, M.E. und Yau, K.W.: Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu.Rev.Physiol.* 58:395-426 (1996) .
70. Fiorica-Howells, E., Wade, P.R. und Gershon, M.D.: Serotonin-induced increase in cAMP in ganglia isolated from the myenteric plexus of the guinea pig small intestine: mediation by a novel 5-HT receptor. *Synapse* 13 (1993) 333-349.
71. Flemström, G.: Gastric and duodenal mucosal secretion of bicarbonate. In Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven, New York, 1994, pp.1285-1309.
72. Flynn, E.R., Bradley, K.N., Muir, T.C. und McCarron, J.G.: Functionally-separate intracellular Ca²⁺ stores in smooth muscle. *J Biol Chem* 2001.Jul.26.;. .
73. Franklin, J.L. und Willard, A.L.: Voltage-dependent sodium and calcium currents of rat myenteric neurons in cell culture. *J.Neurophysiol.* 69 (1993) 1264-1275.
74. Furness, J. B. und Costa, L. G. *The enteric nervous system*. 1982. Edinburgh,UK, Churchill Livingstone.
75. Furness, J.B., Li, Z.S., Young, H.M. und Forstermann, U.: Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell Tissue Res.* 277 (1994) 139-149.
76. Gabella, G.: Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* 6 (1981) 425-436.
77. Gafni, J., Munsch, J.A., Lam, T.H., Catlin, M.C., Costa, L.G., Molinski, T.F. und Pessah, I.N.: Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19 (1997) 723-733.

78. Galligan, J.J.: Electrophysiological studies of 5-hydroxytryptamine receptors on enteric neurons. *Behav. Brain Res.* 73 (1996) 199-201.
79. Garthwaite, J.: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14 (1991) 60-67.
80. Geboes, K. und Collins, S.: Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil* 10 (1998) 189-202.
81. Gershon, M.D. und Rothman, T.P.: Enteric glia. *Glia* 4 (1991) 195-204.
82. Ghosh, A. und Greenberg, M.E.: Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268 (1995) 239-247.
83. Glabella, G.: Structures of muscles and nerves of the gastrointestinal tract. In Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, 1987, pp.335-382.
84. Gong, M.C., Iizuka, K., Nixon, G., Browne, J.P., Hall, A., Eccleston, J.F., Sugai, M., Kobayashi, S., Somlyo, A.V. und Somlyo, A.P.: Role of guanine nucleotide-binding proteins--ras-family or trimeric proteins or both--in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 1340-1345.
85. Goyal, R.K. und Hirano, I.: Mechanisms of Disease: The Enteric Nervous System. *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 1106-1115.
86. Grider, J.R.: Somatostatin release from isolated ganglia of the myenteric plexus. *Am. J. Physiol.* 257 (1989) G313-G315
87. Grider, J.R. und Bonilla, O.M.: Differential expression of substance P, somatostatin, and VIP in neurons from cultured myenteric ganglia. *Am. J. Physiol.* 267 (1994) G322-G327
88. Grider, J.R. und Jin, J.G.: Vasoactive intestinal peptide release and L-citrulline production from isolated ganglia of the myenteric plexus: evidence for regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neuroscience* 54 (1993) 521-526.
89. Hanani, M., Baluk, P. und Burnstock, G.: Myenteric neurons express electrophysiological and morphological diversity in tissue culture. *J. Auton. Nerv. Syst.* 5 (1982) 155-164.
90. Hanani, M., Baluk, P. und Burnstock, G.: Myenteric neurons express electrophysiological and morphological diversity in tissue culture. *J Auton Nerv Syst* 5 (1982) 155-164.
91. Hanani, M. und Burnstock, G.: Synaptic activity of myenteric neurons in tissue culture. *J. Auton. Nerv. Syst.* 14 (1985) 49-60.

92. Hanani, M., Francke, M., Hartig, W., Grosche, J., Reichenbach, A. und Pannicke, T.: Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.*2000.Apr.;278.(4.):G644-51.
93. Hanani, M. und Lasser-Ross, N.: Activity-dependent changes in intracellular calcium in myenteric neurons. *Am.J.Physiol.* 273 (1997) G1359-G1363
94. Hebeiss, K. und Kilbinger, H.: Differential effects of nitric oxide donors on basal and electrically evoked release of acetylcholine from guinea-pig myenteric neurones. *Br.J.Pharmacol.* 118 (1996) 2073-2078.
95. Hens, J., Schrod, F., Brehmer, A., Adriaensen, D., Neuhuber, W., Scheuermann, D.W., Schemann, M. und Timmermans, J.P.: Mucosal projections of enteric neurons in the porcine small intestine. *J.Comp.Neurol.*2000.Jun.5.;421.(3.):429.-36.
96. Hens, J., Vanderwinden, J.M., De Laet, M.H., Scheuermann, D.W. und Timmermans, J.P.: Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. *J.Neurochem.*2001.Jan.;76.(2.):464-471.
97. Hirst, G.D.S., Holman, M.E. und Spence, I.: Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J.Physiol.* 236 (1974) 303-326.
98. Hobbs, A.J.: Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends.Pharmacol.Sci.* 18 (1997) 484-491.
99. Hodgkiss, J.P. und Lees, G.M.: Morphological studies of electrophysiologically identified myenteric plexus neurones of the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 8 (1983) 593-608.
100. Hoffman, H.H. und Schnitzlein, N.N.: The number of vagus nerves in man. *Anat.Rec.* 139 (1969) 429-435.
101. Hofmann, F., Ammendola, A. und Schlossmann, J.: Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J.Cell Sci.*2000.May.;113.(Pt.10.):1671-6.
102. Hofmann, F., Biel, M. und Flockerzi, V.: Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 17:399-418. (1994) 399-418.
103. Hopker, V.H., Saffrey, M.J. und Burnstock, G.: Myenteric plexus explants promote neurite elongation and survival of striatal neurons in vitro. *Brain Res.* 648 (1994) 332-336.
104. Hopker, V.H., Saffrey, M.J. und Burnstock, G.: The neuritogenic effect of myenteric plexus on striatal neurones in co-culture involves nitric oxide. *Neuroreport.* 6 (1995) 1153-1156.
105. Hopker, V.H., Saffrey, M.J. und Burnstock, G.: Neurite outgrowth of striatal neurons in vitro: involvement of purines in the growth-promoting effect of myenteric plexus explants. *Int.J.Dev.Neurosci.* 14 (1996) 439-451.

106. Huber, A., Neuhuber, W.L., Klugbauer, N., Ruth, P. und Allescher, H.D.: Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 2000.Feb.25.;275.(8.):5504-11.
107. Huber, A., Saur, D., Kurjak, M., Schusdziarra, V. und Allescher, H.D.: Characterization and splice variants of neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. *Am.J.Physiol.* 275 (1998) G1146-G1156
108. Huber, A., Trudrung, P., Storr, M., Franck, H., Schusdziarra, V., Ruth, P. und Allescher, H.D.: Protein kinase G expression in the small intestine and functional importance for smooth muscle relaxation. *Am.J.Physiol.* 275 (1998) G629-G637
109. Hyman, P.E., Diego, A., Ridout, D., Yuan, Q.X., Ennes, H., Cominelli, F., Snape, W.J.J. und Tomomasa, T.: Effect of cell culture on rabbit colonic smooth muscle bradykinin receptors. *Gastroenterology* 102 (1992) 1597-1604.
110. Ignarro, L.J.: Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels* 28 (1991) 67-73.
111. Ignarro, L.J., Degnan, J.N., Baricos, W.H., Kadowitz, P.J. und Wolin, M.S.: Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* 718 (1982) 49-59.
112. Inoue, R. und Isenberg, G.: Acetylcholine activates nonselective cation channels in guinea pig ileum through a G protein. *Am J Physiol* 258 (1990) C1173-C1178
113. Inoue, R. und Isenberg, G.: Effect of membrane potential on acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum. *J Physiol* 424:57-71. (1990a).
114. Inoue, R. und Isenberg, G.: Intracellular calcium ions modulate acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum. *J Physiol* 424:73-92. (1990b).
115. Jaeger, C.B.: Isolation of enteric ganglia from the myenteric plexus of adult rats. *J.Neural Transplant.Plant.* 5 (1995) 223-232.
116. Jaeger, C.B., Toombs, J.P. und Borgens, R.B.: Grafting in acute spinal cord injury: morphological and immunological aspects of transplanted adult rat enteric ganglia. *Neuroscience* 52 (1993) 333-346.
117. Jaggar, J.H., Porter, V.A., Lederer, W.J. und Nelson, M.T.: Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000.Feb.;278.(2):C235-56.
118. Janssen, L.J., Betti, P.A., Netherton, S.J. und Walters, D.K.: Superficial buffer barrier and preferentially directed release of Ca²⁺ in canine airway smooth muscle. *Am J Physiol* 276 (1999) L744-L753.

119. Jessen, K.R. und Mirsky, R.: Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286 (1980) 736-737.
120. Jessen, K.R. und Mirsky, R.: Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J.Neurosci.* 3 (1983) 2206-2218.
121. Jessen, K.R., Mirsky, R., Dennison, M.E. und Burnstock, G.: GABA may be a neurotransmitter in the vertebrate peripheral nervous system. *Nature* 281 (1979) 71-74.
122. Jessen, K.R., Polak, J.M., Van Noorden, S., Bloom, S.R. und Burnstock, G.: Peptide-containing neurones connect the two ganglionated plexuses of the enteric nervous system. *Nature* 283 (1980) 391-393.
123. Jessen, K.R., Saffrey, M.J., Baluk, P., Buckley, N. und Burnstock, G.: Tissue culture of the enteric nervous system. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl.* 71:173 (1982) 173.
124. Jessen, K.R., Saffrey, M.J., Baluk, P., Hanani, M. und Burnstock, G.: The enteric nervous system in tissue culture. III. Studies on neuronal survival and the retention of biochemical and morphological differentiation. *Brain Res.* 262 (1983b) 49-62.
125. Jessen, K.R., Saffrey, M.J. und Burnstock, G.: The enteric nervous system in tissue culture. I. Cell types and their interactions in explants of the myenteric and submucous plexuses from guinea pig, rabbit and rat. *Brain Res.* 262 (1983a) 17-35.
126. Johnson, R.J., Schemann, M., Santer, R.M. und Cowen, T.: The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J.Anat.* 192 (1998) 479-488.
127. Johnson, S.M., Katayama, Y. und North, R.A.: Slow synaptic potentials in the neurons of the myenteric plexus. *J.Physiol.* 301 (2001) 505-516.
128. Kannan, M.S., Prakash, Y.S., Johnson, D.E. und Sieck, G.C.: Nitric oxide inhibits calcium release from sarcoplasmic reticulum of porcine tracheal smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 272 (1997) L1-L7
129. Karaosmanoglu, T., Aygun, B., Wade, P.R. und Gershon, M.D.: Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons. *Anat.Rec.* 244 (1996) 470-480.
130. Katayama, Y. und North, R.A.: Does Substance P mediate slow synaptic excitation within the myenteric plexus ? *Nature* 274 (2001) 387-388.
131. Kimball, B.C. und Mulholland, M.W.: Neuroligands evoke calcium signaling in cultured myenteric neurons. *Surgery* 118 (1995) 162-169.

132. Kimball, B.C. und Mulholland, M.W.: Enteric glia exhibit P2U receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism. *J.Neurochem.* 66 (1996) 604-612.
133. Kimball, B.C., Yule, D.I. und Mulholland, M.W.: Caffeine- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores in cultured guinea pig myenteric neurons. *Am.J.Physiol.* 270 (1996a) G594-G603
134. Kimball, B.C., Yule, D.I. und Mulholland, M.W.: Extracellular ATP mediates Ca²⁺ signaling in cultured myenteric neurons via a PLC-dependent mechanism. *Am.J.Physiol.* 270 (1996b) G587-G593
135. Koh, S.D. und Sanders, K.M.: Modulation of Ca²⁺ current in canine colonic myocytes by cyclic nucleotide-dependent mechanisms. *Am.J.Physiol.* 271 (1996) C794-C803
136. Komalavilas, P. und Lincoln, T.M.: Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J.Biol.Chem.* 271 (1996) 21933-21938.
137. Kraus-Friedmann, N.: Cyclic nucleotide-gated channels in non-sensory organs. *Cell Calcium* 2000.Mar.;27.(3.):127-38.
138. Kuemmerle, J.F., Murthy, K.S. und Makhlof, G.M.: Agonist-activated, ryanodine-sensitive, IP₃-insensitive Ca²⁺ release channels in longitudinal muscle of intestine. *Am.J.Physiol.* 266 (1994) C1421-C1431
139. Kulkarni-Narla, A. und Brown, D.R.: Opioid, cannabinoid and vanilloid receptor localization on porcine cultured myenteric neurons. *Neurosci.Lett.*2001.Aug.10.;308.(3.):153.-6.
140. Kunze, W.A. und Furness, J.B.: The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu.Rev.Physiol.* 61:117-42 (1999).
141. Kunze, W.A., Furness, J.B., Bertrand, P.P. und Bornstein, J.C.: Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. *J.Physiol.(Lond.)* 506 (1998) 827-842.
142. Kurjak, M., Allescher, H.D., Schusdziarra, V. und Classen, M.: Release of bombesin-like immunoreactivity from synaptosomal membranes isolated from the rat ileum. *Eur.J.Pharmacol.* 257 (1994) 169-179.
143. Kurjak, M., Fritsch, R., Saur, D., Schusdziarra, V. und Allescher, H.D.: Functional coupling between nitric oxide synthesis and VIP release within enteric nerve terminals of the rat: involvement of protein kinase G and phosphodiesterase 5. *J Physiol* 2001.Aug.1.;534.(Pt.3.):827-36.
144. Kurjak, M., Fritsch, R., Saur, D., Schusdziarra, V. und Allescher, H.D.: NO releases bombesin-like immunoreactivity from enteric synaptosomes by cross-activation of protein kinase A. *Am.J.Physiol.* 276 (1999) G1521-G1530

145. Kurjak, M., Koppitz, P., Schusdziarra, V. und Allescher, H.D.: Evidence for a feedback inhibition of NO synthesis in enteric synaptosomes via a nitrosothiol intermediate. *Am.J.Physiol.* 277 (1999) G875-G884
146. Kurjak, M., Sattler, D., Schusdziarra, V. und Allescher, H.D.: Characterization of prejunctional and postjunctional muscarinic receptors of the ascending reflex contraction in rat ileum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 290 (1999) 893-900.
147. Kurjak, M., Schusdziarra, V. und Allescher, H.D.: Release of somatostatin-like immunoreactivity from enriched enteric nerve varicosities of rat ileum. *Eur.J.Pharmacol.* 281 (1995) 295-301.
148. Kurjak, M., Schusdziarra, V. und Allescher, H.D.: Presynaptic modulation by VIP, secretin and isoproterenol of somatostatin release from enriched enteric synaptosomes: role of cAMP. *Eur.J.Pharmacol.* 314 (1996) 165-173.
149. Langley, J.N.: *The Autonomic Nervous System, Part I.* W.Heffer and Sons, Cambridge, England (1921)
150. Lee, H.K., Shuttleworth, C.W. und Sanders, K.M.: Tachykinins activate nonselective cation currents in canine colonic myocytes. *Am J Physiol* 269 (1995) C1394-C1401
151. Li, Z.S. und Furness, J.B.: Immunohistochemical localisation of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 294 (1998) 35-43.
152. Lincoln, T.M. und Cornwell, T.L.: Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 7 (1993) 328-338.
153. Lincoln, T.M., Dey, N. und Sellak, H.: Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl.Physiol* 2001.Sep.;91.(3.):1421-30.
154. Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U. und De Jonge, H.R.: Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends.Biochem.Sci.* 22 (1997) 307-312.
155. Lohn, M., Furstenau, M., Sagach, V., Elger, M., Schulze, W., Luft, F.C., Haller, H. und Gollasch, M.: Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circ.Res* 2000.Nov.24.;87.(11.):1034-9.
156. Lomax, A.E., Bertrand, P.P. und Furness, J.B.: Electrophysiological characteristics distinguish three classes of neuron in submucosal ganglia of the guinea-pig distal colon. *Neuroscience* 2001.;103.(1.):245-55.
157. Lomax, A.E., Bertrand, P.P. und Furness, J.B.: Identification of the populations of enteric neurons that have NK1 tachykinin receptors in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 294 (1998) 27-33.

158. Lomax, A.E. und Furness, J.B.: Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea pig distal colon. *Cell Tissue Res.* 302 (2000) 59-72.
159. Lomax, A.E., Sharkey, K.A., Bertrand, P.P., Low, A.M., Bornstein, J.C. und Furness, J.B.: Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon. *J.Auton.Nerv.Syst.* 76 (1999) 45-61.
160. Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P. und Waldman, S.A.: Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol.Rev.*2000.Sep.;52.(3.):375-414.
161. Ma, H.T., Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K. und Gill, D.L.: Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels [see comments]. *Science* 2000.Mar.3.;287.(5458.):1647-51.
162. Marin, J., Encabo, A., Briones, A., Garcia-Cohen, E.C. und Alonso, M.J.: Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci* 64 (1999) 279-303.
163. Marsden, P.A., Schappert, K.T., Chen, H.S., Flowers, M., Sundell, C.L., Wilcox, J.N., Lamas, S. und Michel, T.: Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 307 (1992) 287-293.
164. Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. und Mikoshiba, K.: 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J.Biochem.(Tokyo.)* 122 (1997) 498-505.
165. Miampamba, M. und Sharkey, K.A.: c-Fos expression in the myenteric plexus, spinal cord and brainstem following injection of formalin in the rat colonic wall. *J Auton Nerv Syst* 77 (1999) 140-151.
166. Miampamba, M. und Sharkey, K.A.: Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 11 (1999) 193-206.
167. Miller, M.J. und Sandoval, M.: Nitric Oxide. III. A molecular prelude to intestinal inflammation. *Am J Physiol* 276 (1999) G795-G799
168. Missiaen, L., Callewaert, G., De Smedt, H. und Parys, J.B.: 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺ pump and the non-specific Ca²⁺ leak from the non-mitochondrial Ca²⁺ stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* 2001.Feb.;29.(2):111-6.

169. Mitchell, R.W., Halayko, A.J., Kahraman, S., Solway, J. und Wylam, M.E.: Selective restoration of calcium coupling to muscarinic M(3) receptors in contractile cultured airway myocytes. *Am.J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol.* 2000.May.;278.(5.):L1091-100.
170. Moncada, S., Higgs, A. und Furchgott, R.: International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol.Rev.* 49 (1997) 137-142.
171. Moncada, S., Palmer, R.M. und Higgs, E.A.: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38 (1989) 1709-1715.
172. Moncada, S., Palmer, R.M. und Higgs, E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43 (1991) 109-142.
173. Moneta, N.A., McDonald, T.J. und Cook, M.A.: Endogenous adenosine inhibits evoked substance P release from perfused networks of myenteric ganglia. *Am.J.Physiol.* 272 (1997) G38-G45
174. Mulholland, M.W., Romanchuk, G., Lally, K. und Simeone, D.M.: Nerve growth factor promotes neurite outgrowth in guinea pig myenteric plexus ganglia. *Am.J.Physiol.* 267 (1994) G716-G722
175. Mulholland, M.W. und Simeone, D.M.: Bombesin-stimulated acetylcholine release from myenteric plexus neurons. *J.Surg.Res.* 54 (1993) 389-392.
176. Murthy, K.S., Jin, J.G. und Makhlof, G.M.: Inhibition of nitric oxide synthase activity in dispersed gastric muscle cells by protein kinase C. *Am J Physiol* 266 (1994) G161-G165
177. Murthy, K.S. und Makhlof, G.M.: Phosphoinositide metabolism in intestinal smooth muscle: preferential production of Ins(1,4,5)P3 in circular muscle cells. *Am.J.Physiol.* 261 (1991) G945-G951
178. Murthy, K.S. und Makhlof, G.M.: Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 268 (1995) C171-C180
179. Murthy, K.S. und Makhlof, G.M.: cGMP-mediated Ca²⁺ release from IP3-insensitive Ca²⁺ stores in smooth muscle [see comments]. *Am.J.Physiol.* 274 (1998) C1199-C1205
180. Murthy, K.S. und Makhlof, G.M.: Differential regulation of phospholipase A2 (PLA2)-dependent Ca²⁺ signaling in smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. Inhibitory phosphorylation of PLA2 by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J.Biol.Chem.* 273 (1998) 34519-34526.

181. Murthy, K.S. und Makhlof, G.M.: Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates cGMP levels in smooth muscle by stimulating phosphodiesterase 5 (PDE 5) and inhibiting soluble guanylate cyclase. *Am.J.Physiol.Abstract* 784 (2000)
182. Murthy, K.S., Severi, C., Grider, J.R. und Makhlof, G.M.: Inhibition of IP3 and IP3-dependent Ca²⁺ mobilization by cyclic nucleotides in isolated gastric muscle cells. *Am.J.Physiol.* 264 (1993) G967-G974
183. Murthy, K.S., Zhang, K.M., Jin, J.G., Grider, J.R. und Makhlof, G.M.: VIP-mediated G protein-coupled Ca²⁺ influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. *Am.J.Physiol.* 265 (1993) G660-G671
184. Nakamura, K., Takahashi, T., Taniuchi, M., Hsu, C.X. und Owyang, C.: Nicotinic receptor mediates nitric oxide synthase expression in the rat gastric myenteric plexus. *J.Clin.Invest.* 101 (1998) 1479-1489.
185. Nathan, C.F. und Hibbs, J.B.J.: Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr.Opin.Immunol.* 3 (1991) 65-70.
186. Neunlist, M., Reiche, D., Michel, K., Pfannkuche, H., Hoppe, S. und Schemann, M.: The enteric nervous system: region and target specific projections and neurochemical codes. *Eur.J.Morphol.* 37 (1999) 233-240.
187. Nishi, R. und North, R.A.: Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *J.Physiol.* 231 (1973) 471-491.
188. Nishi, R. und Willard, A.L.: Neurons dissociated from rat myenteric plexus retain differentiated properties when grown in cell culture. I. Morphological properties and immunocytochemical localization of transmitter candidates. *Neuroscience* 16 (1985) 187-199.
189. Nocerino, A., Iafusco, M. und Guandalini, S.: Cholera toxin-induced small intestinal secretion has a secretory effect on the colon of the rat. *Gastroenterology* 108 (1995) 34-39.
190. Ohta, T., Ito, S. und Nakazato, Y.: All-or-nothing responses to carbachol in single intestinal smooth muscle cells of rat. *Br J Pharmacol* 112 (1994) 972-976.
191. Pabelick, C.M., Sieck, G.C. und Prakash, Y.S.: Invited review: significance of spatial and temporal heterogeneity of calcium transients in smooth muscle. *J Appl.Physiol* 2001.Jul.;91.(1.):488-96.
192. Palmer, R.M., Ferrige, A.G. und Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 (1987) 524-526.
193. Pasricha, P.J., Ravich, W.J., Hendrix, T.R., Sostre, S., Jones, B. und Kalloo, A.N.: Intrasphincteric botulinum toxin for the treatment of achalasia. *N Engl J Med* 332 (1995) 774-778.

194. Perez, G.J., Bonev, A.D., Patlak, J.B. und Nelson, M.T.: Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J Gen Physiol* 113 (1999) 229-238.
195. Pfannkuche, H., Reiche, D., Firzlaff, U., Sann, H. und Schemann, M.: Enkephalin-immunoreactive subpopulations in the myenteric plexus of the guinea-pig fundus project primarily to the muscle and not to the mucosa. *Cell Tissue Res.* 294 (1998) 45-55.
196. Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G.X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K.E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R. und Hofmann, F.: Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 17 (1998) 3045-3051.
197. Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. und Hofmann, F.: Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:105-49. (1999) 105-149.
198. Pfitzer, G.: Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl.Physiol* 2001.Jul.;91.(1.):497-503.
199. Portbury, A.L., Furness, J.B., Young, H.M., Southwell, B.R. und Vigna, S.R.: Localisation of NK1 receptor immunoreactivity to neurons and interstitial cells of the guinea-pig gastrointestinal tract. *J.Comp.Neurol.* 367 (1996) 342-351.
200. Porter, A.J., Wattchow, D.A., Brookes, S.J. und Costa, M.: The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. *Gastroenterology* 113 (1997) 1916-1923.
201. Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., LaMont, J.T., Jaffer, A., O'Keane, J.C., Snider, R.M. und Leeman, S.E.: CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 947-951.
202. Puffenberger, E.G., Hosoda, K., Washington, S.S., Nakao, K., deWit, D., Yanagisawa, M. und Chakravart, A.: A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79 (1994) 1257-1266.
203. Putney, J.W.J. und McKay, R.R.: Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* 21 (1999) 38-46.
204. Qiu, W., Lee, B., Lancaster, M., Xu, W., Leung, S. und Guggino, S.E.: Cyclic nucleotide-gated cation channels mediate sodium and calcium influx in rat colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000.Feb.;278.(2):C336-43.
205. Raeymaekers, L., Eggermont, J.A., Wuytack, F. und Casteels, R.: Effects of cyclic nucleotide dependent protein kinases on the endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump of bovine pulmonary artery. *Cell Calcium* 11 (1990) 261-268.

206. Raeymaekers, L., Hofmann, F. und Casteels, R.: Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J* 252 (1988) 269-273.
207. Roberts, J.D.J., Fineman, J.R., Morin, F.C., Shaul, P.W., Rimar, S., Schreiber, M.D., Polin, R.A., Zwass, M.S., Zayek, M.M., Gross, I., Heymann, M.A. und Zapol, W.M.: Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. The Inhaled Nitric Oxide Study Group. *N Engl J Med* 336 (1997) 605-610.
208. Romeo, G., Ronchetto, P., Luo, Y., Barone, V., Seri, M., Ceccherini, I., Pasini, B., Bocciardi, R., Lerone, M. und Kaariainen, H.: Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367 (1994) 377-378.
209. Ruhl, A., Franzke, S., Collins, S.M. und Stremmel, W.: Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001.Jun.;280.(6.):G1163.-71. 280 G1163-G1171
210. Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. und Hofmann, F.: Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90 (1993) 2623-2627.
211. Saffrey, M.J., Bailey, D.J. und Burnstock, G.: Growth of enteric neurons from isolated myenteric ganglia in dissociated cell culture. *Cell Tissue Res.* 265 (1991) 527-534.
212. Saffrey, M. J. und Burnstock, G. Growth of myenteric plexus explant cultures in a serum-free, hormon supplemented culture medium. 2(6), 591-602. 1984. *Int. J. Devl. Neuroscience.*
213. Saffrey, M.J. und Burnstock, G.: Peptide-containing neurons in explant cultures of guinea-pig myenteric plexus during development in vitro: gross morphology and growth patterns. *Cell Tissue Res.* 254 (1988) 167-176.
214. Saffrey, M.J. und Burnstock, G.: Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system. *J.Auton.Nerv.Syst.* 49 (1994) 183-196.
215. Saffrey, M.J., Hassall, C.J., Allen, T.G. und Burnstock, G.: Ganglia within the gut, heart, urinary bladder, and airways: studies in tissue culture. *Int.Rev.Cytol.* 136:93-144 (1992) 93-144.
216. Saffrey, M.J., Hassall, C.J., Hoyle, C.H., Belai, A., Moss, J., Schmidt, H.H., Forstermann, U., Murad, F. und Burnstock, G.: Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in cultured myenteric neurones. *Neuroreport.* 3 (1992) 333-336.

217. Saffrey, M.J., Wardhaugh, T., Walker, T., Daisley, J. und Silva, A.T.: Trophic actions of neurotrophin-3 on postnatal rat myenteric neurons in vitro. *Neurosci.Lett.*2000.Jan.14.;278.(3.):133-6.
218. Sanders, K.M.: Invited Review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl.Physiol* 2001.Sep.;91.(3.):1438-49.
219. Sanders, K.M.: A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 111 (1996) 492-515.
220. Sanders, K.M. und Ward, S.M.: Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 262 (1992) G379-G392
221. Sandgren, K., Ekblad, E. und Larsson, L.T.: Survival of neurons and interstitial cells of Cajal after autotransplantation of myenteric ganglia from small intestine in the lethal spotted mouse. *Pediatr.Surg.Int.*2000.;16.(4.):272-6.
222. Sarna, S.K., Stoddard, C., Belbeck, L. und McWade, D.: Intrinsic nervous control of migrating myoelectric complexes. *Am.J.Physiol.* 241 (1981) G16-G23
223. Saur, D., Paehge, H., Schusdziarra, V. und Allescher, H.D.: Distinct expression of splice variants of neuronal nitric oxide synthase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2000.May.;118.(5.):849-58.
224. Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. und Loirand, G.: Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2000.Jul.14.;275.(28.):21722-9.
225. Schafer, K.H. und Mestres, P.: Reaggregation of rat dissociated myenteric plexus in extracellular matrix gels. *Dig.Dis.Sci.*2000.Aug.;45.(8.):1631-8.
226. Schafer, K.H. und Mestres, P.: Human newborn and adult myenteric plexus grows in different patterns. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le.-grand.)* 43 (1997) 1171-1180.
227. Schafer, K.H. und Mestres, P.: The GDNF-induced neurite outgrowth and neuronal survival in dissociated myenteric plexus cultures of the rat small intestine decreases postnatally. *Exp.Brain Res.* 125 (1999) 447-452.
228. Schafer, K.H., Mestres, P., Marz, P. und Rose-John, S.: The IL-6/sIL-6R fusion protein hyper-IL-6 promotes neurite outgrowth and neuron survival in cultured enteric neurons. *J.Interferon.Cytokine.Res.* 19 (1999) 527-532.
229. Schafer, K.H., Saffrey, M.J. und Burnstock, G.: Trophic actions of 2-chloroadenosine and bFGF on cultured myenteric neurones. *Neuroreport.* 6 (1995) 937-941.

230. Schafer, K.H., Saffrey, M.J., Burnstock, G. und Mestres-Ventura, P.: A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 1 (1997) 109-113.
231. Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. und Ruth, P.: Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* 2000.Mar.9.;404.(6774.):197-201.
232. Sharkey, K.A. und Kroese, A.B.: Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat. Rec.* 2001.Jan.1.;262.(1.):79-90..
233. Shehnaz, D., Ansari, K.Z. und Ehler, F.J.: Acetylcholine-induced desensitization of the contractile response to histamine in Guinea pig ileum is prevented by either pertussis toxin treatment or by selective inactivation of muscarinic M(3) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001.Jun.;297.(3.):1152-9.
234. Shmigol, A.V., Eisner, D.A. und Wray, S.: Simultaneous measurements of changes in sarcoplasmic reticulum and cytosolic. *J. Physiol.* 2001.Mar.15.;531.(Pt.3.):707-13.
235. Shuttleworth, C.W., Xue, C., Ward, S.M., de Vente, J. und Sanders, K.M.: Immunohistochemical localization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience* 56 (1993) 513-522.
236. Simeone, D.M., Kimball, B.C. und Mulholland, M.W.: Bombesin-mediated calcium fluxes in myenteric plexus neurons. *Peptides* 16 (1995) 1307-1311.
237. Simeone, D.M., Romanchuk, G. und Mulholland, M.W.: Dual pathways regulate neurite outgrowth in enteric ganglia. *Am. J. Physiol.* 267 (1994) G723-G729
238. Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V.: Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.* 2000.Jan.15.;522.Pt.2.:177-85.
239. Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V.: Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372 (1994) 231-236.
240. Song, Z.M., Brookes, S.H. und Costa, M.: All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neurosci. Lett.* 180 (1994) 219-222.
241. Song, Z.M., Brookes, S.H. und Costa, M.: Projections of specific morphological types of neurons within the myenteric plexus of the small intestine of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 285 (1996) 149-156.

242. Song, Z.M., Brookes, S.H., Steele, P.A. und Costa, M.: Projections and Pathways of submucous neurons to the mucosa of guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 269 (1992) 87-98.
243. Song, Z.M., Brookes, S.J., Llewellyn-Smith, I.J. und Costa, M.: Ultrastructural studies of the myenteric plexus and smooth muscle in organotypic cultures of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 280 (1995) 627-637.
244. Stark, M.E. und Szurszewski, J.H.: Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 103 (1992) 1928-1949.
245. Sternini, C., Wong, H.C., Wu, S.V., De Giorgio, R., Yang, M., Reeve, J., Brecha, N.C. und Walsh, J.H.: Somatostatin 2A receptor is expressed by enteric neurons, and by interstitial cells of Cajal and enterochromaffin-like cells of the gastrointestinal tract. *J.Comp.Neurol.* 386 (1997) 396-408.
246. Stone, J.R. und Marletta, M.A.: Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33 (1994) 5636-5640.
247. Storr, M., Geisler, F., Neuhuber, W.L., Schusdziarra, V. und Allescher, H.D.: Endomorphin-1 and -2, endogenous ligands for the mu-opioid receptor, inhibit striated and smooth muscle contraction in the rat oesophagus. *Neurogastroenterol.Motil.* 2000.Oct.;12.(5.):441-8.
248. Stull, J.T., Hsu, L.C., Tansey, M.G. und Kamm, K.E.: Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 265 (1990) 16683-16690.
249. Takahashi, T., Tsunoda, Y., Lu, Y., Wiley, J. und Owyang, C.: Nicotinic receptor-evoked release of acetylcholine and somatostatin in the myenteric plexus is coupled to calcium influx via N-type calcium channels. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 263 (1992) 1-5.
250. Taylor, C.W. und Broad, L.M.: Pharmacological analysis of intracellular Ca²⁺ signalling: problems and pitfalls. *Trends.Pharmacol.Sci.* 19 (1998) 370-375.
251. Teng, B., Murthy, K.S., Kuemmerle, J.F., Grider, J.R., Sase, K., Michel, T. und Makhlof, G.M.: Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 275 (1998) G342-G351
252. Tertyschnikova, S., Yan, X. und Fein, A.: cGMP inhibits IP₃-induced Ca²⁺ release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *J.Physiol.(Lond.)* 512 (1998) 89-96.
253. Tew, E.M., Anderson, P.N., Saffrey, M.J. und Burnstock, G.: Transplantation of the postnatal rat myenteric plexus into the adult rat corpus striatum: an electron microscopic study. *Exp.Neurol.* 129 (1994) 120-129.

254. Tew, E.M., Fearon, A., Anderson, P.N. und Burnstock, G.: Tyrosine hydroxylase-containing fibres extend from the rat corpus striatum into grafts of muscularis externa and myenteric plexus. *Neurosci.Lett.* 194 (1995) 33-36.
255. Tew, E.M., Saffrey, M.J., Anderson, P.N. und Burnstock, G.: Postnatal rat NADPH-diaphorase-containing myenteric neurons extend processes when transplanted into adult rat corpus striatum. *Exp.Neurol.* 124 (1993) 265-273.
256. Tew, E.M., Saffrey, M.J., Anderson, P.N. und Burnstock, G.: NADPH-diaphorase-containing enteric neurones survive for a year in the adult rat striatum. *Neuroreport.* 7 (1996) 958-960.
257. Timmermans, J.P., Hens, J. und Adriaensen, D.: Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat.Rec.*2001.Jan.1.;262.(1.):71-8.
258. Torihashi, S., Ward, S.M. und Sanders, K.M.: Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology* 112 (1997) 144-155.
259. Turner, D.J., Segura, B.J., Cowles, R.A., Zhang, W. und Mulholland, M.W.: Functional overlap of IP(3)- and cADP-ribose-sensitive calcium stores in guinea pig myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001.Jul.;281.(1.):G208-15.
260. Valentine, J.F., Tannahill, C.L., Stevenot, S.A., Sallustio, J.E., Nick, H.S. und Eaker, E.Y.: Colitis and interleukin 1beta up-regulate inducible nitric oxide synthase and superoxide dismutase in rat myenteric neurons. *Gastroenterology* 111 (1996) 56-64.
261. van Breemen, C. und Saida, K.: Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. *Annu Rev Physiol* 51:315-29. (1989).
262. Vanden Berghe, P., Molhoek, S., Missiaen, L., Tack, J. und Janssens, J.: Differential Ca^{2+} signaling characteristics of inhibitory and excitatory myenteric motor neurons in culture. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.*2000.Nov.;279.(5.):G1121-7.
263. Vanden Berghe, P., Tack, J., Andrioli, A., Missiaen, L. und Janssens, J.: Receptor-induced Ca^{2+} signaling in cultured myenteric neurons. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.*2000.Jun.;278.(6.):G905-14.
264. Vanden Berghe, P., Tack, J., Coulie, B., Andrioli, A., Bellon, E. und Janssens, J.: Synaptic transmission induces transient Ca^{2+} concentration changes in cultured myenteric neurones. *Neurogastroenterol.Motil.*2000.Apr.;12.(2.):117-24.
265. Vanner, S.: Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.*2000.Aug.;279.(2.):G380-7.

266. Vanner, S. und Surprenant, A.: Cholinergic and noncholinergic submucosal neurons dilate arterioles in guinea pigs. *Am.J.Physiol.* 261 (1996) G136
267. Vogalis, F., Furness, J.B. und Kunze, W.A.: Afterhyperpolarization current in myenteric neurons of the guinea pig duodenum. *J.Neurophysiol.*2001.May.;85.(5.):1941-51.
268. Vogalis, F., Hillsley, K. und Smith, T.: Recording ionic events from cultured, Dil-labelled myenteric neurons in the guinea-pig proximal colon. *J Neurosci Methods* 2000.Mar.1.;96.(1.):25-34.
269. Vogalis, F., Hillsley, K. und Smith, T.K.: Diverse ionic currents and electrical activity of cultured myenteric neurons from the guinea pig proximal colon. *J Neurophysiol.*2000.Mar.;83.(3.):1253-63.
270. Vogalis, F., Publicover, N.G., Hume, J.R. und Sanders, K.M.: Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. *Am J Physiol* 260 (1991) C1012-C1018
271. Wang, X. und Robinson, P.J.: Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J.Neurochem.* 68 (1997) 443-456.
272. Wang, X.Y., Sanders, K.M. und Ward, S.M.: Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 295 (1999) 247-256.
273. Wang, Y.F., Mao, Y.K., Fox-Threlkeld, J.E., McDonald, T.J. und Daniel, E.E.: Colocalization of inhibitory mediators, NO, VIP and galanin, in canine enteric nerves. *Peptides* 19 (1998) 99-112.
274. Ward, S.M., Burns, A.J., Torihashi, S. und Sanders, K.M.: Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J.Physiol.* 480 (1994) 91-97.
275. Ward, S.M., Morris, G., Reese, L., Wang, X.Y. und Sanders, K.M.: Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* 115 (1998) 314-329.
276. Ward, S.M., Ordog, T., Bayguinov, J.R., Horowitz, B., Epperson, A., Shen, L., Westphal, H. und Sanders, K.M.: Development of interstitial cells of Cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves. *Gastroenterology* 117 (1999) 584-594.
277. Ward, S.M. und Sanders, K.M.: Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat.Rec.*2001.Jan.1.;262.(1.):125-35.
278. Wayman, C.P., Gibson, A. und McFadzean, I.: Depletion of either ryanodine- or IP3-sensitive calcium stores activates capacitative calcium entry in mouse anococcygeus smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 435 (1998) 231-239.

279. Wayman, C.P., McFadzean, I., Gibson, A. und Tucker, J.F.: Two distinct membrane currents activated by cyclopiazonic acid-induced calcium store depletion in single smooth muscle cells of the mouse anococcygeus. *Br J Pharmacol* 117 (1996) 566-572.
280. Wayman, C.P., Wallace, P., Gibson, A. und McFadzean, I.: Correlation between store-operated cation current and capacitative Ca^{2+} influx in smooth muscle cells from mouse anococcygeus. *Eur J Pharmacol* 376 (1999) 325-329.
281. Wiklund, N.P., Iversen, H.H., Leone, A.M., Cellek, S., Brundin, L., Gustafsson, L.E. und Moncada, S.: Visualization of nitric oxide formation in cell cultures and living tissue. *Acta Physiol.Scand.* 167 (1999) 161-166.
282. Willard, A.L. und Nishi, R.: Neurons dissociated from rat myenteric plexus retain differentiated properties when grown in cell culture. II. Electrophysiological properties and responses to neurotransmitter candidates. *Neuroscience* 16 (1985b) 201-211.
283. Willard, A.L. und Nishi, R.: Neurons dissociated from rat myenteric plexus retain differentiated properties when grown in cell culture. III. Synaptic interactions and modulatory effects of neurotransmitter candidates. *Neuroscience* 16 (1985a) 213-221.
284. Wilson, A.J., Furness, J.B. und Costa, M.: The fine structure of the submucous plexus of the guinea-pig ileum. *J.Neurocytol.* 10 (1981) 759-804.
285. Wood, J.D.: Histamine signals in enteric neuroimmune interactions. *Ann N Y Acad Sci* 664:275-83 (1992).
286. Wood, J.D.: Application of classification schemes to the enteric nervous system. *J.Auton.Nerv.Syst.* 48 (1994) 17-29.
287. Wood, J.D.: Physiology of the Enteric Nervous System. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Second edition, edited by Leonhard R.Johnson. Raven Press, New York. (2001) 67-130.
288. Wu, K.D., Lee, W.S., Wey, J., Bungard, D. und Lytton, J.: Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol* 269 (1995) C775-C784
289. Xia, Y., Baidan, L.V., Fertel, R.H. und Wood, J.D.: Determination of levels of cyclic AMP in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. *Eur.J.Pharmacol.* 206 (1991) 231-236.
290. Xia, Y., Fertel, R.H. und Wood, J.D.: Stimulation of formation of cAMP by 5-hydroxytryptamine in myenteric ganglia isolated from guinea pig small intestine. *Life Sci.* 55 (1994) 685-692.
291. Xia, Y., Fertel, R.H. und Wood, J.D.: Suppression of cAMP formation by adenosine in myenteric ganglia from guinea-pig small intestine. *Eur.J.Pharmacol.* 320 (1997) 95-101.

292. Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T. und Nathan, C.: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256 (1992) 225-228.
293. Xiong, Z., Sperelakis, N., Noffsinger, A. und Fenoglio-Preiser, C.: Ca²⁺ currents in human colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 269 (1995) G378-G385.
294. Xu, S.Z. und Beech, D.J.: TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca(2+) channels in native vascular smooth muscle cells. *Circ.Res* 2001.Jan. 88 (1901) 84-87.
295. Yamazawa, T., Iino, M. und Endo, M.: Presence of functionally different compartments of the Ca²⁺ store in single intestinal smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 301 (1992) 181-184.
296. Yau, W.M., Dorsett, J.A. und Parr, E.L.: Characterization of acetylcholine release from enzyme-dissociated myenteric ganglia. *Am.J.Physiol.* 256 (1989) G233-G239.
297. Yau, W.M., Dorsett, J.A. und Yother, M.L.: Bradykinin releases acetylcholine from myenteric plexus by a prostaglandin-mediated mechanism. *Peptides* 7 (1986) 289-292.
298. Yau, W.M., Dorsett, J.A. und Yother, M.L.: Calcium-dependent stimulation of acetylcholine release by substance P and vasoactive intestinal polypeptide. *Eur.J.Pharmacol.* 120 (1986) 241-243.
299. Young, S.H., Ennes, H.S., McRoberts, J.A., Chaban, V.V., Dea, S.K. und Mayer, E.A.: Calcium waves in colonic myocytes produced by mechanical and receptor-mediated stimulation. *Am.J.Physiol.* 276 (1999) G1204-G1212
300. Zhang, W., Sarosi, G.A.J., Barnhart, D.C. und Mulholland, M.W.: Endothelin-stimulated capacitative calcium entry in enteric glial cells: synergistic effects of protein kinase C activity and nitric oxide. *J.Neurochem.* 71 (1998) 205-212.
301. Zholos, A.V., Fenech, C.J., Prestwich, S.A. und Bolton, T.B.: Membrane currents in cultured human intestinal smooth muscle cells. *J.Physiol.*2000.Nov.1.;528.(Pt.3.):521-537.
302. Zhou, X. und Galligan, J.J.: GABA(A) receptors on calbindin-immunoreactive myenteric neurons of guinea pig intestine. *J.Auton.Nerv.Syst.*2000.Jan.14.;78.(2.-3.):122-35.
303. ZhuGe, R., Sims, S.M., Tuft, R.A., Fogarty, K.E. und Walsh, J.V.J.: Ca²⁺ sparks activate K⁺ and Cl⁻ channels, resulting in spontaneous transient currents in guinea-pig tracheal myocytes. *J Physiol* 513 (1998) 711-718.

8 Danksagung

Herzlich danken möchte ich all denen, die mir bei der praktischen Arbeit im Laboralltag, bei der theoretischen Erarbeitung des wissenschaftlichen Gebietes und beim Verfassen der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H.D. Allescher für die stets freundschaftliche und motivierende Unterstützung bei dieser Arbeit, die Geduld und große Hilfsbereitschaft bei der Vermittlung der Grundlagen wissenschaftlicher Tätigkeit und die von Anfang an freundliche Aufnahme in seine wissenschaftliche Arbeitsgruppe.

Danken möchte ich meinen akademischen Lehrern, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. M. Classen und Herrn Prof. Dr. med. V. Schusdziarra, für die Bereitstellung der technischen Einrichtungen und die freundliche Aufnahme in ihrer Klinik.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. M. Kurjak für die Überlassung des Themas und die stets von Freundschaft und Hilfsbereitschaft geprägte Zusammenarbeit in Theorie und Praxis, die die Aufrechterhaltung von Freude und Motivation durch die Höhen und Tiefen wissenschaftlichen Arbeitens hindurch und das bestmögliche Zustandekommen dieser Arbeit erst ermöglichte.

9 Lebenslauf

Persönliches

Name:	Ralph Michael Fritsch
Geburtsdatum:	28.07.1973
Geburtsort:	Aichach
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Emil Fritsch, Bankkaufmann (verst. 1983) Edeltraud Fritsch, Büroangestellte

Schulbildung

1979 – 1983	Grundschule, Schrobenhausen
1983 – 1985	Gymnasium Schrobenhausen
1985 - 1992	Johann-Michael-Sailer-Gymnasium, Dillingen/Do.

Hochschulbildung

1993 – 1995	Medizinische Vorklinik, Universität Regensburg
1995	Ärztliche Vorprüfung
1995 – 2000	Humanmedizin, Klinischer Abschnitt, TU München
1996	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Auszeichnung als Jahrgangsbester)
ab 1997	Experimenteller Teil der vorliegenden Dissertation an der TU München, II. Med. Klinik, Klinikum rechts der Isar, (Doktorvater: Prof. Dr. med. H.D. Allescher)
seit 07/2000	Arzt im Praktikum an der II. Medizinischen Klinik, Klinikum rechts der Isar der TU München