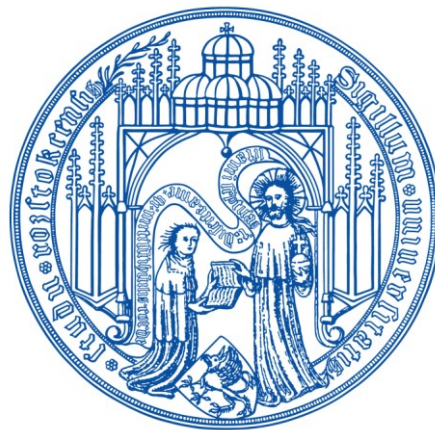


AUS DEM OSCAR LANGENDORFF INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. R. KÖHLING

**UNTERSUCHUNG ZUR ERREGUNGSKOPPLUNG AM GLATTEN GEFÄßMUSKEL DER
PORTALVENE MITTELS MEHRDIMENSIONALER KORRELATIVER NETZWERKANALYSE**



INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
„DOKTOR DER MEDIZIN“

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

VORGELEGT VON
SEBASTIAN IGELBRINK
AUS DORMAGEN

ROSTOCK, 2012

DEKAN: PROF. DR. MED. EMIL REISINGER

1. GUTACHTER: PROF. DR. MED. THOMAS NOACK, OSCAR LANGENDORFF INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE, UNIVERSITÄT ROSTOCK
2. GUTACHTER: PROF. DR. MED. GUSTAV STEINHOFF, KLINIK UND POLIKLINIK FÜR HERZCHIRURGIE, UNIVERSITÄT ROSTOCK
3. GUTACHTER: PROF. DR. MED. ANDREAS PATZAK, INSTITUT FÜR VEGETATIVE PHYSIOLOGIE, CHARITÉ BERLIN

DATUM DER EINREICHUNG: 24. AUGUST 2012

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 30. APRIL 2013

FÜR MEINE FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1. <u>EINLEITUNG</u>	1
1.1. VASOMOTION	3
1.2. KOORDINIERTES GEFÄßVERHALTEN	4
1.3. ENTSTEHUNG UND VERMITTLUNG FORTGELEITETER GEFÄßANTWORTEN	5
1.4. GAP JUNCTIONS	8
1.5. KALZIUMOSSZILATION ALS MOTOR DER VASOMOTION	10
1.6. INTERSTITIELLE ZELLEN NACH CAJAL	11
1.7. FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ	14
2. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
2.1. LÖSUNGEN	16
2.2. PRÄPARATION	17
2.3. BELADUNG UND FLUORESZENSMESSUNG DES PRÄPARATES	18
2.4. VERSUCHSAUFBAU	19
2.4.1. ORGANBAD	19
2.4.2. MIKROSKOP	20
2.5. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	22
2.5.1. MESSABLAUF	22
2.5.2. BERECHNUNG DER RELATIVEN FLUORESZENZINTENSITÄT	22
2.6. AUSWERTUNG DER DATEN	22
2.6.1. SCHEMA	23
2.6.2. KREUZKORRELATION UND NORMIERUNG DER DATEN	24
2.6.3. ANWENDUNG DER KREUZKORRELATION	25
3. <u>ERGEBNISSE</u>	27
3.1. KOPPLUNGSANALYSE DURCH KREUZKORRELATION	27
3.2. KOPPLUNGSVERHALTEN GLATTER MUSKELZELLEN DER PORTALVENE	32
3.3. RÄUMLICHE KOPPLUNG GLATTER MUSKELZELLEN	33
3.4. PHYSIOLOGISCHE & PHARMAKOLOGISCHE MODULATION DER KOPPLUNGSSTÄRKE	35
3.5. RELATIVE VERÄNDERUNG DER KOPPLUNGSSTÄRKE	38
3.6. KOPPLUNGSSTÄRKE & SIGNALWEITERLEITUNG ÜBER LÄNGERE DISTANZEN	42

4.	<u>DISKUSSION</u>	45
4.1.	KORRELATIVE NETZWERKANALYSE NETZWERKARTIGER STRUKTUREN	45
4.2.	LAUFZEITANALYSE	48
4.3.	SIGNALPROPAGATION ÜBER GAP JUNCTIONS	49
4.4.	MULTIFOKALE ERREGUNGS-AUSBREITUNG	51
4.5.	MODELL DER KOPPLUNG: GEKOPPELTE HOT SPOTS	53
4.6.	MODULATION DER KONTRAKTION	55
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	57
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	59
7.	<u>ANHANG</u>	59
7.1.	VERÖFFENTLICHUNGEN	67
7.2.	LEBENS-LAUF	68
7.3.	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG / EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG NACH § 4 ABS. 2.5	69
7.4.	DANKSAGUNG	70
8.	<u>THESEN</u>	71

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

ABBILDUNGEN

ABBILDUNG 1: PARALLELE REGISTRIERUNG DER SPONTANEN MECHANISCHEN UND ELEKTRISCHEN AKTIVITÄT DER RATTENPORTALVENE	6
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PRÄPARATION	17
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ORGANBADES	19
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MESSPLATZES	21
ABBILDUNG 5: BERECHNUNG DER RELATIVEN FLUORESZENZINTENSITÄT	22
ABBILDUNG 6: AUSWERTUNGSSCHEMA	24
ABBILDUNG 7: DEFINITION DER KREUZKORRELATIONSFUNKTION	25
ABBILDUNG 8: ANWENDUNG DER KREUZKORRELATION	26
ABBILDUNG 9: REGISTRIERUNG DER ZEITABHÄNGIGEN INTRAZELLULÄREN KALZIUMOSZILLATION	27
ABBILDUNG 10: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ZEITABHÄNGIGEN KALZIUMOSZILLATION	28
ABBILDUNG 11: KREUZKORRELIERTE KALZIUMSIGNALE DER MESSFELDER I–III	29
ABBILDUNG 12: KORRELATIONSDIFFERENZ DER MESSFELDER I-III	30
ABBILDUNG 13: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KALZIUMSIGNALERHEBUNG	31
ABBILDUNG 14: KREUZKORRELIERTES KALZIUMSIGNAL	31
ABBILDUNG 15: PHYSIOLOGISCH RÄUMLICHES KOPPLUNGSVERHALTEN GLATTER MUSKELZELLEN	33
ABBILDUNG 16: VERGLEICH LONGITUDINALER UND TRANSVERSALER KOPPLUNG GLATTER MUSKELZELLEN	34
ABBILDUNG 17: VERGLEICH NORADRENALIN STIMULIERTER GLATTER MUSKELZELLEN MIT KONTROLLWERTEN	35
ABBILDUNG 18: VERGLEICH DER KOPPLUNG OCTANOL BEHANDELTER GLATTER MUSKELZELLEN MIT KONTROLLWERTEN	37
ABBILDUNG 19: RELATIVE VERÄNDERUNG DER KOPPLUNGSSTÄRKE NACH NORADRENALINSTIMULATION	38
ABBILDUNG 20: RELATIVE VERÄNDERUNG DER KOPPLUNGSSTÄRKE NACH OCTANOLBEHANDLUNG	40

ABBILDUNG 21: KOPPLUNGSSTÄRKE UND SIGNALWEITERLEITUNG GLATTER MUSKELZELLEN ÜBER DISTANZ	43
ABBILDUNG 22: MODELLHAFTE DARSTELLUNG DER HOT SPOTS INNERHALB EINES NICHT STIMULIERTEN GEFÄßABSCHNITTS	51
ABBILDUNG 23: MODELLHAFTE DARSTELLUNG DER HOT SPOTS INNERHALB EINES NORADRENALINSTIMULIERTEN GEFÄßABSCHNITTS	53
ABBILDUNG 24: KALZIUMOSZILLATION ZWEIER MESSFELDER	55
 TABELLEN	
TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DER PRÄPARIERLÖSUNG	16
TABELLE 2: ZUSAMMENSETZUNG DER KREBSLÖSUNG	16
TABELLE 3: MITTELWERTE UND STANDARDFEHLER ZU ABBILDUNG 16	34
TABELLE 4: MITTELWERTE UND STANDARDFEHLER ZU ABBILDUNG 17	36
TABELLE 5: MITTELWERTE UND STANDARDFEHLER ZU ABBILDUNG 18	37
TABELLE 6: MITTELWERTE UND STANDARDFEHLER DER RELATIVEN VERÄNDERUNG DES KALZIUMSIGNALS NACH NORADRENALINSTIMULATION	39
TABELLE 7: MITTELWERTE UND STANDARDFEHLER DER RELATIVEN VERÄNDERUNG DES KALZIUMSIGNALS NACH BEHANDLUNG GLATTER MUSKELZELLEN MIT OCTANOL	40
TABELLE 8: MITTELWERTE UND STANDARDFEHLER ZU ABBILDUNG 21	43

1. EINLEITUNG

Die glatte Muskelzelle ist eine regulatorische Endstruktur von vielen vegetativen Prozessen im Organismus des Menschen. Aus medizinischer Sicht ist der glatte Muskel ein bedeutsamer Faktor in der Kette physiologischer Prozesse, der eine gewisse Intervention ermöglicht. Therapeutische Maßnahmen zielen häufig auf die gefäßregulatorischen Organkomponenten, z.B. Koronararterien sowie das Herz oder auf Komponenten der endogenen Rhythmizität, wie z.B. Magen, Darm, Uterus oder Harnwege. So stellen große Teile der Herz-Kreislauftherapie den Gefäßmuskel in Herz, Niere und Peripherie in den Mittelpunkt der medizinischen Intervention.

Aber auch bei Formen der Kolik, bei Störungen des enteralen Nahrungstransportes und bei Asthma bronchiale sind es vor allem die glattmuskulären Kontraktionsprozesse, die man beeinflussen möchte. Dies geschieht durch eine Vielzahl von Rezeptoragonisten und Antagonisten sowie durch Modulatoren der Ionenkanäle in den Zellmembranen glatter Muskelzellen [1, 2].

Aus der Vielzahl der Organe, welche zum Teil mit glatter Muskulatur ausgestattet sind und deren sehr unterschiedlichen Reagibilität und Kontraktionsverhalten, hat sich früh ein Modell etabliert, welches die glatte Muskulatur in sogenanntes Multi- und Single-Unit Gewebe einteilt [3]. Nach dieser Vorstellung werden als Multi-Unit Muskeln diejenigen bezeichnet, die nur einen geringen Kopplungsgrad aufweisen. Diese Gewebe sind stark vegetativ innerviert, um eine motorische Aktivität zu erzeugen. Damit liegen viele voneinander unabhängige funktionelle Einheiten vor.

Als Beispiele für den Multi-Unit-Typ werden häufig Muskeln der Iris oder des Ductus deferens genannt. Single-Unit Muskel sind nach dieser Vorstellung elektrisch gut gekoppelt. Die Muskelzellen dieses Typs kontrahieren bei Erregung nahezu gleichzeitig, da sie als Einheit arbeiten. Single-Unit Muskeln weisen eine

starke spontanmyogene Aktivität auf. Man findet sie in den Wänden viszeraler Organe und in Blutgefäßen.

Diese Klassifizierung ist heutzutage weitgehend überholt, obwohl sie noch häufig in den Lehrbüchern zu finden ist.

Bei den Blutgefäßen ist die Einteilung nach obiger Klassifizierung nur schwer möglich. Kleine Haut- und Koronargefäße weisen phasisch-rhythmische Spontanaktivität auf, während perivaskuläre Nervenfasern in großer Vielzahl an peripheren Gefäßen vorhanden sind, obwohl diese zum Teil keinerlei Spontanaktivität besitzen. Andererseits lässt sich an einem relativ großen Gefäß, der Portalvene, eine ausgeprägte Spontanaktivität nachweisen, welche auch in völlig denerviertem Zustand erhalten bleibt.

In vielen Untersuchungen wird stellvertretend für den glatten Gefäßmuskel die Aorta aufgrund ihrer leichten Präparier- und guten Reproduzierbarkeit eingesetzt. Aufgrund der Vielfalt der motorischen Antworten der Gefäßmuskulatur ist dieses vaskuläre Modell nur mit Vorbehalt als allgemeingültig zu werten.

Eine andere Einteilung der glatten Muskulatur könnte die unterschiedlichen Kontraktionsformen berücksichtigen. Diese lassen sich nach ihrer Ablaufform in anhaltend-tonisch und phasisch-rhythmisch unterscheiden. Arterien weisen stark tonische Aktivität auf, zeigen aber zusätzlich im Myographen einen basalen Tonus, der Ausdruck einer spontanen Aktivität des Gefäßmuskels ist. Zwischen rein tonischer und phasischer Aktivität gibt es alle denkbaren Mischformen. Die Vielfalt an charakteristischen Kontraktionsmustern des glatten Muskelgewebes ist trotz vielfältiger Untersuchungen in ihren ursächlichen Mechanismen nicht vollständig verstanden. Insbesondere die Spontanaktivität lässt sich mit elektrophysiologischen Messungen (Ionenstrommessung oder Patch-Clamp-Technik) nicht zufriedenstellend rekonstruieren [4, 5].

In dieser Arbeit wird das spontan oszillierende Kalziumsignal der glatten Muskelzellen als Grundlage zur Untersuchung der Erregungsfortleitung sowie der Zell-Zell-Kopplung von Gefäßmuskeln genutzt. Dabei wird erstmals eine

Methode angewendet, die Kopplungseigenschaften eines intakten Gewebstückes aufzeichnen kann.

Im Folgenden sollen zunächst die wesentlichen Eigenschaften glatter Muskelzellen und deren synchronisiertes Gefäßverhalten erläutert werden, anschließend wird der zur Bearbeitung der Fragestellung gewählte Ansatz vorgestellt.

1.1. VASOMOTION

Rhythmische Veränderungen des Gefäßtonus werden als Vasomotion bezeichnet. Die erste detaillierte Beschreibung der Vasomotion liegt bereits 150 Jahre zurück. Jones untersuchte dazu 1852 Venen von Fledermausflügeln und fand rhythmische Gefäßkontraktionen vor, deren Ursprung er jedoch nicht erklären konnte [6].

Auch in Koronargefäßen, kleinen Arterien und Lymphgefäßen ist unter bestimmten Erregungszuständen Vasomotion zu beobachten. Zumeist handelt es sich dabei um einen mittleren Gefäßtonus mit partieller Kaliumkanalblockade, welche zu einer leichteren Depolarisation führen kann. Da der Blutkreislauf in komplexen Organismen die metabolischen Bedürfnisse aller Zellen im Körper befriedigen soll, sind die Einflüsse auf den Gefäßmuskel vielfältig. Veränderungen des vegetativen Tonus sowie lokale Milieuveränderungen des pH-Wertes, O_2 -Partialdruckes und anderer Stoffwechselmetaboliten, wie z.B. Adenosin, beeinflussen die Nachfrage nach oxygeniertem Blut. Diese variiert sowohl lokal als auch zeitlich durch den jeweiligen Funktionsstatus der Organe. Deshalb ist es wichtig eine präzise Regulation des Blutflusses durch Veränderung des Blutdruckes, Durchflusses, Metabolitenspiegels und neuronaler Signale zu gewährleisten. Dabei erfordert die Flusskontrolle die Erfassung von metabolischen und hämodynamischen Parametern. Wichtige Effektoren der Regulationsmechanismen sind Arteriolen und kleine Arterien, die vor den von ihnen versorgten Gewebsabschnitten liegen. Der Druck fällt beim Durchfließen dieser Gefäße deutlich ab [7]. Somit wird eine erhebliche Beteiligung dieser Gefäße am vaskulären Gesamtwiderstand belegt [8, 9].

Vasomotion, welche zu einer zyklischen (minutenrhythmischen) synchronisierten Durchmesseränderung kleiner Arterien führt, ist für einen Gefäßabschnitt von vitaler Bedeutung. Diese zeitlichen Durchmesserinhomogenitäten, die sich wie eine myogene Pumpe auf die Strömung von arteriellem und venösem Blut sowie auf die Strömung der Lymphflüssigkeit auswirken, bestimmen das Fließverhalten und die Durchblutung wesentlich [10].

Pathologische Veränderungen des peripheren Gefäßwiderstandes als Ursache für Hypertension [11] verdeutlichen die Notwendigkeit des Verständnisses der zugrunde liegenden Mechanismen.

Obwohl Vasomotion als Phänomen schon lange bekannt ist, sind die Ursachen und funktionellen Zusammenhänge immer noch unbefriedigend verstanden.

1.2. KOORDINIERTES GEFÄßVERHALTEN

Eine Form des koordinierten Gefäßverhaltens ist die fortgeleitete Gefäßreaktion oder fortgeleitete Gefäßantwort (engl.: conducted response). Der aufsteigenden Vasodilatation im Gefäßmuskel soll nach einer Hypothese von Hilton eine Signalvermittlung innerhalb der arteriellen Gefäßwand zugrunde liegen [12].

Diese Hypothese wurde später von Duling und Segal bestätigt. Sie zeigten, dass intravasal applizierte vasoaktive Substanzen nicht nur eine lokale Reaktion unmittelbar am Applikationsort auslösen, sondern dass die Gefäße auch proximal und distal zur Applikationsstelle dilatieren [13]. Allerdings konnte in späteren Versuchen gezeigt werden, dass eine Gefäßantwort, welche dilatatorisch mit dem NO-Donor Nitroprussid-Natrium ausgelöst wurde, sich nicht über den Gefäßmuskel ausbreitet [14]. Die Applikation von NO führt zu einer lokalen Dilatation, eine Erweiterung entfernter Gefäßabschnitte wie nach Acetylcholin-Applikation war jedoch nicht zu beobachten. Scherkraftabhängig freigesetztes NO aus dem Endothel der Gefäße dürfte folglich keinen Einfluss auf fortgeleitete Gefäßantworten haben. Auch das zeitliche Verhalten der induzierbaren Gefäßantworten ist unterschiedlich. Dass die maximale flussinduzierte Vasodilatation des Skelettmuskels erst nach 30-150 Sekunden erreicht wird [15],

während bei der fortgeleiteten Gefäßreaktion die maximale Dilatation an distalen Abschnitten unmittelbar (innerhalb weniger ms) nach geeignetem lokalem Stimulus auftritt, dürfte als weiterer Beleg dafür gelten, dass es sich um unterschiedliche Mechanismen handelt [16]. (2 Sätze)

Weitere Untersuchungen von Segal und Duling zeigen, dass fortgeleitete Gefäßreaktionen nicht auf nervalen Reflexen oder nervaler Impulsmodulation beruhen können [13, 16]. Durch die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle mittels Tetrodotoxin wurde die Aktivität perivaskulärer Nerven inhibiert. Die fortgeleiteten Gefäßreaktionen blieben erhalten. Diese Befunde unterstreichen die Ergebnisse von Hilton und deuten auf eine innerhalb der Gefäßwand oder über das Endothel vermittelte Signalausbreitung hin [10].

1.3. ENTSTEHUNG UND VERMITTLUNG FORTGELEITETER GEFÄßANTWORTEN

Es ist allgemein akzeptiert, dass die Kontraktion glatter Muskelzellen durch eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums initiiert wird. Unterschieden werden kann dabei zwischen glatten Muskelzellen, die den Bedarf an Kalzium durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern decken und solchen, bei denen der Einstrom extrazellulärer Kalziumionen durch spannungsabhängige Kalziumkanäle die wesentliche intrazelluläre Erhöhung von Kalzium erzeugt [17]. Neben der Erhöhung des intrazellulären Kalziums wird die Kontraktion durch Phosphorylierung der Myosinuntereinheit MLC20 ausgelöst [18]. Verantwortlich dafür ist die vom Kalzium-Calmodulin-Komplex abhängige Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) [19] oder andere kalziumunabhängige Kinasen, wie z.B. Rho-kinase, Integrin-Linked-Kinase (ILK) oder Zipper-Interacting-Protein-Kinase (ZIPK) [20, 21]. Die Phosphorylierung von MLC20 erleichtert die Bindung von Actin an Myosin und startet den Querbrückenzyklus. Die Relaxation wird durch einen sinkenden intrazellulären Kalziumspiegel eingeleitet. Bedingt durch den verringerten Kalziumspiegel dissoziiert der Kalzium-Calmodulin-Komplex. Die Myosinphosphatase MLCP sorgt für eine Dephosphorylierung der Myosinuntereinheit und hält damit die Kontraktibilität der glatten Muskelzelle in

Balance [22, 23]. Dieser Mechanismus findet sich in jedem glattmuskulären Gewebe. Bei genauerer Betrachtung der Kontraktion zeichnen sich einige glatte Muskeln durch charakteristische rhythmische Kontraktionsformen aus. Am glatten Gefäßmuskel bildet die Vasomotion die Grundlage auf der kreislaufregulatorische Prozesse ablaufen. Um ein koordiniertes Miteinander der spontanaktiven Muskelzellen zu ermöglichen, ist eine sehr hohe Geschwindigkeit des vernetzenden Signals notwendig. Die Geschwindigkeit mit der sich fortgeleitete Gefäßantworten entlang der Skelettmuskelarteriolen ausbreiten, deutet dabei auf eine elektrische Signalvermittlung hin [16].

Bereits 1964 beschreiben Funaki und Bohr [24] sowie 1967 Axelsson spontane elektrische und mechanische Aktivität am glatten Muskel der Rattenportalvene [25]. Dabei präparierten sie 0,5 mm x 3 mm große Streifen glatter Muskelzellen und überführten diese in eine Nährlösung (Krebslösung, siehe Tabelle 2). Daraufhin zeigten sich spontane Kontraktionen, ähnlich der in Abbildung 1 registrierten.

Abbildung 1 zeigt einen kurzen Ausschnitt der Registrierung elektrischer und mechanischer Aktivität. Die Kontraktionen treten mit einer typischen Frequenz von ca. 3/min auf.

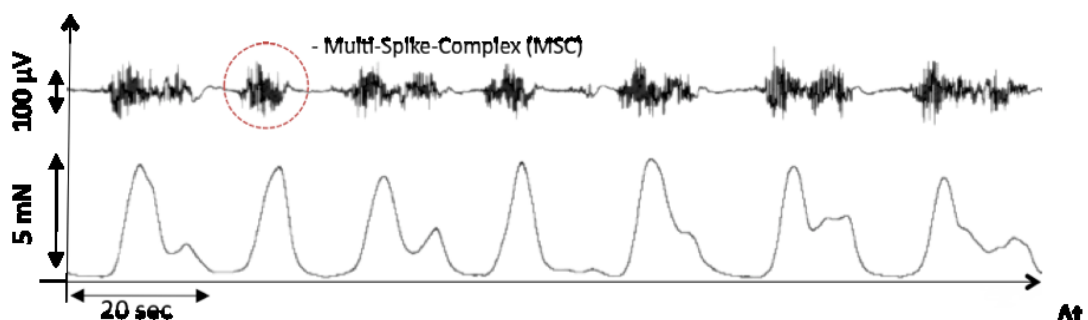


Abbildung 1: Parallele Registrierung der spontanen mechanischen und extrazellulär abgeleiteten elektrischen Aktivität der Rattenportalvene.

Obere Kurve: Elektrische Aktivität. Untere Kurve: Mechanik. Eichung der Achsen wie in der Abbildung angegeben [26].

Die elektrische Aktivität wurde mit Feldpotentialelektroden extrazellulär abgeleitet. Intrazelluläre Potentialmessungen an phasisch kontrahierenden Muskeln wie der Teania Coli und der Portalvene des Meerschweinchens [27, 28] sowie an Muskelzellen des Magenantrums [29] zeigen, dass die Kontraktionen durch einen Wechsel von Phasen schneller elektrischer Aktivität und Ruheperioden ausgelöst werden.

Die Phasen der elektrischen Aktivität werden durch spontan auftretende Multi-Spike-Complexe (MSC) gebildet (siehe Abbildung 1). MSC treten mit einer Frequenz von 3/min und einer Dauer von 5 s auf. Jeder Komplex wird vom nächsten durch eine 15 – 20 s dauernde Ruheperiode getrennt. Der MSC besteht aus 15-25 schnelle Depolarisationen („fast spikes“), die die langsameren Membrandepolarisationen („slow waves“) überlagern. Diese Membrandepolarisationen führen zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, die den für die Kontraktion nötigen Kalziumstrom liefern.

Obwohl erste Messungen der spontanen elektrischen Aktivität vor mehr als 40 Jahren durchgeführt wurden, ist deren Ursprung und räumliche Ausbreitung weiterhin ungeklärt. Die Literatur gibt Hinweise auf eine longitudinale [30] beziehungsweise transversale Achse [31]. Besonders erwähnenswert ist eine Studie von Hermsmeyer aus dem Jahre 1973. Dieser untersucht die Portalvene mit sechs Mikroelektroden und stellt basierend auf seinen Messergebnissen ein Model der elektrischen Ausbreitung vor. Dabei zeigt er, dass sich die elektrische Spontanaktivität nicht wie von Nerven bekannt kontinuierlich fortgeleitet über den Muskel „bewegt“, sondern sich zentrifugal von diffus verteilten Arealen ausbreitet [32].

Weiterhin zeigen Welsh und Segal durch Applikation von Acetylcholin eine sich über das Gewebe ausbreitende Depolarisation, die synchron mit der Kontraktion der Muskelzellen auftritt [33]. Da das elektrische Signal über eine größere Strecke fortgeleitet wird als es bei einer passiven elektrotonischen Ladungsverschiebung zu erwarten wäre, muss das Signal durch einen bisher ungeklärten Verstärkungsmechanismus entlang des Gefäßes regeneriert werden [34].

1.4. GAP JUNCTIONS

Damit aus Einzelzellen ein Organ entsteht, ist eine funktionelle Organisation der Zellen in Zellverbänden mit Kommunikationsmechanismen zwischen den Einzelzellen erforderlich. Auf der Suche nach einem Vermittler des zellübergreifenden elektrischen Signals entlang der Arteriolen wird bereits Ende der 80er Jahre die Rolle von Gap Junctions diskutiert. Gap Junctions bestehen aus Proteinkomplexen, die den zytoplasmatischen Raum zweier benachbarter Zellen funktionell miteinander verbinden. Jede Gap Junction ist aus zwei Halbkanälen, sogenannten Connexonen aufgebaut. Dabei bildet jede Zelle ein Connexon, das sich mit dem Connexon der korrespondierenden Zelle im Interzellularraum verbindet. Die Connexone sind aus 6 Connexinen aufgebaut, die sich um eine zentrale Pore der Zellmembran gruppieren [35]. Dabei kann ein Connexon homomer (eine Art Connexin) oder heteromer (mehrere unterschiedliche Arten Connexine) aufgebaut sein. Abhängig von der Zusammensetzung kann die Permeabilität des Kanals variieren.

Elektrophysiologische Untersuchungen an interagierenden Nervenzellen im Rückenmark des Flusskrebsses konnten 1959 erstmals Zell-zu-Zell Kopplung über Gap Junctions zeigen [36]. Der Begriff Gap Junction (engl.: Gap = Lücke) geht auf Revel und Karnovsky zurück [37]. Diese stellten erstmals mit elektronenmikroskopischen Bildern die scheinbare Kontinuitätsunterbrechung der benachbarten Plasmamembranen dar. Farroway brachte per Injektion von Lucifer Yellow den Beweis der direkten Zellkopplung über Gap Junctions [38]. Inzwischen ist allgemein akzeptiert, dass nur Gap Junctions Durchlass von Farbstoffen wie Lucifer Yellow oder Neurobiotin zwischen den Zellen ermöglichen. Ähnliche Untersuchungen führte Verheule 1997 zur elektrischen Kopplung der Zellen mit Patch-Clamp-Technik durch. Dabei beobachtete er, dass nach Stimulation der Eingangszelle die elektrischen Ströme auch an der Ausgangszelle nahezu unverändert messbar sind [39].

Connexine können in nahezu allen Geweben vieler Säugetiere nachgewiesen werden. Bis heute sind 21 Subtypen im menschlichen Genom identifiziert, vier

davon in vaskulären Muskelzellen (Cx45, Cx43, Cx40, Cx37) [35, 40]. Gap Junctions können innerhalb weniger Sekunden in die Zellmembran eingebaut werden und auf diese Weise eine Zellverbindung herstellen. Sie ermöglichen den unspezifischen Austausch von Ionen, Wasser und kleinen molekularen Verbindungen von maximal 1kDa Masse und einem Durchmesser von 1,5 bis 2 nm. Weitere Untersuchungen legen nahe, dass auch pathologische zelluläre Veränderungen wie neoplastische Transformationen über Gap Junctions vermittelt werden können [41].

Für den hier entscheidenden Zusammenhang der elektrischen Kopplung, ist bedeutsam, dass ein interzellulärer Kanal mit niedrigem elektrischem Widerstand entsteht, der die elektrotonische Ausbreitung zwischen benachbarten Zellen ermöglicht. Allgemein würden die elektrotonischen Eigenschaften der Gap Junctions eine gute Basis für die Fortleitung der elektrischen Erregung liefern. Ob sie jedoch die einzige Struktur in der Gefäßwand darstellen, über welche die elektrischen Erregungen fortgeleitet werden, ist Gegenstand intensiver Untersuchungen.

Neben der unspezifischen Gap Junction Blockade durch Entkoppler wie Saccharose-Lösung, Octanol oder einer hohen CO₂-Konzentration [16] stehen heute Verfahren zur Verfügung, die eine differenzierter Betrachtung einzelner Connexine und deren Funktion erlauben. GAP-Peptide (Gap Junction imitierendes Peptid) beispielsweise bestehen aus 20 Peptiden und lagern sich an die extrazelluläre Domäne der Connexine. Es wird sowohl der Kanal als auch die Bildung des Kanals blockiert. Dieses Verfahren eignet sich insbesondere für in vitro Untersuchungen, da in vivo die notwendigen Konzentrationen nicht erreicht werden können ohne die Zelle in ihrer Funktion massiv zu beeinträchtigen [42, 43].

Eine Studie um de Wit beschreibt Versuche mit genetisch modifizierten Mäusen, bei denen das Gen für ein bestimmtes Connexin entfernt wird. Bei Tieren mit Verlust von Cx40 ist eine schwächere Dilatationsamplitude nach Acetylcholin-Applikation nachweisbar als bei Tieren mit Cx40. Interessanterweise wird die

kaliuminduzierte Depolarisation bei genetisch veränderten Tieren nicht beeinflusst. Lediglich endothel-abhängige Stimuli werden nicht physiologisch fortgeleitet [44]. Obwohl diese Untersuchung eine Beteiligung von Connexinen an der Vasomotion belegt, zeigt sie zugleich, dass mehr Strukturen zur Steuerung der Vasomotion notwendig sein müssen als die alleinige Kontrolle des elektrischen Signals durch Gap Junctions erklären würde.

1.5. KALZIUMOSZILLATION ALS MOTOR DER VASOMOTION

Kleine Mesenterialarterien gehören zu den Gefäßen, die eine ausgeprägte Spontanaktivität zeigen können. In einer Studie von Aalkjaer und Mitarbeitern wurden diese Oszillationen genauer untersucht [45, 46]. Aus Kraft- und Kalziummessungen schlussfolgern sie, dass zyklisch freigesetztes intrazelluläres Kalzium als Motor der Vasomotion angesehen werden kann.

Diese Arbeitsgruppe hat sich der Genese der Vasomotion intensiv gewidmet und versucht zu belegen, dass die für die Kontraktion notwendige Kalziumwelle durch eine wiederkehrende Ausschüttung und Wiederaufnahme des Kalziums aus - beziehungsweise in das intrazellulär gelegene sarkoplasmatische Retikulum der glatten Muskelzelle generiert wird [47, 48]. Peng, Nilsson und Aelkjaer unterstützen die These, dass die Synchronisation der einzelnen Muskelzellen über die wiederholende Änderung des intrazellulären Kalziumspiegel und der damit verbundenen Kalziumoszillation zustande kommt. Sie beschreiben die intrazelluläre Kalziumoszillation einzelner Muskelzellen als Grundrhythmus der koordinierten Vasomotion [49]. Dabei führt das aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzte Kalzium zur Aktivierung eines depolarisierenden elektrischen Stroms. Dieser breitet sich, getragen von Gap Junctions, über das gesamte Gewebe aus und führt durch gleichzeitige Aktivierung eines genügend großen Kollektivs zu einer simultanen Depolarisation aller Muskelzellen [50]. Die gleichzeitig depolarisierten Muskelzellen steigern durch spannungsabhängige Kalziumkanäle den intrazellulären Kalziumspiegel. Grundlage dafür ist die Aktivierung kalziumabhängiger Inositol 1,4,5-Triphosphatase-Rezeptoren oder Ryanodine-Rezeptoren, die wiederum die gleichzeitige Öffnung intrazellulärer

Kalziumspeicher in Form der sarkoplasmatischen Retikuli aller beteiligten Muskelzellen ermöglichen [51]. Die unsynchronisierten Oszillationen einzelner glatter Muskelzellen sind durch das Zusammenspiel von Membranpotential und intrazellulärem Kalziumspiegel funktionell gekoppelt. Auf diese Weise können sie synchronisiert Vasomotion initiieren und aufrechterhalten. Dieses Modell unterscheidet sich somit grundlegend von aktionspotentialgesteuerten synchronisierten Geweben. Auch die kontraktionsteuernden Pacemakerzellen im Gastrointestinaltrakt haben in diesem Modell keine Bedeutung. Ein auf Pacemakerzellen basierender Ansatz wird im Folgenden vorgestellt.

1.6. INTERSTITIELLE ZELLEN NACH CAJAL

Der Ursprung spontaner Aktivität ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Johansson und Ljung postulierten 1967, dass die Spontanaktivität der Portalvene vom Muskel selbst generiert wird und bezeichnen den Ursprung der Spontanaktivität entsprechend als myogen [52]. Da zu dieser Zeit angenommen wurde, dass der glatte Muskel ein homogenes Gewebe ist, gingen auch Tomita & Watanabe von der myogenen Spontanaktivität aus und diskutierten 1973 Form und Amplitude der elektrischen Aktivität. Ihre Versuche zeigten, dass das Auftreten von mechanischer Spontanaktivität zum Teil auch bei sehr schwach ausgeprägten slow waves zu beobachten war und sich vor allem durch die Gegenwart der fast spikes äußerte. Sie folgerten, dass die in allen spontanaktiven glatten Muskeln existierende langsame Membrandepolarisation Schrittmacherpotential hat. Ihre Vermutung stützen sie auf einen hohen Q_{10} -Wert im Gewebe und argumentierten, dass slow waves metabolisch angetrieben und durch zytoplasmatisches Kalzium moduliert werden können [53]. Zu diesem Zeitpunkt war bekannt, dass bei einer Trennung der Muskelschichten die Spontanaktivität in der longitudinalen Schicht erhalten bleibt, während sie in der zirkulären Schicht zum Erliegen kommt. Bortoff schlussfolgerte 1976, dass die longitudinale Schicht aus sich selbst heraus Rhythmizität erzeugt und damit für die Spontanaktivität verantwortlich ist [54].

Thuneberg zeigte 1982 am Darmmuskel, dass spontane Kontraktionen mit der Verteilung der Cajalzellen korrelieren und dass bei einer Teilung in longitudinale und zirkuläre Muskelschichten die Cajalzellen mit der longitudinalen Schicht verbunden bleiben, während der Kontakt zur zirkulären Schicht und damit die Fähigkeit zu spontanen Kontraktionen verloren geht. Er postulierte, dass die Schrittmacherfunktion nicht von den Muskelzellen, sondern von Cajalzellen ausgehen könnte. Darauf aufbauend entfernte Thuneberg durch photochemische Ablation das Netzwerk aus Cajalzellen und beobachtete dabei das Verschwinden der slow-wave Aktivität [55].

Bezogen auf den Gastrointestinaltrakt ist die Pacemakerfunktion der Cajalzellen heute weitgehend, für den Gefäßmuskel jedoch nicht unwidersprochen, akzeptiert. Cajalzellen wurden bereits 1889 von dem spanischen Neuroanatomen Santiago Ramón y Cajal entdeckt [56]. In seiner Untersuchung am Darmgewebe beobachtete er die bis dahin bekannten Zellkonglomerate bestehend aus Muskel- und Nervenzellen, sowie Fibroblasten. Darüberhinaus beschrieb er einen weiteren Zelltyp – die heute nach ihm benannte Cajalzelle oder Interstitial Cells of Cajal.

Lange blieb die Funktion dieser Zellen unbestimmt. Heute gilt als gesichert, dass Cajalzellen mit langen aufgezweigten Fortsätzen ein komplexes Zellsystem bilden, das Vermittlerfunktion zwischen dem enterischen Nervensystem und den glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes übernimmt [57]. Cajalzellen exprimieren das c-kit Protoonkogen, wodurch sich diese gezielt histologisch anfärben lassen [58]. So ließ sich belegen, dass diese sowohl mit glatten Muskelzellen als auch mit Nervenzellen über Gap Junctions kommunizieren.

Im Auerbach-Plexus des Dickdarms und zwischen glatten Muskelzellen der Darmwand lassen sich ebenfalls Cajalzellen nachweisen. Diese triggern lokale Kontraktionen der Darmwandmuskulatur ohne zu kontrahieren und kontrollieren die durch das vegetative Nervensystem gesteuerte Darmaktivität.

Bolton und Mitarbeiter gelang 2003 die Identifikation von Zellen in der Mesenterialarterie des Meerschweinchens, die in Eigenschaft und Morphologie Cajalzellen gleichen [59]. Kurze Zeit später wies die gleiche Arbeitsgruppe

Cajalzellen in der Portalvene des Kaninchens nach [60]. Durch weitere Versuche an der Portalvene mittels Elektronenmikroskopie, konfokaler Lasermikroskopie und Patch-Clamp-Technik wurden direkte funktionelle Zellverbindungen zwischen Cajalzellen und glatten Muskelzellen der Portalvene sowie zwischen Cajalzellen untereinander nachgewiesen [61]. Hinsichtlich der Funktion der Cajalzellen innerhalb der Gefäßwände ist heute wenig bekannt. Die Nachweisbarkeit des c-kit Protoonkogens sowie die Vergleichbarkeit des Phänomens der Darmmotilität und der Vasomotion stützen die Annahme, dass diese Zellen ähnliche Funktionen wie im Verdauungstrakt übernehmen können. Damit stehen diese Ergebnisse in deutlichen Gegensatz zu den umfangreichen Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Aalkjaer.

1.7. FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ

Wie in den vorhergehenden Kapiteln dargestellt, liegen zu den Grundprozessen der Vasomotion und deren Fortleitung über das gesamte Gewebe sehr unterschiedliche Daten vor. Während die Arbeitsgruppe um Bolton versucht die Existenz von primären Schrittmacherzellen zu belegen, wird eine solche Existenz von der Arbeitsgruppe Aalkjaers ausgeblendet und abgelehnt. Beide Autoren gehen davon aus, dass die Propagation der slow waves vor allem durch die Zell-zu-Zell-Verbindungen der glatten Muskelzellen stattfindet, ähnlich der nervalen Signalpropagation. Diese ist dabei hinreichend durch biologische und mathematische Modelle geklärt.

Die Signalweiterleitung des glatten Muskelgewebes und deren Analyse ist hingegen schwieriger zu erfassen und durch die zelluläre Inhomogenität anhand üblicher Untersuchungsmethoden nicht realitätsgetreu abbildbar. Bezüglich glattmuskulären Gewebes sind zahlreiche Studien veröffentlicht, welche die Erregbarkeit der isolierten Zelle beschreiben.

Auch gibt es Versuche, die Kopplung über Gap Junctions mit anderen Muskelzellen zu untersuchen und modellhafte Berechnungen vorzunehmen. Zellen wie z.B. Cajal-, Nerven- oder Endothelzellen werden dabei nur unzureichend berücksichtigt. Das Problem besteht einerseits in der Anzahl der Freiheitsgrade im intakten Gewebe und andererseits in der adäquaten Modellierung aus Daten, die durch Zellisolation gewonnen wurden. Bekannte Untersuchungsmethoden, die glatte Muskelzellen analysieren, lösen den Zellverband auf, beeinflussen wie bei der Patch-Clamp-Technik die Membraneigenschaften und haben so wenig Möglichkeiten ein realitätsgetreues Bild des gesamten Gewebes zu zeigen. Es ist somit nicht möglich, eine klare Aussage über die Signalpropagation zu treffen.

Ziel dieser Arbeit ist es die interzelluläre Kopplung glatter Muskelzellen nicht-invasiv und berührungslos zu untersuchen. Dazu wird erstmals eine mehrdimensionale korrelative Netzwerkanalyse verwendet, mit deren Hilfe die zeitliche Veränderung des Kalziumsignals über mehrere gekoppelte Zellen

hinweg beobachtet werden kann. Dabei wird der Gefäßmuskel als eine partiell homogene Struktur angesehen. Insbesondere sollen die Kopplungseigenschaften unter adrenergem Antrieb und unter Spontanbedingungen in ein Konzept gebracht werden, welches den Beobachtungen am Gesamtorgan entspricht.

Auf diese Weise wird neben der Klärung einiger Aspekte des klinisch hochrelevanten Phänomens der Vasomotion eine neue berührungslose und nicht-invasive Methode vorgestellt, die es gestattet funktionelle zelluläre Daten zu erheben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. LÖSUNGEN

2.1.1. PRÄPARIERLÖSUNG

Die zur Grob- und Feinpräparation sowie zum Transport und zur Aufbewahrung der Muskelpräparate verwendete Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

Substanzen	NaCl	KCl	CaCl ₂ + 2 H ₂ O
mmol/l	143	5,9	0,1

Tabelle 1: Zusammensetzung der Präparierlösung.

2.1.2. KREBSLÖSUNG

Zur Ernährung des Muskelpräparates während des Versuchs unter dem konfokalen Mikroskop im Organbad wird Krebslösung verwendet [62], die folgende Zusammensetzung aufweist:

Substanzen	NaCl	NaHCO ₃	KH ₃ PO ₄	KCl	MgCl ₂ + 6H ₂ O	CaCl ₂ + 2H ₂ O	Glucose
mmol/l	112	25	1,2	4,7	1,2	2,5	11,5

Tabelle 2: Zusammensetzung der Krebslösung.

Diese Lösung wird vor jedem Versuch neu angesetzt und bei 7° Celsius aufbewahrt. Die zusätzliche Dauerbegasung der Krebslösung mit Carbogen dient sowohl der Sauerstoffversorgung des Gewebes als auch der Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 [62].

2.1.3. WEITERE SUBSTANZEN

Weiterhin wurden als Testsubstanzen Octanol und Noradrenalin in einer Konzentration von 10⁻⁵ mol/l verwendet (Sigma-Aldrich).

2.2. PRÄPARATION

Zehn Ratten beiderlei Geschlechts, mit einem Gewicht zwischen 200 und 450 g wurden durch einen Schlag auf den Kopf oder durch Zusatz von Äther zur Atemluft betäubt und anschließend durch Dekapitierung mittels der Guillotine getötet. Nach Eröffnung der Bauchdecke wird durch Beseitigung des Darms und Drehung der Leber die Portalvene dargestellt. Die Fixation der Vene an beiden Enden durch Bindfäden erleichtert zum einen das Lösen der Pfortader aus dem Versuchstier, zum anderen ermöglicht es die anschließende traumaarme Fixierung des Gefäßes in der Präparierschale mithilfe zweier Stecknadeln. Die Präparation des mit Präparierlösung bedeckten Gewebes wird unter Kaltlichtmikroskopie bei einer zehnfachen Vergrößerung in der Präparierschale durchgeführt. Dabei wird das Gefäß weitgehend von adventitiellem Binde- und Fettgewebe befreit (siehe Abb. 2A).

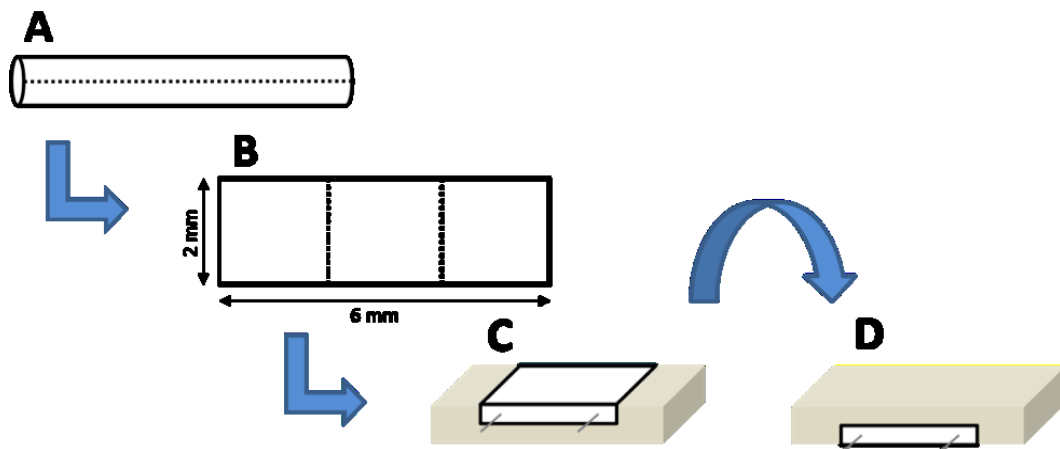


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Präparation.

Das gereinigte Gefäß (A) wird längs gespalten (B), auf der Silikonplatte fixiert (C) und gewendet im Organbad fixiert (D, siehe auch Abbildung 3).

Mit einer feinen Pinzettenschere wird die Vene der Länge nach geteilt, sodass das Gefäß aufgeklappt in der Präparierschale liegt (siehe Abb. 2B). Anschließend

wird das Gefäß in 2 x 2 mm große Streifen geteilt. Einen Streifen fixiert man anschließend auf einer hierfür konstruierten Silikonplatte (1 x 3 x 2 mm Kantenlänge) mit Hilfe von Stecknadeln, sodass von der endothelialen Seite aus mikroskopiert werden kann. (Abb. 2C+D). Die fertigen Präparate liegen bis Versuchsbeginn bei 7° Celsius gekühlt in Präparierlösung.

2.3. BELADUNG UND FLUORESZENZMESSUNG DES PRÄPARATES

Um das Kalzium der glatten Muskelzellen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie sichtbar zu machen, stehen kalziumspezifische Indikatoren zur Verfügung. Sie fluoreszieren nach Bindung an Kalzium bei Anregung mit kurzwelligem Licht ($\lambda = 488 \text{ nm}$). Für die Experimente wird FluoChrom Fluo-3 AM-E (Emmissionsmaximum bei $\lambda = 526\text{nm}$ und $K_d = 390 \text{ nM}$) verwendet. Das Präparat wird in 1 ml Lösung inkubiert, die sich aus 900 μl Krebslösung, 20 μl Fluo-3 (Konzentration 5 $\mu\text{mol/l}$) und 80 μl Pluronic zusammensetzt. Hierbei dient Krebslösung als Trägersubstanz und Fluo-3 AM-E als Indikator. Fluo-3 ist ein Acetoxymethyl-Ester, der die Zellmembran aufgrund seiner unpolaren Struktur gut permeiert. Pluronic ist eine nichtionische und nicht denaturierende Substanz. Diese dient intrazellulär als Emulgator und sorgt somit für eine bessere Verteilung des schlecht wasserlöslichen Indikators. Durch ubiquitäre Esterasen erfolgt intrazellulär die Hydrolyse in eine impermeable, kalziumsensitive und fluoreszierende Substanz. Das Präparat wird bei 22° C zwei Stunden an einem dunklen Ort inkubiert. Bevor die Zellen unter konfokaler Mikroskopie betrachtet werden, wird unter Durchlichtmikroskopie die zu untersuchende Schicht im Gewebe aufgesucht und fokussiert.

2.4. VERSUCHSAUFBAU

2.4.1. ORGANBAD

Das farbstoffbeladene Präparat wird in ein für die vorliegende Arbeit konstruiertes Organbad überführt. Hierzu dient eine 2 cm große Objektträgerschale aus Kunststoff mit 160µm dickem Glasboden.

Mittels einer Halterung wird das Präparat am Boden der Objektträgerschale fixiert (siehe Abbildung 3). Die Temperatur wird mittels Thermostats (Temperature Controller TC-344B, Warner Instrument Corporation) sowie zweier Messfühler auf 36° Celsius gehalten. Ein Messfühler wird direkt in der Petrischale befestigt, während sich ein weiterer innerhalb der Heizeinheit befindet. Kontinuierlich befördert eine Schlauchpumpe (Sci-Q 400, Watson-Marlow) mit Carbogen (95% O₂; 5% CO₂) begaste Krebslösung durch die Heizeinheit in die Petrischale und saugt diese ab, sodass eine durchgehende Beheizung und Versorgung mit frischer Krebslösung für die Dauer der Versuche gewährleistet ist.

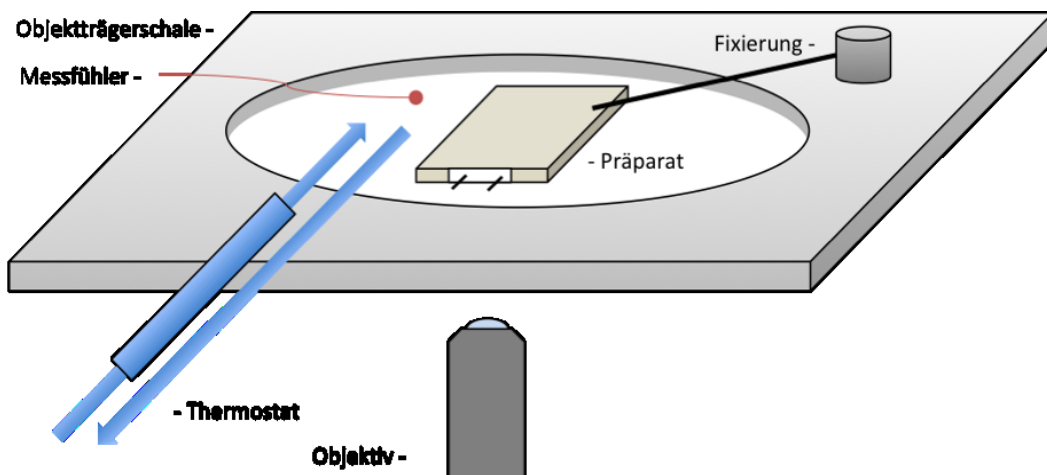


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Organbades.

Zu Abbildung3: 12 x 12 cm große Trägerplatte mit Objektträgerschale, Fixierung, Thermostat und Messfühler

Neben der Pumpe befinden sich Bechergläser für die Krebslösung und die unterschiedlichen Testsubstanzen (siehe Abbildung 4). Die Angabe der Testsubstanzkonzentration bezieht sich immer auf die Konzentration im Organbad.

2.4.2. MIKROSKOP

Bei den Experimenten kommt ein konfokales Lasermikroskop (Eclipse TE 2000-S, Nikon Instruments Inc.) mit integrierter Scannereinheit (CSU-10, Yokogawa) zur Anwendung. Das Präparat wird mit einem 60-fach Immersionsölobjektiv betrachtet und untersucht. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt mit einem Argon-Laser (643 Ion Laser, CVI Melles Griot) bei einer Wellenlänge von 488 nm. Von dem emittierten Kalziumsignal wird alle 500 ms ein Bild angefertigt. Diese Messdaten werden auf einem PC sowie einer externen Festplatte gesichert und mit einer Software graphisch ausgewertet (UltraView, PerkinElmer) (siehe Abbildung 4).

Aus den minutenrhythmischen Kalziumoszillationen des im Organbad fixierten Gewebes lässt sich dessen Vitalität über 120 min dokumentieren. Die Absolutamplitude des Kalziumsignals ändert sich dabei zeitabhängig. Letzteres ist bei erhöhter Laserintensität vermehrt zu beobachten, sodass es sich um Bleicheffekte handeln muss. Während der Anwendung einer konstanten Laserleistung von rund 25 % der maximalen Energie war das Optimum zwischen Signalstärke und Bleicheffekten bei der gewählten Bildwiederholfrequenz erreicht. Das Messintervall wurde nach 1 min konstanter Anregung begonnen. Für weitere 5 min zeigte sich daraufhin ein minimaler Signalabfall während der Messung.

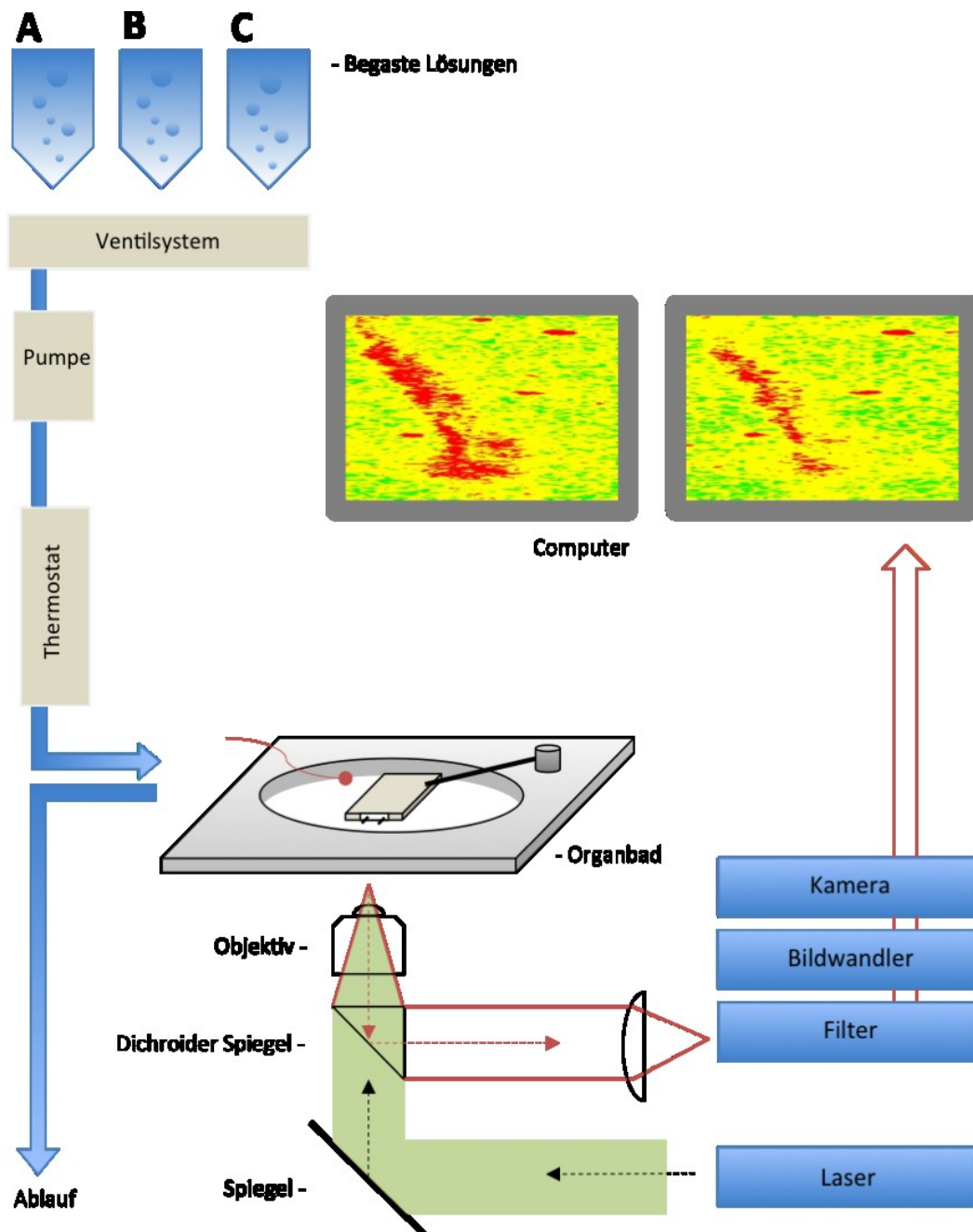


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Messplatzes.

Links Nährlösung (A-C) und Flüssigkeitsregulation. Mittig: Organbad und Strahlengang des Mikroskops. Rechts: Verarbeitung und Digitalisierung des Bildsignals.

2.5. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

2.5.1. MESSABLAUF

Zu Beginn einer Messserie wird das Präparat nach der Inkubation 20 min vor der ersten Messung zum Anwärmen im Organbad fixiert. Im Anschluss werden zwei Kontrollmessungen ohne Substanzzugabe durchgeführt, die der Dokumentation der Funktionalität des Präparates dienen. Es folgen die weiteren Messungen mit Testsubstanzen. Nach den Messungen wird das Präparat gespült, um im Anschluss eine weitere Kontrollmessung durchführen zu können. Die Abstände der Messungen betragen 10 min, dabei dauert ein Messdurchgang 120 s bei einer zeitlichen Auflösung von 500 ms. Somit entstehen 240 Bilder pro Messdurchgang. Die graphische Auflösung eines Einzelbildes beträgt 1344×1024 Bildpunkte.

2.5.2. BERECHNUNG DER RELATIVEN FLUORESZENZINTENSITÄT

Der verwendete Kalziumindikator ist ein quantitativ relativer Farbstoff. Dementsprechend kann der ausgegebene Zahlenwert einer Oszillation nur in Abhängigkeit der Grundfluoreszenz betrachtet werden. Absolute Aussagen über die Menge des sichtbar gemachten Kalziums sind daher nicht möglich. Lediglich die relative Veränderung des Kalziumsignals kann gemessen werden. Hierbei gilt:

$$I_{(t)} = \frac{I_{\max(t)} - I_{0(t)}}{I_{0(t)}}$$

Abbildung 5: Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität.

I_{max}: Maximale Fluoreszenzintensität. *I₀*: Grundfluoreszenz am gleichen Messpunkt.

2.6. AUSWERTUNG DER DATEN

Zellverbände stellen durch komplexe Verbindungen die eigentlichen Funktionen des Organsystems her. Veränderungen in der Kommunikation zwischen den

Zellen können für das Organ eine Fehlfunktion und für den Organismus das Einsetzen einer Erkrankung bedeuten. Bislang ist es schwierig diese Vorgänge in vitalem Gewebe zu untersuchen, da es die zur Verfügung stehenden Verfahren erforderlich machen, einzelne Zellen aus dem Verband zu lösen. Damit einhergehend kommt es zur Störung der Zellkontakte sowie zur Unterbrechung und Störung der Zellkommunikation [63]. Viele Prozesse sind daher mangels geeigneter Methodik nicht ausreichend verstanden.

Die vielfältigen Datenmengen, welche im Rahmen der Proteomics oder anderer verwandter zellbiologischer Zweige in den letzten Jahren entstanden sind, werden durch Korrelation zu netzwerkartigen Strukturen zusammengefasst. Diese zeigen in der Regel keine echte zeitliche Dimension und können daher Zellinteraktion funktionell nur begrenzt darstellen. Die Signalanalyse hingegen ermöglicht auf der Basis einer Frequenzanalyse die Beschreibung der dynamischen Eigenschaften der endogen oszillierenden Portalvene.

2.6.1. SCHEMA

Aufgezeichnet wird ein $120\ \mu\text{m} \times 160\ \mu\text{m}$ großer Ausschnitt des Muskelgewebes der Portalvenenintima. Zur Analyse des Gewebes wird ein Schema mit jeweils 8 peripheren und 8 zentralen Messfeldern konzipiert, die sich um ein zentrales Bezugsfeld z gruppieren. Die peripher transversale Distanz zum Bezugsfeld beträgt $20\ \mu\text{m}$, die longitudinale $25\ \mu\text{m}$. Longitudinale und transversale Distanz der zentralen Messfelder betragen $2\ \mu\text{m}$. Mit Hilfe dieses Schemas werden die zeitlichen Veränderungen der Kalziumkonzentration nach dem in Abbildung 6 gezeigten Muster für 17 Messfelder registriert.

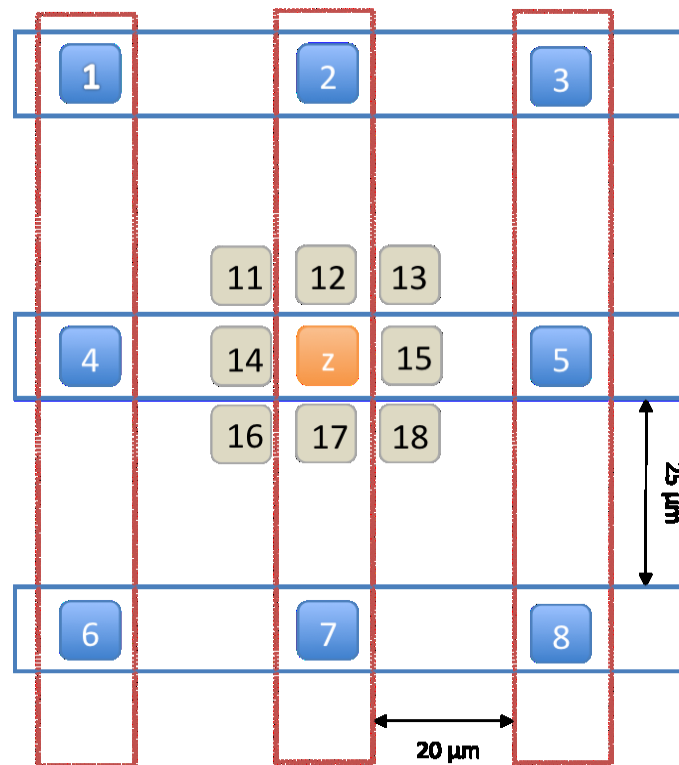


Abbildung 6: Auswertungsschema. Blau: periphere Messfelder. Grau: zentrale Messfelder. Orange: zentrales Bezugsfeld z.

2.6.2. KREUZKORRELATION UND NORMIERUNG DER DATEN

Dem Problem der mangelnden zeitlichen Dimension bereits vorhandener netzwerkartiger Strukturen wird mithilfe der Kreuzkorrelation begegnet.

Aus den zuvor gewonnenen Daten der Kalziumschwankungen können die Kopplungseigenschaften des glatten Muskelgewebes berechnet werden. Dazu werden die Kalziumsignale zweier Messfelder, „ $x(t)$ “ und „ $y(t)$ “, mittels Kreuzkorrelationsfunktion „ $K(\tau)$ “ bei veränderlicher Zeitverschiebung τ korreliert.

Es gilt:

$$K(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) y(t + \tau) \Delta t$$

Abbildung 7: Definition der Kreuzkorrelationsfunktion zweier Zeitfunktionen $x(t)$, $y(t)$.

Das Signal eines peripheren Messfeldes ist zeitlich um den Wert τ verschoben und wird mit dem Signal des Bezugfeldes z multipliziert. Das Ergebnis wird integriert. Sind beide Signale gleich, zeitlich aber um den Wert $\tau \pm \Delta t$ verschoben, wird die Korrelationsfunktion für $\tau = \tau \pm \Delta t$ ein Maximum aufweisen. Somit ist berechenbar, wie sich die Signale der peripheren bzw. zentralen Messfelder mit dem Signal des Bezugfeldes z ähneln und um wie viele Sekunden sie zeitlich verschoben registriert werden.

Liefert die Kreuzkorrelationsfunktion den Wert 1 für $\tau = 0$ sind die verglichenen Signale, wie bei Autokorrelationsfunktionen, identisch. Bei exakt gegenphasigen Signalen beträgt der Wert -1. Ist der Wert der Korrelation für alle $\tau = 0$ sind die Signale zu keinem Zeitpunkt korreliert. Für weitere statistische Berechnungen wurden die maximalen Kreuzkorrelationswerte auf die jeweiligen Autokorrelationswerte des zentralen Messfeldes z bezogen.

2.6.3. ANWENDUNG DER KREUZKORRELATION

Alle Messfelder werden gegen das Bezugsfeld z korreliert. Exemplarisch zeigt Abbildung 8 den charakteristischen Kurvenverlauf einer Kreuzkorrelation dieser Arbeit. Wie auf der x-Achse dargestellt, werden in jeder Kreuzkorrelation 2 Signale, sowohl 150 Versätze á 0.5 s > 0 als auch < 0 , kreuzkorreliert. Die y-Achse gibt die Korrelationshöhe wieder. Dabei weist der Kurvenverlauf dieser Kreuzkorrelation drei Maxima auf. Das mittlere Maximum zeigt die

Signalähnlichkeit der verglichenen Signale zum Verschiebungszeitpunkt $\tau = 0$ an. Die außen liegenden Maxima stellen die maximale Korrelation des Bezugssignals zum Zeitpunkt $\tau = 0$ mit dem eine Periode später aufgezeichneten Signal eines Messfeldes dar. Der Versatz zweier Maxima beschreibt die Periodendauer der slow waves. Auch die Laufzeit eines Signals kann durch Bestimmung des zeitlichen Versatzes berechnet werden. Mit Hilfe der Kreuzkorrelationsfunktion lässt sich ein zuvor aufgezeichnetes Kalziumsignal im Gewebe an anderer Stelle zum Zeitpunkt $\tau = 0$ als auch $\tau = 0 + \Delta\tau$ wiederfinden. Daher eignet sich die Kreuzkorrelationsfunktion besonders zur Ermittlung von Übertragungswegen sowie zur Ortung von Signalquellen.

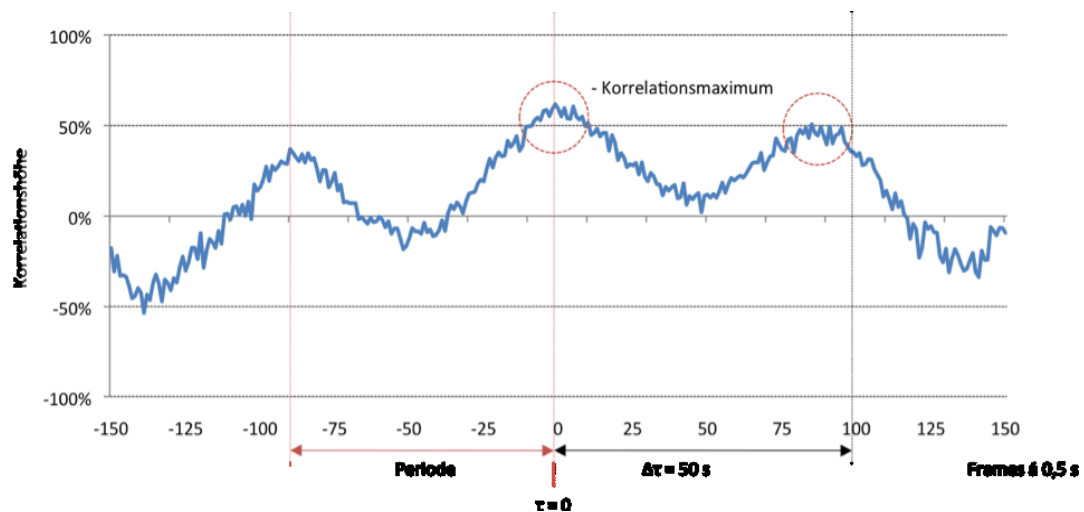


Abbildung 8: Anwendung der Kreuzkorrelation.

3. ERGEBNISSE

3.1. KOPPLUNGSANALYSE DURCH KREUZKORRELATION

Grundlage der Kopplungsanalyse im glatten Muskel der Portalvene der Ratte sind in der vorliegenden Arbeit die kommunizierenden intrazellulären Kalziumoszillationen.

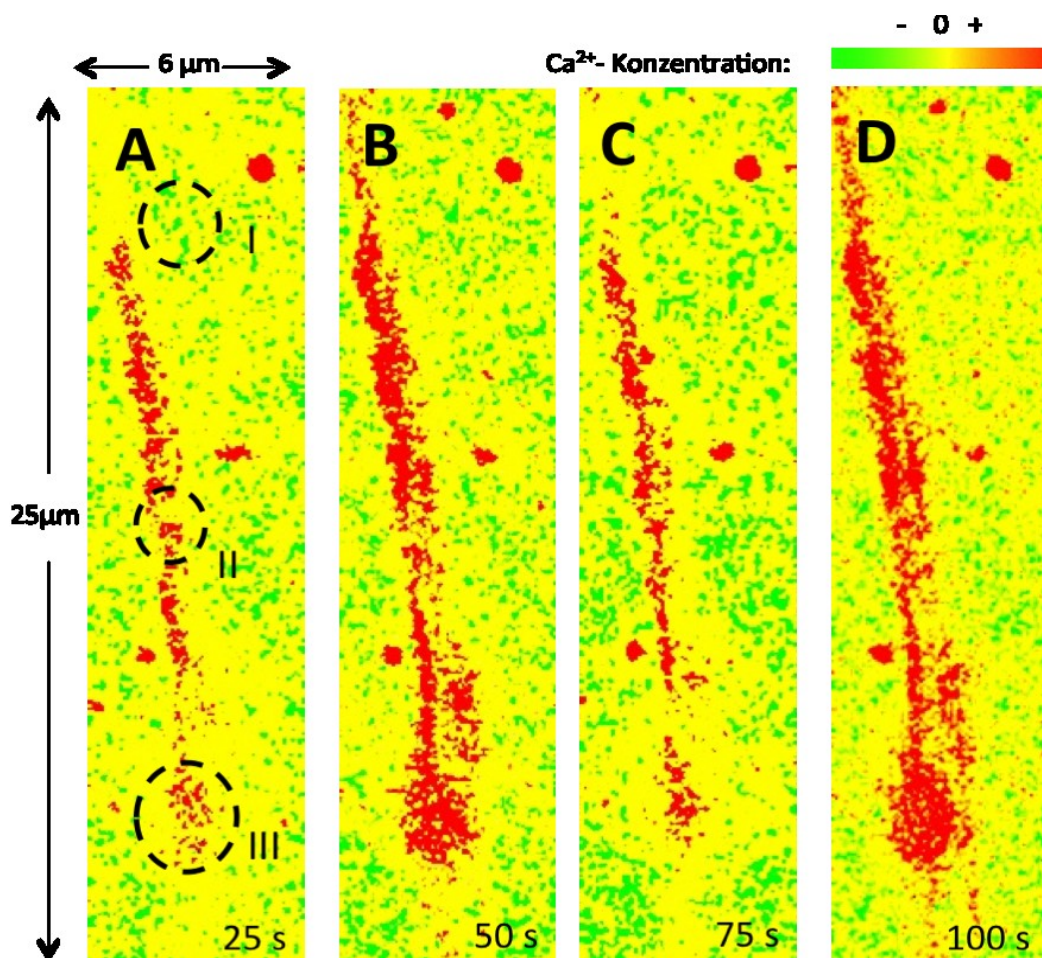


Abbildung 9: Registrierung der zeitabhängigen intrazellulären Kalziumoszillation.

A-D: 25 x 6 µm großer Ausschnitts der Portalvene. Das Zeitintervall beträgt jeweils 25 s. Die drei Messfelder (I-III) korrespondieren mit den dort gemessenen Zeitverläufen in Abbildung 10.

Im Folgenden soll exemplarisch dargelegt werden, wie die Kopplungsanalyse mittels Kreuzkorrelation am glatten Muskelgewebe angewendet werden und sich die Kopplung unter physiologischen Bedingungen ändern kann.

Während einer Messung werden 240 Einzelbilder erstellt, von denen vier in Abbildung 9 dargestellt sind. Jedes Bild (Abbildung 9A-D) zeigt einen $25\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$ großen Ausschnitt des beobachteten glatten Muskelgewebes der Portalvene.

Es wurde eine optische Ebene gewählt, die unterhalb der Endothelschicht in der zweiten Zelllage der glatten Muskulatur liegt. Intrazellulär ungebundenes Kalzium kann in Abhängigkeit des Konzentrationsgefälles sichtbar gemacht werden. Kalziumarme Bereiche sind in der Abbildung grün markiert, während Regionen mit hoher Kalziumkonzentration rot eingefärbt sind. Der zeitliche Abstand der Bilder beträgt 25 s.

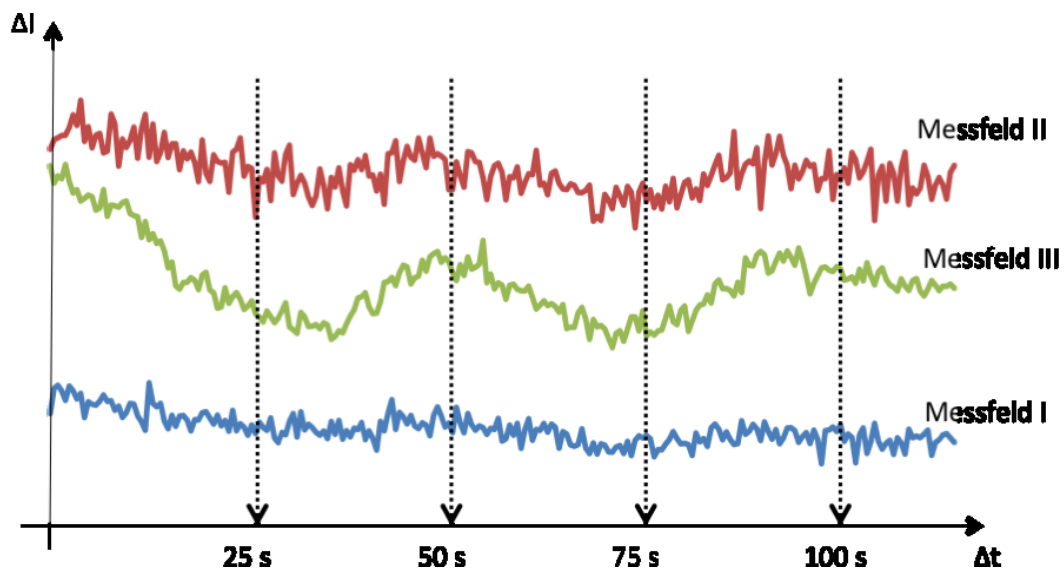


Abbildung 10: Graphische Darstellung der zeitabhängigen Kalziumoszillation dreier Messfelder.

Messdauer: 120 s. Die Intervalle von 25 s markieren die vier Einzelbilder der Abbildung 8A-D.

Drei Messfelder werden wie in Abbildung 9A an definierten Orten im Gewebe markiert. Messfeld I liegt in der Randzone des aufgezeichneten Bereichs außerhalb einer auffällig stark mit Kalzium angereicherten glatten Muskelzelle. In den Messfeldern II und III wird das Kalziumsignal innerhalb einer glatten Muskelzelle aufgezeichnet, wobei Messfeld III einen Bereich höherer Aktivität innerhalb der Zelle zeigt. Die Konzentrationsschwankungen des Kalziums der drei Messfelder sind in Abbildung 10 abgebildet.

Die Konzentrationsschwankungen des Kalziums der drei Messfelder sind in Abbildung 10 abgebildet. Auf der x-Achse ist die Zeitachse dargestellt, dabei beträgt der zeitliche Abstand zweier Messpunkte 0,5 s. Das Kalziumsignal des ersten (grün) und zweiten (rot) Messfeldes zeigt deutliche periodische Oszillationen. Die Kalziumoszillation im Bereich des ersten randständigen Messfeldes (blau) ist weniger stark ausgeprägt.

Eine Inhomogenität der Signalstärke der drei Messbereiche lässt sich aus den Abbildungen 9 und 10 ableiten. Trotz der Schwäche des Kalziumsignals aus Messfeld I lassen sich die Daten verwenden, um das Gewebe hinsichtlich der Signalpropagation zu analysieren. Die Kalziumsignale aus Abbildung 10 belegen diese Aussage (siehe Kreuzkorrelation dieser Daten in Abbildung 11).

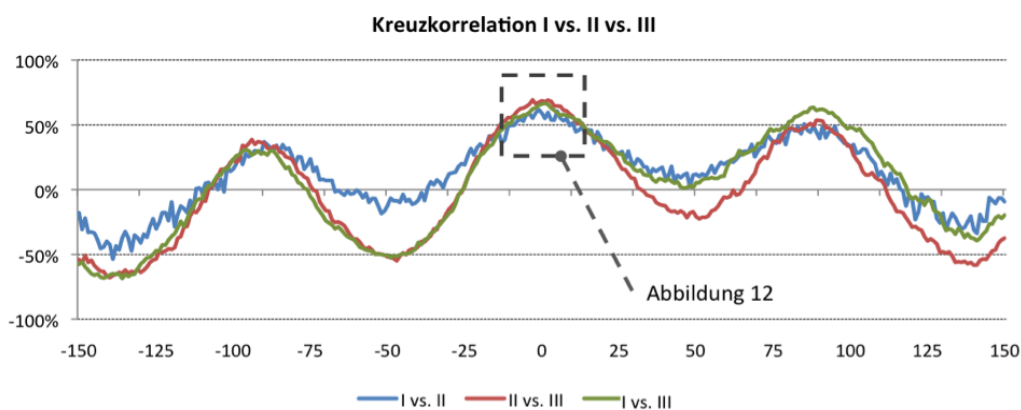


Abbildung 11: Kreuzkorrelierte Kalziumsignale der Messfelder I – III aus Abbildung 10.

Alle drei abgebildeten Korrelationskurven in Abbildung 11 weisen dieselbe deutliche Periodizität auf, die sich bereits in den reinen Kalziumsignalen aus Abbildung 10 findet. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Ausgangsdaten von Messfeld I deutlich schlechter als die der Messfelder II und III sind.

Die Analyse der Kreuzkorrelationen zum Zeitpunkt $\tau = 0$ zeigt, dass die Korrelation zwischen dem randständigem Messfeld I und den Messfeldern II bzw. III weniger stark ausgeprägt ist (I vs. II, I vs. III) als die Korrelation dieser Felder untereinander (II vs. III). Trotz Signalverrauschung oder einer grundsätzlichen Schwäche des Signals ist die Vergleichbarkeit der Signale bei gleicher Entfernung zwischen den Feldern erhalten (siehe Abbildung 12). Somit lassen sich vermeintlich schwächere Ausgangssignale ebenfalls zur Signalanalyse nutzen.

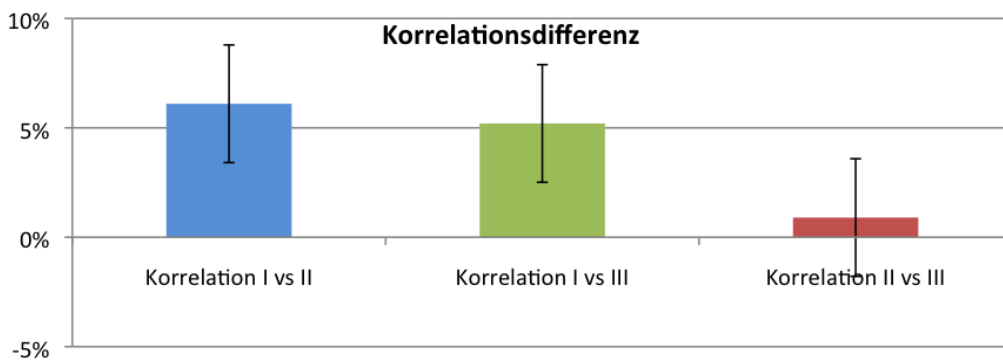


Abbildung 12: Korrelationsdifferenz der Messfelder I-III. $n=4$, $SEM \pm 2,6 \%$.

Die Datenerhebung wird exemplarisch für alle Versuche an einem Versuch konkret dargestellt (siehe Abbildungen 13 und 14). Aufgrund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse wurde der Messbereich dort angesiedelt, wo eine gute Anfärbung des Kalzium zu beobachten war, um ein gutes Signal / Rauschverhältnis der Signale über den Messzeitraum zu gewährleisten. Dazu wird die Schablone aus Abbildung 6 mittig positioniert. Für jedes der 16 Messfelder sowie das Bezugsfeld z wurde das Kalziumsignal aufgezeichnet. Das Bezugsfeld z wird im weiteren Verlauf orange dargestellt.

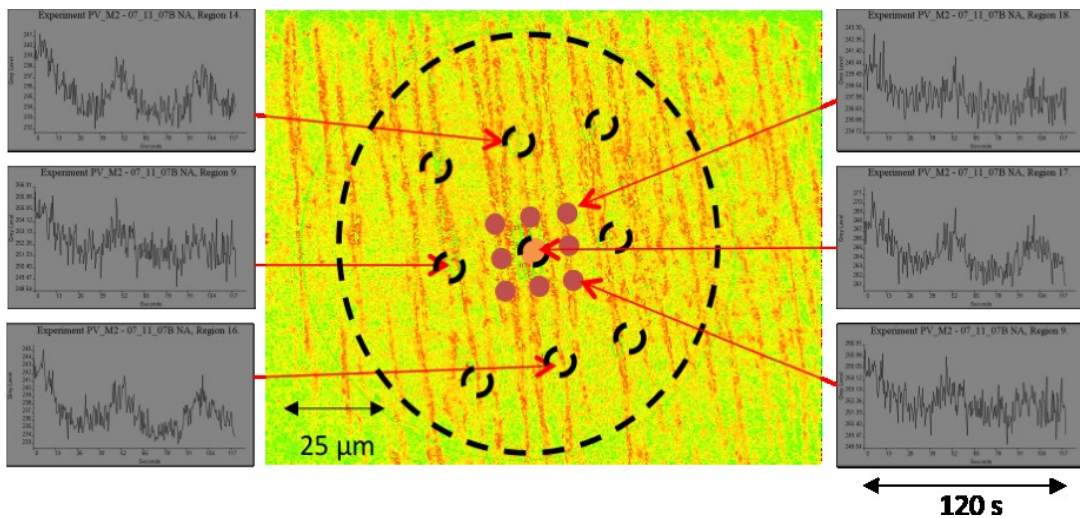


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Kalziumsignalerhebung.

Mitte: Einzelbild des fluoreszierenden glatten Muskelgewebes mit aufgelegter Schablone. Links: Kalziumsignale dreier peripherer Messfelder. Rechts: Kalziumsignale zentraler Messfelder sowie des Bezugsfeld z.

Die Messschablone wird wie in Abbildung 14 dargestellt, viermal um 2 μm verschoben, sodass für jedes Messfeld und das Bezugsfeld z der Mittelwert aus vier Kreuzkorrelationen gebildet werden kann. Die Kopplungswerte finden sich in den folgenden Abbildungen wieder (siehe Abbildungen 15-21).

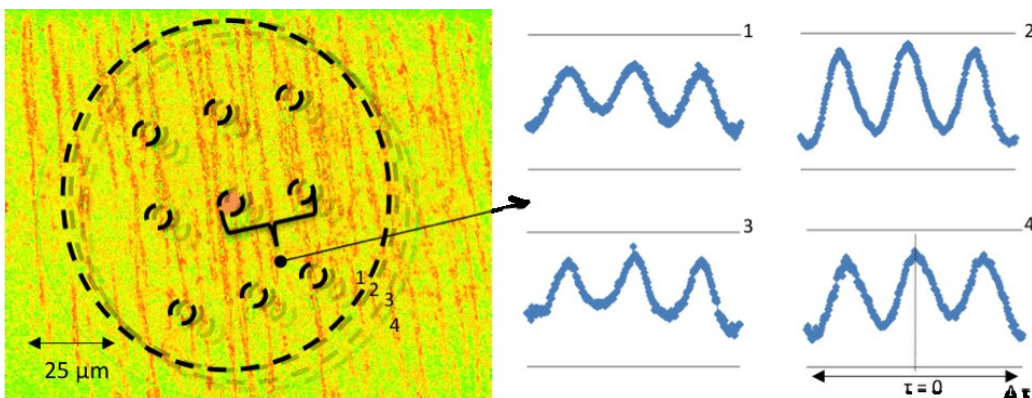


Abbildung 14: Kreuzkorreliertes Kalziumsignal.

Links: Einzelbild des fluoreszierenden Gewebes. Rechts: Vier Kreuzkorrelationen zweier Messpunkte (Bezugsfeld z vs. Messfeld 4).

3.2. KOPPLUNGSVERHALTEN GLATTER MUSKELZELLEN DER PORTALVENE

Bei der Untersuchung glatter Muskelzellen der Portalvene liegt das Interesse auf den von ihnen ausgehenden zeitlich-räumlichen Kalziumsignalen. Zunächst wurden für die 8 peripheren Messfelder (siehe Schablone Abbildung 6) die Einzelwerte für die ersten untersuchten Präparate ermittelt. Diese Ergebnisse wurden dann in Transversal- und Longitudinalrichtung zusammengefasst und mit den Werten, vorne, hinten, links und rechts jeweils verglichen. Die Unterschiede zwischen diesen Werten und den longitudinal bzw. transversal zusammengefassten Werten waren nicht signifikant voneinander verschieden, sodass in den folgenden Untersuchungen auf das Ausmessen der Eckpunkte „hinten links“, „hinten rechts“, „vorne links“ und „vorne rechts“ zu Gunsten der Werte für „links“, „rechts“, „vorne“ und „hinten“ verzichtet werden konnte. Aus den so erhaltenen Datensätzen ließ sich die folgende Graphik ermitteln (Abbildung 15).

Die Streuungen sind aus Übersichtlichkeitsgründen in Abbildung 16 getrennt dargestellt. Es ist bei der Abbildung 15 zu beachten, dass die Teilung der Ebene nicht linear erfolgt ist. Nach Berechnung der Korrelationshöhe kann untersucht werden, inwieweit das Signal einer zuvor definierten zentralen Zelle in anderen Zellen wiedergefunden werden kann. Die Kopplung nicht stimulierter glatter Muskelzellen wird durch zunehmende Dämpfung des Kalziumsignals mit steigender Distanz zum Bezugfeld z ausgedrückt. Zu berücksichtigen ist die Distanz der zentralen und peripheren Messfelder zum Bezugfeld z . Trotz Verzehnfachung der Distanz bleibt die Synchronisation des Signals peripherer Messfelder besser erhalten als es eine lineare Dämpfung erwarten lässt.

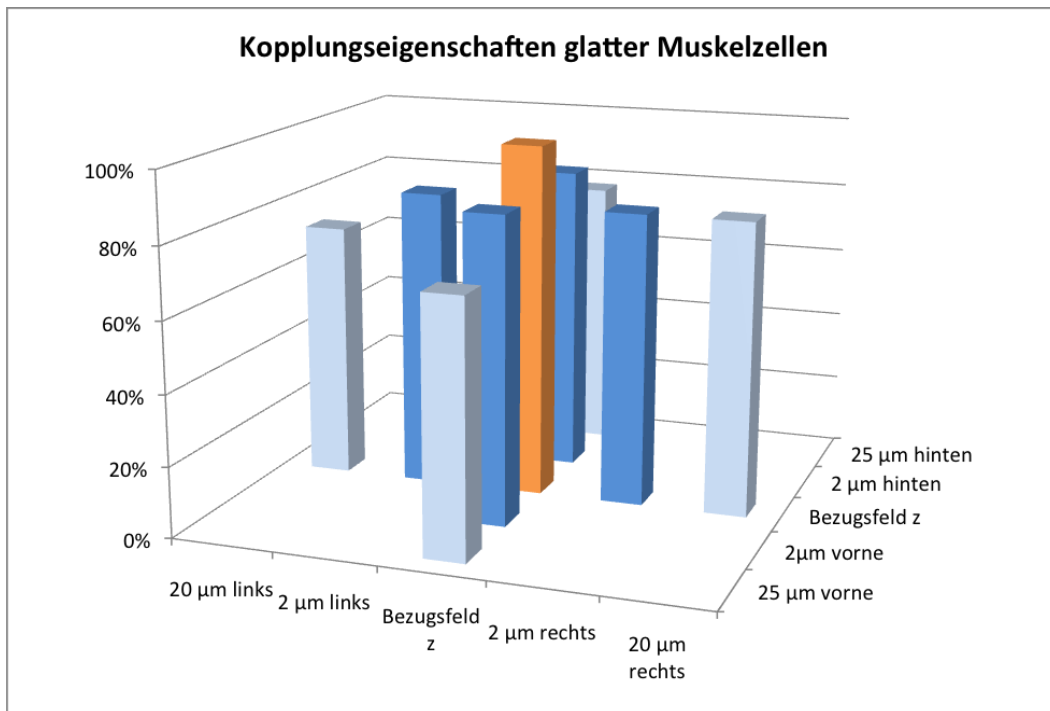


Abbildung 15: Physiologisch räumliches Kopplungsverhalten glatter Muskelzellen. z-Achse: Kopplungsstärke in Prozent. x-Achse und y-Achse: Distanz der Messfelder zum Bezugsfeld z.

3.3. RÄUMLICHE KOPPLUNG GLATTER MUSKELZELLEN

Die Untersuchung des physiologisch arbeitenden Muskelgewebes lässt vermuten, dass es zwischen longitudinaler und transversaler Ausbreitung keinen signifikanten Unterschied gibt. Daraufhin wird das longitudinale dem transversalen Kalziumsignal gegenübergestellt (siehe Abbildung 16). Obwohl die Signale im Abstand 2 μm etwas besser korrelieren als die Signale in 25 bzw. 20 μm Entfernung zum Bezugsfeld z, sind alle Werte gegeneinander statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

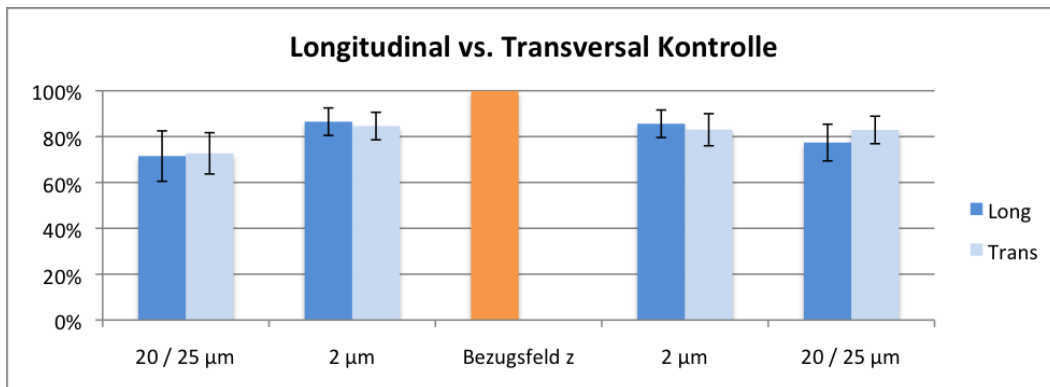


Abbildung 16: Vergleich longitudinaler und transversaler Kopplung glatter Muskelzellen. *x-Achse: Distanz zum Bezugsfeld z. y-Achse: Kopplungsstärke. Für jeden Wert erfolgte die Angabe des SEM (n=24).*

Die Durchführung eines gepaarten t-Tests bestätigt die Nullhypothese. Messwerte sowie statistische Daten des Vergleichs longitudinaler und transversaler Kopplung glatter Muskelzellen (siehe Abbildung 16) sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten Präparate zu Abbildung 16. *Die p-Werte wurden bei einer Signifikanzebene von $\alpha \leq 0,05$ durch einen gepaarten t-Test ermittelt.*

	Mittelwert	SEM	n	p
25 µm vorne	71,5	11	24	0,69
20 µm rechts	72,7	9	24	
25 µm hinten	77,4	8	24	0,2
20 µm links	82,9	6	24	
2 µm vorne	86,5	6	24	0,55
2 µm rechts	84,6	6	24	
2 µm hinten	85,6	6	24	
2 µm links	83	7	24	0,07

3.4. PHYSIOLOGISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE MODULATION DER KOPPLUNGSSTÄRKE

Im Folgenden wird die Reaktion der glatten Muskelzellen auf Noradrenalin und Octanol hinsichtlich des interzellulären Kopplungsverhaltens untersucht. Basierend auf den zuvor gewonnenen Ergebnissen (siehe Abbildung 16) kann die Auswertung weiter vereinfacht und die longitudinalen und transversalen Signale gemittelt werden, um sie anschließend den Werten des Noradrenalin stimulierten beziehungsweise Octanol behandelten Muskelgewebes gegenüberzustellen.

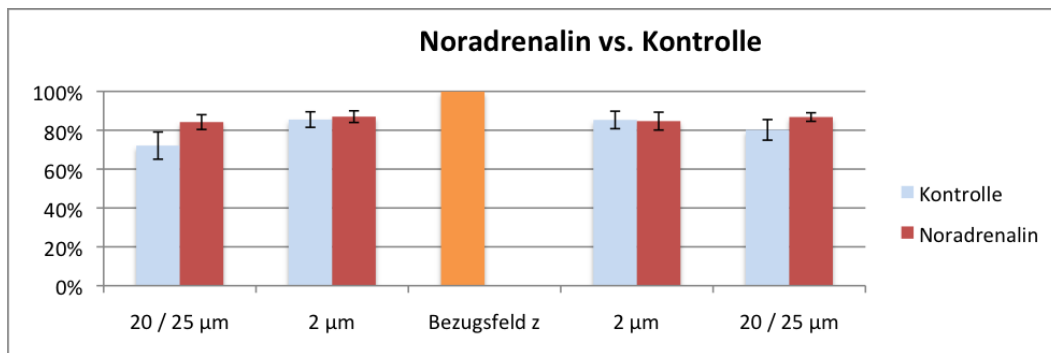


Abbildung 17: Vergleich Noradrenalin stimulierter glatter Muskelzellen mit Kontrollwerten. *x-Achse: Distanz zum Bezugsfeld z. y-Achse: Kopplungsstärke. Für jeden Wert erfolgt die Angabe des SEM (Kontrolle: n = 24, Noradrenalin n = 12)*

Nach Stimulation mit Noradrenalin (10^{-5} mol/l) wird eine Verstärkung der Kopplung glatter Muskelzellen beobachtet. Dabei ist die Zunahme der Kopplungsstärke zentraler Messfelder nicht signifikant. Verglichen damit fällt der größere Zuwachs der Kopplungsstärke peripherer Messfelder auf. Das zuvor beschriebene Phänomen der peripheren Dämpfung ist auf den ersten 2 µm auch nach Noradrenalinstimulation erkennbar, anschließend bleibt die Signalstärke jedoch konstant. Tabelle 4 zeigt den Datensatz der Experimente (siehe Abbildung 17). Bei den Kontrollmessungen wurden auch diejenigen Datensätze inkludiert,

bei denen das Gewebe im Anschluss nicht der Noradrenalinbehandlung ausgesetzt war. Dadurch wird der Effekt von Noradrenalin unterschätzt, es ergibt aber ein besseres Gesamtbild in Bezug auf die allgemeine Kopplung einer Zufallsstichprobe unter physiologischen Bedingungen. Das gleiche Vorgehen wurde bei der Octanolbehandlung gewählt.

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten Präparate zu Abbildung. Die p-Werte wurden bei einer Signifikanzebene von $\alpha \leq 0,05$ durch einen gepaarten t-Test ermittelt.

	Mittelwert	SEM	n	p
25/20 μm vorne/links Kontrolle	72,1	7	24	0,18
25/20 μm vorne/links NA	84,2	3,8	12	
2 μm vorne/links Kontrolle	85,5	4	24	0,78
2 μm vorne/links NA	87	3	12	
2 μm hinten/rechts Kontrolle	85,3	4,5	24	0,93
2 μm hinten/rechts NA	84,7	4,6	12	
25/20 μm hinten/rechts Kontrolle	80,2	5,3	24	0,27
25/20 μm hinten/rechts NA	86,8	2,2	12	

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde der Zellentkoppler Octanol in einer Badkonzentration von 1 mmol/l appliziert. Octanol wird als (Teil-) Entkoppler der Gap Junctions verwendet und ist in der Literatur als solcher bekannt. Die Verwendung ist zum Teil kritisch, da die Konzentrations-Wirkungsbeziehung sehr steil verläuft und durchaus weitere Wirkungen bei zu hoher Dosierung zu erwarten sind (Noack, persönliche Mitteilung). Die Nährlösung wurde dazu mit Octanol vorbereitet und über das Perfusionssystem dem Gewebe zugesetzt. Es wurde jeweils 5 min gewartet bis die Gewebereaktion stabil verlief. Zur Datenevaluation wurde die Schablone (siehe Abbildung 6) genutzt, um das Kalziumsignal in 2 μm und 20 / 25 μm Entfernung zum Bezugsfeld z zu registrieren. Die Werte des Experimentes sind denen der Kontrolle gegenübergestellt (Abbildung 18).

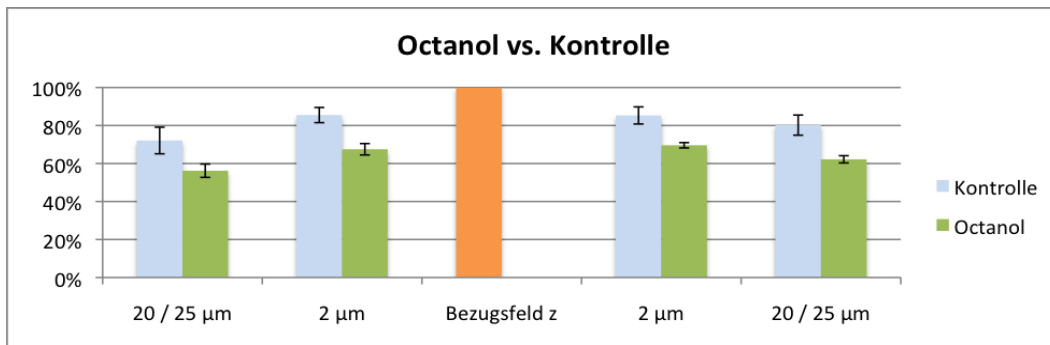


Abbildung 18: Vergleich der Kopplung Octanol behandelter glatter Muskelzellen mit Kontrollwerten. *x-Achse: Distanz zum Bezugsfeld z. y-Achse: Kopplungsstärke. Für jeden Wert erfolgt die Angabe des SEM (Kontrolle: n = 24, Octanol n = 12).*

Unter Octanoleinfluss verminderte sich die Kopplung zwischen den Muskelzellen deutlich. Dabei ist die größte Veränderung der Kopplungsstärke innerhalb der ersten 2 µm zu verzeichnen. Bei größeren Entfernungen vom Bezugsfeld z nimmt die Kopplungsstärke der Muskelzellen ab, jedoch nicht proportional zur Entfernung. Tabelle 5 zeigt den Datensatz der Experimente (siehe Abbildung 18).

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten Präparate zu Abbildung 18. Die p-Werte wurden bei einer Signifikanzebene von $\alpha \leq 0,05$ durch einen gepaarten t-Test ermittelt.

	Mittelwert	SEM	n	p
25/20 µm vorne/links Kontrolle	72,1	7	24	0,08
25/20 µm vorne/links Octanol	56,2	3,5	12	
2 µm vorne/links Kontrolle	85,5	4	24	0,01
2 µm vorne/links Octanol	67,5	3	12	
2 µm hinten/rechts Kontrolle	85,3	4,5	24	0,01
2 µm hinten/rechts Octanol	69,6	1,4	12	
25/20 µm hinten/rechts	80,2	5,3	24	0,01
25/20 µm hinten/rechts Octanol	62,2	1,9	12	

3.5. RELATIVE VERÄNDERUNG DER KOPPLUNGSSTÄRKE

Aufgrund des begrenzten zeitlichen Fensters, welches durch die Problematik der Beladung und des Ausbleichens des kalziumsensitiven Farbstoffes gegeben wird, mussten die Experimente mit Noradrenalin und Octanol nacheinander in separaten Geweben vorgenommen werden. Relative Veränderungen, die durch die Wirkstoffe hervorgerufen werden, können so in dieser ungepaarten Form erfasst werden.

Die folgenden zwei Untersuchungen geben die relativen Veränderungen des Kalziumsignals nach Stimulation der Zellen mit Noradrenalin (n = 12) und Octanol (n=12) wieder. Dabei fließen nur die am selben Präparat gemessenen Kontrollen in die Auswertung ein (gepaarte Experimente).

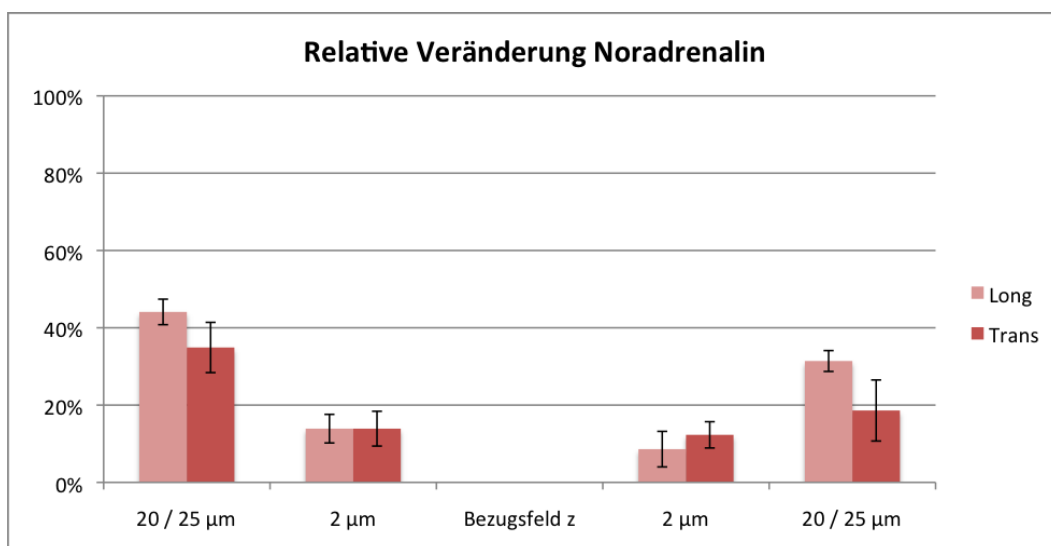


Abbildung 19: Relative Veränderung der Kopplungsstärke nach Noradrenalinstimulation (10^{-5} mol/l). x-Achse: Abstand zum Bezugsfeld z (Center). y-Achse: Änderung der Kopplung.

Gegenüber der Zusammenstellung aus Abbildung 17 sind die Noradrenalineffekte auf die Kopplung entfernter Zellen deutlich vergrößert. Sowohl die longitudinale

als auch die transversale Kopplung hat sich gegenüber der Kontrolle im Mittel um mehr als 30 % verstärkt.

In 2 μm Entfernung zum Bezugsfeld z beträgt die Verbesserung $12,2 \% \pm 4,1 \%$.

In 25 μm Entfernung führt die Stimulation mit Noradrenalin (10^{-5} mol/l) zu einer Verbesserung der Kopplung von $32,3 \% \pm 5,1\%$.

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardfehler der relativen Veränderung des Kalziumsignals nach Noradrenalinstimulation. Stimulation glatter Muskelzellen (siehe Abbildung 19). Die p-Werte wurden bei einer Signifikanzebene von $\alpha \leq 0,05$ durch einen gepaarten t-Test ermittelt.

	Mittelwert	SEM	n	P
25 μm vorne	44,1	3,3	12	0,02
20 μm rechts	34,9	6,5	12	0,01
2 μm vorne	13,9	3,7	12	0,01
2 μm rechts	13,9	4,5	12	0,01
2 μm hinten	8,6	4,6	12	0,01
2 μm links	12,3	3,4	12	0,01
25 μm hinten	31,4	2,7	12	0,04
20 μm links	18,6	7,9	12	0,01

Der Einsatz des Zellentkopplers Octanol führt zu einer massiven Abnahme der Zellkopplung glatter Muskelzellen. Vergleicht man die Stärke der Effekte, die durch Octanol direkt hervorgerufen werden mit der Darstellung der Abbildung 18 (Octanol vs. Kontrolle), so werden die mitunter massiven Entkopplungseffekte deutlich. In unmittelbarer Nähe zum Bezugsfeld z beträgt die Abnahme der Signalintensität $43,4 \% \pm 2,6 \%$. Die Signalabnahme peripherer Messfelder beträgt $64,1 \% \pm 3,8 \%$.

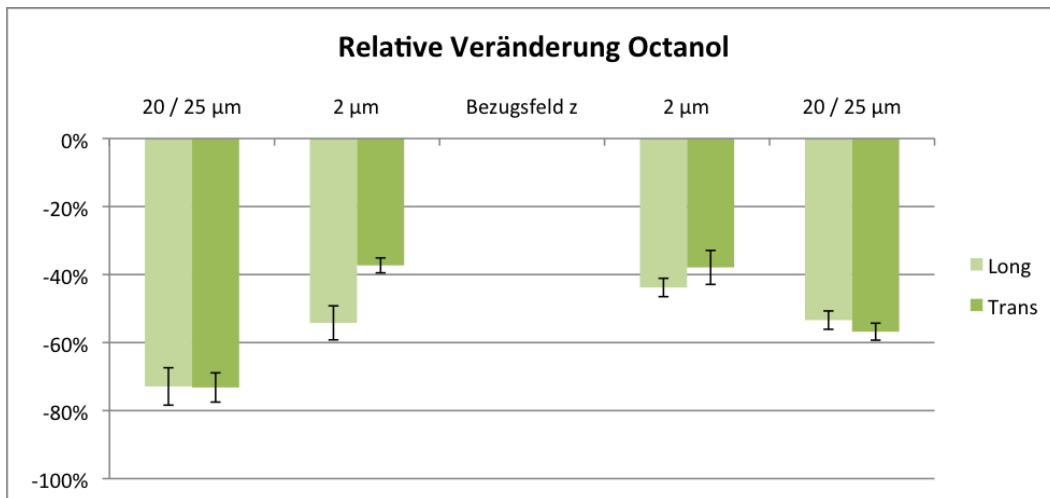


Abbildung 20: Relative Veränderung der Kopplungsstärke nach Octanolbehandlung. *x*-Achse: Abstand zum Bezugsfeld *z* (Center). *y*-Achse: Änderung der Kopplung.

Sowohl nach Einsatz von Noradrenalin als auch Octanol verändert sich das interzelluläre Kopplungsverhalten in unmittelbarer Nähe zum Bezugsfeld *z* weniger stark, als in peripheren Messfeldern. Während die Distanz zwischen zentralen und peripheren Messfeldern verzehnfacht wird, nimmt die Signaländerung um den Faktor 1,5 zu.

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardfehler der relativen Veränderung des Kalziumsignals nach Behandlung glatter Muskelzellen mit Octanol (siehe Abbildung 20). Die *p*-Werte wurden bei einer Signifikanzebene von $\alpha \leq 0,05$ durch einen gepaarten *t*-Test ermittelt.

	Mittelwert	SEM	n	p
25 µm vorne	-72,9	5,5	12	0,03
20 µm rechts	-73,2	4,3	12	0,01
2 µm vorne	-54,2	5	12	0,03
2 µm rechts	-37,3	2,2	12	0,01
2 µm hinten	-43,8	2,7	12	0,01
2 µm links	-37,9	0,5	12	0,01
25 µm hinten	-53,4	2,7	12	0,01
20 µm links	-56,8	2,5	12	0,01

In Relation zur zurückgelegten Strecke des Kalziumsignals ist aber die stärkste Veränderung innerhalb der ersten 2 μm zu verzeichnen. Die Kopplung entfernter Bereiche wächst oder reduziert sich nicht direkt proportional. Tabelle 7 fasst die Ergebnisse des Versuchs (siehe Abbildung 20) zusammen.

3.6. KOPPLUNGSSTÄRKE UND SIGNALWEITERLEITUNG ÜBER LÄNGERE DISTANZEN

Die letzte Untersuchung fasst den Verlauf der longitudinalen und transversalen Kalziumsignale sowohl von Noradrenalin als auch Octanol sowie der Kontrolle in je einer Kurve zusammen. Es wird untersucht, wie sich das Signal über die gemessene Strecke verhält. Dabei wird die Distanz der Messfelder zum Bezugsfeld z in Beziehung zur Kopplungsstärke gesetzt. Der Signalverlauf der Kontrolle ($n = 24$) wird mit dem Noradrenalin stimulierten ($n = 12$) und Octanol behandelten Gewebe ($n = 12$) verglichen. Zuvor wird mittels t-Test analysiert, inwieweit sich die Ausbreitung des Signals in den vier gemessenen Richtungen unterscheidet. Da der Unterschied nicht signifikant ist (vgl. Abbildung 16), können die Signalverläufe in einer Kurve zusammengefasst werden. Das Kalziumsignal nimmt sowohl bei der Kontrolle als auch bei den pharmakologisch behandelten Zellen innerhalb der ersten $2 \mu\text{m}$ stärker ab, als über die nachfolgenden $18 / 23 \mu\text{m}$. Dabei führt Noradrenalin zu einer verbesserten Signalweiterleitung. Abbildung 21 soll somit die unterschiedlichen Kurvenverläufe über die Strecke / Fläche darstellen. Aus den Verläufen wird vor allem deutlich, wie unterschiedlich die beiden Behandlungen Einfluss auf die Nah- und Fernkopplung haben. Zusätzlich wird eine Modellkurve abgebildet, welche die hypothetische Dämpfung eines elektrotonisch fortgeleiteten Signals über acht Zellen hinweg beschreibt. In dieser Modellkurve wird angenommen, dass die Signalpropagation nur über Gap Junctions ermöglicht wird. Als Faktor der Dämpfung an den Zellgrenzen wird der gemessene Signalverlust der Kontrolle während der ersten $2 \mu\text{m}$ übernommen und auf jede der sieben weiteren Zellverbindungen als prozentuale Abnahme der Kopplung von der Gesamtkopplung übertragen.

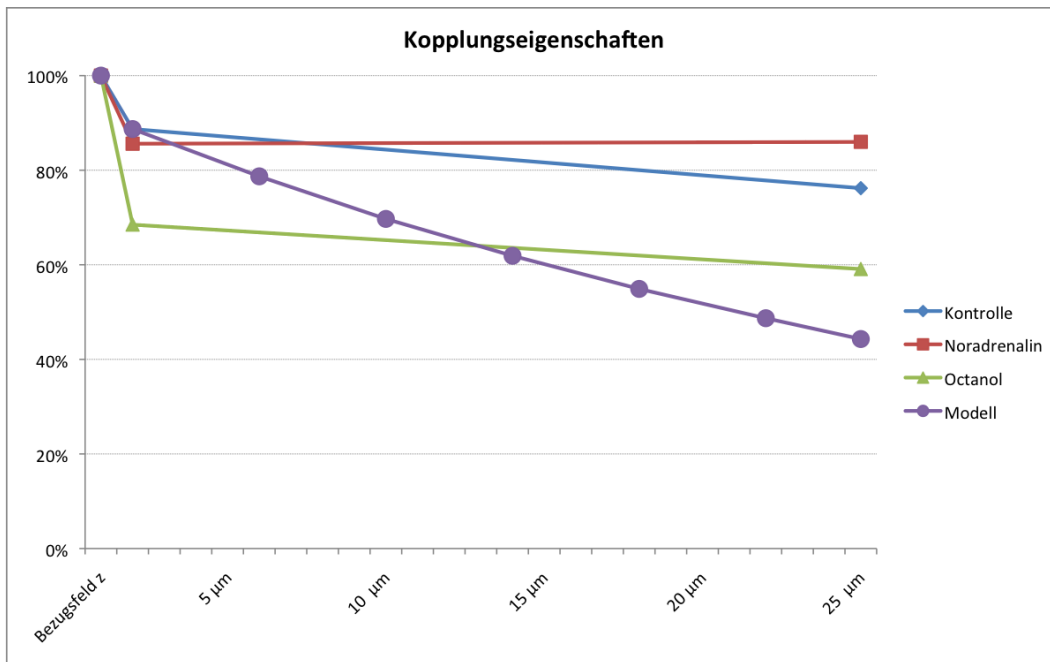


Abbildung 21: Kopplungsstärke und Signalweiterleitung glatter Muskelzellen über Distanz.

Es ist deutlich zu sehen, dass der in der Rattenportalvene vorliegende Kopplungsmechanismus sich deutlich von dem rein über Gap Junctions vermittelten Weg unterscheidet. Ferner wird deutlich, dass zwischen Nah- und Fernkopplung ein Mechanismus existiert, welcher das Signal entlang seiner Ausbreitung regenerieren muss.

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima nullter Ordnung, sowie Anzahl n der untersuchten Präparate zu Abbildung 21. Die p-Werte wurden bei einer Signifikanzebene von $\alpha \leq 0,05$ durch einen gepaarten t-Test ermittelt

a.) Kontrolle				
	Mittelwert	SEM	n	p
25 μm vorne	71,5	11	24	0,42
25 μm hinten	77,4	8	24	
25 μm links	72,7	9	24	0,17
25 μm rechts	83	6	24	
2 μm vorne	86,5	6	24	0,17
2 μm hinten	87,5	6	24	
2 μm links	84,6	6	24	0,71
2 μm rechts	83	7	24	
b.) Noradrenalin				
	Mittelwert	SEM	n	p
25 μm vorne	86,7	3	12	0,25
25 μm hinten	85,4	3	12	
25 μm links	81,7	6	12	0,23
25 μm rechts	88,3	3	12	
2 μm vorne	88,7	4	12	0,17
2 μm hinten	85,8	5	12	
2 μm links	85,3	4	12	0,73
2 μm rechts	83,7	8	12	
c.) Octanol				
	Mittelwert	SEM	n	p
25 μm vorne	57	6	12	0,22
25 μm hinten	63,4	3	12	
25 μm links	55,3	4	12	0,15
25 μm rechts	60,9	3	12	
2 μm vorne	64,6	5	12	0,23
2 μm hinten	68,9	3	12	
2 μm links	70,3	2	12	0,98
2 μm rechts	70,3	1	12	

4. DISKUSSION

4.1. KORRELATIVE NETZWERKANALYSE NETZWERKARTIGER STRUKTUREN

Im Rahmen dieser Arbeit wird die korrelative Netzwerkanalyse konkret auf den Gefäßmuskel angewendet. Insbesondere soll geprüft werden, ob die vorgestellte Methode modifiziert werden muss, um non-invasiv und berührungslos die Kopplungseigenschaften eines quasi-homogenen Netzwerkes untersuchen zu können.

Als vaskuläres Modell eignet sich besonders die Portalvene der Ratte. Diese zeichnet sich durch eine regelmäßige Spontanaktivität aus und ist elektrophysiologisch gut untersucht [4]. Die Spontanaktivität der Portalvene ist als Indikator für deren physiologische Funktionsfähigkeit zu sehen, da diese äußerst sensitiv gegenüber kleinen Änderungen des Umgebungsmilieus ist (Temperatur, Ionenkonzentration von Kalzium, Magnesium, Kalium und Natrium, pH-Wert Änderungen etc.) Ferner ist diese Spontanaktivität eine absolute Voraussetzung für eine homogene korrelative Netzwerkanalyse.

Andere glattmuskuläre Gewebe, wie die Aorta oder die A. Iliaca sind zwar präparatorisch gut zugänglich, jedoch durch fehlende Spontanaktivität unbrauchbar unter beiden Gesichtspunkten. Durch fehlende oder schwächere Ausprägung der Spontanaktivität lassen Untersuchungen an diesen glattmuskulären Muskelgruppen Aussagen über einzelne Carrier oder Ionenkanäle zu, können aber für eine Signalanalyse des Gesamtgewebes nicht genutzt werden. Für die kreuzkorrelative Kopplungsanalyse wird im einfachsten Fall ein autooszillierendes Gewebe benötigt, da ein nicht periodisch auftretendes Signal (Rauschsignal) zu keiner Kreuzkorrelation mit ausgeprägten Maxima führt. Zellkopplungen von nicht autooszillierenden Geweben bedürften dann eines exogenen Oszillators, um oben genannte Grundbedingungen für die korrelative Netzwerkanalyse zu erfüllen.

Die verwendete Portalvene der Ratte wurde im Zellverband untersucht. Eine solche Herangehensweise, zelluläre Kopplung zu untersuchen, zeichnet sich im

Gegensatz zu Experimenten an „Zweizellpräparaten“ durch einen maximalen Erhalt physiologischer Funktionen aus.

In der Vergangenheit wurden Zellkopplungen mittels elektrophysiologischer Messungen evaluiert. „Zweizellpräparate“ wurden enzymatisch aus dem Zellverband herausgelöst und die Kopplungsströme mit zwei Patchelektroden gemessen. Diese aufwendige Methode kann jedoch keine Daten zu einer funktionellen Kopplung der Zellen liefern, da völlig unklar ist, wie groß die Kopplungswiderstände zwischen zwei und mehr benachbarten Zellen sein müssen, um für eine geordnete Erregung zu sorgen.

Mögliche Beeinflussungen des Kalziumsignals und der Signalpropagation, infolge von Isolierung und Kultivierung der glatten Muskelzellen, werden somit vermieden. Durch Erhalt des Zellverbundes befinden sich die Zellen in einer physiologischeren Umgebung. In anderen Versuchen wurden Zellverbindungen durch Lucifer Yellow dargestellt [63]. Die Aussagekraft dieses Verfahrens wird jedoch durch die intrazelluläre Manipulation begrenzt.

Die kreuzkorrelative Kopplungsanalyse bietet hinsichtlich der Durchführbarkeit und des benötigten Zeitaufwandes Vorteile gegenüber den anderen Verfahren. Der methodische Aufwand ist erstaunlich gering und die Qualität der erhobenen Ergebnisse ist von Beginn an sehr hoch. Da die Umgebungstemperatur einen großen Einfluss auf die Motorik der Spontanaktivität hat, muss diese präzise kontrolliert und geregelt werden. Hierfür wurde ein Perfusionselement mit Thermistorregelung in den Zufluss geschaltet und die aktuell am Präparat vorherrschende Temperatur kontinuierlich gemessen. Darüber hinaus erweisen sich Mehrzellpräparate als widerstandsfähiger gegenüber zeitlichen intra- und extrazellulären Veränderungen als z.B. Einzelzellen.

Abbildung 10 dokumentiert die Robustheit der mathematischen Analyse. Trotz Auswahl eines signalärmeren Messfeldes ergibt die korrelative Netzwerkanalyse brauchbare Ergebnisse (vgl. Abbildung 12).

Die Methode ermöglicht es, über längere Zeiträume die rhythmischen Kontraktionen des physiologisch arbeitenden Muskelgewebes aufzuzeichnen.

Messungen zeigen mitunter nach zwei Stunden noch eine ausgeprägte Signalpersistenz. Die registrierte Periodik der Spontanaktivität stimmt mit zuvor im Organbad ermittelten Werten, sowie mit Daten aus der Literatur überein. Darüber hinaus kann belegt werden, dass mechanische Aktivität immer von elektrischer Aktivität begleitet wird (vgl. Abbildung 1) [4]. Die elektrische Aktivität wird durch Blockade der L-Type Kalziumkanäle inhibiert. Aufgrund des fehlenden, für die Kontraktion notwendigen intrazellulären Kalziums, kommt die mechanische Aktivität zum Erliegen.

Kernstück für die hier gezeigte Netzwerkanalyse ist ein räumlich-zeitlich gut auflösendes konfokales Mikroskop. Durch höhere graphische und zeitliche Auflösung ist es theoretisch möglich, die in der Einleitung beschriebenen Kalziumsignale noch schneller aufzuzeichnen und damit auch andere Gewebe wie z.B. Herzmuskeln und Nervengewebe zu analysieren. Theoretisch ließen sich auch periodische (induzierbare) intrazelluläre Funktionsabläufe damit darstellen.

4.2. LAUFZEITANALYSE

Laufzeitanalysen sind mittels korrelativer Netzwerkanalyse sehr gut durchführbar. Hierbei wird das Maximum nullter Ordnung aufgesucht und der zeitliche Abstand von τ als Versatz gegenüber Null bestimmt. Je nachdem, ob dieser Versatz positiv oder negativ ist, nähert oder entfernt sich das Signal dem Bezugspunkt z. Aus der Wegstrecke S vom Bezugspunkt und dem zeitlichen Abstand τ lässt sich die Propagationsgeschwindigkeit $v = s / \tau$ bestimmen. Da das τ einen Zeitpunkt repräsentiert, der mindestens einige Frames (aufgezeichnete Gesamtbilder) vom Nullpunkt verschoben sein muss, um ihn sicher zu bestimmen, ergibt sich aus der räumlichen Auflösung, der einsetzbaren Laserintensität (Ausbleichen des Farbstoffes) und damit der Bildwiederholfrequenz die Begrenzung für ein messbares von Null verschiedenes τ .

Mit der hier verwendeten Konfiguration des konfokalen Mikroskopes sind, obwohl es an sich schon als schnelles Mikroskop ausgelegt ist, klare Grenzen gesetzt. Eine Abschätzung ergibt, dass die Geschwindigkeit um den Faktor 10 und mehr vergrößert werden müsste, um auf diesen Distanzen 25 μm Laufzeiten messen zu können.

Bei einer zeitlichen Auflösung von 500 ms pro Bild ist es möglich ein Signal im Gewebe zu lokalisieren und die Ähnlichkeit des Signals zum Ausgangssignal an anderer Stelle zu bestimmen. In der Literatur finden sich Werte, welche die Ausbreitung der Kalziumwelle mit 100 $\mu\text{m/s}$ beschreiben [64]. Eine Erhöhung der zeitlichen Auflösung ist zwingend erforderlich, um mehrere Datenpunkte zu generieren, falls derartige Fragenstellungen beantwortet werden sollen.

4.3. SIGNALPROPAGATION ÜBER GAP JUNCTIONS

Dass Gap Junctions an der Ausbildung synchroner Muskelkontraktion beteiligt sind, ist hinreichend belegt. Dabei spielen Gap Junctions eine bedeutende Rolle als niederohmige Zellverbindung für die Fortleitung der intrazellulären Kalziumoszillationen [65, 66]. Es kann gezeigt werden, dass sich die Kopplung glatter Muskelzellen unter Noradrenalinstimulation signifikant verbessert (siehe Abbildung 19). Eine mögliche Signalkette, welche diesen Mechanismus erklären könnte, wird durch α 1-Rezeptor basierte Aktivierung von Proteinkinase C ausgelöst. Die Kinase phosphoryliert das Connexin Cx43 und erhöht auf diese Weise die Leitfähigkeit der beeinflussten Gap Junction.

Auffällig ist die stärkere Zunahme der Kopplung peripherer verglichen mit zentralen Messfeldern (vgl. Abbildung 19). Nach anfänglicher Dämpfung des Signals innerhalb der ersten 2 μ m kommt es zu keiner weiteren Abnahme der Signalstärke (vgl. Abbildung 21). Anders als Noradrenalin beeinflusst Octanol die Connexine der Gap Junctions durch eine direkte reversible Bindung. Diese führt zu einer Verringerung der Leitfähigkeit und damit zu asynchroner Oszillation aller behandelten glatten Muskelzellen. Auch nach Behandlung der Zellen mit Octanol fällt eine stärkere Signaländerung innerhalb der ersten 2 μ m auf. Die anschließende Dämpfung des Signals fällt dabei weitaus geringer aus als eine rein Gap Junction vermittelte elektrotonische Signalausbreitung erklären würde. Andernfalls müsste das Signal nach Entkopplung der Muskelzellen konstant abfallen und nicht wie in den gezeigten Versuchen nach anfänglichem Signalverlust in eine Plateauphase übergehen (vgl. Abbildung 21). Die Vermutung liegt nahe, dass mittels eines unbekanntes Mechanismus das Signal entlang der Gefäßwand erneuert wird.

In einer aus der Arbeitsgruppe Alkjaer veröffentlichten Studie wird eine Hypothese für die Entstehung der Vasomotion, basierend auf der Kalziumfreisetzung des sarkoplasmatischen Retikulums, aufgestellt (2001 von Peng). In diesem Modell wird der depolarisierende Strom über Gap Junctions vermittelt und durch jede stimulierte Muskelzelle erneuert. Damit ist der

Erneuerungsprozess des Signals hinreichend erklärt. Eine Erläuterung der für die geordnete Kontraktion notwendigen Kontrolle der Signalpropagation bleibt aus. Ferner zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Abbildung 21), dass unter Modulation der Gap Junctions andere Ergebnisse erzielt werden, als sich aus theoretischen Überlegungen bei einer allein auf Gap Junctions basierenden Fortleitung ergeben würde.

4.4. MULTIFOKALE ERREGUNGS-AUSBREITUNG

Bestehende Konzepte der glattmuskulären synchronen Kontraktion und der dafür grundlegenden Signalausbreitung ähneln bereits bekannten Mechanismen der nervalen und somit linearen Erregungsfortleitung entlang der Gefäßachse. In den hier gezeigten Versuchen sind die Zellen in alle Richtungen zeitlich gleich gut gekoppelt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen longitudinaler und transversaler Kopplung (vgl. Abbildung 16). Die Dämpfung des Signals ist in alle vier Richtungen gleich stark ausgeprägt, während bei linearer Erregungsausbreitung davon auszugehen ist, dass die Zellen in Richtung der Erregung besser gekoppelt sein müssten als entgegengesetzt. Patjedi und Noack beschreiben ein Modell [67], in dem der elektrische Strom nicht monodirektional durch das Gewebe geleitet wird, sondern zu einem definierten Zeitpunkt im Gewebe ableitbar ist. Diese gemessenen Potentialänderungen deuten damit auf eigenständige „Hot Spots“, Kerne mit erhöhter elektrischer Aktivität, im glatten Muskelgewebe hin (siehe Abbildung 22).

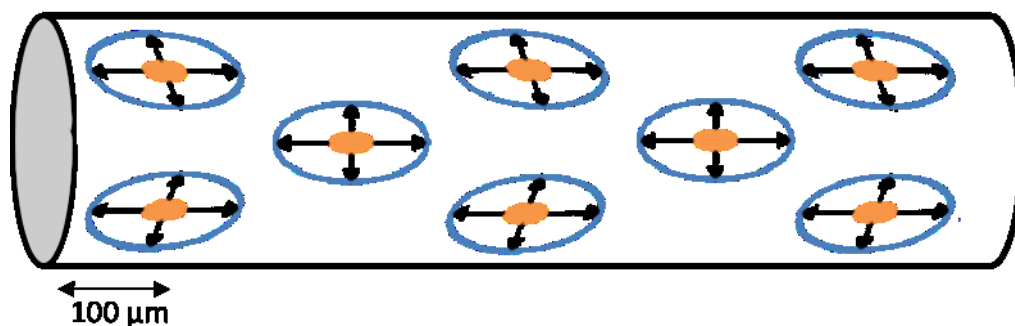


Abbildung 22: Modellhafte Darstellung der Hot Spots innerhalb eines nicht stimulierten Gefäßabschnitts. Eine basale Kopplung der Muskelzellen ist nachweisbar (vgl. Abbildung 21 - Kontrolle).

Da elektrische Aktivität im glatten Muskel durch Kalziumoszillation verursacht wird [26], unterstreichen die beobachteten Signalverläufe dieser Arbeit das Modell der verteilten Hot Spots. Auch die Beobachtungen Hermsmeyers passen in

dieses Modell. Er beschreibt in einer Studie Kerne, die sich durch unterschiedlich hohe elektrische Aktivität auszeichnen [32].

Einen ersten Hinweis auf die Abhängigkeit der Kerne voneinander liefern Patjedi und Noack. Sie zeigen durch Ableitung eines extrazellulären Potentials das zeitlich verzögerte Auftreten der Erregung zwischen zwei Kernen [67]. Dass die Kerne über andere Zellen als den glatten Muskel kommunizieren müssen, zeigt das in Kapitel 4.3 beschriebene Signalverhalten.

Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierte Signalpersistenz zwischen Nah- und Fernsignal ist eher mit dem Modell der Hot Spots und umliegenden Gap Junction gekoppelten Zellen erklärbar als durch eine Situation, die sich alleine auf Gap Junction Kopplung bezieht.

4.5. MODELL DER KOPPLUNG: GEKOPPELTE HOT SPOTS

Um Vasomotion der Gefäße zu ermöglichen, ist es notwendig Kontraktion und Dilatation der glatten Muskelzellen zu koordinieren. Die bereits formulierte hypothetische Annahme der nonlinearen, multizentrischen Erregungsfortleitung führt zu der Frage, wie die einzelnen Hot Spots eine geordnete Kontraktion ermöglichen. Die Kopplung der Muskelzellen unter physiologischen Bedingungen gibt bereits erste Hinweise auf einen solchen Mechanismus. Eine basale Kopplung der Muskelzellen kann während des gesamten Versuchs gemessen werden. Dabei fällt die gemessene Kopplungsstärke vom Zentrum der höchsten Aktivität ausgehend zirkulär ab. Hermsmeyer, der die räumliche Ausbreitung elektrischer Erregung untersucht, kann dieses Phänomen bereits 1973 zeigen. Durch Lokalisation von Regionen mit hoher elektrischer Aktivität und der damit verbundenen elektrischen Kopplung umliegender Zellen kann er nachweisen, dass mit zunehmender Distanz zu diesen Regionen die Stärke der elektrischen Aktivität abnimmt. [32]. Die in den vorgestellten Experimenten beobachtete zirkuläre Abnahme der Kopplungsstärke stützt Hermsmeyers Modell und zeigt darüber hinaus, dass die Kopplung durch Stimulation mit Noradrenalin zunimmt. Noradrenalin führt weiterhin zu einer Vergrößerung der Hot Spots.

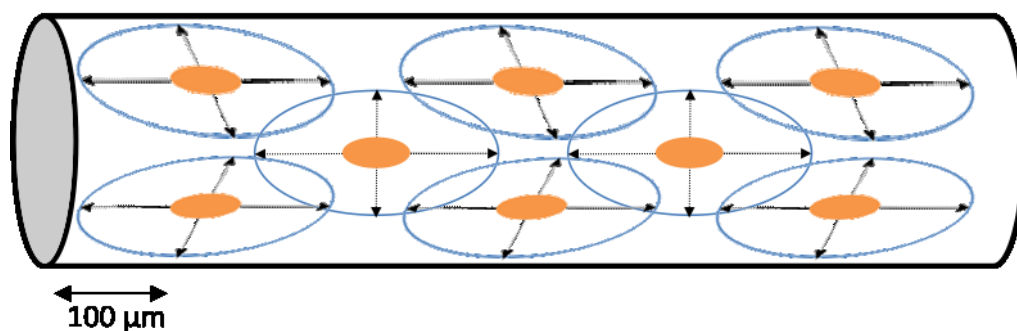


Abbildung 23: Modellhafte Darstellung der Hot Spots innerhalb eines noradrenalinstimulierten Gefäßabschnitts. Die Vergrößerung und Verschmelzung der Hot Spots ist nachweisbar (vgl. Abb. 19 - Noradrenalin).

Im noradrenalinstimulierten Gesamtgewebe verbreitern sich dann die Aktivitätszyklen, die Pausen nehmen ab und bei weiterer Stimulation wird ein glattmuskulärer, tetanischer Tonus erreicht, der keine weitere phasische Aktivität zeigt [68]. Während das Ausgangssignal des physiologisch arbeitenden Muskels mit zunehmender Distanz gedämpft wird, geht das Noradrenalin stimulierte Signal nach anfänglicher Dämpfung in eine Plateauphase über. Diese Beobachtung zeigt, dass das Gewebe innerhalb des registrierten Areals lückenlos gekoppelt ist. Diese Erkenntnis wird dahin gehend interpretiert, dass weiter voneinander entfernte Gewebsabschnitte nach Stimulation mit Noradrenalin als homogen gekoppeltes Muskelgewebe arbeiten. Die zirkuläre Dämpfung der Grundoszillation, sowie die nach Noradrenalinstimulation vergrößerten Hot Spots sprechen für eine multizentrische Erregungsausbreitung (siehe Abbildung 23). Durch die Vergrößerung und die damit verbundene Verschmelzung der Hot Spots wird die Kontraktion möglich.

4.6. MODULATION DER KONTRAKTION

Wie bereits dargelegt, wird die Existenz von signalverarbeitenden spezialisierten Zellen im Gefäßmuskel von einzelnen Autoren abgelehnt [49]. Oszillationen des Kalziumsignals werden ausschließlich myogener Genese zugeschrieben. In ca. 5 % der einzelnen Registrierungen waren neben den zeitabhängigen Kalziumoszillationen auch 180° phasenverdrehte Kalziumsignale zu beobachten (siehe Abbildung 24).

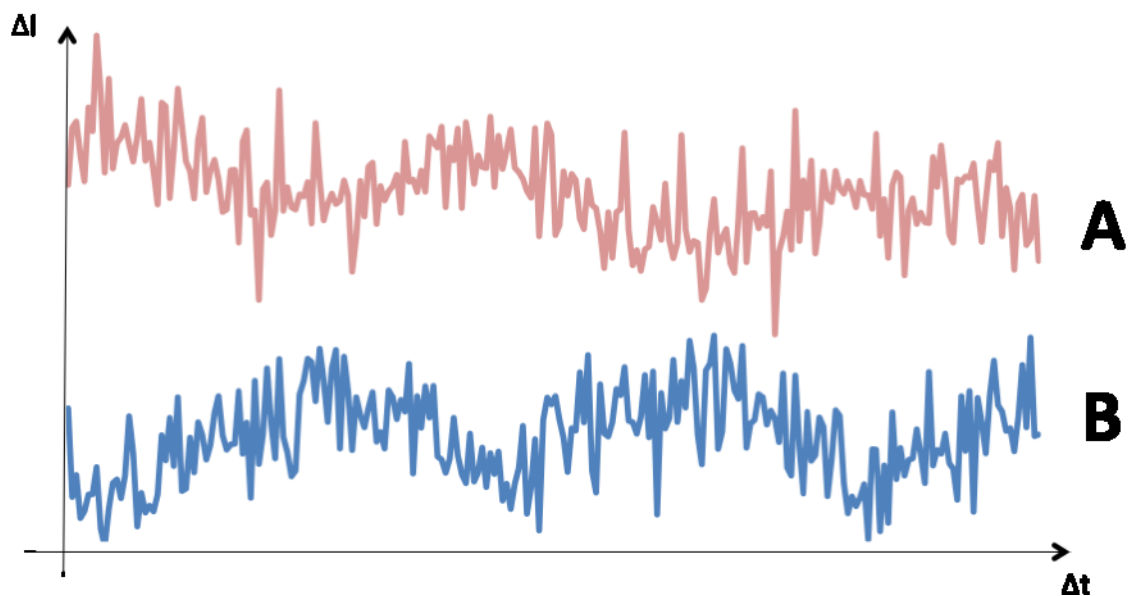


Abbildung 24: Kalziumoszillation zweier Messfelder.

A: Kalziumsignal eines in Phase geschalteten Messfeldes. B: 180° phasenverdrehtes Kalziumsignal eines benachbarten Messfeldes.

Die Frequenz war identisch, jedoch wurde ein Maximum erreicht, während der Großteil der sonstigen Zellen ein Minimum aufwies. Derartige Phasendrehungen sind nur mit signalverarbeitenden Zellen in der Gefäßwand zu erklären.

Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass nicht Muskelzellen alleine an der Signalpropagation beteiligt sein können. Zum aktuellen Zeitpunkt belegen Studien die Funktion von Gap Junctions als Zellverbindungen, welche

Signalpropagation ermöglichen [69]. Eine hinreichende Erklärung für das zuvor beschriebene Phänomen der phasenverdrehten Messfelder ermöglichen diese jedoch nicht. Die beobachteten Ergebnisse legen die Existenz von cajalähnlichen Zellen zumindest nahe.

Deren Pacemakerfunktion ist inzwischen für diesen c-kit positiven Zelltyp im Gastrointestinaltrakt anerkannt [70-72]. Bolton beschreibt c-kit positive Zellen innerhalb der Gefäßwand von Portalvenen [59-61] und deren Potential, Netzwerke mit Pacemakerfunktion auszubilden.

Die mögliche Funktion der phasenverdreht arbeitenden Zellen könnte darin liegen, als Netzwerk aus Cajalzellen und eventuell anderen Zellen, als Mittler zwischen erregten und nicht erregten Zellen zu wirken.

Dabei synchronisieren sie sowohl die in Phase geschalteten Muskelzellen, als auch solche, die gegenphasig oszillieren. In der vorliegenden Arbeit wird dieser Sachverhalt dahingehend gedeutet, dass ein festgelegtes Muster, bestehend aus erregten und nicht erregten Arealen, in der Lage ist, eine gerichtete Kontraktion zu koordinieren.

Die vorgestellten Daten unterstützen das Modell multipler Erregungsareale [32, 67]. Nach Stimulation mit Noradrenalin verschmelzen die in Grundoszillation verharrenden glatten Muskelzellen zu einem zeitlich homogen kontrahierenden Gewebe. Dabei wird das Kalziumsignal und somit die Kontraktion durch cajalähnliche Zellen moduliert.

5. Zusammenfassung

Zellen kommunizieren über komplexe Verbindungen und bilden somit funktionelle Organsysteme. Veränderungen in der Kommunikation zwischen den Zellen können für das Organ eine Fehlfunktion und für den Organismus das Einsetzen einer Erkrankung bedeuten. Man denke an die fehlende Überleitung im Herzen vom Vorhof auf die Kammern. Daraus resultiert das große klinische Interesse an der Signalentstehung und Signalpropagation auch im glatten Muskelgewebe, da glattmuskuläre phasisch-zyklische Aktivität zumeist Propagation des luminalen Inhaltes bedeutet.

Für einzelne Zellen ist die elektrische Situation einfach zu beschreiben und in ein mathematisches Modell zu überführen. Anders verhält es sich mit multizellulären Strukturen wie dem glattmuskulären Gewebe der Portalvene. Dieses Gewebe zeichnet sich durch spontane rhythmische Kontraktionen basierend auf dem intrazellulär oszillierenden Kalziumspiegel aus. Bisherige elektrophysiologische Untersuchungsmethoden der Portalvene manipulieren durch Zellisolation aus intaktem Gewebe das physiologische Milieu. Studien an vitalem Gewebe kommen der Organfunktion recht nahe, jedoch sind mechanische oder elektrische Messungen immer integrale Messungen, bei welchen die umliegenden Zellen in die Messstelle hineinprojizieren und damit ein unscharfes Bild erzeugen.

Durch die hier erstmals vorgestellte mehrdimensionale kreuzkorrelative Netzwerkanalyse mittels schneller konfokaler Mikroskopie und anschließender Kreuzkorrelation der Daten ließen sich auf elegante Weise die Propagationen über das Gewebe berührungs- und zerstörungsfrei nutzen, um die Kopplung der Zellen zu ermitteln.

Das dokumentierte Kopplungsverhalten ist mit einem in dieser Arbeit vorgestellten Modell erklärbar, das auf multiplen Errungsarealen ("Hot Spots") innerhalb der Gefäßwand basiert. Das Modell favorisiert eine von Gap Junction getragene, sich von den Hot Spots konzentrisch ausbreitende Erregung. Dass die Hot Spots nicht voneinander getrennt betrachtet werden können, legen Versuche

mit Noradrenalin und Octanol nahe. Dabei schließen die erhobenen Daten eine alleinige Zellkopplung und Signalpropagation über Gap Junctions, sowie eine rein myogene Spontanaktivität glatter Gefäßmuskelzellen aus.

Die erstmalige Beobachtung von phasenverdrehten Kalziumsignalen weist auf die Beteiligung von cajalähnlichen Zellen hin. Das Signal und damit die Kontraktion wird dabei wie aus dem Darm bekannt von Cajalzellen moduliert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

[1] Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 1998;50:413-92.

[2] Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* 2005;352:1685-95.

[3] Bozler E. Physiological evidence for the syncytial character of smooth muscle. *Science* 1937;86:476.

[4] Patejdl R, Noack P, Hopp H, Weston A, Noack T. The importance of the different ionic current components in action potential generation in vascular smooth muscle. *Trace Elements and Electrolytes* 2005;22:248.

[5] Noack T, Deitmer P, Lammel E. Characterization of membrane currents in single smooth muscle cells from the guinea-pig gastric antrum. *The Journal of Physiology* 1992;451:387.

[6] Jones T. Discovery that the veins of the bat's wing are endowed with rhythmical contractility, and that the onward flow of blood is accelerated by each contraction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 1852;142:131-6.

[7] Davis M, Ferrer P, Gore R. Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1986;250:H291-H303.

[8] Mulvany M, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiological reviews* 1990;70:921-61.

[9] Folkow B. Structural factors: the vascular wall. Consequences of treatment. *Hypertension* 1983;5:III58.

- [10] Daut J, Klieber H, Cyrus S, Noack T. KATP channels and basal coronary vascular tone. *Cardiovascular Research* 1994;28:811.
- [11] Schiffrin E. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension* 1992;19:II1.
- [12] Hilton S. A peripheral arterial conducting mechanism underlying dilatation of the femoral artery and concerned in functional vasodilatation in skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 1959;149:93.
- [13] Segal S, Duling B. Conduction of vasomotor responses in arterioles: a role for cell-to-cell coupling? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1989;256:H838.
- [14] Gustafsson F, Holstein-Rathlou N. Conducted vasomotor responses in arterioles: characteristics, mechanisms and physiological significance. *Acta Physiologica Scandinavica* 1999;167:11-21.
- [15] Pohl U, Busse R. Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxant factor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1989;256:H1595.
- [16] Segal S, Duling B. Propagation of vasodilation in resistance vessels of the hamster: development and review of a working hypothesis. *Circulation Research* 1987;61:II20-5.
- [17] Dacquet C, Mironneau C, Mironneau J. Effects of calcium entry blockers on calcium-dependent contractions of rat portal vein. *British Journal of Pharmacology* 1987;92:203.
- [18] Somlyo A, Somlyo A. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews* 2003;83:1325.

- [19] Taylor D, Stull J. Calcium dependence of myosin light chain phosphorylation in smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:14456.
- [20] Niiro N, Ikebe M. Zipper-interacting protein kinase induces Ca²⁺-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:29567.
- [21] Ihara E, MacDonald J. The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2007;85:79-87.
- [22] Ito M, Nakano T, Erdi F, Hartshorne D. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004;259:197-209.
- [23] Stief C, Noack T, Andersson K. Signal transduction in cavernous smooth muscle. *World Journal of Urology* 1997;15:27-31.
- [24] Funaki S, Bohr D. Electrical and Mechanical Activity of Isolated Vascular Smooth Muscle of the Rat. *Nature* 1964;203:192-4.
- [25] Axelsson J, Wahlstrom B, Johansson B, Jonsson O. Influence of the Ionic Environment on Spontaneous Electrical and Mechanical Activity of the Rat Portal Vein. *Circulation Research* 1967;21:609.
- [26] Noack T, Weston A, Igelbrink S, Patjedl R. Spike activity and duration of multi-spike complex of rat portal vein smooth muscle is in reality shorter than determined with sharp microelectrodes. *Acta Physiologica* 2008;192:154.
- [27] Golenhofen K, Loh D. Elektrophysiologische Untersuchungen zur normalen Spontanaktivität der isolierten Taenia coli des Meerschweinchens. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 1970;314:312-28.

- [28] Golenhofen K, Loh D. Intracelluläre Potentialmessungen zur normalen Spontanaktivität der isolierten Portalvene des Meerschweinchens. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 1970;319:82-100.
- [29] El-Sharkawy T, Morgan K, Szurszewski J. Intracellular electrical activity of canine and human gastric smooth muscle. *The Journal of Physiology* 1978;279:291.
- [30] Ljung B, Stage L. Adrenergic excitatory influences on initiation and conduction of electrical activity in the rat portal vein. *Acta Physiologica Scandinavica* 1970;80:131-41.
- [31] Takahashi S, Hitomi J, Satoh Y, Takahashi T, Asakura H, Ushiki T. Fine structure of the mouse portal vein in relation to its peristaltic movement. *Archives of Histology and Cytology* 2002;65:71-82.
- [32] Hermsmeyer K. Multiple pacemaker sites in spontaneously active vascular muscle. *Circulation Research* 1973;33:244.
- [33] Welsh D, Segal S. Endothelial and smooth muscle cell conduction in arterioles controlling blood flow. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1998;274:H178.
- [34] Crane G, Neild T, Segal S. Contribution of active membrane processes to conducted hyperpolarization in arterioles of hamster cheek pouch. *Microcirculation* 2004;11:425-33.
- [35] Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* 2004;62:228.
- [36] Furshpan E, Potter D. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *The Journal of Physiology* 1959;145:289.

- [37] Revel J, Karnovsky M. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *The Journal of Cell Biology* 1967;33:C7.
- [38] Farraway L, Ball A, Huizinga J. Intercellular metabolic coupling in canine colon musculature. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1995;268:C1492.
- [39] Verheule S, van Kempen M, Welscher P, Kwak B, Jongsma H. Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium. *Circulation Research* 1997;80:673.
- [40] Saez J, Berthoud V, Branes M, Martinez A, Beyer E. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiological Reviews* 2003;83:1359.
- [41] Hotz-Wagenblatt A, Shalloway D. Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Critical Reviews in Oncogenesis* 1993;4:541.
- [42] Martin P, Wall C, Griffith T. Effects of connexin mimetic peptides on gap junction functionality and connexin expression in cultured vascular cells. *British Journal of Pharmacology* 2005;144:617-27.
- [43] Matchkov V, Rahman A, Bakker L, Griffith T, Nilsson H, Aalkjaer C. Analysis of effects of connexin-mimetic peptides in rat mesenteric small arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2006;291:H357.
- [44] de Wit C, Roos F, Bolz S, Kirchhoff S, Kruger O, Willecke K, et al. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circulation Research* 2000;86:649.
- [45] Nilsson H. Interactions between membrane potential and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 1998;164:559-66.

- [46] Peng H, Matchkov V, Ivarsen A, Aalkjar C, Nilsson H. Hypothesis for the initiation of vasomotion. *Circulation Research* 2001;88:810.
- [47] Miriel V, Mauban J, Blaustein M, Gil Wier W. Local and cellular Ca²⁺ transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *The Journal of Physiology* 1999;518:815.
- [48] Iino M, Kasai H, Yamazawa T. Visualization of neural control of intracellular Ca²⁺ concentration in single vascular smooth muscle cells in situ. *The EMBO journal* 1994;13:5026.
- [49] Aalkjaer C, Nilsson H. Vasomotion: cellular background for the oscillator and for the synchronization of smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 2005;144:605-16.
- [50] Hirst G, Neild T. An analysis of excitatory junctional potentials recorded from arterioles. *The Journal of Physiology* 1978;280:87.
- [51] van Breemen C, Laher I, Chen Q. Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Trends in Pharmacological Sciences* 1995;16:98-105.
- [52] Johansson B, Ljung B. Spread of excitation in the smooth muscle of the rat portal vein. *Acta Physiologica Scandinavica* 1967;70:312-22.
- [53] Tomita T, Watanabe H. Factors controlling myogenic activity in smooth muscle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 1973;265:73.
- [54] Bortoff A. Myogenic control of intestinal motility. *Physiological Reviews* 1976;56:418.
- [55] Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 1982;71:1-130.

- [56] Cajal S. Nuevas aplicaciones del metodo de coloracion de Golgi. *Gaceta Medica Catalana* 1889;12:613-6.
- [57] Hirst G, Ward S. Interstitial cells: involvement in rhythmicity and neural control of gut smooth muscle. *The Journal of Physiology* 2003;550:337.
- [58] Sanders K. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996;111:492-515.
- [59] Pucovsky V, Moss R, Bolton T. Non-contractile cells with thin processes resembling interstitial cells of Cajal found in the wall of guinea-pig mesenteric arteries. *The Journal of Physiology* 2003;552:119.
- [60] Povstyan O, Gordienko D, Harhun M, Bolton T. Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Cell Calcium* 2003;33:223-39.
- [61] Harhun M, Gordienko D, Povstyan O, Moss R, Bolton T. Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Circulation Research* 2004;95:619.
- [62] Golenhofen K. Untersuchungen am isolierten glatten Muskel. *Gastrointestinale Motilität - Klinische Untersuchungsmethoden* Edition Medizin, Weinheim 1983:139-49.
- [63] Daniel E, Wang Y. Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Microscopy Research and Technique* 1999;47:309-20.
- [64] Seppey D, Sauser R, Koenigsberger M, Bény J, Meister J. Intercellular calcium waves are associated with the propagation of vasomotion along arterial strips. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2010;298:H488.

- [65] Peracchia C. Structural correlates of gap junction permeation. *International Review of Cytology* 1980;66:81-146.
- [66] Spray D, Bennett M. Physiology and pharmacology of gap junctions. *Annual Review of Physiology* 1985;47:281-303.
- [67] Patejdl R, Noack T. The Propagation of Excitation in Portal Vein Smooth Muscle - Evidence for Coupled "Hot Spots". *Trace Elements und Electrolytes* 2010;27:202-8.
- [68] Golenhofen K, Hannappel J. Normal spontaneous activity of the pyeloureteral system in the guinea-pig. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 1973;341:257-70.
- [69] Maeda S, Tsukihara T. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2011;68:1115-29.
- [70] Hagger R, Finlayson C, Jeffrey I, Kumar D. Role of the interstitial cells of Cajal in the control of gut motility. *British Journal of Surgery* 1997;84:445-50.
- [71] Rumessen J, Thuneberg L. Pacemaker cells in the gastrointestinal tract: interstitial cells of Cajal. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1996;31:82-94.
- [72] Ward S, Sanders K. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterology & Motility* 2004;16:112-7.

7. Anhang

7.1. Veröffentlichungen

Abstracts

A. Kankel, S. Igelbrink, H.-H. Hopp, Th. Noack: Comparison of the cellular coupling parameter of two spontaneous active smooth muscle tissues using biological network analysis: portal vein and gastric antrum. Acta Physiologica 2010, Volume 198, Supplement 677

Poster

Th. Noack, A.H. Weston, S. Igelbrink, H.-H. Hopp, R. Patejdl: Spike activity and duration of multi-spike complex of rat portal vein smooth muscle is in reality shorter than determined with sharp microelectrodes, 87. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Köln

Th. Noack, S. Igelbrink, H.-H. Hopp: Biological Analysis in excitable tissues, 88. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Giessen

7.2. Lebenslauf

Daten zur Person

Name: Sebastian Igelbrink
Anschrift: Mühlenbuschweg 3, 41542 Dormagen
Geburtsdatum: 26.10.1984
Geburtsort: Dormagen

Ausbildung:

1991 - 1995: Sankt Nikolaus Grundschule Dormagen
1995 - 2004: Privates Norbert-Gymnasium Knechtsteden
Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife
2004 - 2006: Studium der Humanmedizin, Universität Marburg
Abschluss der ersten ärztlichen Prüfung
2006 - 2010: Studium der Humanmedizin, Universität Rostock
Staatsexamen, Abschluss der zweiten ärztlichen Prüfung
2011: Studium der Zahnmedizin, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Dissertation:

2006 – 2012: Experimentelle Untersuchung am Institut für Physiologie der Universität Rostock, Lehrstuhl für Physiologie, Arbeitsgruppe der vegetative Physiologie unter der Leitung von Professor Dr. Thomas Noack

7.3. Selbstständigkeitserklärung / Eidesstattliche Erklärung nach § 4 Abs. 2.5

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 23.06.2012

Sebastian Igelbrink

7.4. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Thomas Noack, für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und die exzellente fachliche Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit. Professor Noack vermittelte mir während des experimentellen Arbeitens mit viel Geduld sein Wissen und schulte meine wissenschaftliche Denkweise in zahlreichen kritischen Diskussionen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes bedanken, namentlich besonders bei Fr. Ulrike Mikkat die mir geholfen hat, die Präparation der Versuchstiere zu erlernen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung während des Studiums und der Fertigstellung dieser Arbeit.

8. Thesen

1. Oszillationen des Gefäßdurchmessers entstehen durch die rhythmische Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in den glatten Gefäßmuskelzellen. Für die Vasomotion ist eine Koordination der intrazellulären Kalziumsignale mehrerer Gefäßmuskelzellen erforderlich.
2. Durch Beladung des intakten glattmuskulären Gewebes der Rattenportalvene mit dem kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 und unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops lassen sich Konzentrationsschwankungen des Kalziums sowohl einzelner glatter Gefäßmuskelzellen als auch Konzentrationsschwankungen innerhalb des gesamten Zellverbandes in situ untersuchen.
3. Das räumliche Kopplungsverhalten der Rattenportalvene kann mittels korrelativer Netzwerkanalyse biologisch und technisch elegant gemessen werden. Diese Berechnungen demonstrieren räumliches Kopplungsverhalten und Verzögerungen des korrelierten Signals. Signalquellen und Wege können identifiziert werden. Laufzeitanalyse und Ortung von Signalquellen sind mithilfe kreuzkorrelativer Netzwerkanalyse möglich.
4. Sowohl longitudinale als auch transversale Dämpfung des Kalziumsignals innerhalb des Gewebes liegen im vergleichbaren Bereich. Der zeitliche Versatz in longitudinaler und transversaler Laufrichtung unterscheidet sich bei den verwendeten Gewebedimensionen nicht und ist von Null nicht signifikant.
5. Die Erregung im glatten Muskel breitet sich nicht rein elektrotonisch oder gemischt elektrotonisch und saltatorisch wie bei der Fortleitung des

Nervenaktionspotenzials aus, sondern besitzt offenbar einen anderen Mechanismus. Über sogenannte Hot Spots werden einzelne Areale nahezu zeitgleich erregt. Durch endogene Transmitter wie der Stimulation mit Noradrenalin werden die Hot Spots räumlich vergrößert und verschmelzen. Dadurch entsteht ein homogen koordiniert kontrahierendes Muskelgewebe.

6. Gap Junctions spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der synchronisierenden Signale zwischen den Muskelzellen. Durch Blockade der Gap Junctions mittels Octanol lassen sich die durch Noradrenalin ausgelösten synchronen Kalziumsignale reversibel unterdrücken.
7. Die alleinige Kontrolle der synchronen Kalziumsignale kann nicht den Gap Junctions zugeschrieben werden. Andere zelluläre Mechanismen, wie die aus dem Darm bekannte Pacemakerfunktion der Cajalzellen, sind an der Synchronisation der Kalziumsignale beteiligt. Sie bilden das organisierende Rückgrat der koordinierten muskulären Kontraktion.
8. Kalziumsignale, die 180° phasenverdrehung und mit identischer Frequenz aufgezeichnet wurden, haben ihren Ursprung in einem Netzwerk aus Cajal-, Muskel- und eventuell anderen Zellen. Die phasenverdrehung arbeitenden Zellen dienen als Mittler zwischen erregten und nicht erregten Zellen und tragen zur Koordination der gerichteten Kontraktion bei.