

Aus dem Physiologischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med M. Bleich)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Morphologische und funktionelle Charakterisierung
von differenzierenden enterischen Nervenzellen in Kultur
und in neuro-muskulären Aggregaten**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Schahin Ziaeiian
aus **Göttingen**

Kiel **2017**

1. Berichterstatter: PD Dr. Johann Schmidtmayer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Koch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2018

Zum Druck genehmigt,

Kiel, den 03.07.2018

gezeichnet: Prof. Dr. med. Peer Wulff

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das enterische Nervensystem (ENS)	1
1.1.1 Verschaltungen im ENS	2
1.1.2 Muskel-Reflexe	4
1.2 Morphologische Klassifizierung von enterischen Nervenzellen	4
1.3 GDNF	8
1.4 Pathophysiologie des enterischen Nervensystems	9
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Enterische Nervenzellkulturen	11
2.1.1 Neuromuskuläre Aggregate	12
2.1.2 Immunzytochemie der enterischen Nervenzellkulturen	12
2.1.3 Untersuchung der enterischen Nervenzellkulturen mit dem Rasterelektronenmikroskop	13
2.2 Elektrophysiologische Messung	13
2.2.1 Patch-Clamp-Technik	13
2.2.2 Versuchsaufbau	14
2.2.3 Patchpipetten und Elektroden	15
2.2.4 Lösungen für die Patch-Clamp-Untersuchungen	16
2.2.5 Versuchsdurchführung	17
3. Ergebnisse	19
3.1 Enterische Nervenzellkulturen	19
3.1.1 Morphologie undifferenzierter Zelle	19
3.1.2 Morphologie differenzierender Zellen	21
3.2 Stromprofile der Nervenzellen	22
3.2.1 Messung der Stromprofile	23
3.2.2 Zusammensetzung der Stromprofile aus den einzelnen Komponenten	24
3.2.2.1 Nicht inaktivierender Kaliumstrom	25
3.2.2.2 Natriumstrom + nicht inaktivierender Kaliumstrom	26
3.2.2.3 Natriumstrom + inaktivierender Kaliumstrom + nicht inaktivierender Kaliumstrom	27
3.2.2.4 Multipler Natriumstrom + inaktivierender Kaliumstrom + nicht inaktivierender Kaliumstrom	28
3.2.3 Übersichtsgrafik der Messungen	29
3.2.4 Übersicht über die Entwicklung der Stromprofile	30

3.3 Zuckende Muskelzellen in vitro. Das Zusammenspiel der Initiatoren und der Effektoren der gastrointestinalen Peristaltik	31
3.3.1 Elektrophysiologie der den Muskelzellaggregaten angelagerten Nervenzellen	33
3.3.2 Übersichtsgrafik der Messungen	34
3.3.3 Funktionsprüfung einer Nervenzelle innerhalb eines Zellaggregats	35
3.4 Die Frequenz der spontanen Kontraktionen und die Lage der Kontraktionszentren	36
3.5 Einfluss der Nervenzellen auf die Kontraktionsfrequenz der Muskelzellaggregate	40
4. Diskussion	42
5. Zusammenfassung	46
6. Literaturverzeichnis	48
7. Danksagung	58
8. Lebenslauf	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Darstellung myenterischer Neurone Typ 1-3 (Brehmer et al. 1999)	7
Abbildung 2	Übersichtsaufnahme undifferenzierter Zellen	20
Abbildung 3	Eine undifferenzierte Zelle	20
Abbildung 4	Übersichtsaufnahme differenzierender Zellen	21
Abbildung 5	Zwei differenzierende Zellen	22
Abbildung 6	Ein nicht inaktivierender Kaliumstrom	25
Abbildung 7	Ein Natriumstrom mit einem nicht inaktivierenden Kaliumstrom	26
Abbildung 8	Ein Natriumstrom plus inaktivierendem und nicht inaktivierendem Kaliumstrom	27
Abbildung 9	Multipler Natriumstrom plus inaktivierendem und nicht inaktivierendem Kaliumstrom	28
Abbildung 10	Multipler Natriumstrom plus inaktivierendem und nicht inaktivierendem Kaliumstrom	28
Abbildung 11	Muskelzellaggregate umgeben von Nervenzellen; mit dem Muskelmarker α -SMA bearbeitet)	32
Abbildung 12	Muskelzellaggregate umgeben von Nervenzellen; mit dem pan-neuronalen Marker PGP9.5 präpariert	32
Abbildung 13	Aktionspotenzial einer Nervenzelle am Rande eines Zellaggregats	35
Abbildung 14	Häufigkeit der unterschiedlichen Frequenzen der spontanen Kontraktionen	36
Abbildung 15	Lokalisation der Zuckungen zwischen den Zellaggregaten	38
Abbildung 16	Lokalisation der Zuckungen zentral	39
Abbildung 17	Lokalisation der Zuckungen am Rand	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einige wichtige Eigenschaften der drei Neuron-Typen (Dogiel 1896,1899)	5
Tabelle 2	Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösungen für die Patch-Clamp-Versuche	16
Tabelle 3	Stromprofile der enterischen Nervenzellen während ihres Reifeprozesses	29
Tabelle 4	Stromprofile der den Muskelzellaggregaten angelagerten Nervenzellen	34
Tabelle 5	Zuckungsfrequenz und Kontraktionszentrum der zuckenden Muskelzellen	37
Tabelle 6	Zuckungsfrequenz und Kontraktionszentrum von mit-Lidocain-behandelten-Zellen	41

1. Einleitung

1.1. Das enterische Nervensystem (ENS)

Das enterische Nervensystem ist ein intrinsisches Nervengeflecht in der Darmwand, das aus neuronalen und glialen Elementen besteht. Die enterischen Nervenzellen sind zusammengesetzt aus Soma, Axon und Dendriten und dienen der Erregungsleitung. Die Gliazellen besitzen eine Nähr-, Isolier- und Stützfunktion. Sie sind in Ganglien organisiert und stehen über interganglionäre Nervenfasern in Kontakt. Das daraus resultierende Geflecht wird als Plexus bezeichnet. Im 19. Jahrhundert wurden zwei Nervengeflechte im Gastrointestinaltrakt gefunden: 1857 der Plexus submucosus (Meissner-Plexus), der der Mucosa direkt anliegend ist und 1862 der Plexus myentericus (Auerbach-Plexus), der zwischen den beiden äußeren Muskelschichten nachzuweisen ist.

Der Begriff „enterisches Nervensystem“ wurde im Jahre 1900 von Langley eingeführt. Dieses Nervensystem ist ein eigenständiger Teil des vegetativen Nervensystems und besteht aus ca. 100 Millionen Nervenzellen, deren Funktion es ist, die Motilität, die Sekretion, die lokale Durchblutung (Mikrozirkulation) und die Abwehrmechanismen zu regulieren. 1899 beschrieben Bayliss und Starling, dass der Magen-Darm-Trakt als einziges Organ in der Lage ist, seine Funktionen auch im isolierten Zustand aufrechtzuerhalten. Sie erkannten, dass an einem Darmstück trotz Isolation weiterhin der Inhalt in anale Richtung transportiert wurde. „Law of the intestine“ (Gesetz des Darms) wird dieser Muskelreflex genannt, der eine enorme Bedeutung für die Propulsion des Darminhaltes hat. Das enterische Nervensystem, auch „little brain of the gut“ genannt, ist für die autonome Regulation der Magen-Darm-Funktionen zuständig und wird nur gelegentlich vom Sympathikus und Parasympathikus reguliert, welche eine Überwachungsfunktion haben.

Die anatomische Unterscheidung im ENS zwischen den beiden Plexus spiegelt sich auch in deren Funktionen wieder. Der Plexus myentericus steuert die Aktivität der Muskulatur und der Plexus submucosus die Aktivität der Sekretion und Resorption der Mucosa. Für die Koordination der Abläufe sorgen Verbindungen zwischen den beiden Plexus, die es ermöglichen, dass Sekretion, Durchblutung und Muskelkontraktion während der Propulsion zeitlich aufeinander abgestimmt sind.

Man unterscheidet im ENS verschiedene Zelltypen: die sensorischen Neurone von den Interneuronen und den Motoneuronen, die über verschiedene Reflexschaltkreise miteinander in Verbindung stehen. Diese enterischen Neurone sind in der Lage, über 25 verschiedene Transmittersubstanzen zu synthetisieren, wobei ein Muster anhand der spezifischen Transmitterkombinationen zu erkennen ist. Einer der wichtigsten Übertragungsmechanismen sind schnelle erregende postsynaptische Potenziale (fEPSP), deren bedeutendster Transmitter Acetylcholin ist, das eine Aktivierung des postsynaptischen Neurons über nicotinerge Rezeptoren herbeiführt. Von den fEPSP lassen sich langsame erregende postsynaptische Potenziale (sEPSP) unterscheiden, die jedoch durch muscarinerge Rezeptoren übertragen werden. Die Hemmung im ENS erfolgt entweder durch hemmende postsynaptische Potenziale (sIPSP) oder durch eine präsynaptische Hemmung, in dem die Ausschüttung von Acetylcholin an den Synapsen, die für die fEPSP oder sEPSP zuständig sind, verhindert wird. Der Sympathikus reguliert mithilfe der präsynaptischen Hemmung die Aktivität des Magen-Darm-Trakts herunter. Durch diese weitreichenden und komplexen Vernetzungen ist es dem ENS möglich, auf physiologische und pathophysiologische Veränderungen zu reagieren (M. Schemann 2001)

1.1.1. Verschaltungen im ENS

Sensorische:

Für die sensorische Verschaltung im ENS sind hauptsächlich die intrinsischen primär afferenten Neurone (IPAN) (J.B Furness et al. 1998) zuständig, die die sensorischen Nervenzellen im ENS darstellen. Auf einem Quadratcentimeter Darm sind mehrere hundert IPAN zu finden, die durch ihre spezifischen Eigenschaften gut von den restlichen Nervenzellen innerhalb des ENS abzugrenzen sind. Sie besitzen einige lange Nervenfortsätze und nur wenige Dendriten und werden als Dogiel-Typ-2-Zellen (A.S. Dogiel 1899) bezeichnet. Aufgrund der langanhaltenden Nachhyperpolarisation sind die meisten IPAN AH-Neurone (after hyperpolarisation). Die Aktivierung dieser Zellen erfolgt über sEPSP und die Hemmung über sIPSP. Man vermutet, dass sich die IPAN gegenseitig über sEPSP stimulieren können und sich somit zu

sensorischen Einheiten zusammenfassen. Die IPAN können hauptsächlich chemische und mechanische Reize registrieren wie zum Beispiel Volumenänderungen, intraluminalen Druck, Wandspannung und Scherreize an der Mucosa, wobei es eine entscheidende Rolle spielt, dass nicht die Dehnung selber erkannt wird, sondern die Aktivierung der Muskulatur und somit die Spannung. Außerdem reagieren diese sensiblen Nervenzellen noch auf Osmolarität, Nährstoffe und pH-Änderungen. Mittlerweile ist man aber zu der Annahme gekommen, dass die enterochromaffinen Zellen in der Schleimhaut den eigentlichen Sensor darstellen und auf chemische und mechanische Reize hin Serotonin freisetzen, das dann die IPAN über deren serotonergen Rezeptoren aktiviert.

Interneurone:

Die Grundlage für die Kommunikation innerhalb des ENS bzw. darüber hinaus mit dem Gehirn wird über die Interneurone sichergestellt, die auch dafür verantwortlich sind, ob die verschiedenen Reflexschaltkreise in Gang treten oder ausbleiben.

Motorische:

Es gibt Muskel-, Sekreto- und Vaso-Motoneuronen, wobei die Signale der Interneurone allesamt über EPSP an die Motoneurone weitergeleitet werden. Acetylcholin sorgt hauptsächlich für die Aktivierung der muscarinergen Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen und bewirkt eine Förderung der Motilität. Substanz P ist meist mit Acetylcholin kolokalisiert und wirkt ebenfalls motilitätsstimulierend. Zur Entspannung des Darms führen dagegen die hemmenden Neurotransmitter Stickstoffmonoxid, VIP und ATP. Diese Form der Hemmung wird NANC-Hemmung genannt (nicht adrenerg-nicht cholinerg). Für die Sekretion des Epithels sind Sekreto-Motoneurone zuständig, die durch Acetylcholin und VIP gefördert und durch Somatostatin oder Neuropeptid Y gehemmt wird. Die Mikrozirkulation wird durch Vaso-Motoneurone reguliert, wobei cholinerge und vip-erge Vaso-Motoneurone für eine Erhöhung der Durchblutung im Darm sorgen (M Schemann 2001).

1.1.2. Muskel-Reflexe

Der wichtigste Muskel-Reflex ist der peristaltische Reflex, der für die propulsiven Kontraktionswellen und die regulative Passage des Darminhalts zuständig ist. Durch Reize werden die IPAN angeregt, die für den Start eines Reflexschaltkreises sorgen. Dabei wird die Zirkulärmuskulatur oral des Reizes kontrahiert und anal erschlafft. Es erfolgt die Aktivierung mehrerer Schaltkreise, da die Verschaltungen nur auf einige Millimeter bis wenige Zentimeter wirken.

Unter normalen Bedingungen besteht ein permanent, hemmender Einfluss auf den Darm, der durch die Ausschüttung hemmender Transmitter wie NO zustande kommt. Eine Zunahme der Darmaktivität wird dadurch erreicht, dass diese Hemmung reduziert wird. Die Hyperaktivität dieser hemmenden Neurone kann zu einer Lähmung des Darms führen, wobei es bei der pathologischen Hyperaktivität der erregenden Zellen zum Durchfall kommen kann.

1.2. Morphologische Klassifizierung von enterischen Nervenzellen

Die ersten Unterschiede zwischen enterischen Neuronen werden vom russischen Histologen A.S. Dogiel aufgeführt. Er hat anhand der Form und der Länge der Dendriten drei verschiedene morphologische Typen aufgelistet, wobei sich im Laufe der Zeit nur zwei Typen etabliert haben. Die Typ-1-Zellen haben einen langen und viele kleine Ausläufer und die Typ-2-Zellen haben viele lange Ausläufer. Dogiel versuchte eine Verbindung zwischen Funktion und Struktur der Zellen zu finden. Seine Klassifizierung beruht auf der Unterscheidung zwischen Dendriten (Protoplasmafortsätze) und Axone (Nervenzellfortsätze). Als Charakteristikum für Dendriten nannte er die Verzweigung innerhalb des Ganglions (Dogiel 1895b, 1896, 1899). Neben Form und Länge als Hauptkriterien der Dendriten beachtete er auch noch weitere Merkmale wie die Größe der Nervenzellkörper, ihre Lokalisation innerhalb des Ganglions und die Position des Nukleus.

Typ	Dendriten	Projektion des Axons	Vermutete Funktion
1 4-20 Dendriten 1 Axon	enden und verzweigen sich innerhalb des Ursprungganglions, klein, dick, flach, mit Varikositäten, lamellenförmig	durch die benachbarten Ganglien, mit Nebenästen, vereinzelt zur Muskulatur	motorisch
2 1-16 Dendriten 1 Axon	verlassen das Ursprungganglion, strukturelle Ähnlichkeit zu den Axonen, verzweigen sich zu langen, dünnen gleichmäßigen Ästen, viel länger als Typ-1-Dendriten, manche dendritischen Zweige verlaufen zur Submukosa und Mukosa	zu anderen Ganglien	sensorisch
3 2-10+ Dendriten 1 Axon	enden und verzweigen sich innerhalb des Ursprungganglions, Länger als Typ-1-Zellen, die Enden der Zweige werden dünner und dünner (Verjüngung)	durch andere Ganglien, verfolgbar über eine beträchtliche Entfernung	

Tabelle 1: Einige wichtige Eigenschaften der drei Neuron-Typen (Dogiel 1896,1899)

Dogiel Typ 1:

Es sind multidendritische und uniaxonale Neurone, die viele kleine Ausläufer mit lamellenförmigen Enden haben, was zu den wichtigsten Merkmalen gehört. Sie befinden sich hauptsächlich im Plexus myentericus, und zwar im oralen Teil der Ganglien (Stach 1980). Nervenzellen, die zu diesem Typ gezählt werden, sind Interneurone und inhibitorische und exzitatorische Motoneurone für die zirkuläre und longitudinale Muskulatur (Abbildung 1a) (Brookes und Costa 1990; Pompolo und Furness 1990; Brookes et al. 1991, 1992, 1997; Steele et al. 1991; Costa et al. 1992a; Wattchow et al. 1995; Young und Furness 1995; Young et al. 1995; Portbury et al. 1996; Song et al. 1996; Clerc et al. 1998).

Dogiel Typ 2:

Die größten Fortschritte und die meisten Übereinstimmungen unter den Wissenschaftlern konnten bei diesen Typ-2-Zellen verzeichnet werden. Unterschieden wird zwischen der dendritischen und der adendritischen Form (Stach 1981, 1989; Furness et al. 1988a, 1990; Bornstein et al. 1991). Beim adendritischen Typ zieht ein Axon in die Mukosa während die anderen innerhalb eines zweiten Stranges des Plexus myentericus um die Mukosa herum ziehen (Stach 1981; Furness et al. 1990; Mann et al. 1997; Brehmer et al. 1999). Der dendritische Typ hat lange aborale Projektionen (Brodes et al. 1995). Im Gegensatz zum uniaxonalen Neuron zeigt die Mehrheit der Typ-2-Neurone das Phänomen der Nachhyperpolarisation (after-hyperpolarisation (AH)) (Hirst et al. 1974; Hodgkiss und Lees 1983; Bornstein et al. 1984; Erde et al. 1985; Katayama et al. 1986; Iyer et al. 1988; Tamura 1992, 1997; Clerc et al. 1998), wobei es im Meerschweinchen ausgeprägter ist als im Menschen und im Schwein (Brookes et al. 1987; Cornelissen et al. 1996). Typ-2-Zellen werden als intrinsische, primär afferente Neurone betrachtet (Abbildung 1b)(Kunze et al. 1995; Furness et al. 1998).

Dogiel Typ 3:

Diese multipolaren Neurone besitzen Dendriten, die sich verzweigen und innerhalb des Ursprungsganglions enden, wobei die Dendriten zum Ende hin dünner werden (Tapering) . Stach (1982a) unterschied zwischen Typ 3 und Typ 1 anhand folgender Merkmale: Typ 3 hat längere Dendriten; es erfolgt ein Tapering an den Typ-3-Dendriten und es findet zu 85 % eine aborale Projektion des Axons statt. Die Typ-3-Zellen können als intrinsische oder intestinofugale Interneurone betrachtet werden (Abbildung 1c) (Timmermanns et al. 1992b, 1993). Insgesamt kann man jedoch sagen, dass weder die Submukosa-Zellen noch die myenterischen Zellen zu den Beschreibungen Dogiels passen (Brehmer et al. 1999).

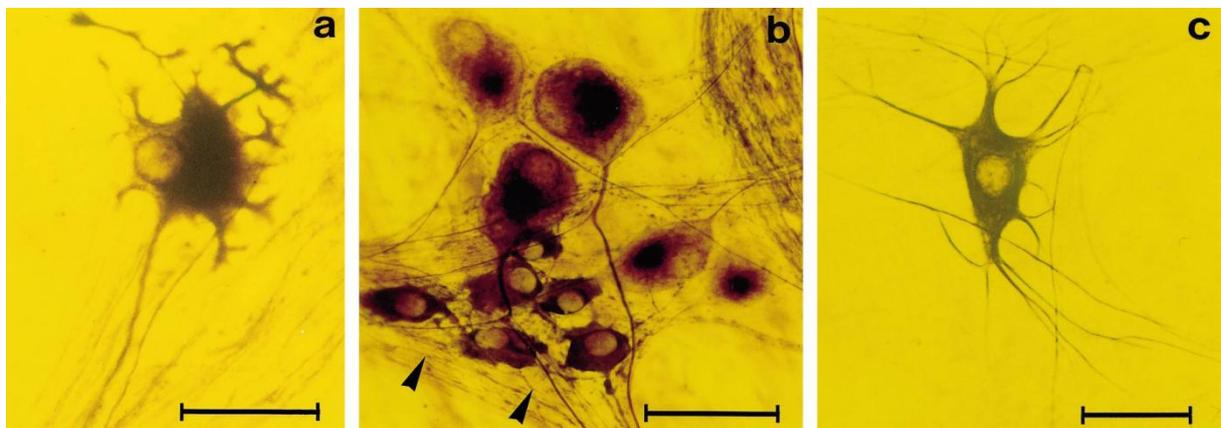


Abbildung 1: Darstellung myenterischer Neurone Typ 1-3 (Brehmer et al. 1999)

Weitere Zelltypen:

- Filamenteuse Neurone: Sie besitzen viele kurze, dünner werdende und sich verzweigende Ausläufer und einen langen Fortsatz (Furness et al. 1988a) und werden zu den absteigenden Interneuronen im Dünndarm gezählt.
- Typ-4-Neurone: Sie haben kurze, kaum verzweigte Dendriten, die asymmetrisch vom Soma ausgehen und treten im Dünndarm des Schweines auf. Der Zellkern ist exzentrisch (Stach 1982b). Sie strahlen vom Plexus myentericus in die Mukosa aus (Brehmer und Stach 1997) und können zu den Sekretomotoneuronen gezählt werden.

- Typ-5-Neurone: Diese befinden sich im unteren Bereich des Dünndarms innerhalb der myenterischen und der externen submukosalen Ganglien (Stach 1985, 1989; Brehmer und Stach 1997, 1998; Brehmer et al. 1998) und sind als Einzelzellen oder als Aggregate vorzufinden.
- Typ-6-Neurone: Kennzeichnend für diese Zellen sind die Dendriten, die am Axonhügel entspringen und sie besitzen die höchste Frequenzzahl im Ileum (Brehmer und Stach 1998). Diese Neurone treten im Schweine-Dünndarm (Stach 1989) auf sitzen sowohl in myenterischen als auch in externen mukosalen Ganglien.
- Kleine Neurone: Andere Namen für diesen Typ sind „kleine Neurone mit einigen Ausläufern“ (Furness et al. 1988a) oder „Minineurone“ (Stach 1989). Sie zählen zu den Motoneuronen der longitudinalen und zirkulären Muskulatur (Clerc et al. 1998).

1.3. GDNF

Das enterische Nervensystem wird stark beeinflusst von neurotrophen Faktoren, wobei der „glial cell line-derived neurotropic factor“ (GDNF) als Schlüssel-Neurotrophin eine besondere Rolle spielt. An der Entwicklung und am Überleben des ENS sind eine Vielzahl von neurotrophen Faktoren beteiligt (Gershon 1997), jedoch kann anhand der GDNF-knockout-Mäuse gezeigt werden, dass die Abwesenheit von GDNF zu einer vollständigen intestinalen Aganglionose führt (Moore et al. 1996; Pichel et al. 1996). Lin et al. konnten 1993 GDNF aus dem Überstand der glialen Zelllinie (B49) isolieren und damit einen positiven Effekt auf das Überleben kultivierter dopaminergischer Neurone bewirken. GDNF gehört zu der TGF- β -Superfamilie, welche einen großen Einfluss auf die Regulation der Differenzierung und Entwicklung des Nervensystems haben (Böttner et al. 2000). Durch die Bindung der GDNF an den GDNF-family Rezeptor $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$) entsteht der GDNF/GFR $\alpha 1$ -Komplex, welcher anschließend mit dem RET-Rezeptor interagiert (Jing et al. 1996).

1.4. Pathophysiologie des enterischen Nervensystems

- **Morbus Hirschsprung:** Eine lokale Aganglionose bzw. eine vollständige Abwesenheit der neuronalen Ganglienzellen kann zu der Krankheit Morbus Hirschsprung führen. Diese Krankheit schlägt sich bereits nach der Geburt nieder und die Inzidenz ist in Mitteleuropa bei etwa 1:5000 Lebendgeburten (Badner et al. 1990; Parisi und Kapur 2000). Aufgrund der fehlenden Ganglienzellen im Bereich der Plexus bilden sich vermehrt Zellen der parasympathischen Nervenfasern, welche ein Zusammenziehen der Ringmuskulatur, vor allem im Segment des Rektums, bewirken. Histopathologisch ist auffällig, dass die enterischen Nervenzellen fehlen und durch verdickte Nervenfasern ersetzt sind (Parisi 1993; Heinzeller und Büsing 2001; Suita et al. 2005; Lüllmann-Rauch 2009). Es kommt zum Darmverschluss und zu einer Obstipation. Der Ausdruck Megakolon lässt sich damit erklären, dass der proximale Darmanteil enorm erweitert ist. Symptome bei den betroffenen Kindern sind die beeinträchtigte Darmmotilität innerhalb der ersten beiden Monate, Bauchschmerzen, Verstopfung, Erbrechen, Blähungen und das Fehlen des ersten Stuhls des Neugeborenen innerhalb der ersten beiden Tage. Die Therapie der Wahl ist die operative Entfernung des betroffenen Darmabschnittes.
- **Die Divertikelkrankheit:** Bei der Divertikulose ist die Kolonwand von multiplen, asymptomatischen Ausstülpungen der Schleimhaut betroffen, die durch präformierte Schwachstellen entstehen, und zwar durch Muskellücken entlang der intramuralen Blutgefäße. Die Krankheit selber entsteht durch eine Entzündung dieser Divertikel (Divertikulitis), die zu Perforationen, Abszessen, Stenosen, Fisteln und Blutungen führen kann. Betroffene Patienten haben eine geringere Dichte an Neuronen in allen enterischen Nervenplexus. Über 44,4 % der Divertikulose-Patienten haben eine erhöhte Anzahl an Gliazellen in den myenterischen Ganglien bei gleichzeitiger oligoneuronaler Hypogangliose, was zu begleitenden Motilitätsstörungen führen kann.

1.5. Fragestellung und Zielsetzung

Die Regulierung der einwandfreien Motilität des Darmes erfordert eine ungestörte Kommunikation zwischen den Iniatoren der Bewegung (enterische Nervenzellen) und den Effektoren (enterische glatte Muskelzellen). Dieses Zusammenspiel wird durch Neurotransmitter ermöglicht und erfordert eine morphologische und physiologische Verknüpfung dieser Komponenten. Zudem sind die enterischen Nervenzellen in verschiedenen Formen und Strukturen vorzufinden und weisen je nach Differenzierung unterschiedliche Kalium- und Natriumströme vor. Daher sollten in dieser Arbeit anhand der in-vitro-Modelle sowohl die Differenzierungen der verschiedenen Nervenzelltypen bezogen auf deren Alter als auch die Interaktion zwischen den Nervenzellen und den Muskelzellen analysiert und bewertet werden

Diese Fragestellungen sollen mit folgenden experimentellen Ansätzen untersucht werden:

- 1.** Analyse der Membranströme durch whole-cell-Ableitungen (patch clamp) von enterischen Nervenzellen aus postnatalen Zellkulturen
- 2.** Charakterisierung der Stromprofile als Kombination verschiedener Ionenströme
- 3.** Statistische Erfassung von Änderungen der Stromprofile während der morphologischen Differenzierung
- 4.** Analyse des Verhaltens spontan aktiver neuromuskulärer Zellaggregate
- 5.** Untersuchung des neuronalen Einflusses auf die Kontraktionsmuster spontan aktiver Zellaggregate durch Blockade mit dem Lokalanästhetikum Lidocain

2. Material und Methoden

2.1. Enterische Nervenzellkulturen

Die myenterischen Ganglienzellen wurden nach einer altbekannten Methode präpariert (Schäfer et al. 1997; 1999). Der Dünndarm der Wistar-Ratte wurde nach zwei bis drei Tagen postnatal entfernt, anschließend wurde die Tunica muscularis von der Mucosa abgezogen und in eine Ca²⁺ und Mg²⁺ freie ausgeglichene Hank-Salzlösung (Hanks' Balanced Salt Solution) gelegt (HBSS, Gibco Life Technologies, Germany), die außerdem mit Antibiotika versehen wurde, welche 1mg/ml Kollagenasen enthalten (SIGMA, Munich, Germany). Nach zwei Stunden Inkubationszeit bei 37° Grad hat man die Bruchstücke des Plexus myentericus mithilfe des Stereomikroskops eingesammelt und durch die 15-minütige Gabe von Trypsin/EDTA (0,125mg/ml Gibco, Life Technologies, Germany) bei 37° Grad voneinander gelöst. Die bei dem Verfahren gewonnenen Zellen wurden bei 900 rpm zentrifugiert.

Die Trypsinierung wird anschließend gestoppt und durch fötales Kälberserum ersetzt (FCS, Gibco, Life Technologies, Germany). Weiterhin wurden die Zellen zerrieben, gezählt und mit einer Dichte von 100000 Zellen/ml auf mit poly-D-Lysin-/ Laminin beschichteten Deckgläsern ausgesät. Das definitive Medium zum Inkubieren der Zellen besteht aus Neurobasal A (Gibco, Life Technologies, Germany) und B27-Ergänzungen (Gibco, Life Technologies, Germany). Der finalen Lösung wurden 50mg/ml GDNF (Peprotech, Hamburg, Germany) hinzugefügt. Die Zellen wurden von zwei Tagen bis sechs Wochen kultiviert, wobei das Medium zweimal die Woche gewechselt wurde.

2.1.1. Neuromuskuläre Aggregate

Die neuromuskulären Aggregate wurden nach dem gleichen Verfahren wie die enterischen Nervenzellen hergestellt mit der Ausnahme, dass zusätzlich zu den Plexus-myentericus-Bruchstücken kleine Muskelaggregate eingesammelt wurden und dass der Schritt der Trituration vor dem Säen ausgelassen wurde.

2.1.2. Immunzytochemie der enterischen Nervenzellkulturen

Die Zellen wurden für 30 min mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert, für 10 min mit Methanol permeabilisiert und 10 min lang mit 3%igem H₂O₂ behandelt. Nachfolgend hat man unspezifische Signale durch normales Ziegen Serum (1:10) für 30 min blockiert.

Anschließend wurden primäre Antikörper in einem Antikörper-Lösungsmittel (Zymed, Invitrogen, CA) verdünnt und für eine Stunde hinzugefügt: PGP 9.5 ist ein PAN-neuronaler Marker, der speziell Nervenzellkörper und Fasern färbt, wodurch eine verlässliche Identifikation der Nervenzellen und eine Bewertung des Nervensystems erlaubt wird. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden sowohl biotinyliertes Ziegen-IgG (1:2000, Jackson Immuno Research, PA) als auch ABC konjugiert mit Meerrettichperoxidase für 30 min hinzugefügt. Als Chromogen wurde DAB (DakoCytomation, Hamburg, Germany) verwendet und die Analysen wurden mit dem Nikon-6000 Mikroskop durchgeführt.

2.1.3. Untersuchung der enterischen Nervenzellkulturen mit dem Rasterelektronenmikroskop

Die Fixierung der enterischen Neurone, die von Tag 2 bis Tag 7 kultiviert wurden, erfolgt mithilfe von Glutaraldehyd in PBS für 30 min, gefolgt von einer Post-Fixierung für 20 min in 2%igem Osmiumoxid und anschließender Dehydrierung. Nachdem ein kritischer Punkt der Trocknung erreicht wurde, wurden die Proben mit Gold aufgesputtert.

Die bearbeiteten kultivierten Zellen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (Phillips XL 20, Phillips) untersucht.

2.2. Elektrophysiologische Messung

2.2.1. Patch-Clamp-Technik

In den 70er Jahren wurde von den beiden deutschen Wissenschaftlern Erwin Neher und Bert Sakmann am Max-Planck-Institut in München die Patch-Clamp-Technik entwickelt (Hamill et al. 1981). Für die Erkenntnis, wie man die Aktivität einzelner, membranständiger Ionenkanäle messen kann, bekamen sie 1981 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Diese Patch-Clamp-Technik ermöglicht die Untersuchung von Membranströmen mit hoher Amplituden- und Zeitauflösung und somit von Kinetik und Leitfähigkeit der spannungs- und ligandengesteuerten Ionenkanäle. Ein wichtiges Kriterium für das Funktionieren dieser Technik ist die feste Verbindung zwischen Glaspipette und Membran, die einen hohen elektrischen Widerstand zwischen der Extrazellulärlösung und der Innenseite der Pipette erst ermöglicht (Gigaseal). Es kommt zu einem geringen elektrischen Rauschen, wodurch die Strombilder der einzelnen Ionenkanäle dargestellt werden können (Bräu, M.E et al. 1996). Eine Spannungsklemme (voltage-clamp) ermöglicht es, dass das Membranpotenzial eines bestimmten Membranstücks (Patch) auf einem bestimmten Wert gehalten und somit der Kompensationsstrom gemessen werden kann. Dieser steht entweder für das Öffnen eines Kanals (single-channel) oder aller Kanäle (whole-cell) einer Zelle.

2.2.2. Versuchsaufbau

Es wird ein Messplatz benötigt, der vor elektrischen und mechanischen Störungen aus der Umgebung geschützt ist, da die Patch-Clamp-Technik eine sehr empfindliche Messmethode darstellt. Daher finden die Untersuchungen in einem erschütterungsfreien Labor statt, in dem darüber hinaus ein massiver Granitblock die Arbeitsfläche vor mechanischen Beeinträchtigungen schützt. Es wird ein Invers-Mikroskop (Zeiss, Axiovert S100) inklusive eines Phasenkontrastkondensators verwendet, wobei die Petrischale mit den Zellen in den Kreuztisch eingelegt wird. Die Patchpipetten werden mittels eines Mikromanipulators (World Precision Instruments, ITEM No. 1XM3301L) präzise und behutsam an die zu untersuchende Zelle geführt. Mithilfe eines Joysticks, der sich außerhalb des Faraday-Käfigs befindet, wird der Mikromanipulator samt seiner drei Schrittmotoren bedient. Das Mikroskop und der Mikromanipulator stehen auf dem stabilen Granitblock, wobei der Vorverstärker (AXON Instruments) und der Pipettenhalter (World Precision Instruments, ITEM No. MEH1SF10) wiederum am Mikromanipulator befestigt sind. Der Pipettenhalter spielt eine sehr wichtige Rolle, da er zum einen die elektrische Verbindung der Pipette zum Verstärker (EPC-7) ermöglicht und zum anderen das Erzeugen eines Über- bzw. Unterdrucks in der Pipette über einen seitlich angelegten Luftschlauch zulässt. Eine 20ml-Spritze ist über einen Dreivegehahn mit dem Luftschlauch verbunden, wodurch der Druck bzw. der Sog erzeugt werden kann. Einmal die Woche erfolgt die Reinigung des Pipettenhalters mit destilliertem Wasser und die Chloridierung des Silberdrahts.

Durch den Vorverstärker werden Stromänderungen über der Membran bei festgelegter Spannung gemessen, wobei die Ergebnisse mithilfe des Programms Signal 2.05 auf dem Computerbildschirm dargestellt und analysiert werden. Die eigentliche Steuereinheit ist jedoch der EPC-7-Verstärker, der das ankommende Signal zusätzlich filtert, wodurch man die Kompensation der Kapazität und des Serienwiderstandes einstellen kann. Die Bandbreite der Daten wird über einen zusätzlichen Tiefpass-Filter auf 3kHz begrenzt. Ein wichtiges Hilfsmittel, das die Annäherung der Pipette an die Zelle ermöglicht, ist eine Videokamera, die am Fotofokus des Mikroskops befestigt und mit einem außerhalb des Faraday-Käfigs gelegenen Bildschirm verbunden ist.

2.2.3. Patchpipetten und Elektroden

Das Ziel ist es, eine hochohmige Verbindung zwischen Zelle und Glaspipette zu erhalten, wofür das Material und die Geometrie der Patch-Pipette eine tragende Rolle spielen. Die Registrierung der transmembranen Ionenströme wird umso rauschärmer, je besser diese Verbindung ist. Die Pipetten wurden aus feinen Borosilikatglas-Röhrchen (Vitrex GB150T- 8P, Science Products GMBH) mithilfe eines Pipetten-Ziehgerätes (sog. Puller: LIST-MEDICAL-ELECTRONIC, L7M-3P-A, S7N 7909050) hergestellt. Der staub- und fettfreie Glasrohling wird vertikal in das Pipetten-Ziehgerät eingespannt und in zwei Heizschritten verarbeitet. Die Heizspirale sorgt zunächst dafür, dass die Kapillare in die Länge gezogen wird und sich das Glas dabei auf einen Durchmesser von 300µm verjüngt. Anschließend wird das Glas im zweiten Heizschritt nach Rezentrierung an der verjüngten Stelle durchtrennt. Zwei Sollwertpotentiometer ermöglichen die Regulierung der Temperatur der Heizspirale, wodurch unterschiedliche Durchmesser und Spitzenlängen erzeugt werden können. Der Spitzendurchmesser, den die hier verwendeten Glaspipetten besitzen, liegt bei 1µm und der Widerstand der Patch-Pipetten bei der Ganzzelleableitung ist zwischen 2 und 5MΩ. Der Widerstand zwischen Zellsoma und Silberchloriddraht, dem sogenannten Serienwiderstand (R_s), der im besten Falle dem Pipettenwiderstand entspricht, ist aufgrund der Membranbestandteile, die sich im Mündungsbereich der Pipette befinden, deutlich erhöht (Numberger und Draguhu, 1996). Um den Serienwiderstand zu verringern, müsste man niederohmige Pipetten verwenden, die aber wiederum eine Sealbildung deutlich erschweren, weswegen man Kompromisse eingehen muss. Die Elektroden bestehen aus einem Silberdraht, welche durch Chloridieren mit einer Chloridschicht bezogen werden. Sie sind metallische Leiter, die für eine Verbindung zwischen Vorverstärker mit Pipettenlösung und Erdleiter in der Badlösung sorgen. Die Chloridschicht auf dem Silberdraht muss regelmäßig erneuert werden. Hierzu wird der Silberdraht mit Sandpapier abgeschliffen und mit 80%-igem Ethanol ab gespült. Anschließend wird er über eine Anode einer Spannungsquelle für ca. 15 Minuten in eine Chloridlösung (0,1N HCL) getaucht.

Ein weiterer mit der Kathode verbundener Draht in der Lösung sorgt nach Anlegen einer Spannung von ca. 1 Volt und einem Strom von 1 mA für das Abziehen der Elektronen an der Elektrode, wodurch Silberchlorid entsteht, erkennbar an der matten, dunkelgrauen Färbung. Der chlorierte Silberdraht hat die Funktion, Offset-

Potentiale konstant zu halten, die an Übergängen innerhalb der Messkette entstehen können wie z.B. Silberdraht und Pipettenlösung oder Badlösung und Erdung. Diese Potentialdifferenzen sollten trotzdem zusätzlich durch den Verstärker korrigiert werden.

2.2.4. Lösungen für die Patch-Clamp-Untersuchungen

In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösungen aufgelistet, die für die Patch-Clamp-Messungen verwendet wurden.

	Externe Lösung (mM)	Interne Lösung (mM)
NaCl	160,0	----
KCL	4,5	140,0
CaCl ₂	2,0	----
MgCl ₂	1,0	----
Glucose	----	----
HEPES	5,0	10,0
EGTA	----	10,0

Tabelle 2: Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösungen für die Patch-Clamp-Versuche

Für die Herstellung der Lösungen muss penibel darauf geachtet werden, dass keine Verunreinigungen mit unerwünschten Ionen stattfinden. Aus diesem Grund werden nur Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades verwendet. Mit Aqua bidest. werden alle Lösungen zubereitet und mit handelsüblichen Filtern werden die Lösungen vor Gebrauch steril filtriert. Die Osmolalität beider Lösungen wird auf 285mosmol eingestellt und der pH-Wert beträgt 7,4.

1000ml der internen und der externen Lösung wurden jeweils hergestellt, welche für bis zu 4 Wochen bei einer Temperatur von 2°C bis 8°C im Kühlschrank gelagert werden konnten. Während die interne Lösung mithilfe eines dünn ausgezogenen Polyethylen-Filaments in die Pipette gefüllt wird, dient die externe Lösung als Messlösung für die mit Zellen gefüllte Petrischale, welche vor Versuchsdurchführung zweimal mit externer Lösung ausgewaschen und anschließend mit 2 ml selbiger Lösung gefüllt wird.

2.2.5. Versuchsdurchführung

Die Patchpipette, die als Messelektrode dient, wird mit einer isotonen internen Lösung gefüllt, welche eine dem Zellinnern vergleichbare Ionenkonzentration besitzt. Diese Lösung innerhalb der Pipette ist entscheidend, da nach dem Durchbrechen der Zellmembran ein Flüssigkeitsaustausch zwischen Pipettenlösung und Zytoplasma stattfindet und somit die physiologischen Bedingungen beibehalten werden. Die Pipette wird an den Vorverstärker der Messeinrichtung befestigt und die Herstellung eines Überdrucks verhindert Verunreinigungen der Pipettenspitze. Auf dem Mikroskopisch befindet sich die Petrischale samt Zellen und Messlösung. Die Pipette wird mithilfe des Joysticks in die Messlösung eingetaucht, wodurch sich der Stromkreis schließt. Der folgende Schritt ist der schwierigste und wichtigste: Per Joysticks wird die Pipette an die ausgewählte Zelle herangeführt; sehr vorsichtig wird an die Oberfläche der Zellmembran angedockt und anschließend wird der Überdruck gelöst und durch leichtes Ansaugen mithilfe der am Luftschlauch befestigten 20ml-

Luftspritze eine mechanische Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran hergestellt, die einen sehr hohen elektrischen Widerstand besitzt (mind. $1\text{ G}\Omega$). Dieser Zustand wird als Cell-attached-Konfiguration bezeichnet. Die Versuche in dieser Arbeit wurden in der whole-cell-Konfiguration durchgeführt, die als nächsten Schritt die Durchdringung der Zellmembran und die Herstellung der Verbindung zum Zytoplasma erfordert. Dies geschieht, indem man immer wieder vorsichtig an der Luftspritze zieht bis der Unterdruck stark genug ist, um das unter der Pipette liegende Membranstück zu zerreißen. Nun kommt es zum oben schon beschriebenen Austausch zwischen Pipettenflüssigkeit und Zytoplasma. Die elektrischen Ereignisse werden nun über die gesamte übrige Membranfläche dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Enterische Nervenzellkulturen

Die enterischen Nervenzellen wurden im anatomischen Institut postnatal aus dem Darm von Ratten kultiviert und täglich dort abgeholt, um sie im physiologischen Institut zu untersuchen. Als erstes wurde immer ein Lösungswechsel vorgenommen, um die Zellen aus ihrem Nährmedium in eine für die Patch-Clamp-Technik geeignete Messlösung zu transferieren. Die Petrischale wurde mit der externen Lösung zweimal ausgewaschen und anschließend mit einer Menge von 2ml derselben Lösung befüllt. Nun wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop begutachtet. Je nach Alter der Zellkultur konnten verschiedene Entwicklungsstadien gefunden werden. Die Zellkulturen wurden über einen Zeitraum von sechs Tagen untersucht, und zwar vom 3. bis zum 9. Zellkulturtag. Das Ziel dieser Untersuchungen war es, die enterischen Nervenzellen in einem sehr frühen und unreifen Stadium zu charakterisieren, die Entwicklung der elektrophysiologischen Membraneigenschaften der Nervenzellen festzustellen und die Ionenströme zu analysieren.

3.1.1. Morphologie undifferenzierter Zellen

Charakteristisch für die undifferenzierten Zellen ist die einfache, runde Gestalt. Es sind noch keine Axone und keine Dendriten vorhanden und die Zellen haben keinerlei physikalischen Kontakt zueinander. Sie unterscheiden sich weder morphologisch noch ultrastrukturell voneinander und werden vom dritten bis zum neunten Kulturtag in abnehmender Häufigkeit gesichtet. Aufgrund des kleinen Durchmessers der Zellen von etwa 5-15 μm war es sehr schwierig Ganzzelleableitungen durchzuführen, weswegen die Erfolgsrate verhältnismäßig gering war. In nur etwa 10% der Versuche war die Membran der getesteten Zelle für einen hohen elektrischen Widerstand von mehreren Gigaohm geeignet („Gigaseal“ ($> 10\text{M}\Omega$)), welcher auch noch viele Sekunden andauern musste. Für eine Untersuchung der Strom-Spannung-Beziehung in größerem Maße waren die Aufnahmebedingungen nicht stabil genug.

Insgesamt wurden 13 Ganzzellableitungen mit befriedigender Qualität von undifferenzierten Zellen durchgeführt.

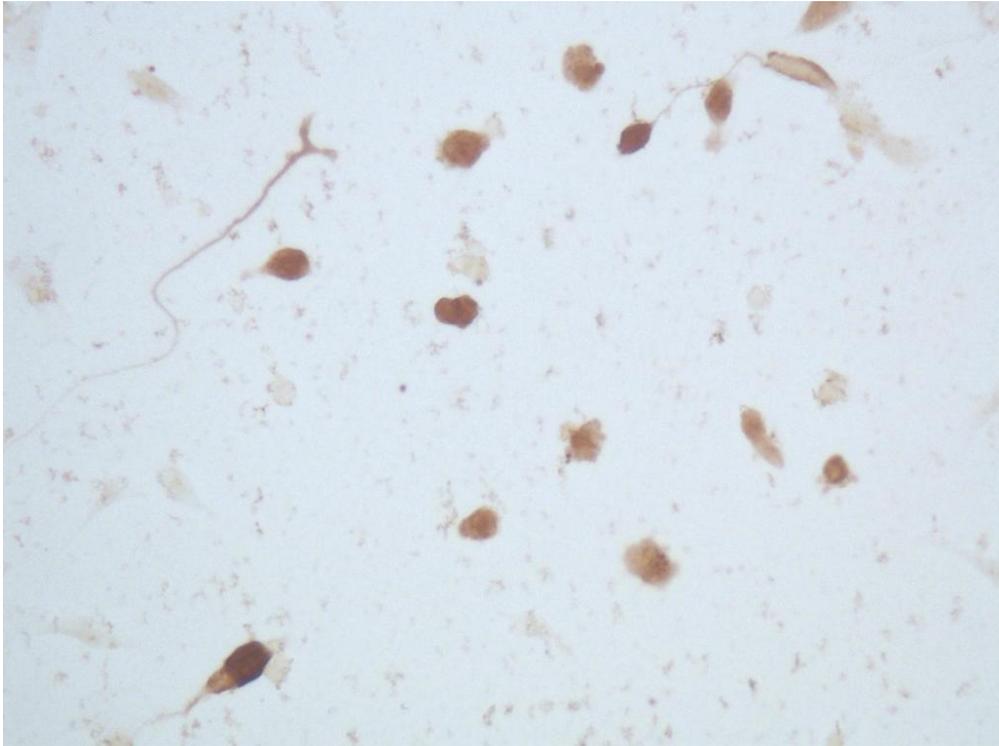


Abbildung 2: Übersichtsaufnahme undifferenzierter Zellen

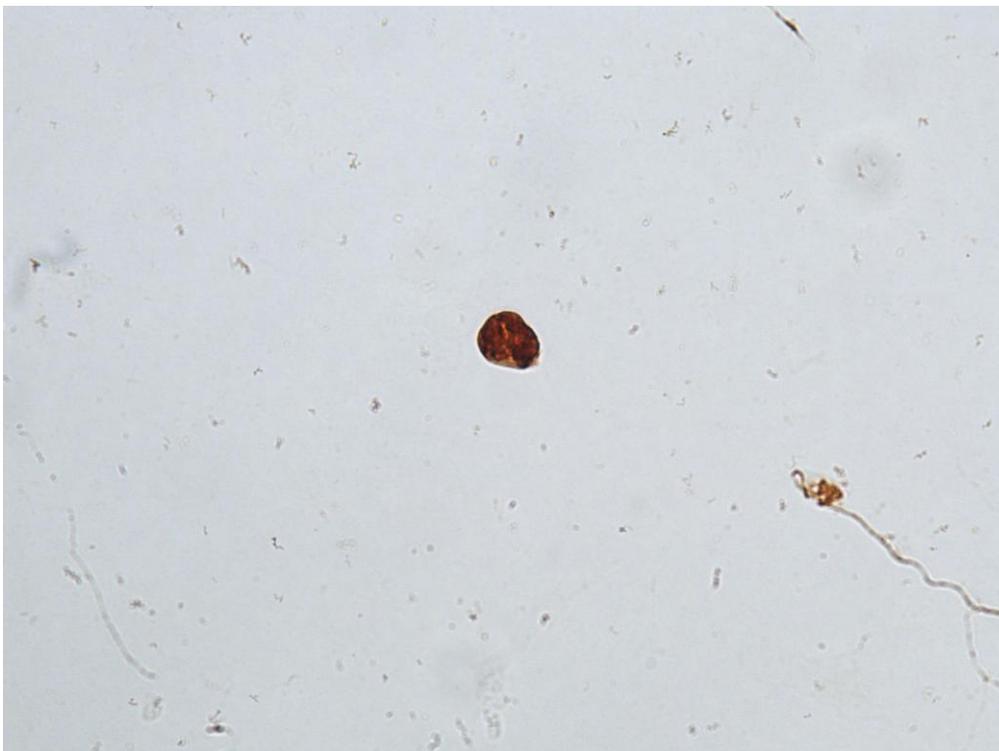


Abbildung 3: Eine undifferenzierte Zelle

3.1.2. Morphologie differenzierender Zellen

Differenzierende Zellen sind gekennzeichnet durch dendriten- und neuritenähnliche Fortsätze. Sie wurden vom dritten bis zum neunten Zellkulturtag in ansteigender Häufigkeit gesichtet. Je älter die Zellkultur, desto verzweigter und komplexer sind die Zellnetzwerke. Bei den differenzierenden Neuronen kann zwischen unipolaren und multipolaren Zellen unterschieden werden. Wie die undifferenzierten Zellen haben auch die differenzierenden Zellen einen sehr kleinen Durchmesser, weshalb die Patch-Clamp-Ableitung erheblich erschwert wurde. Eine weitere Erschwerung der Messung ergibt sich aus der Tatsache, dass die Ionenkanäle bei den differenzierenden Zellen in die Axone wandern, die Kanaldichte im Zellkörper hingegen abnimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 12 zufriedenstellende Ganzzelleableitungen von differenzierenden Zellen hergestellt, wobei vier verschiedene Stromprofile diagnostiziert werden konnten.

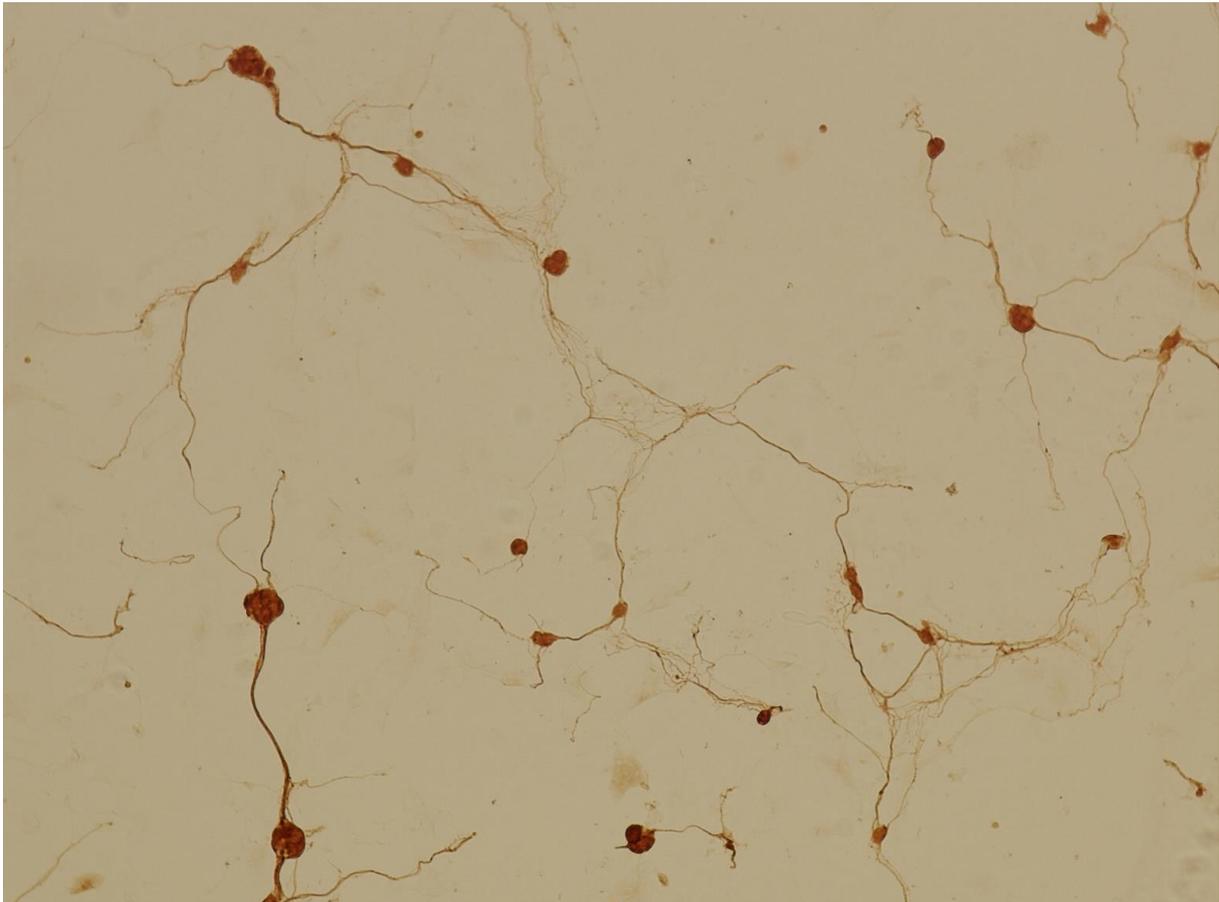


Abbildung 4:Übersichtsaufnahme differenzierender Zellen

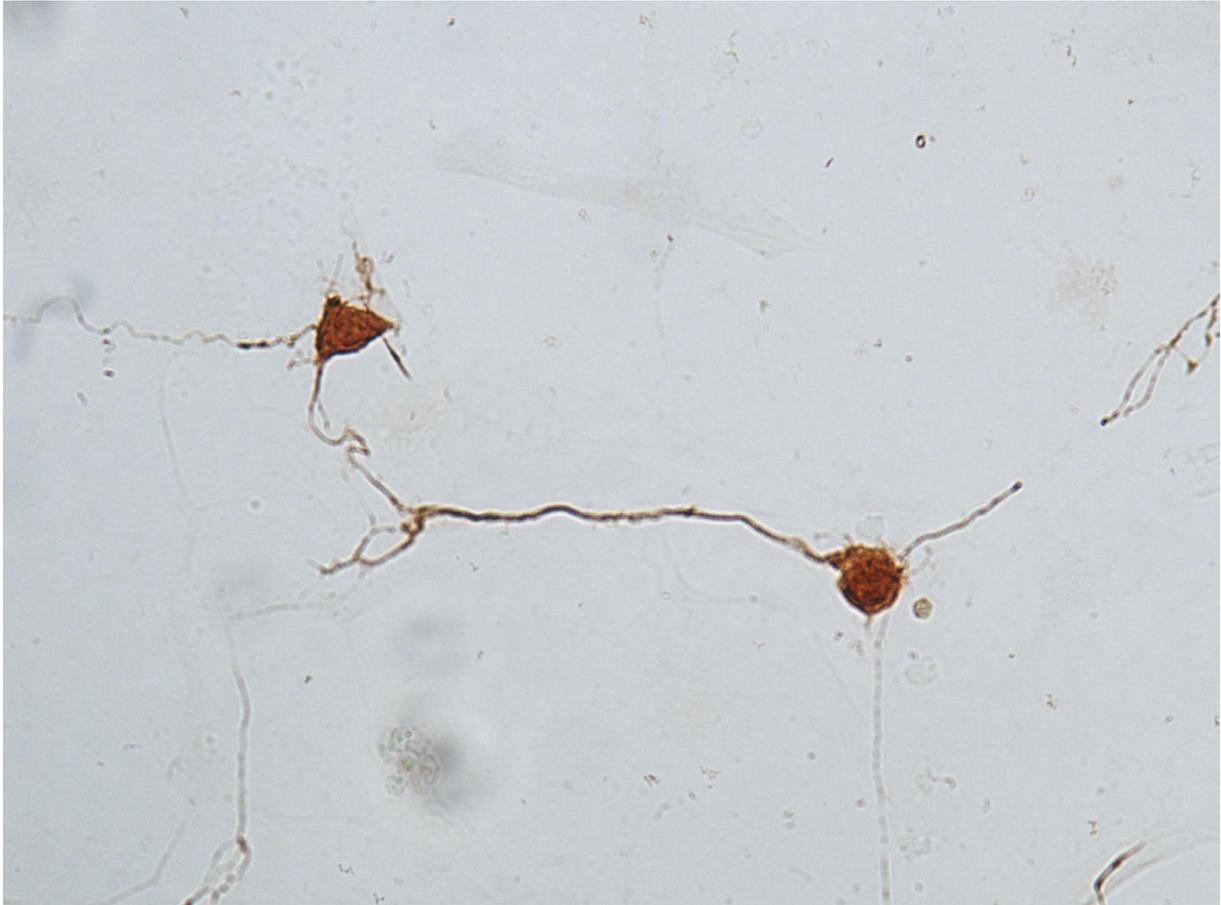


Abbildung 5: Zwei differenzierende Zellen

3.2. Stromprofile der Nervenzellen

Ein Stromprofil beschreibt die Gesamtleitfähigkeit einer Zelle, die sich aus den Leitfähigkeitswerten der verschiedenen Einzelkanäle innerhalb der Zellmembran zusammensetzt. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede der Ionenkanäle innerhalb der verschiedenen Zellen sind dafür verantwortlich, dass jeder Zelltyp ein charakteristisches Stromprofil aufweist. Die Dichte bzw. die Anzahl der Ionenkanäle ist entscheidend für die Amplituden im Stromprofil, die Art und die spezifische Funktion der Ionenkanäle sind maßgeblich für den zeitlichen Verlauf .

Bisher ist nur wenig bekannt über das Auftreten der Ionenströme während der Entwicklung der unreifen enterischen Nervenzelle bis zum differenzierten Stadium. Das Besondere der Nervenzellen ist das Zusammenspiel der Natriumströme mit den verschiedenen Kaliumströmen, wobei die Natriumleitfähigkeit essenziell ist für das Entstehen eines Aktionspotentials. Außerdem ist bekannt, dass das Expressieren der

verschiedenen Ionenkanäle während der Entwicklung nicht gleichzeitig stattfindet. Es wird viel mehr eine aufeinanderfolgende Entstehung der Ionenkanäle beschrieben.

Natriumkanäle gibt es in über neun verschiedenen Isoformen, wobei in diesem Fall nur die schnell inaktivierenden Natriumkanäle relevant sind. Sobald das Ruhepotenzial in Richtung weniger negativer Werte depolarisiert wird und dabei das Schwellenpotenzial überschritten wird, öffnen sich schnelle spannungsabhängige Natriumkanäle, die dafür sorgen, dass ein Natriumeinstrom die Zelle schnell und verstärkt depolarisiert. Bei anhaltender Depolarisation sorgt ein Inaktivierungsmechanismus dafür, dass die Natriumkanäle sich schließen und solange nicht mehr aktivierbar sind, bis die Kaliumkanäle für eine Repolarisation gesorgt haben. Dieses Strombild des einwärtsfließenden Natriumstroms ist in der Abbildung 13 zu sehen. Die Familie der Kaliumkanäle ist wesentlich komplexer. Sie sorgen u.a. für die Kontrolle des Ruhemembranpotenzials und für die Regulation der elektrischen Erregbarkeit der Neuronen, in dem sie die Dauer der Aktionspotenziale limitieren und somit ihre Frequenz regulieren. Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) sind dafür verantwortlich, dass mithilfe der Auswärtsströme die Repolarisation eingeleitet wird. Es gibt zwei Unterformen dieser auswärtsgerichteten Kaliumkanäle: a) den schnell aktivierende und schnell inaktivierende A-Typ, welcher in den Abbildungen 8, 9 und 10 zusehen ist und b) die langsam aktivierenden und nicht inaktivierenden Kaliumkanäle (delayed rectifier), welche in den Abbildungen 6 und 7 zu sehen sind.

3.2.1. Messung der Stromprofile

Die Whole-Cell-Konfiguration ermöglicht es, über die gesamte Zellmembran Ionenströme zu messen, in dem man die Membran, die die Barriere zwischen Pipetteninhalt und Zellinnerem darstellt, durch kurzes Ansaugen durchbricht. Bei dieser Patch-Clamp-Methode sorgt die Spannungsklemme dafür, dass das Membranpotenzial der untersuchten Zelle konstant gehalten (geklemmt) wird, und zwar mithilfe eines Kompensationsstroms, der die gleiche Größe hat wie der Strom, der innerhalb der Membran entsteht, diesem jedoch entgegengerichtet ist. Ein Regler

ist dafür verantwortlich, dass der Unterschied zwischen dem gemessenen Membranpotenzial und dem gewünschten Wert, der sogenannten Sollspannung, erkannt wird und anschließend ein entgegengesetzter Strom der Zelle zugeführt wird, welcher dann als Kompensationsstrom bei Voltage-Clamp-Versuchen gemessen wird.

Die geringe Größe der untersuchten Nervenzellen erschwerte die Versuche erheblich und ermöglichte nur eine sehr kurze Messdauer. Eine ausführliche Untersuchung der Ionenströme über einen größeren Potentialbereich war daher nicht möglich. Um die Stromprofile der Zellen zu charakterisieren, wurde ein konstantes Reizprogramm verwendet. Das Haltepotenzial wurde auf -80 mV eingestellt, was dem natürlichen Ruhemembranpotenzial einer Nervenzelle entspricht. Somit wurde gewährleistet, dass alle Natriumkanäle aktivierbar waren. Nun wurde der Zelle ein Reizpotenzial von 100mV zugefügt, wodurch die Zelle ein Potenzial von +20 mV erreichte. Aufgrund der hohen Öffnungswahrscheinlichkeit aller Ionenkanäle konnten bei diesem Potential optimale Amplituden zur Darstellung der jeweiligen Stromprofile ausgelöst werden.

3.2.2. Zusammensetzung der Stromprofile aus den einzelnen Komponenten

Elektrophysiologisch wurden die Zellen vom dritten bis zum neunten Kulturtag untersucht. Gemessen werden insgesamt vier verschiedene Stromprofile, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

3.2.2.1. Nicht inaktivierender Kaliumstrom

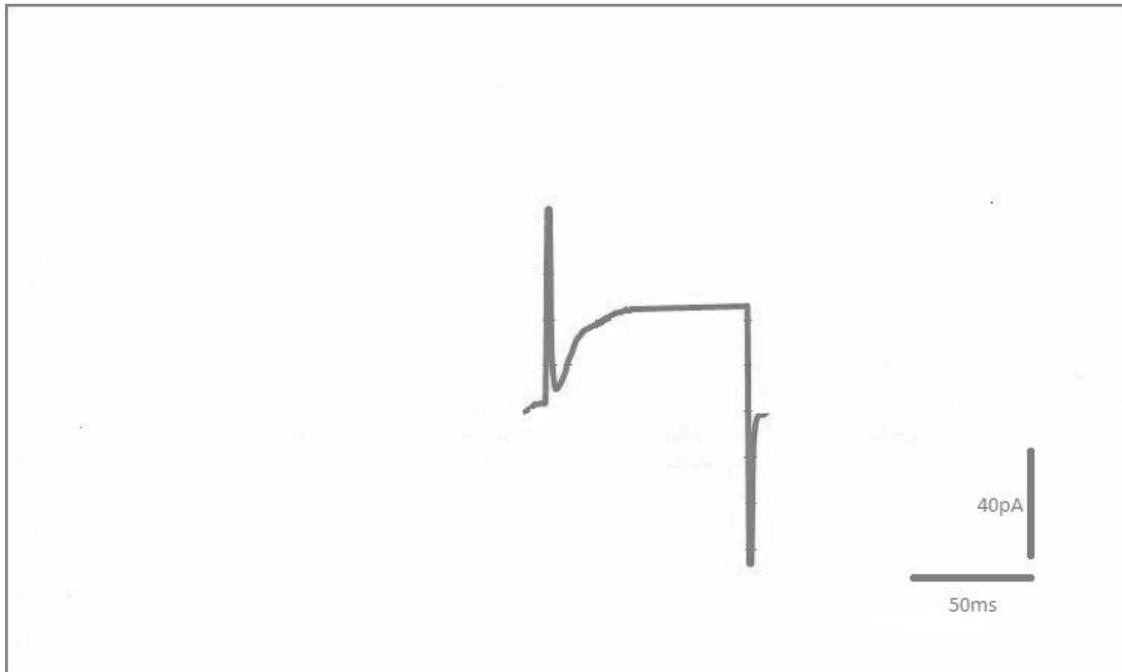


Abbildung 6: Ein nicht inaktivierender Kaliumstrom

Dieses Stromprofil weist keinen Natriumstrom auf, sondern nur einen nicht inaktivierenden Kaliumstrom. Der Verlauf der Stromlinie ist wie folgt: Zunächst ist ein leicht ansteigender Kaliumstrom zu erkennen, der anschließend konstant seine Stärke beibehält, wie anhand des Plateaus zu erkennen ist. Der Abstand zwischen Plateau und Nulllinie steht für die Anzahl der geöffneten Kaliumkanäle. Alle 13 Patch-Clamp-Versuche an den undifferenzierten Zellen sowie die beiden Messungen an den differenzierenden Zellen vor dem fünften Tag ergaben dieses Strommuster.

3.2.2.2. Natriumstrom + nicht inaktivierender Kaliumstrom

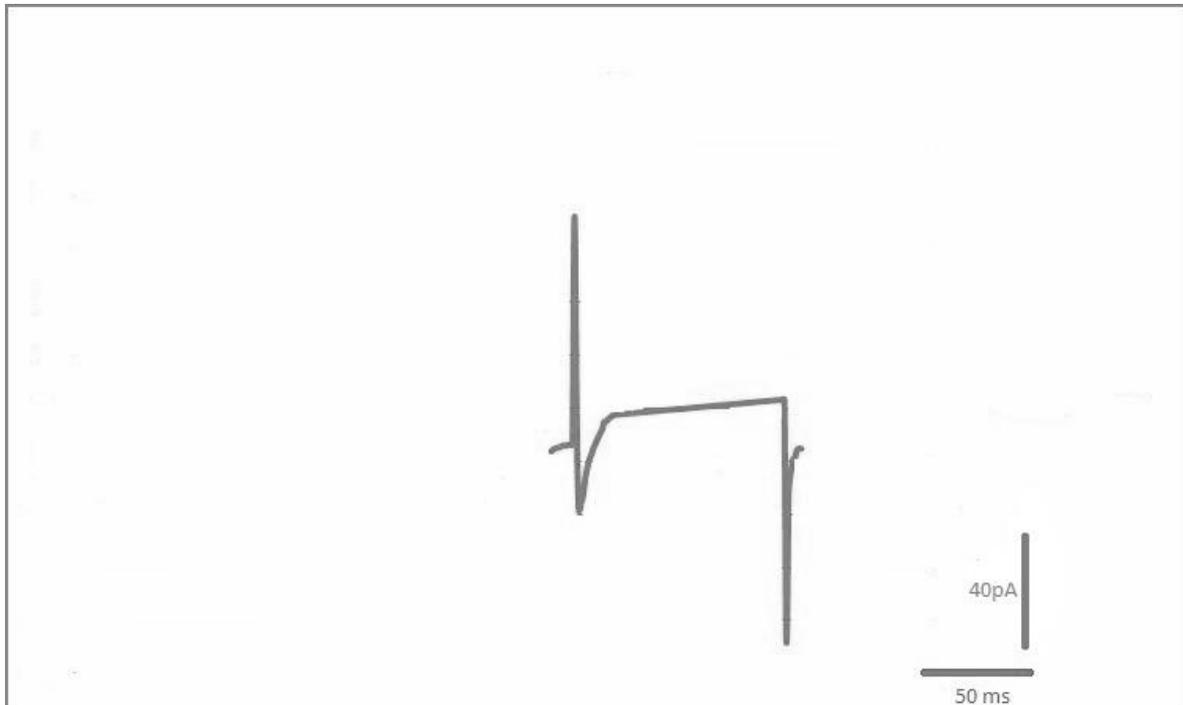


Abbildung 7: Ein Natriumstrom mit einem nicht inaktivierenden Kaliumstrom

Dieses Strombild zeigt einen schnellen Natriumeinwärtsstrom gefolgt von einem nicht inaktivierenden Kaliumstrom. Bei Reizbeginn öffnen sich die Natriumkanäle und es kommt zu einem schnellen Spitzenstrom, der trotz anhaltender Depolarisation innerhalb von wenigen Millisekunden aufgrund der vollständigen Inaktivierung der Natriumkanäle zurückgeht. Anschließend ist ein Plateau oberhalb der Nulllinie zu erkennen, welches für einen konstanten Kaliumstrom steht. Dieses Stromprofil konnte zwischen dem sechsten und dem neunten Tag an den differenzierenden Zellen festgestellt werden.

3.2.2.3. Natriumstrom + inaktivierender Kaliumstrom + nicht inaktivierender Kaliumstrom

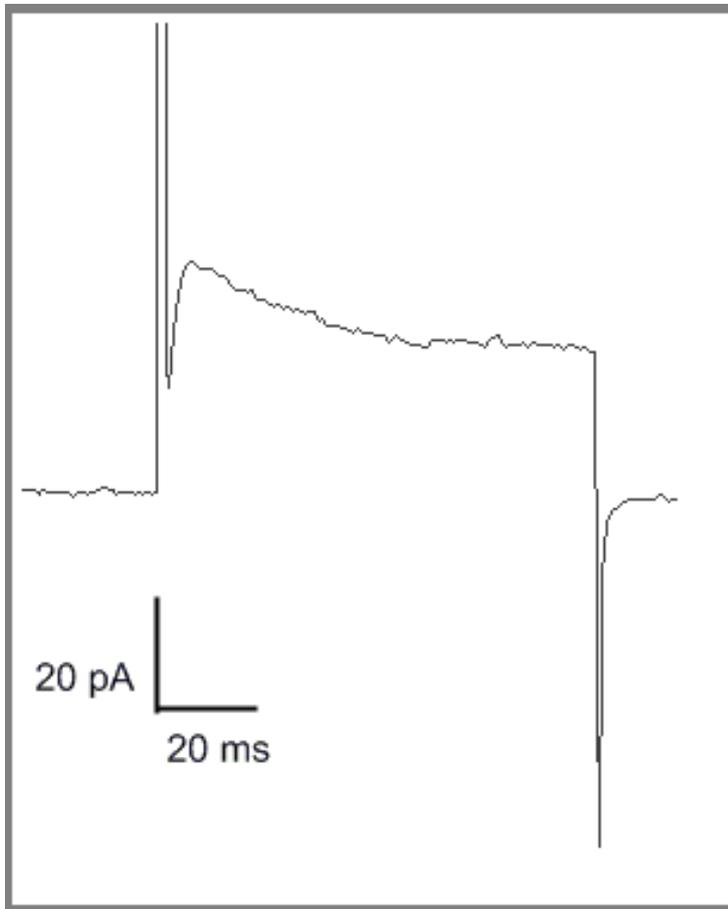


Abbildung 8: Ein Natriumstrom plus inaktivierendem und nicht inaktivierendem Kaliumstrom

Dieses Stromprofil weist einen schnellen Natriumeinwärtsstrom auf mit einem anschließend inaktivierenden und einem nicht inaktivierenden Kaliumstrom. Die Spitze des Natriumeinstromes wird durch einen schnell aktivierenden Kaliumausstrom über die Nulllinie gehoben. Der inaktivierende Kaliumstrom ist durch die leicht abfallende Stromlinie zuerkennen und der nicht inaktivierende Kaliumstrom am nachfolgenden Plateau. Dieses Messergebnis wurde vom fünften bis zum siebten Tag an den differenzierenden Zellen erzielt.

3.2.2.4. Multipler Natriumstrom + inaktivierender Kaliumstrom + nicht inaktivierender Kaliumstrom

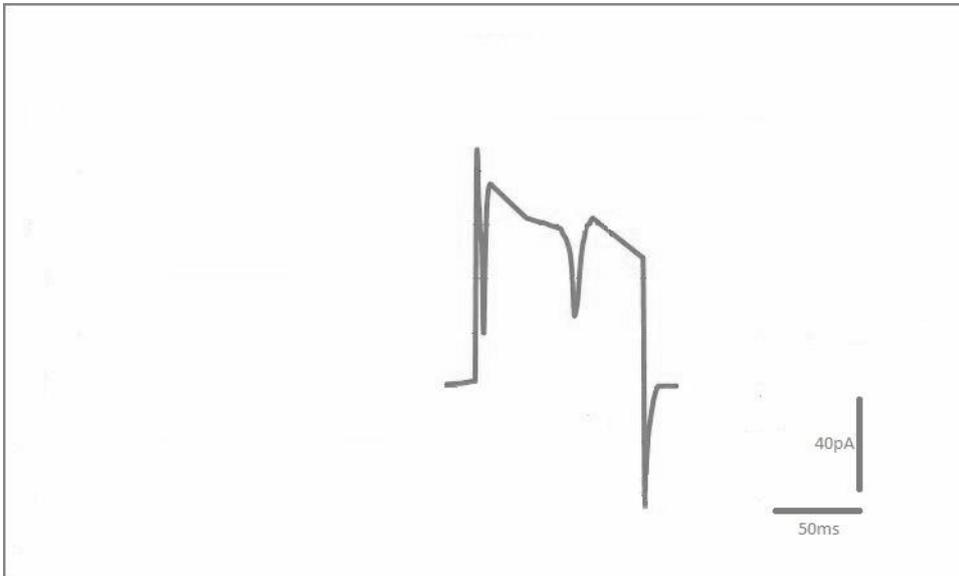


Abbildung 9: Multipler Natriumstrom plus inaktivierendem und nicht inaktivierendem Kaliumstrom

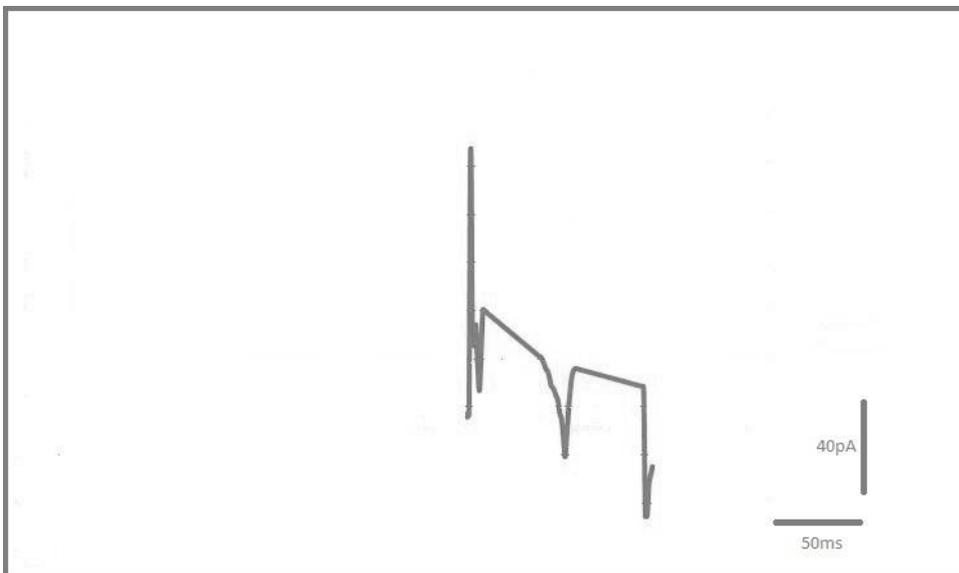


Abbildung 10: Multipler Natriumstrom plus inaktivierendem und nicht inaktivierendem Kaliumstrom

An diesem Stromprofil ist erkennbar, dass es mehrere schnelle Natrium-einwärtsströme gibt kombiniert mit inaktivierenden und nicht inaktivierenden Kaliumströmen. Dieses Strommuster wurde nur am siebten und am achten Kulturtag an differenzierenden Zellen gemessen.

3.2.3. Übersichtsgrafik der Messungen

<u>culture day (d)</u>	3	5	6	7	8	9
<u>cell type</u>						
<u>undifferentiated cells</u>	2* 	3* 	4* 	2* 	1* 	1* 
<u>differentiating cells</u>	2* 	1* 	1*  1* 	1*  1*  2* 	1*  1* 	1* 

Tabelle 3: Stromprofile der enterischen Nervenzellen während ihres Reifeprozesses

3.2.4. Übersicht über die Entwicklung der Stromprofile

In dieser Versuchsreihe wurden enterische Nervenzellen während ihres Reifeprozesses untersucht und in zwei Gruppen aufgeteilt. Wir unterscheiden zwischen undifferenzierten und differenzierenden Zellen, wobei die undifferenzierten Zellen allesamt durch einen runden Zellkörper charakterisiert sind, wohingegen die differenzierenden Zellen verschiedene Formen und Strukturen aufweisen wie z.B. unipolar oder bipolar. Die undifferenzierten Nervenzellen haben bis zum neunten Kulturtag ausschließlich nicht inaktivierende Kaliumströme und können keinerlei Natriumströme vorweisen. Die differenzierenden Nervenzellen sind ab dem fünften Entwicklungstag in der Lage Natriumströme zu entwickeln. Die Natriumströme treten in Verbindung mit nicht inaktivierenden Kaliumströmen oder in Verbindung mit inaktivierenden und nicht inaktivierenden Kaliumströmen auf. Die Besonderheit dieser Ergebnisreihe sind die multiplen Natriumströme samt inaktivierenden und nicht inaktivierenden Kaliumströmen. Vor dem fünften Tag sind die differenzierenden Nervenzellen vom Stromprofil ausgehend gleichzusetzen mit den undifferenzierten Zellen. Während der Transformation der unreifen Zelle zum Neuron erfolgt eine Erhöhung der Dichte der Natriumkanäle sowie eine Differenzierung der Kaliumkanäle, was eine Vielfalt der Membranströme zur Folge hat. Je älter die Zellkulturen wurden, desto kleiner wurden die Zellkörper, weswegen die Patch-Clamp-Technik ab dem zehnten Tag nicht mehr möglich war.

3.3. Zuckende Muskelzellen in vitro. Das Zusammenspiel der Initiatoren und der Effektoren der gastrointestinalen Peristaltik

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt das Zusammenspiel zwischen den enterischen Nervenzellen und den glatten Muskelzellen. Die Regulierung der gastrointestinalen Motilität ist von der ungestörten Kommunikation dieser beiden Zelltypen miteinander abhängig, welche durch Neurotransmitter vermittelt wird. In den hier untersuchten Co-Kulturen formieren sich die enterischen Neurone und die Muskelzellen zu Zell-Aggregaten, die für eine rhythmische Kontraktion in vitro sorgen.

Durch eine immunzytochemische Färbung wird deutlich, dass relativ große Häufchen der Muskelzellen von neuronalen Netzwerken umgeben sind, welche in direktem Kontakt zu den Muskelzellaggregaten stehen, was in den Abbildungen 11 und 12 zu sehen ist. Unter dem Lichtmikroskop ist eine Spontanaktivität der Muskelzellen zu erkennen, welche auf einen Impulsgeber schließen lässt. Durch das Filmen vieler einzelner zuckender Muskelaggregate konnten die Frequenzen der Zuckungen und die Kontraktionszentren analysiert und bestimmt werden. Die Anzahl der Zuckungen pro Minute variiert zwischen 2 und 15. Das Zentrum der Zuckungen wechselt zwischen Zellhäufchenmitte und Zellhäufchenrand, wobei prozentual gesehen die Zuckungszentren vermehrt am Rand der Muskelzellaggregate liegen.



Abbildung 11: Muskelzellaggregate umgeben von Nervenzellen; mit dem Muskelmarker α -SMA bearbeitet

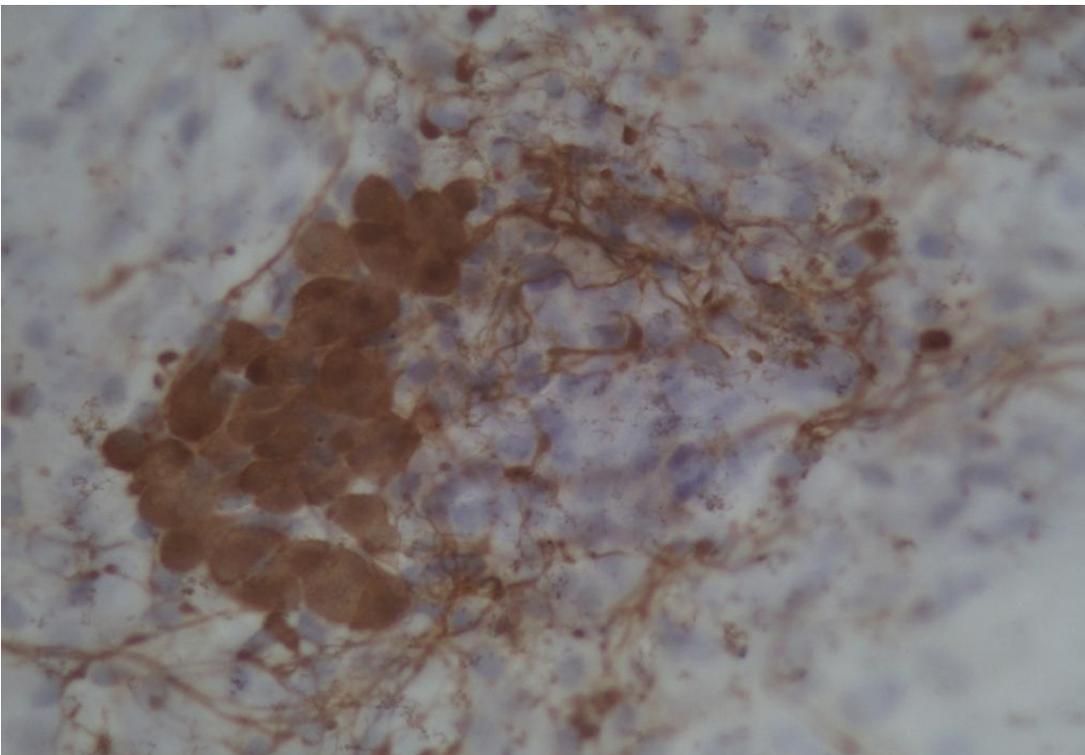


Abbildung 12: Muskelzellaggregate umgeben von Nervenzellen; mit dem pan-neuronalen Marker PGP9.5 präpariert

3.3.1. Elektrophysiologie der den Muskelzellaggregaten angelagerten Nervenzellen

Durch die Anfärbung der Präparate wurde ersichtlich, welche Strukturen mithilfe der Patch-Clamp-Technik zu untersuchen sind. Wie bei den enterischen Nervenzellkulturen wurden die Zellen aus ihrem Nährmedium in eine geeignete Messlösung übertragen. Unter dem Mikroskop wurden hauptsächlich die Nervenzellen gesucht, die sich in Häufchen gruppiert am Rand eines Muskelzellaggregats befinden. Durch die Verwendung eines inversen Mikroskops war durch eine mehrlagige Zellschicht die Spitze der Messpipette nicht mehr zu erkennen. Die einzelnen Zellen sind nicht voneinander abzugrenzen, wodurch das Andocken der Patchpipette an eine Zellmembran nur an einem erhöhten elektrischen Widerstand zu erkennen war.

Außerdem wurden auch die vereinzelt undifferenzierten und differenzierenden Nervenzellen untersucht, die sich geringfügig außerhalb dieser Zellaggregate befanden. Insgesamt wurden 24 Ableitungen erreicht, die zwischen dem 3. und dem 10. Kulturtag registriert wurden. Die vereinzelt undifferenzierten und differenzierenden Nervenzellen haben nur Kaliumströme und keine Natriumströme vorzuweisen. Die sich zu Häufchen zusammengelagerten Nervenzellen lassen vor allem am 3. und am 4. Tag Natriumströme erkennen, welche im Laufe des Alterns der Zellkulturen weniger werden. Ab dem 8. Tag waren kaum noch Ableitungen möglich. Siehe Tabelle (Übersichtsgrafik der Messungen)

3.3.2. Übersichtsgrafik der Messungen

culture day (d)	3	4	5	6	7	8	10
cell type							
undifferentiated cells	-----	-----	-----	1* 	1* 	-----	1* 
differentiating cells	-----	1* 	-----	-----	2* 	-----	3* 
cellular aggregates	5* 	1*  4* 	1* 	1* 	1*  1* 	1* 	-----

Tabelle 4: Stromprofile der den Muskelzellaggregaten angelagerten Nervenzellen

3.3.3. Funktionsprüfung einer Nervenzelle innerhalb eines Zellaggregats

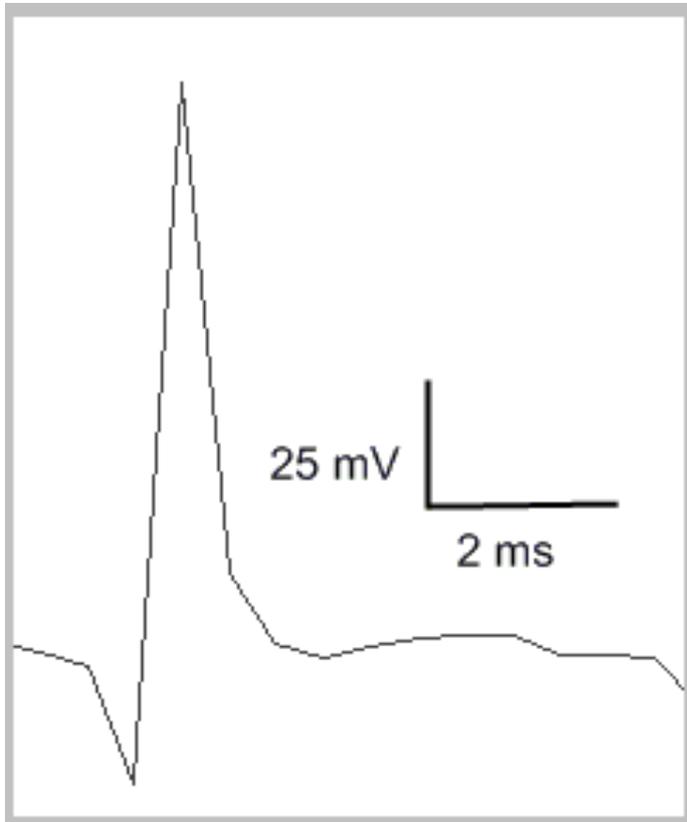


Abbildung 13: Aktionspotenzial einer Nervenzelle am Rande eines Zellaggregats

Durch die bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich im Verlauf der Zelldifferenzierung komplexe Stromprofile herausbilden können. Die Funktion einer Nervenzelle hängt allerdings davon ab, ob die Dichte der Ionenkanäle in der Zellmembran ausreichend ist, um Aktionspotenziale erzeugen zu können. Trotz der schwierigen Ableitbedingungen ist es gelungen, aus einer am Rande eines Zellaggregats liegenden Nervenzelle ein Aktionspotential abzuleiten. Zu diesem Zweck wurde die Messeinstellung des Regelverstärkers von „voltage clamp“ auf „current clamp“ umgestellt. Bei dieser Einstellung wird der Membranstrom vom Regelverstärker konstant gehalten, Potentialänderungen werden zugelassen. Abb. 13 zeigt das unter diesen Bedingungen abgeleitete Aktionspotenzial. Es erfüllt alle Kriterien einer funktionsfähigen Nervenzelle. Die Anstiegssteilheit und die Amplitude (ca 100 mV) sprechen für eine hohe Natriumkanaldichte, die schnelle Repolarisation für eine hohe Kaliumkanaldichte.

3.4. Die Frequenz der spontanen Kontraktionen und die Lage der Kontraktionszentren

Neben den elektrophysiologischen Messungen an den Nervenzellen wurden 49 Filmaufnahmen von spontan zuckenden Zellaggregaten in vitro analysiert. Bei den Untersuchungen wurde das Hauptaugenmerk auf zwei Faktoren gelegt, einmal auf die Häufigkeit der Zuckungen pro Minute und einmal auf die Lokalisation der Kontraktionszentren.

Für die untere Grafik wurden 23 Zellaggregate ausgewertet (farbig markiert in den Tabellen). Wie zu sehen, ist die Zuckungsfrequenz sehr unterschiedlich und reicht von zwei bis zu 15 Mal pro Minute. Die Frequenzen 4,5,9 und 12 treten minimal häufiger auf.

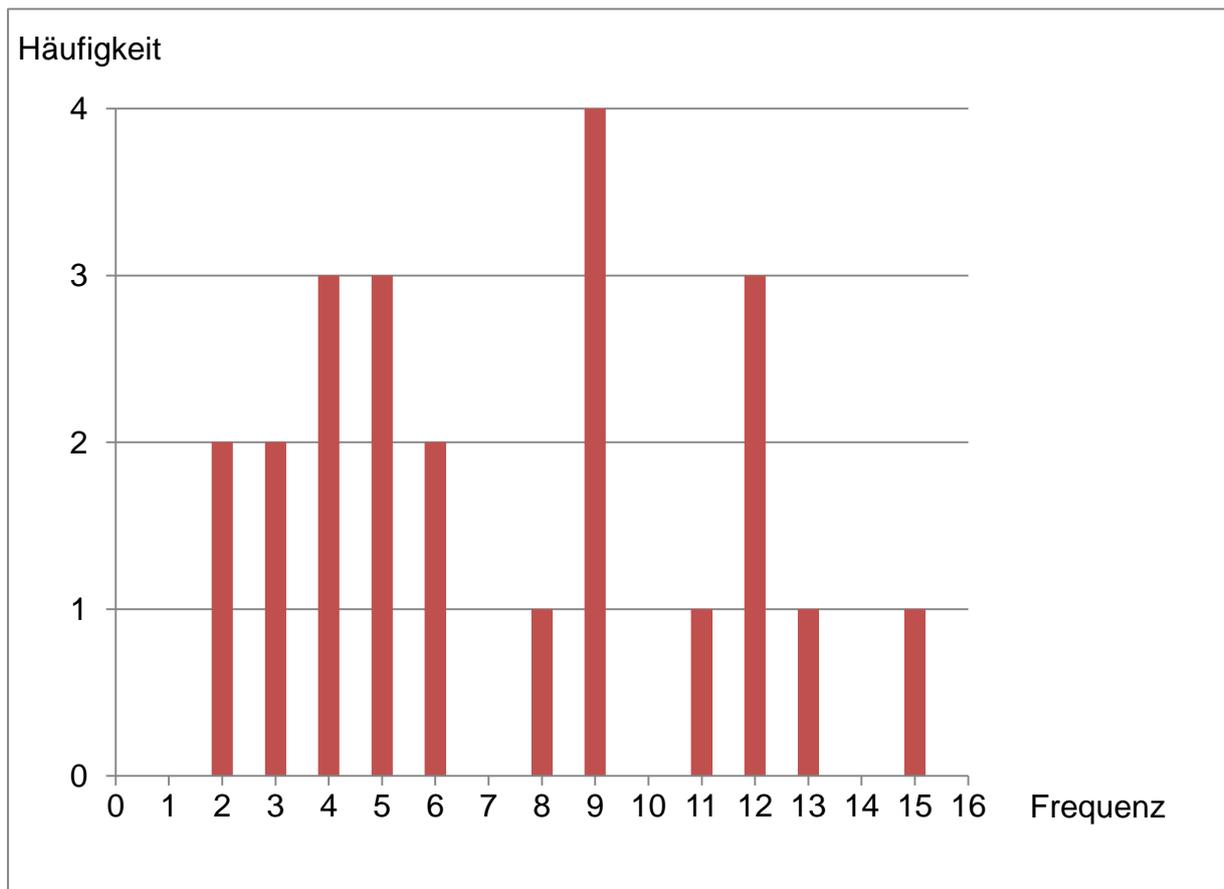


Abbildung 14: Häufigkeit der unterschiedlichen Frequenzen der spontanen Kontraktionen

Nummer + Datum + Konz. Lidocain (M)	Zuckungsfrequenz (pro min)	Kontraktionszentrum (Mittelpunkt bis zum Rand)
Kontraktion-10x-2587 (14.08.2012)	4	Zwei Zentren
Kontraktion-10x-2590 (14.08.2012)	5	2/3 Richtung Rand
Kontraktion-40x-2568 (14.08.2012)	9	Zentrum
2066-5x-1-11-2012	2	1/2 Richtung Rand
2068-10x-1-11-2012-Drilling	9	Zentral zwischen den drei Häufchen
2553-vom-7-8-2012-10x	4	Am Rand zwischen beiden Häufchen
2777-vom-18-9-2012-5x	12	Zentrum
2778-vom-18-9-2012-10x	12	3/4 Richtung Rand
2716-04092012-controll	12	2/3 Richtung Rand
2718-04092012-controll	9	2/3 Richtung Rand
Kontraktion-10x-2592-14082012	11	Rand
Kontraktion-10x-2594-15082012	6	Rand
2635-10x-22082012-1	8	2/3 Richtung Rand
2636-10x-22082012	3	Zentrum
2811-10x-1 (28.9.2012)	13	1/3 Richtung Rand
2686-10x-29082012-2	2	Rand
2779-10x-8-11-2012-0M	5	Zentrum
2860-10x-9-11-2012-0M	4	2/3 Richtung Rand
2920-10x-23-11-2012-0M	9	Zentrum
2918-10x-0mM-Ultracaine	3	2/3 Richtung Rand
10x-ohne Lidocain (30.10.2012)	6	Zentrum
2860-10x-5-11-2012-0M	5	Zentrum
2777-10x-7-11-2012-0M	15	Rand

Tabelle 5: Zuckungsfrequenz und Kontraktionszentrum der zuckenden Muskelzellen

Wie anhand der Tabelle deutlich wird, ist die Lage der Kontraktionszentren nicht einheitlich. Es ist festzustellen, dass der Kontraktionsursprung sich eher am Rand der Zellen befindet als im Zentrum. Im Folgenden sind drei Abbildungen aufgeführt, in denen der Kontraktionsursprung einmal zentral zwischen drei Muskelzellaggregaten ist, dann zentral im Häufchen selbst und einmal direkt am Rand des Zellaggregates. Die Kontraktionszentren sind durch Pfeile markiert. Um den Verlauf der spontanen Kontraktionen zu verdeutlichen, gibt es für jedes abgebildete Aggregat ein entsprechendes Video auf der beigefügten DVD.

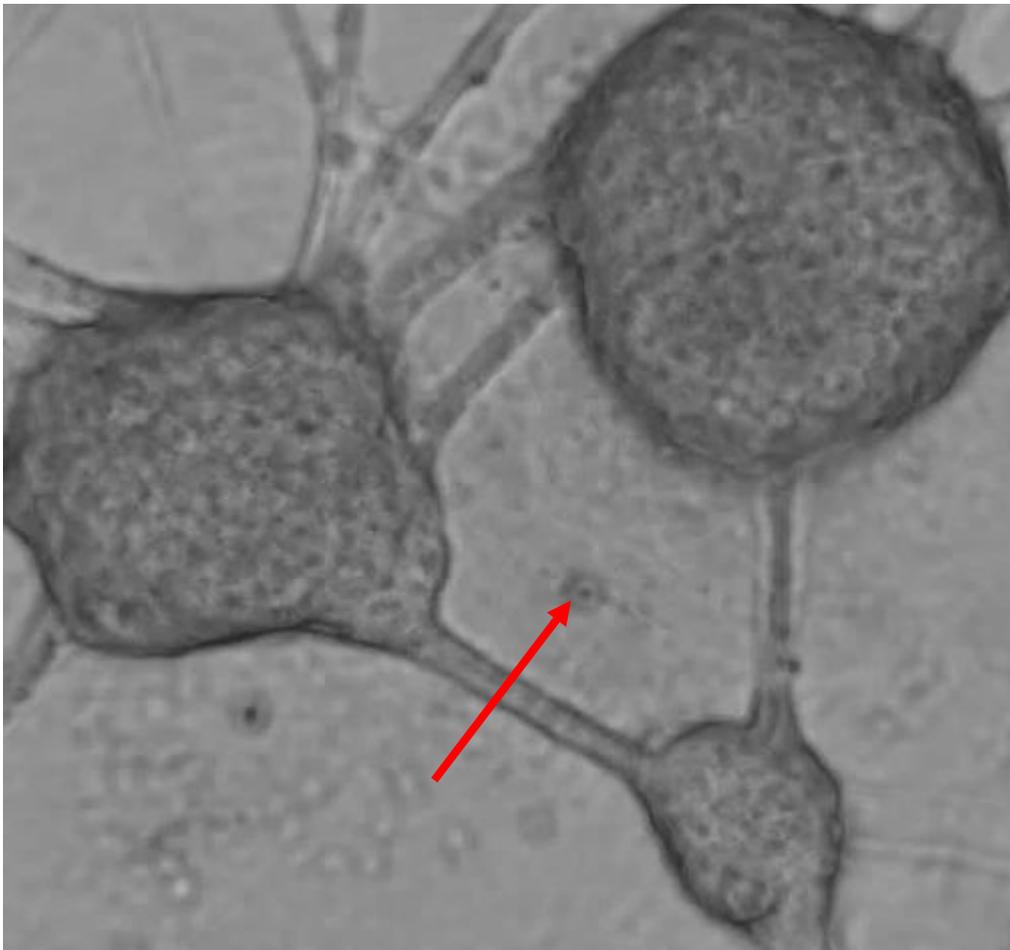


Abbildung 15: Lokalisation des Schrittmachers zwischen den Zellaggregaten

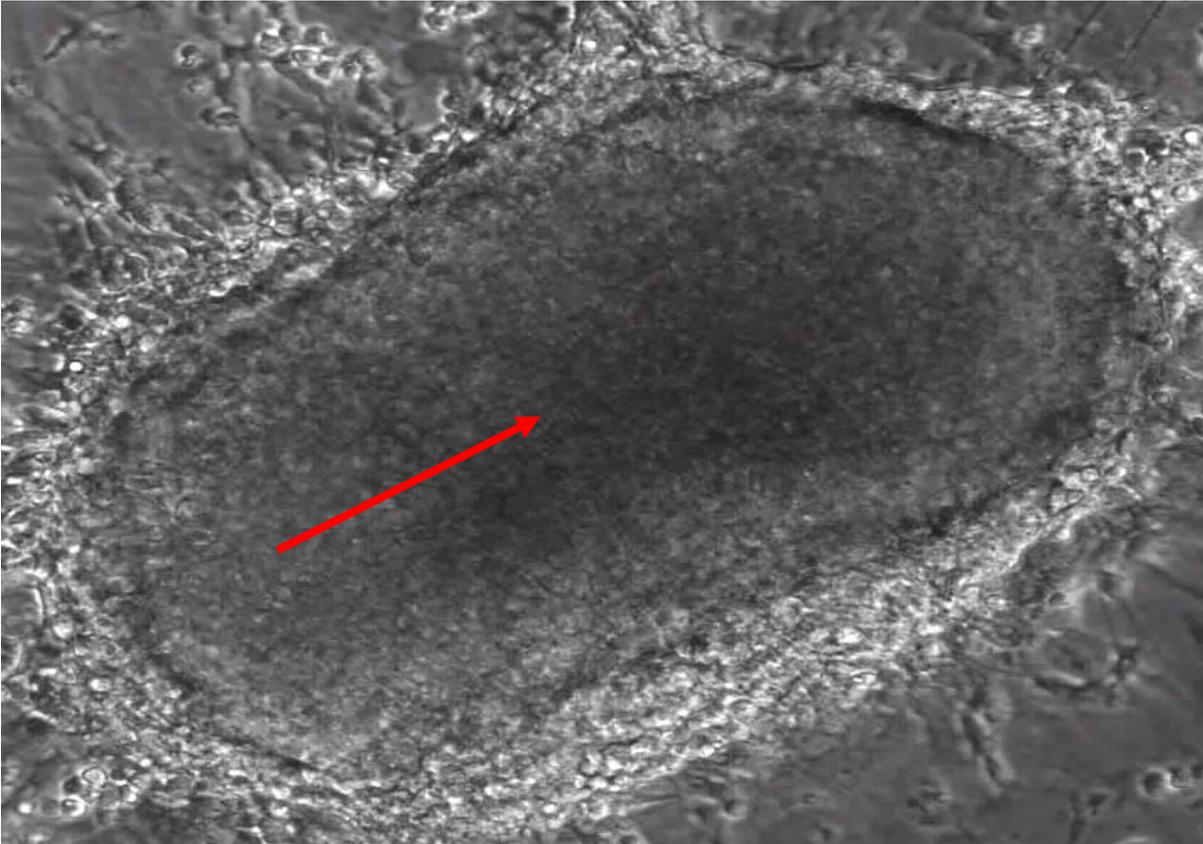


Abbildung 16: Lokalisation der Zuckungen zentral

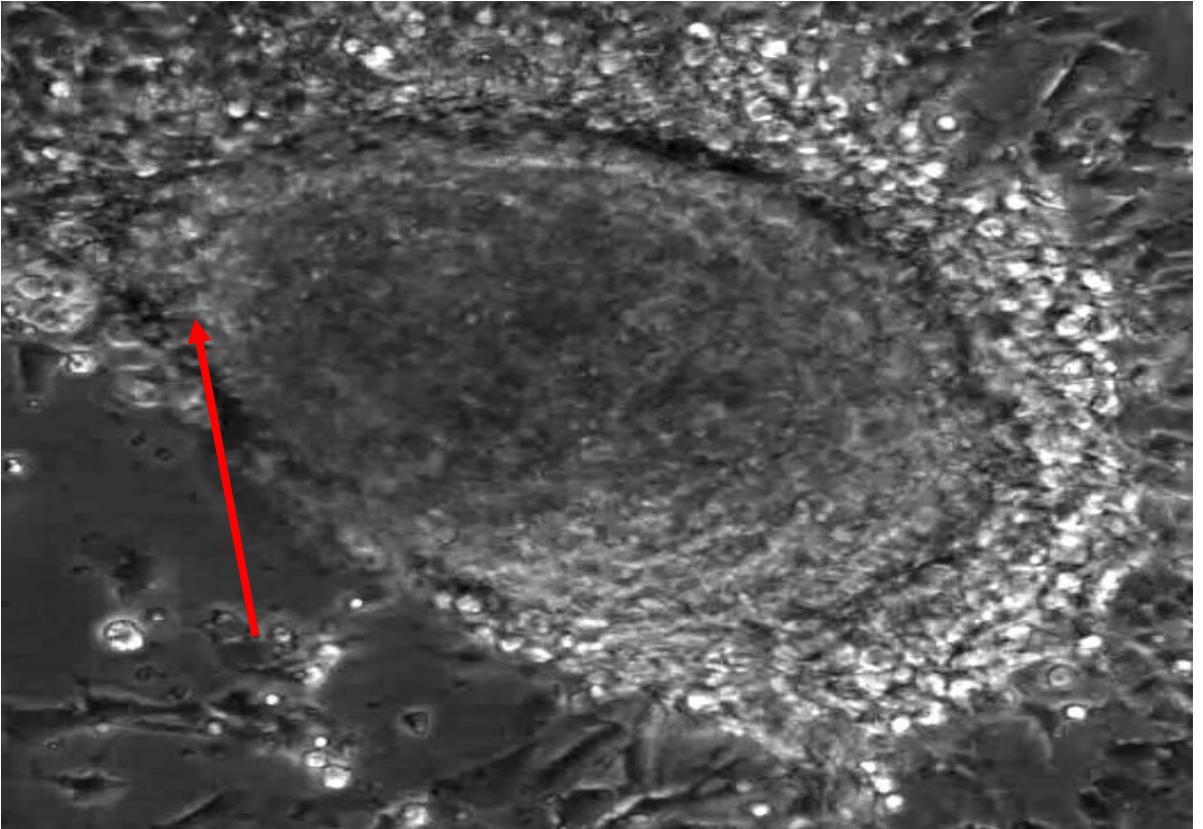


Abbildung 17: Lokalisation der Zuckungszentren am Rand

3.5. Einfluss der Nervenzellen auf die Kontraktionsfrequenz der Muskelzellaggregate

Um den Einfluss der Nervenzellen auf die Kontraktionsfrequenzen zu untersuchen, wurden diese durch die Verwendung des Lokalanästhetikums Lidocain blockiert. Die Frequenz der Muskelkontraktion wurde pro untersuchte Kultur insgesamt bis zu fünfmal gemessen. Einmal zu Beginn des Versuches, dann nach 4 Stunden und dann nach Zugabe von Lidocain in drei unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-4}Mol , 10^{-6}Mol und 10^{-8}Mol). Es konnte bei Gabe von Lidocain keine systematische Veränderung der Frequenz der Zuckungen festgestellt werden. Häufig reduzierte sich die Frequenz der Zuckungen. Zum Teil erhöht sie sich trotz Lidocain bzw. trotz einer erhöhten Konzentration von Lidocain.

Nummer + Datum + Konz. Lidocain (M)	Zuckungsfrequenz (pro min)	Kontraktionszentrum (Mittelpunkt bis zum Rand)
2779-10x-8-11-2012-0M	5	Zentrum
2779-8-11-2012-4h-later	11	Zentrum
2779-10x-8-11-2012-10 ⁻⁴ M	8	Zentrum
2779-10x-8-11-2012-10 ⁻⁶ M	6	Zentrum
2779-10x-8-11-2012-10 ⁻⁸ M	4	Zentrum
2860-10x-9-11-2012-0M	4	2/3 Richtung Rand
2860-10x-9-11-2012-4h-later	4	2/3 Richtung Rand
2860-10x-9-11-2012-10 ⁻⁴ M	5	2/3 Richtung Rand
2860-10x-9-11-2012-10 ⁻⁶ M	3	2/3 Richtung Rand
2860-10x-9-11-2012-10 ⁻⁸ M	3	2/3 Richtung Rand
2920-10x-23-11-2012-0M	9	Zentrum
2920-10x-23-11-2012-10 ⁻⁴ M	2	2/3 Richtung Rand
2920-10x-23-11-2012-10 ⁻⁶ M	11	Zentrum
2920-10x-23-11-2012-10 ⁻⁸ M	4	Zentrum
2920-10x-23-11-2012-nach2h	3	Zentrum
2920-10x-23-11-2012-nach5h	2	Zentrum
2918-10x-0mM-Ultracain	3	2/3 Richtung Rand
2918-10x-1mM-Ultracain	0	-----
2918-10x-200µM-Ultracain	3	Zwei Zentren
2918-10x-nach-1h-Ultracain	0	-----
10x-ohne Lidocain (30.10.2012)	6	Zentrum
4 h nach Lidocain (30.10.2012)	13	Zentrum
10x-10 ⁻⁴ molar Lidocain (30.10.2012)	6	Zentrum
10x-10 ⁻⁶ molar Lidocain (30.10.2012)	1	Zentrum
10x-10 ⁻⁸ molar Lidocain (30.10.2012)	5	Zentrum
2860-10x-5-11-2012-0M	5	Zentrum
2860-10x-5-11-2012-10 ⁻⁴ M	2	Zentrum
2860-10x-5-11-2012-10 ⁻⁶ M	1	Zentrum
2860-10x-5-11-2012-10 ⁻⁸ M	4	Zentrum
2777-10x-7-11-2012-0M	15	Rand
2777-10x-7-11-2012-10 ⁻⁴ M	13	Rand
2777-10x-7-11-2012-10 ⁻⁶ M	13	Rand
2777-10x-7-11-2012-10 ⁻⁸ M	10	Rand

Tabelle 6: Zuckungsfrequenz und Kontraktionszentrum von mit -Lidocain behandelten -Zellen

4. Diskussion

Der erste Abschnitt der Arbeit befasst sich mit den elektrophysiologischen Eigenschaften der enterischen Nervenzellen während ihrer Differenzierung.

Zu den Neuronen im enterischen Nervensystem gehören Motoneurone, sensorische Neurone und Interneurone (Wood, 1994), die sich sowohl morphologisch als auch elektrophysiologisch voneinander unterscheiden können. Der russische Histologe A.S. Dogiel veröffentlichte als erster die strukturellen Unterschiede der verschiedenen Neurone, wobei diese Klassifizierung bis heute ihre Gültigkeit hat.

Die Dogiel-Typ-1-Zellen besitzen ein langes Axon und viele kurze, lamellenähnliche Dendriten. Die Tatsache, dass das Axon bis zu vier Ganglien durchzieht und in der Muskulatur endet, lässt vermuten, dass es sich um Motoneurone handelt (Wood, 1994; Bornstein et al. 1991). Die Dogiel-Typ-2-Zellen haben dagegen viele sehr lange Dendriten, die das Ursprungsganglion verlassen und ein Axon, das zu anderen Ganglien zieht. Diese Zellen haben vermutlich sensorische Fähigkeiten. Eine wichtige Bedeutung für das Erfassen der Physiologie im enterischen Nervensystem haben die elektrophysiologischen Untersuchungen, die im Laufe der Zeit präziser wurden. Die ersten Messungen wurden mit extrazellulären Elektroden getätigt, später erzielte man grundlegende Erkenntnisse durch die intrazellulären Ableitungstechniken (Nishi und North, 1973) und durch die Patch-Clamp-Technik (Baidan et al. 1992).

Elektrophysiologisch können vier Gruppen von Neuronen voneinander unterschieden werden. Zur ersten Population gehören die S-Neurone (Hirst et al. 1974), auch Typ-1-Neurone genannt (Nishi und North 1973). Die Reaktion dieser S-Neurone auf eine elektrische Stimulation ist ein schnelles exzitatorisches postsynaptisches Potential (fast EPSPs), das durch die Freisetzung von Acetylcholin entsteht, welches an die nikotineren Acetylcholinrezeptoren bindet. Das Spannungsprofil dieser Zellen entspricht dem der Motoneurone. So folgt dem Aktionspotential eine kurze Hyperpolarisationsphase und eine anschließende überschießende Repolarisation. Zur zweiten Gruppe gehören die AH/Typ-2-Neurone (afterhyperpolarisation), welche sich dadurch von den S-Neuronen unterscheiden, dass nach dem Aktionspotential zwei Hyperpolarisationsphasen auftreten, und zwar einmal eine schnelle und einmal zusätzlich eine sich langsam entwickelnde

Hyperpolarisation. Diese relativ lange zweite Phase verhindert ein erneutes Aktionspotential, da die Reizschwelle zu der Zeit erhöht ist. Die S-Neurone dagegen können multiple repetitive Aktionspotentiale aufweisen. Ein zu diesem Erregungsmuster passendes Stromprofil konnten wir in unseren Versuchen an Kulturtag 7 und 8 an insgesamt drei Zellen beobachten. Die rasch aktivierenden Kaliumströme mit hoher Amplitude ermöglichen repetitive Na-Einwärtsströme, durch Aufhebung der Inaktivierung dieser Natriumkanäle während der Reizdauer. Die meisten S-Neurone haben strukturell betrachtet Ähnlichkeiten mit Dogiel-Typ-1-Zellen und die Mehrheit der AH-Neurone hat die Morphologie der Dogiel-Typ-2-Zellen. Die dritte Gruppe der Neurone ist durch ihre elektrische Unerregbarkeit und durch ihr hohes Ruhepotential gekennzeichnet. Die vierte Population ist den AH-Neuronen ähnlich, mit dem Unterschied, dass sie TTX-sensitiv ist.

In den Versuchen wurden insgesamt vier verschiedene Stromprofile gemessen. Die undifferenzierten Zellen haben an allen Tagen nur einen nicht inaktivierenden Kaliumstrom. Dies hängt damit zusammen, dass in der Anfangsphase der Zellentwicklung die Stabilisierung des Membranpotentials angestrebt wird, was durch die Kaliumkanäle ermöglicht wird, die Abweichungen vom Ruhepotential durch einen Auswärtsstrom kompensieren können. Die differenzierenden Zellen können dagegen Natriumströme vorweisen, wobei sich das Strommuster nur in der Aktivität der Kaliumströme unterscheidet. Die sich im Reifeprozess befindenden Neurone, die nach dem Natriumstrom einen inaktivierenden und einen nicht inaktivierenden Kaliumstrom zeigen, erinnern an die AH-Neurone, welche durch ihre langsame Hyperpolarisation weitere Aktionspotentiale unterbinden. Diese Zellen können vermutlich sensorische Neurone im enterischen Nervensystem darstellen. Die Zellen jedoch, die in unseren Patch-Clamp-Versuchen multiple Natriumströme vorweisen, können mit den S-Neuronen verglichen werden, die bei intrazellulären Stimulationen repetitiv Aktionspotentiale auslösen können.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wird die Regulierung der Aktivität der glatten Muskelzellen im Gastrointestinaltrakt in Zusammenhang mit Schrittmacherzellen untersucht. Der Gastrointestinaltrakt ist in verschiedene Abschnitte unterteilt, die sich u.a. in der Frequenz der Muskelaktivität unterscheiden, was u.a mit der Funktion der jeweiligen Bereiche zusammenhängt. Die Hauptverantwortlichen für die Peristaltik im GIT sind die enterischen Nervenzellen und die glatten Muskelzellen. Die Frequenz der Muskelzuckungen, sogenannte „slow waves“, liegt im Magen bei 3/min, im Duodenum bei 12/min, im Jejunum bei 10/min, im Ileum bei 8/min und im Colon bei 3/min. Die Anzahl der Kontraktionen stimmt überein mit den Werten, die im Rahmen dieser Arbeit an den zuckenden Muskelzellaggregaten in vitro gemessen wurden.

Die Spontanaktivität dieser Muskelzellaggregate und die Übereinstimmung der Frequenzen in vitro und in vivo legt nahe, dass es mit den sogenannten interstitiellen Cajal-Zellen vermutlich einen vom Nervensystem unabhängigen Schrittmacher gibt. Diese Zellen haben kleine Zellkörper und viele lange Fortsätze. Ultrastrukturell sind sie gekennzeichnet durch zahlreiche Mitochondrien, einen mäßig entwickelten Golgi-Apparat und eine diskontinuierliche Basallamina. Des Weiteren stehen sie in engem Kontakt mit Nervenendigungen und über Gap junctions in Verbindung mit den glatten Muskelzellen. (Camborova et al. 2002). Es existieren verschiedene Typen von ICC (interstitial cells of Cajal), die sich in unterschiedlichen anatomischen Schichten befinden und innerhalb des GITs unterschiedlich lokalisiert sind. Von Bedeutung sind vor allem die ICC-IM, die sich in der zirkulären und der longitudinalen Muskulatur befinden, die ICC-MY aus dem Plexus Myentericus und die ICC-DMP aus dem tiefen Muskelplexus. Die interstitiellen Cajal-Zellen sind die Vermittler zwischen enterischen Nervenzellen und glatten Muskelzellen. Sie übermitteln Inputs von enterischen Motoneuronen und erzeugen dabei elektrische, intrinsische Rhythmen in glatten Muskelzellen (Al-Shboul OA 2012). Dieser basale Organrhythmus entsteht durch rhythmische Potenzialschwankungen, die in den Depolarisationsphasen bei unter -45 mV Entladungen auslösen, welche sich als Kontraktionen bemerkbar machen. Außerdem haben sie eine Sensorfähigkeit. Im Gewebe, in dem ICC-IM fehlt, kommt es zur erheblichen Senkung von cholinergen Stimmulierungen und nitrergen Inhibitionen. Bei längeren Impulsen kann das ICC-MY in der Abwesenheit von ICC-IM direkt aktiviert werden (S. M. Ward et al. 2003).

Im gesamten GIT treten unterschiedliche Frequenzen der „slow waves“ auf, was durch die jeweiligen ICC der Region bedingt ist. Ein Beweis dafür, dass die Schrittmacheraktivität durch die ICC veranlasst wird und nicht durch neuronale Inputs zeigt die Tatsache, dass Neurotoxine wie Tetrodotoxin (TTX) die slow waves nicht hemmen (Forrest et al. 2006). Dieser Umstand erklärt, warum es in der hier behandelten Versuchsreihe mit Lidocain (ein Na-Kanalblocker wie TTX) keine Hemmung der „slow waves“ gab. Das Lidocain hat keine Auswirkung auf die Cajal-Zellen, weswegen die Aktivität der Muskelzellaggregate nicht systematisch verändert wurde. Hieraus lässt sich schließen, dass der Grundrhythmus durch die ICC gegeben ist und die enterischen Nervenzellen höchstens einen modifizierenden Anteil dazu beitragen.

Durch die physiologische Untersuchung spontan aktiver Zellaggregate konnten Eigenschaften beschrieben werden, die sie als kleinste funktionelle Einheiten der Darmperistaltik charakterisieren. Die Zellaggregate enthalten alle Zelltypen (Schrittmacherzellen, Muskelzellen und Nervenzellen), die zu Ausführung rhythmischer Kontraktionen notwendig sind. Alle enthaltenen Zelltypen sind funktionsfähig. Die Schrittmacherzellen (ICC) erzeugen spontan rhythmische Depolarisationen, die Muskelzellen sind kontraktionsfähig, aus den Nervenzellen lassen sich Aktionspotenziale ableiten. Das Spektrum der Kontraktionsfrequenzen der einzelnen Präparate reicht von 2/min bis 15/min und entspricht damit den in vivo Verhältnissen im Gastrointestinaltrakt. Mit diesen Eigenschaften erfüllen die spontan aktiven Zellaggregate alle Voraussetzungen für ein physiologisch relevantes Modell zur experimentellen Untersuchung der Prinzipien der Darmmotilität.

5. Zusammenfassung

Das enterische Nervensystem ist ein komplexes Geflecht aus Nervenzellen im Darm und ist entscheidend für die Funktion des Magen-Darm-Trakts. Die fehlerfreie Motilität innerhalb dieses Bereiches ist maßgebend für die Verdauung, weswegen das Zusammenspiel zwischen den enterischen Nervenzellen und den glatten Muskelzellen einwandfrei funktionieren muss. In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe der Whole-cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik zum einen die Membranströme der enterischen Nervenzelle während ihrer Entwicklung gemessen und ausgewertet und zum anderen das Verhalten spontan aktiver neuromuskulärer Zellaggregate analysiert. Der Differenzierungsprozess der enterischen Nervenzellen innerhalb der ersten neun Kulturtage ist sowohl morphologisch als auch elektrophysiologisch erkennbar. Bis zum fünften Kulturtag haben sowohl die runden undifferenzierten als auch die differenzierenden Zellen ausschließlich Kaliumströme. Danach jedoch erfolgt eine Erhöhung der Dichte der Natriumkanäle und eine Differenzierung der Kaliumkanäle innerhalb der differenzierenden Zellen, was eine Vielfalt der Membranströme zur Folge hat und auf verschiedene Typen von Neuronen schließen lässt. Die enterischen Nervenzellen, die multiple Natriumströme vorweisen, sind vergleichbar mit S-Neuronen und die Neurone, die nach dem Aktionspotential einen inaktivierenden und einen nicht inaktivierenden Kaliumstrom besitzen, gleichen den AH-Neuronen. In der anderen Versuchsreihe wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der enterischen Neurone untersucht, die sich mit glatten Muskelzellen zu, in vitro rhythmisch kontrahierenden, Zellaggregaten formiert haben. Diese, sich am Rand der Muskelzellaggregate befindenden, Zellen besitzen das typische Stromprofil einer klassischen Nervenzelle. Zudem wurden die Frequenz der Zuckungen der Muskelzellaggregate pro Minute und die Kontraktionszentren ausgewertet und analysiert. Weiterhin wurde der Einfluss der Nervenzellen auf die Kontraktionsfrequenz untersucht, indem wir mithilfe des Lokalanästhetikums Lidocain diese blockiert haben. Unsere in-vitro-Werte von 3 bis 15 Zuckungen pro Minute stimmen überein mit den in-vivo-Werten der Muskelzellen innerhalb des Gastrointestinaltrakts. Die Tatsache, dass das Lidocain keine systematische Veränderung der Zuckungsfrequenz hervorruft und dass trotz fehlendem Nervensystem die in vitro und die in-vivo-Werte übereinstimmen, zeigt, dass es einen unabhängigen Schrittmacher gibt, und zwar die sogenannten

interstitiellen Cajal-Zellen. Die spontan aktiven Zellaggregate erfüllen alle Voraussetzungen für ein physiologisch relevantes Modell und eignen sich hervorragend für weitere Untersuchungen bezüglich der Physiologie der Darmmotilität.

6. Literaturverzeichnis

Al-Shboul OA (2013) The importance of interstitial cells of cajal in the gastro-intestinal tract. Saudi J Gastroenterol; 19:3-15

Badner, J. A., W. K. Sieber, et al. (1990) "A genetic study of Hirschsprung disease." Am J Hum Genet **46**(3): 568-580

Baidan LV, Zholos AV, Shuba MF, Wood JD(1992) Patch-clamp recording in myenteric neurones of guinea-pig small intestine. American Journal of Physiology; 262:G1074–1078

Bayliss WM, Starling EH (1899) The movements and innervations of the small intestine. J Physiol (Lond) 24:99-143

Bornstein JC, Costa M, Furness JB, Lees GM (1984) Electrophysiology and enkephalin immunoreactivity of identified myenteric plexus neurones of guinea-pig small intestine. J Physiol (Lond) 381:465-482

Bornstein JC, Hendriks R, Furness JB, Trussel DC (1991) Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. J Comp Neurol 314:437-451

Bottner, M., K. Krieglstein and K. Unsicker (2000) The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. Journal of neurochemistry **75**(6): 2227-2240

Bräu ME, Vogel W, Hempelmann G (1996) Einsatzmöglichkeiten der Patch-Clamp-Methode in der anästhesiologischen Forschung. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmedizin. Schmerzther* 31:537-542

Brehmer A, Stach W, Krammer HJ, Neuhuber W (1998) Distribution, morphology and projections of nitrenergic and non-nitrenergic submucosal neurons in the pig small intestine. *Histochem Cell Biol* 109:87–94

Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W, Hens J, Timmermans J-P (1999) Comparison of enteric neuronal morphology as demonstrated by Dil-tracing under different tissue handling conditions. *Anat Embryol* 199:57–62

Brookes SJH, Costa M (1990) Identification of enteric motor neurones which innervate the circular muscle of the guinea pig small intestine. *Neurosci Lett* 118:227–230

Brookes SJH, Song Z-M, Ramsay GA, Costa M (1995) Long aboral projections of Dogiel type II, AH neurons within the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J Neurosci* 15:4013–4022

Brookes SJH, Ewart WR, Wingate DL (1987) Intracellular recordings from myenteric neurones in the human colon. *J Physiol (Lond)* 390:305–318

Brookes SJH, Steele PA, Costa M (1991) Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 42:863–878

Brookes SJH, Song Z-M, Steele PA, Costa M (1992) Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *Gastroenterology* 103:961–973

Brookes SJH, Meedeniya ACB, Jobling P, Costa M (1997) Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine. *JPhysiol* 505:473–491

Cambrova P, Hubka P, Sulkova I, Huliun I (2003) The Pacemaker Activity of Interstitial Cells of Cajal and Gastric Electrical Activity; *Physiol. Res.* 52:275-284

Clerc N, Furness JB, Bornstein JC, Kunze WAA (1998) Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of myenteric neurons of the duodenum in the guinea-pig. *Neuroscience* 82:899–914

Cornelissen W, Timmermans J-P, Bogaert P-P van, Scheuermann DW (1996) Electrophysiology of porcine myenteric neurons revealed after vital staining of their cell bodies. A preliminary report. *Neurogastroenterol Motil* 8:101–109

Costa M, Brookes S, Waterman S, Mayo R (1992) Enteric neuronal circuitry and transmitters controlling intestinal motor function. In: Holle GE, Wood JD (eds) *Advances in the innervations of the gastrointestinal tract*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp115–121

Dogiel AS (1895) Zur Frage über den feineren Bau des sympathischen Nervensystems bei den Säugethieren. *Arch Mikrosk Anat* 46: 305–344

Dogiel AS (1896) Zwei Arten sympathischer Nervenzellen. *Anat Anz* 11:679–687

Dogiel AS (1899) Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. Arch Anat Physiol Leip Anat Abt: 130–158

Erde SM, Sherman D, Gershon MD (1985) Morphology and serotonergic innervation of physiologically identified cells of the guinea pig's myenteric plexus. J Neurosci 5: 617–633

Forrest AS, Ordög T, Sanders KM (2006) Neural regulation of slow-wave frequency in the murine gastric antrum. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol; 290:G486-G495

Furness JB, Bornstein JC, Trussell DC (1988) Shapes of nerve cells in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine revealed by the intracellular injection of dye. Cell Tissue Res 254:561–571

Furness JB, Trussell DC, Pompolo S, Bornstein JC, Smith TK (1990) Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. Cell Tissue Res 260:261–272

Furness JB, Kunze WAA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC (1998) Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. Prog Neurobiol 54:1–18

Gershon, M. D. (1997) Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. Curr Opin Neurobiol 7(1): 101-109.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques: single channels and single cells. *Pflügers Arch.* 391:85-100

Heinzeller, T. and C. M. Büsing (2001) Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg : 47 Tabellen. Stuttgart [u.a.], Thieme

Hirst GDS, Holman ME, Spence I (1974) Two types of neurons in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* 236: 303–326

Hodgkiss JP, Lees GM (1983) Morphological studies of electrophysiologically identified myenteric plexus neurons of the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 8:593–608

Iyer V, Bornstein JC, Costa M, Furness JB, Takahashi Y, Iwanaga T (1988) Electrophysiology of guinea-pig myenteric neurons correlated with immunoreactivity for calcium binding proteins. *J Auton Nerv Syst* 22:141–150

Jing, S., D. Wen, Y. Yu, P. L. Holst, Y. Luo, M. Fang, R. Tamir, L. Antonio, Z. Hu, R. Cupples, J. C. Louis, S. Hu, B. W. Altmann and G. M. Fox (1996) GDNF induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. Cell 85(7): 1113-1124.

Katayama Y, Lees GM, Pearson GT (1986) Electrophysiology and morphology of vasoactive-intestinal-peptide-immunoreactive neurones of the guinea-pig ileum. *J Physiol (Lond)* 378:1–11

Kunze WAA, Bornstein JC, Furness JB (1995) Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ (the intestine) of a mammal. *Neuroscience* 66:1–4

Langley JN (1900) The sympathetic and other related systems of nerves. In: Schäfer EA (ed) Text-book of physiology. Pentland, Edinburgh, pp 616–696

Lin, L. F., D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektesh and F. Collins (1993) "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." Science 260 (5111): 1130-1132

Lüllmann-Rauch, R. (2009) Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart, Thieme.

Mann PT, Southwell BR, Ding YQ, Shigemoto R, Mizuno N, Furness JB (1997) Localisation of neurokinin 3 (NK3) receptor immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract. Cell Tissue Res 289:1–9

Moore, M. W., R. D. Klein, I. Farinas, H. Sauer, M. Armanini, H. Phillips, L. F. Reichardt, A. M. Ryan, K. Carver-Moore and A. Rosenthal (1996) "Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF." Nature 382(6586): 76-79.

NISHI, S. & NORTH, R. A. (1973) Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. J. Physiol., Lond., 231,471-491.

Numberger M, Draguhn A (1996) Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford, 1.Auflage

Parisi, M. A. (1993) Hirschsprung Disease Overview. GeneReviews. R. A. Pagon, T. D. Bird, C. R. Dolan, K. Stephens and M. P. Adam. Seattle (WA)

Parisi, M. A. and R. P. Kapur (2000) Genetics of Hirschsprung disease. *Curr Opin Pediatr* **12** (6): 610-617.

Pichel, J. G., L. Shen, H. Z. Sheng, A. C. Granholm, J. Drago, A. Grinberg, E. J. Lee, S. P. Huang, M. Saarma, B. J. Hoffer, H. Sariola and H. Westphal (1996) Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* **382**(6586): 73-76.

Pompolo S, Furness JB (1990) Ultrastructure and synaptology of neurons immunoreactive for gamma-aminobutyric acid in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J Neurocytol* **19**:539–549

Portbury AL, Furness JB, Young HM, Southwell BR, Vigna SR (1996) Localisation of NK1 receptor immunoreactivity to neurons and interstitial cells of the guinea-pig gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* **367**:342–351

Schäfer K. H., Saffrey M. J., Burnstock G., Mestres-Ventura P. (1997) A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **1**, 109–113. 10.1016/s1385-299x(96)00017-7

Schäfer KH, Hänsgen A, Mestres P. (1999) Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat Rec*; **256**:20–28.

Schemann M (2001) Das enterische Nervensystem, in: *Lexikon der Ernährung*, Band 1, Heidelberg, Berlin, Spektrum, Akad. Verl. 360-364

Song Z-M, Brookes SJH, Costa M (1996) Projections of specific morphological types of neurons within the myenteric plexus of the small intestine of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 285:149–156

Stach W (1980) Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinedünndarm. I. Typ I-Neurone. *Z Mikrosk Anat Forsch* 94:833–849

Stach W (1981) Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinedünndarm. II. Typ II-Neurone. *Z Mikrosk Anat Forsch* 95:161–182

Stach W (1982a) Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinedünndarm. III. Typ III-Neurone. *Z Mikrosk Anat Forsch* 96:497–516

Stach W (1982b) Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinedünndarm. IV. Typ IV-Neurone. *Z Mikrosk Anat Forsch* 96:972–994

Stach W (1985) Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinedünndarm. V. Typ V-Neurone. *Z Mikrosk Anat Forsch* 99:562–582

Stach W (1989) A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. In: Singer MV, Goebell H (eds) *Nerves and the gastrointestinal tract*. Kluwer, Lancaster, pp29–45

Steele PA, Brookes SJH, Costa M (1991) Immunohistochemical identification of cholinergic neurons in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 45:227–239

Suita, S., T. Taguchi, et al. (2005) Hirschsprung's disease in Japan: analysis of 3852 patients based on a nationwide survey in 30 years. *J Pediatr Surg* **40**(1): 197-201; discussion 201-192

Tamura K (1992) Morphology of electrophysiologically identified myenteric neurons in the guinea pig rectum. *Am J Physiol* 262:G545–G552

Tamura K (1997) Synaptic inputs to morphologically identified myenteric neurons in guinea pig rectum from pelvic nerves. *Am J Physiol* 273:G49–G55

Timmermans J-P, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D, De Groodt-Lasseel MHA (1992) Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals. *Eur J Morphol* 30:113–122

Timmermans J-P, Barbiers M, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D, De Groodt-Lasseel MHA (1993) Occurrence, distribution and neurochemical features of small intestinal neurons projecting to the cranial mesenteric ganglion in the pig. *Cell Tissue Res* 272:49–5

Ward SM, Sanders KM (2001) Interstitial Cells of Cajal: Primary Targets of Enteric Motor Innervation, *The Anatomical Record* 262:125-135

Wattchow DA, Brookes SJH, Costa M (1995) The morphology and projections of retrogradely labeled myenteric neurons in the human intestine. *Gastroenterology* 109:866–875

Wood JD (1994) Physiology of the enteric nervous system. In: Johnson LR (ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, pp 423–482

Young HM, Furness JB (1995) Ultrastructural examination of the targets of serotonin-immunoreactive descending interneurons in the guinea pig small intestine. *J Comp Neurol* 356:101–114

Young HM, Furness JB, Povey JM (1995) Analysis of connections between nitric oxide synthase neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *J Neurocytol* 24:257–266

7. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem **Doktorvater PD Dr. J. Schmidtmayer** bedanken, der nicht nur ein angenehmer und gutherziger Mensch, sondern auch ein großartiger Wissenschaftler und Betreuer ist. Seine Faszination für die Forschung ist bemerkenswert.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau **PD Dr. rer. nat. Martina Böttner** bedanken, die eine große Hilfe bei der Durchführung dieser Doktorarbeit war. Die Bereitstellung von Zellkulturen, Bild- und Videomaterial war die Grundlage unserer wissenschaftlichen Untersuchungen.

Ein besonderer Dank gilt der Liebe meines Lebens **Rojin Ahmadi-Ziaeian**, die mir immer den Rücken stärkte und ein ausgezeichneter Motivator war. Ihre liebenswerte und fürsorgliche Art und Weise half mir auch in schweren Zeiten weiterzumachen.

Auch meinen Eltern **Nahid Zenoozi** und **Morteza Ziaeian** sowie meinem Bruder **Shahab Ziaeian** möchte ich besonders danken, ohne die, diese Arbeit nie zustande gekommen wäre. Sie unterstützen mich während des gesamten Studiums und ermöglichten es mir, meinen Traum zu verwirklichen.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinem langjährigen Freund **Stefan Klotz** bedanken, der diese Arbeit Korrektur gelesen hat und der auch sonst sehr hilfreiche Tipps bezüglich der Form der Dissertation gegeben hat.

8. Lebenslauf

Name: **Schahin Ziaeian**

Geboren am **24.11.1986** in Göttingen (Niedersachsen)

Tätigkeiten nach der Approbation

01/07/2015 – heute

Angestellter Zahnarzt in der Praxis Ziaeian

01/07/2013 – 30/06/2015

Assistenz Zahnarzt in der Praxis Ziaeian (Elisabethstr. 49
24143 Kiel

Studium

10/2007 – 24/06/2013

Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

22/09/2008

Naturwissenschaftliche Vorprüfung

25/03/2010

Zahnärztliche Vorprüfung

24/06/2013

Zahnärztliche Prüfung

01/07/2013

Approbation als Zahnarzt

Zivildienst

10/2006 – 07/2007

Zivildienst in der evangelischen Kindertagesstätte
Hasseldieksdamm (Kiel)

Schulische Ausbildung

08/1993 – 08/1997

Grundschule am Göteborgring/ Goetheschule/
Grundschule Russee (Kiel)

08/1997 – 08/2005

Max-Planck-Schule (Kiel)

08/2005 – /06/2006

Integrierte Gesamtschule Hassee (Kiel)

06/2006

Abitur