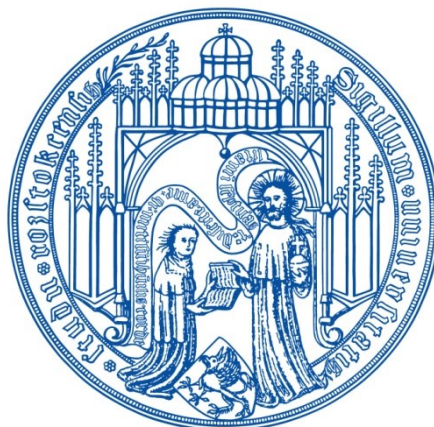


Aus dem Oscar Langendorff-Institut für Physiologie der Universität Rostock

Direktor : Prof. Dr. R. Köhling



**Untersuchung zur Erregungskopplung im glattmuskulären Magenantrum
der Ratte mittels mehrdimensionaler korrelativer Netzwerkanalyse**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Antje Kankel aus Altefähr

Rostock, 2014

[1]

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Noack,
Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie,
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Gerhard Stuhldreier,
Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Kinderchirurgie,
Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Rainer Rettig,
Institut für Physiologie,
Universität Greifswald

Datum der Einreichung: 11.12.2014

Datum der Verteidigung: 07.07.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	6
1 Einleitung	9
1.1 Struktur und Funktion des Magenantrums	10
1.2 Erregungsbildung und Erregungsfortleitung.....	12
1.3 Der Kontraktionsprozess in der glatten Muskelzelle	14
1.4 Elektrophysiologie der glatten Muskelzellen.....	15
1.5 Calcium-Handling	15
1.6 Modulation der Aktivität durch das vegetative und enterische Nervensystem	16
1.7 Gap Junctions (GJ).....	17
1.8 Ziel der Kopplungsanalyse.....	18
1.9 Ziel der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Verwendete Lösungen.....	21
2.1.1 Präparierlösung	21
2.1.2 Physiologische Salzlösung.....	21
2.1.3 Farbstofflösung	21
2.2 Präparation und Inkubation	23
2.3 Versuchsaufbau	24
2.3.1 Messung der mechanischen Aktivität im Organbad	24
2.3.2 Räumlich-zeitliche Darstellung des intrazellulären Ca^{2+} -Signals mittels Fluoreszenzmikroskopie	25
2.4 Versuchsablauf Fluoreszenzmikroskopie.....	29
2.5 Verwendete Substanzen	30
2.6 Auswertung	30
2.7 Die Kreuzkorrelationsfunktion.....	35
2.8 Maximal detektierbare Geschwindigkeit	36
2.9 Statistik.....	37
3 Ergebnisse.....	38
3.1 Die mechanische Spontanaktivität und ihre Beeinflussung durch Temperatur, Acetylcholin und Octanol.....	38
3.2 Sichtbare Strukturen / Konfokale Einzelbilder	41

3.3	Fluoreszenz-Signalverläufe/Konfokale Serienaufnahmen/ Spontanaktivität.....	43
3.4	Auswahl der Präparate und Bildausschnitte.....	45
3.5	Abhängigkeit der normierten KKF am Modell der Sinusschwingung....	45
3.5.1	Amplitude und absolute Höhe des Ausgangssignals	45
3.5.2	Zeitlicher Versatz.....	46
3.5.3	Frequenz.....	46
3.5.4	Rauschen.....	47
3.5.5	Abnahme durch Bleichungseffekte.....	48
3.6	Räumliche Kopplung im homogenen glattmuskulären Zellverband	49
3.7	Zeitliche Kopplung der glatten Muskelzellen	58
3.8	Pharmakologische Beeinflussbarkeit der Kopplung	59
3.8.1	Effekt von Acetylcholin.....	59
3.8.2	Einfluss von Octanol.....	61
4	Diskussion	63
4.1	Korrelative Netzwerkanalyse homogener Strukturen	63
4.2	Kopplung im Magenantrum	63
4.3	Gap Junctions	65
4.4	Cholinerge Modulation der Kopplung	65
4.5	Anpassung der Kontraktionskraft	66
4.6	Fehlerquellen, Grenzen und Potential der Methodik	67
4.6.1	Präparation	67
4.6.2	Indikator.....	68
4.6.3	Korrelative Netzwerkanalyse.....	69
4.6.4	Modellrechnung.....	70
4.6.5	Laufzeitanalyse	70
4.6.6	Frequenz.....	71
4.7	Die Kopplungsreserve.....	72
4.8	Bedeutung der Kopplungsreserve	72
5	Thesen.....	74
6	Literaturverzeichnis.....	76
7	Anhang	87
7.1	Selbstständigkeitserklärung.....	87
7.2	Danksagung.....	87

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
CML	circular muscle layer = zirkuläre glatte Muskelschicht
DMSO	Dimethylsulfoxid
AM-E	Acetoxymethylester
GJ	Gap Junctions
HS	Hot Spots
ICC	interstitielle Zellen nach Cajal
ICC-IM	intramuskuläre Cajal-Zellen
ICC-MY	myenterische Cajal-Zellen
ILK	Integrin-linked Kinase
IP ₃	Inositol 1,4,5 -triphosphat
K1	Kontrolle
K2	Nachkontrolle
K _d	Dissoziationskonstante
KKF	Kreuzkorrelationsfunktion
LML	longitudinal muscle layer = longitudinale glatte Muskelschicht
MCP	Metoclopramid
MLCK	Myosin-Leicht-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase
NCX	Natrium/Calcium-Austauscher
nKKF	normierte Kreuzkorrelationsfunktion
NO	Stickoxid
Oct	Octanol
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMCA	Plasma-Membran-Calcium-ATPase
Rho-K	Rho-Kinase
ROI	Region of Interest = Messfeld
s	Standardabweichung
sem	standard error of the mean = Standardfehler

SERCA	sarkoplasmatisches Retikulum-Calcium-ATPase
SMC	smooth muscle cell = glatte Muskelzelle
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
VDCC	spannungsabhängige, Dihydropyridin-sensitive Calcium-Kanäle
ZIPK	Zipper-Interacting-Protein-Kinase

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

- 1.1 Schematische Darstellung der Tunica muscularis des Magenantrums, modifiziert nach Ward. et. al. [12]
- 1.2 Simultane Messung des Membranpotentials (MP), des intrazellulären Calciums (Ratio) und der Kraft (Tension), Quelle: [58]
- 2.1 Schematische Darstellung der Präparatentnahme und -vorbereitung
- 2.2 Schematischer Versuchsaufbau des Organbades
- 2.3 Schematischer Versuchsaufbau am konfokalen Mikroskop
- 2.4 Schematischer Versuchsablauf am konfokalen Mikroskop
- 2.5 Matrix 1
- 2.6 Matrix 2
- 2.7 Schematische Darstellung der Auswertung
- 3.1 Spontanaktivität des Magenantrums der Ratte
- 3.2 Abhängigkeit der mechanischen Spontanaktivität von der Temperatur
- 3.3 Einfluss des Acetylcholin auf die mechanische Aktivität des Magenantrums
- 3.4 Mechanische Aktivität im Organbad unter Octanol
- 3.5 Korrelation der mechanischen Aktivität unter Spontanbedingungen vs. Octanol bzw. Acetylcholin
- 3.6 Einzelaufnahmen des Calcium-Signals der kontraktile Schicht der Magenwand der Ratte
- 3.7 konfokale Einzelbilder

- 3.8 Einfluss der prozentualen Abweichung der Periodendauer auf das Maximum der Kreuzkorrelationsfunktion
- 3.9 Einfluss des Signal-Rausch-Quotienten auf das Maximum der nKKF
- 3.10 Abnahme der maximalen Korrelation in Abhängigkeit von der linearen Komponente
- 3.11 Kopplungsverhalten spontan aktiver glatter Muskelzellen im 20 μm - Radius
- 3.12 Gegenüberstellung der Kopplung unter Spontanbedingungen in entgegengesetzten Richtungen vom Zentrum
- 3.13 Gegenüberstellung der Kopplung unter Spontanbedingungen longitudinal vs. transversal
- 3.14 Veränderung der Kopplung durch Zusammenfassung von ROIs zu Gruppen
- 3.15 Anordnung der ROIs der Matrix 2
- 3.16 Kopplungsverhalten spontan aktiver glatter Muskelzellen im 60 μm - Radius
- 3.17 Kumulierte Häufigkeitsverteilungen des zeitlichen Versatzes
- 3.18 Vergleich der Kopplung unter Acetylcholin vs. Spontanbedingungen
- 4.1 Vergleich der Kopplung unter Octanol vs. Spontanbedingungen
- 4.1 Kopplungsverhalten im Magenantrum

Tabellen:

- 3.1 Mittelwerte und Standardfehler der Standardabweichungen der Korrelationsmaxima in 5 bzw. 20 μm Entfernung vom Zentrum
- 3.2 Mittelwerte der Kreuzkorrelationsmaxima zu Abbildung 3.11
- 3.3 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten Präparate zu Abbildung 3.12
- 3.4 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten Präparate zu Abbildung 3.13
- 3.5 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten ROIs zu Abbildung 3.14
- 3.6 Mittelwerte der Korrelationsmaxima im 60 μm - Radius

- 3.7 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl
n der untersuchten Präparate zu Abbildung 3.16
- 3.8 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl
n der untersuchten Präparate (Vergleich longitudinal vs. transversal)
- 3.9 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl
n der untersuchten ROIs zu Abbildung 3.18
- 3.10 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl
n der untersuchten ROIs zu Abbildung 3.19

1 Einleitung

Eine Reihe von Erkrankungen geht mit einer Veränderung der gastralen Motilität einher und verursacht somit Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen, Appetitverlust, Völlegefühl und Magenschmerzen. Ein typisches Beispiel ist die diabetische Gastropathie. Sie tritt bei etwa 50% der Patienten mit Typ I-Diabetes und 30% der Patienten mit Typ-II-Diabetes auf, geht in 75% der Fälle mit den genannten Symptomen einher und beeinflusst damit die Lebensqualität der Betroffenen maßgeblich [1]. Die pathophysiologischen Zusammenhänge wurden in den letzten Jahren zunehmend untersucht. Neben einer autonomen neuropathischen wurde auch eine myopathische Genese diskutiert [1, 2]. Neuere Studien wiesen zudem eine Verminderung von sogenannten interstitiellen Cajal-Zellen nach [3, 4]. Bei der diabetischen Gastropathie beobachtet man vor allem eine Verminderung der postprandialen Antrummotilität und eine Dysfunktion des Pylorus [5]. Aber auch eine Hyperglykämie per se kann die phasischen Kontraktionen des Magenantrums und den Tonus des Magenfundus vermindern [6]. Der veränderten Magenfunktion liegen demnach sowohl funktionelle Wechselwirkungen als auch morphologische Veränderungen zu Grunde.

Es ist bekannt, dass eine konsequente antidiabetische Therapie die Entwicklung diabetischer kardiovaskulärer oder neuropathischer Komplikationen verhindern kann. Ebenso verhält es sich mit der diabetischen Gastropathie. Die therapeutischen Möglichkeiten sind zumeist rein symptomatisch und unter Abwägung der möglichen Risiken limitiert, wie das aktuelle EU-weite Risikobewertungsverfahren für den motilitätssteigernden Dopamin-D2-Rezeptor-Inhibitor Metoclopramid (MCP) zeigt [7]. Als Ultima Ratio bei therapierefraktärer Gastroparese und ausgeprägter Symptomatik kann eine Magenschrittmacherimplantation erwogen werden [8]. Bei Erkrankungen wie der diabetischen Gastropathie, welche mit Verzögerung bis hin zur völligen Aufhebung der Motilität einhergehen, wird die Bedeutung eines reibungslosen Ablaufes peristaltischer Kontraktionen zur Durchmischung und Beförderung des

Mageninhaltenes deutlich. Der gastralen glattmuskulären Aktivität liegen hierbei komplexe Mechanismen der Erregungsbildung und koordinierten Erregungsfortleitung zu Grunde. Insgesamt erhofft man sich durch ein besseres Verständnis der gastralen Physiologie und Pathophysiologie auch Fortschritte in der Entwicklung neuer Therapieansätze.

1.1 Struktur und Funktion des Magenantrums

Das Magenantrum dient der Durchmischung und Homogenisierung des Speisebreis mit der von den Belegzellen des Korpus gebildeten Magensäure, bevor der gesamte Mageninhalt portionsweise durch den Pylorus ins Duodenum abgegeben wird. Hierzu weist das Antrum ein stark synchronisiertes phasisch-rhythmisches Kontraktionsverhalten auf. Eine ausführliche Beschreibung der hier angedeuteten funktionellen Prozesse und eine Übersicht der entsprechenden Originalarbeiten geben Golenhofen et. al. 1970 [9] sowie Lüdtker et. al. 1991 [10].

Die Tunica muscularis des Magens enthält ein komplexes Netzwerk aus glatten Muskelzellen (SMC), interstitiellen Cajal-Zellen (ICC), enterischen Ganglienzellen und vegetativen Nervenfasern. Die Abbildung 1.1 gibt einen schematischen Überblick über die beteiligten Zellen der Tunica muscularis der antralen Magenwand, sowie die bisher identifizierten und postulierten interzellulären Kommunikationswege.

Neben den kontraktile glatten Muskelzellen, welche in einer inneren zirkulären und einer äußeren longitudinalen Muskelschicht angeordnet sind, befinden sich in der Magenwand 2 verschiedene Typen von sogenannten Interstitiellen Zellen nach Cajal. Eine Übersicht gibt die Arbeit von Burns et.al. 1997 [11].

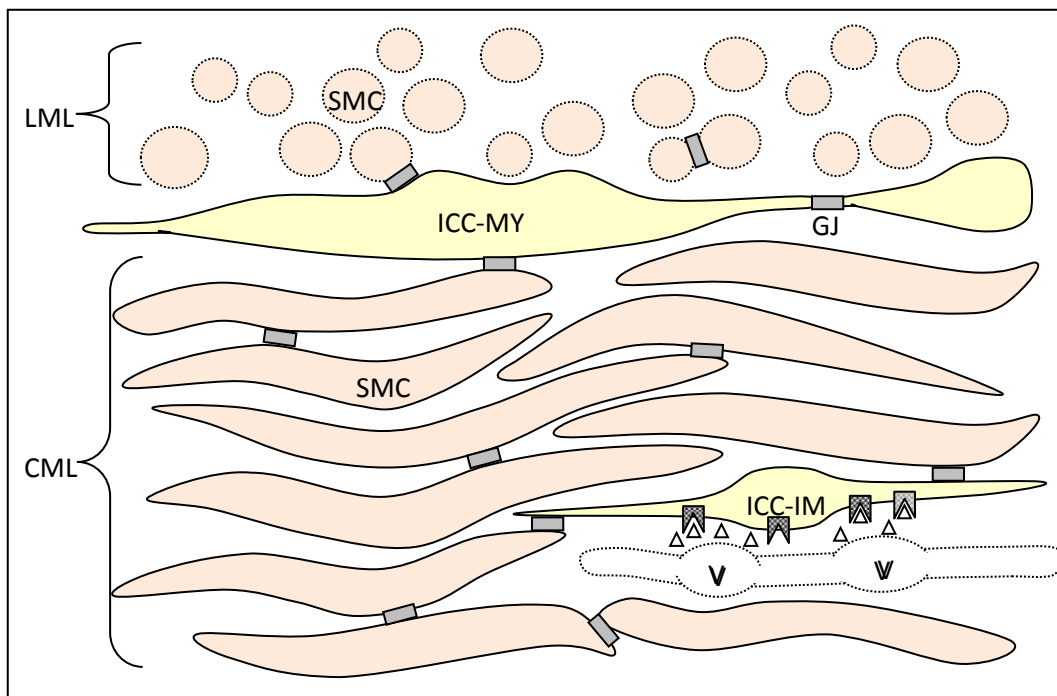







Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Tunica muscularis des Magenansatzes, modifiziert nach Ward et. al. [12]

Die glatten Muskelzellen (SMC) sind in einer inneren zirkulären (CML, ) und einer äußeren longitudinalen (LML, ) Schicht angeordnet. Dazwischen befindet sich eine dünne bindegewebige Schicht, welche den Plexus myentericus und die myenterischen interstitiellen Zellen von Cajal enthält (ICC-MY, )). Die ICC-MY mit ihren zahlreichen Fortsätzen sind über Gap Junctions (GJ ) untereinander und mit den angrenzenden glatten Muskelzellen des Stratum circulare und longitudinale verbunden [11, 13, 14]. In der inneren zirkulären Muskelschicht liegen die parallel angeordneten glatten Muskelzellen, welche ebenfalls durch Gap Junctions miteinander in Verbindung stehen. Zwischengelagert finden sich intramuskuläre Cajal-Zellen (ICC-IM, )). Diese spindelförmigen Zellen, die parallel zu den glatten Muskelzellen angeordnet sind und untereinander und mit den glatten Muskelzellen der zirkulären Muskelschicht durch Gap Junctions verbunden sind, stehen in engem Kontakt zu enterischen Nervenendigungen und bilden synapsenartige Verbindungen mit deren Varikositäten (V), Transmitter (Δ), Rezeptor (\blacksquare). Diese strukturellen Gegebenheiten sind die Grundlage für das Postulat der Mediatorrolle der ICC-IM in der Signalübertragung von den enterischen exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen auf die glatte Muskulatur des Magens [15].

Die myenterischen Cajal-Zellen (ICC-MY) liegen zwischen der zirkulären und der longitudinalen Muskelschicht, also in einer Ebene mit dem Plexus myentericus. Sie besitzen zahlreiche Fortsätze, durch die sie über Gap Junctions (GJ) untereinander und mit den angrenzenden glatten Muskelzellen des Stratum circulare und longitudinale verbunden sind [11, 13, 14]. Die intramuskulären interstitiellen Zellen (ICC-IM) befinden sich vor allem in der zirkulären Muskelschicht, in geringerer Anzahl auch in der longitudinalen Muskelschicht des Antrums. Diese spindelförmigen Zellen sind parallel zu den glatten Muskelzellen angeordnet und ebenfalls über Gap Junctions miteinander und mit den zirkulären Muskelzellen verbunden [11]. Des Weiteren stehen sie über Synapsen-artige Strukturen in engem Kontakt zu enterischen Nervenendigungen [15].

1.2 Erregungsbildung und Erregungsfortleitung

Die phasisch-rhythmische Aktivität des Magenantrums ist „myogener“ Natur, d.h. sie entsteht in der Magenwand selbst und ist auch am isolierten Magen bzw. am isolierten Streifen der Magenwand noch vorhanden. Als Schrittmacher der myogenen mechanischen Aktivität gelten die ICC-MY [16, 17].

Intrazelluläre Potentialmessungen an Zellbündeln zeigten, dass die ICC-MY untereinander und mit den angrenzenden glatten Muskelzellen, sowohl der longitudinalen, als auch der zirkulären Muskelschicht elektrisch gekoppelt sind. Dabei verglichen Cousins et. al. sogenannte Input- oder Transferwiderstände, definiert als Quotient der Amplitude der evozierten elektrotonischen Potentiale und der Amplitude des applizierten Stromes und stellten fest, dass die elektrische Kopplung unter benachbarten Zellen in einer Schicht besser ist als die Kopplung der ICC-MY zu Zellen der angrenzenden Muskelschichten [13, 14].

Die ICC-MY generieren sogenannte Schrittmacher-Potentiale (je nach Literatur auch Slow Waves genannt). Dies sind langsame, rhythmische Depolarisationen, welche sich passiv auf die angrenzenden glatten Muskelzellen ausbreiten, einerseits in das Stratum circulare, hier entstehen Slow Waves, andererseits in das

Stratum longitudinale, dort werden Follower Potentials hervorgerufen. Simultane Messung der elektrischen Phänomene in Zellen verschiedener Schichten zeigte, dass die Schrittmacher-Potentiale, die Slow Waves und die Follower Potentials synchron auftreten [18].

Als Ursprung der Schrittmacher-Aktivität im Magen des Meerschweinchens und der Ratte gelten die ICC-MY an der großen Krümmung des Magenkorpus. Untersuchungen am Magen des Meerschweinchens zeigten von hier aus eine schnelle Ausbreitung der Erregung in zirkumferentieller Richtung zur kleinen Krümmung (mit einer Geschwindigkeit von ca. 14 mm/s) und eine etwas langsamere Ausbreitung in Richtung Magenausgang (mit einer mittleren Geschwindigkeit von 3 mm/s) [19, 20]. Für den Rattenmagen wurde in Experimenten am gesamten Magen in vivo eine oro-anale Ausbreitungsgeschwindigkeit von etwa 1 mm/s beobachtet [21]. An isolierten Muskelstreifen aus unterschiedlichen Regionen des Magens kann in vitro vom proximalen Corpus zum distalen Antrum eine abnehmende Eigenfrequenz der mechanischen Aktivität beobachtet werden, sodass man davon ausgehen kann, dass die Schrittmacher in allen Teilen des Magens vorhanden sind.

Insgesamt ist die Signalentstehung und -weiterleitung im multizellulären Netzwerk des Magenantrums in ihrer Komplexität jedoch nur schwer erfassbar und durch die zelluläre Inhomogenität mittels üblicher Untersuchungsmethoden nicht realitätsgetreu abbildbar. An glattmuskulären Geweben wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, welche die Erregbarkeit der isolierten Zelle beschreiben, die Kopplung mit anderen (Muskel-)zellen durch Farbstoffdiffusion und Multielektrodenmessungen untersuchen und modellhafte Berechnungen zur Erregungsbildung und -fortleitung vornehmen [11, 13, 14]. Probleme ergeben sich bei dieser Vorgehensweise jedoch durch die Anzahl der Freiheitsgrade im intakten Gewebe und die Modellbildung aus Daten, welche durch Zellisolation oder Applikation eines exogenen Signals (Farbstoff oder Strom) gewonnen wurden. Einige Untersuchungsmethoden, die glatte Muskelzellen analysieren, lösen den

Zellverband auf, beeinflussen wie bei der Patch-Clamp-Technik die Membraneigenschaften und haben so wenig Aussicht, die Signalentstehung und -propagation im intakten Zellverband bzw. die interzelluläre Kopplung realitätsnah abzubilden. Bereits Versuche mit der „Rostocker Hose“ legten eine hohe Kopplung im Magenantrum im Vergleich zum vaskulären glatten Gefäßmuskel der Portalvene nahe. Die dieser Beobachtung zu Grunde liegende Untersuchung analysierte die Kopplung der mechanischen Aktivität zweier künstlich in Längsrichtung zu $\frac{3}{4}$ getrennten Gewebehälften („Hosenbeine“), welche über eine Länge von $\frac{1}{4}$ des Präparates (sogenannter „Hosenbund“) verbunden blieben [22].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, die *interzelluläre* Kopplung im glattmuskulären Zellverband möglichst nicht-invasiv zu untersuchen, zu beschreiben und zu quantifizieren. Dazu wird eine mehrdimensionale korrelative Netzwerkanalyse verwendet [23]. Sie ermöglicht eine ortsabhängige/mehrdimensionale Analyse des Kopplungsverhaltens der glatten Muskelzellen auf Zellebene.

1.3 Der Kontraktionsprozess in der glatten Muskelzelle

Die elektromechanische Kopplung im glatten Muskel wird ähnlich wie im Skelettmuskel durch die Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration vermittelt. Die Calcium-Ionen bilden mit Calmodulin und der Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (MLCK) einen aktivierten Enzymkomplex und führen so zu einer Phosphorylierung der 20 kDa Untereinheit der leichten Myosinkette, welche im phosphorylierten Zustand die Bindung von Aktin an Myosin erleichtert und die glattmuskuläre Kontraktion über den Querbrückenmechanismus bewirkt [24, 25]. Neben der Calcium vermittelten Aktivierung der MLCK gibt es noch eine Reihe weiterer Calcium-unabhängiger Kinasen, wie z.B. die Rho-Kinase (Rho-K), die Integrin-linked-Kinase (ILK) und die Zipper-Interacting-Protein-Kinase (ZIPK), welche über die Hemmung der Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLCP) oder direkte Phosphorylierung der MLC20 das Gleichgewicht in Richtung Kontraktion verschieben können [26, 27]. Bei sinkenden intrazellulären Calcium-

Konzentrationen dissoziiert der Calcium-Calmodulin-MLCK-Komplex in seine inaktiven Einzelkomponenten. Dadurch überwiegt die Aktivität der MLCP und das Gleichgewicht verschiebt sich durch Dephosphorylierung der MLC in Richtung Relaxation [28].

1.4 Elektrophysiologie der glatten Muskelzellen

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes wurden an verschiedenen Nagetieren untersucht. Eine Übersicht gibt die Arbeit von Sanders et. al. 2008 [29]. Allen glatten Muskelzellen gemeinsam ist das Vorhandensein von spannungsabhängigen, Dihydropyridin-sensitiven Calcium-Kanälen (VDCC) vom Typ $Ca_v1.2$ [30, 31], sowie delayed-rectifier Kalium-Kanälen vom Typ $K_v1.5$ oder K_v2 [32, 33] und Calcium-aktivierten (BK) Kalium-Kanälen. Einen Überblick über beteiligte Ströme in den glatten Muskelzellen im Magenantrum des Meerschweinchens gibt die Veröffentlichung von Noack et. al. 1992 [34].

1.5 Calcium-Handling

Da das intrazelluläre Calcium den entscheidenden Mediator der elektromechanischen Kopplung darstellt, wird die zytoplasmatische Konzentration streng reguliert. Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration kann prinzipiell durch Calcium-Einstrom aus dem Extrazellularraum via spannungsabhängige Calcium-Kanäle (VDCC= $Ca_v1.2$) zu Stande kommen oder durch Freisetzung von Calcium aus zytoplasmatischen Organellen wie dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) oder den Mitochondrien [35]. Die Senkung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration erfolgt durch aktiven Transport ins sarkoplasmatische Retikulum via SR-Calcium-ATPase (SERCA) oder in den Extrazellularraum via Plasma-Membran-Calcium-ATPase (PMCA) oder den Natrium/Calcium-Austauscher (NCX) (siehe [36]). Die Funktion der SERCA wird durch das Protein Phospholamban reguliert. Phosphorylierung des Phospholambans (durch Proteinkinase A, C, G oder Ca-

Calmodulin-abhängige Proteinkinase) steigert die Wiederaufnahme des Calciums ins SR [37 - 40]. Das sarkoplasmatische Retikulum hat 2 Rezeptoren, welche für die Calcium-Freisetzung eine Rolle spielen. Dabei handelt es sich um den Ryanodin-Rezeptor und den etwa 10-mal häufigeren Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor (IP₃-Rezeptor) [41].

Der IP₃-Rezeptor wird durch Bindung von Inositol-1,4,5-triphosphat aktiviert. Dieser second messenger entsteht nach Bindung von extrazellulären Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der glattmuskulären Zellmembran. Im Magenantrum gehören dazu unter anderem Acetylcholin [42], Motilin, Gastrin [43] und Cholezystokinin [44].

1.6 Modulation der Aktivität durch das vegetative und enterische Nervensystem

Die antrale Motilität kann durch das vegetative Nervensystem (d.h. den Sympathikus und den Parasympathikus) und das enterische Nervensystem, organisiert im Plexus myentericus, beeinflusst werden [41, 42]. Eine Durchtrennung der extrinsischen vegetativen Innervation beeinträchtigt die Anpassungsfähigkeit an die jeweiligen Erfordernisse, die meisten elementaren Funktionen jedoch nicht. Zudem gibt es Hinweise dafür, dass intrinsische enterische Reflexe nur spärlich vorhanden sind und die gastrale Peristaltik auch in Abwesenheit des Plexus myentericus funktioniert [12].

Sowohl die glatten Muskelzellen als auch die interstitiellen Cajal-Zellen besitzen an ihrer Oberfläche eine Reihe von Rezeptoren. Einen Überblick geben die Arbeiten von Wrzos et. al. 2004 und Garcia-Lopez et. al. 2009 [45, 46].

In vivo wird die nervale Innervation im Magenantrum vermutlich über die ICC-IM vermittelt. So zeigten Untersuchungen an Tieren, denen diese interstitiellen Zellen fehlten, im Vergleich zu normalen Tieren verminderte inhibitorische und fehlende exzitatorische postjunktionale Reaktionen auf NO bzw. cholinerge Stimulation [47, 48]. Durch elektronenmikroskopische, immunhistochemische

und molekularbiologische (PCR) Verfahren konnte gezeigt werden, dass die ICC-IM spezialisierte Synapsen-ähnliche Kontakte mit Nervenendigungen ausbilden [15]. Des Weiteren geht man davon aus, dass in vivo durch Nervenfasern freigesetztes Acetylcholin über die Synapsen-artigen Kontakte nur die ICC-IM erreicht und außerhalb dieser Regionen schnell durch Cholinesterasen gespalten wird und somit in vivo keinen direkten Effekt auf die glatten Muskelzellen hat [12].

1.7 Gap Junctions (GJ)

1937 postulierte Emil Bozler erstmals den synzytialen Charakter der glatten Muskulatur in Analogie zum quergestreiften Herzmuskel [49, 50]. Im Herzen verbinden Gap Junctions die einzelnen quergestreiften Muskelfasern zu einem elektrischen Synzytium und ermöglichen somit die koordinierte kardiale Kontraktion. Ebenso wird den Gap Junctions im glatten Muskelzellverband des Gastrointestinaltraktes, und auch des Magens, von einigen Autoren eine bedeutende Rolle im Rahmen der Erregungsleitung und -koordination zugesprochen [11, 13, 14]. Gap Junctions ermöglichen durch ihren Aufbau und ihre Lokalisation eine direkte Kommunikation zwischen benachbarten Zellen, indem sie die Diffusion zahlreicher Moleküle (Metaboliten, Ionen, Second messenger und Wasser) mit einer maximalen Größe von 1,5 bis 2 nm und einer Masse von 1 kDa zulassen und auch elektrische Signale weiterleiten können [51, 52, 53]. Die Leitfähigkeit der GJ wird durch die intrazelluläre Calcium-Konzentration, den pH-Wert und Protein-Kinasen reguliert [54]. GJ sind durchlässig für Farbstoffe wie Lucifer Yellow oder Neurobiotin. Diese Eigenschaft nutzten Dickens et. al. und zeigten, dass sowohl die SMC in der zirkulären Muskelschicht als auch die ICC des Magenantrums untereinander durch GJ verbunden sind. Durch Potentialmessungen nach Strominjektion an benachbarten Zellen konnte auch eine elektrische Kopplung nachgewiesen werden [13]. 2003 gelang der Nachweis des Connexin 43 im Magenantrum [14]. Dennoch ist die Rolle der Gap Junctions in der interzellulären Kommunikation im GIT

nicht unumstritten. Insbesondere die Arbeitsgruppe um Daniel et. al. stellt die Beteiligung der GJ an der Kommunikation zwischen den interstitiellen Zellen und den glatten Muskelzellen im Rahmen der Schrittmacherfunktion und der Neurotransmission in Frage und vermutet einen weiteren, bisher unbekanntem Mechanismus [55, 56]. Dieser Standpunkt stützt sich auf Untersuchungen mit GJ-Blockern wie Octanol oder Carbenoxolon am Dünndarm der Maus und kritisch hinterfragt bisheriger experimenteller Ergebnisse und Schlussfolgerungen. So funktioniert die Zellkommunikation im Dünndarm auch in Abwesenheit von GJ. Für das Magenantrum wurde postuliert, dass sowohl die glatten Muskelzellen untereinander, die ICC untereinander und auch die glatten Muskelzellen mit den ICC durch GJ in Verbindung stehen. Die Farbstoffe wie Lucifer Yellow oder Neurobiotin, welche gewöhnlich GJ permeieren können, verteilen sich jedoch nur im Verband gleichartiger Zellen einer Schicht, während das elektrische Signal, wenn auch schwächer, in benachbarte Zellschichten vordringt.

1.8 Ziel der Kopplungsanalyse

Die Magenmotilität gewährleistet durch koordinierte phasisch-rhythmische Aktivität die peristaltischen Kontraktionen der Magenwand zur Durchmischung und Beförderung des Mageninhaltes. Generiert und koordiniert wird diese Aktivität in einem multizellulären Netzwerk aus Cajal-Zellen und glatten Muskelzellen, beeinflusst durch enterische und vegetative Innervation.

Ziel dieser Arbeit ist es, die interzelluläre glattmuskuläre Kopplung möglichst nichtinvasiv zu untersuchen. Hierzu wird die mehrdimensionale korrelative Netzwerkanalyse eingesetzt, mit deren Hilfe die zeitliche Veränderung des Calcium-Signals über mehrere Zellen hinweg beobachtet werden kann, ohne die Einbettung in den physiologischen Zellverband aufzuheben.

Das kontraktile Gewebe des Magenantrums zeigt in vivo eine phasisch-rhythmische Spontanaktivität, welche auch an isolierten Streifen der Magenwand im Organbad erhalten bleibt. Diese endogene Spontanaktivität ist eine

unerlässliche Voraussetzung für die korrelative Netzwerkanalyse und stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber den meisten bisherigen Untersuchungen dar, in denen die Propagation eines exogen applizierten Signals analysiert wurde.

Der ideale Ansatz zur nicht-invasiven Bestimmung der Kopplung ist die zyttoplasmatische Calcium-Konzentrationsänderung, da diese einen repräsentativen Parameter für den Erregungs- und Kontraktionszustand der Einzelzelle darstellt, weil sie im Rahmen der elektromechanischen Kopplung zeitlich eng sowohl mit der Erregung der Zelle (Depolarisation durch Slow Wave) als auch der Kontraktion verbunden ist, wie simultane Messung des Membranpotentials, der intrazellulären Calcium-Konzentration und der Kraft zeigten (siehe Abbildung 1.2 aus [57]).

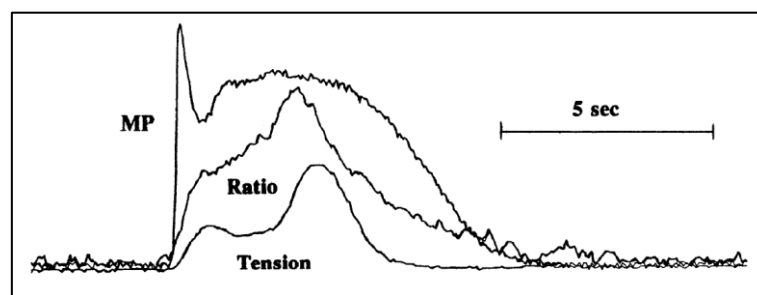


Abbildung 1.2 Simultane Messung des Membranpotentials (MP), des intrazellulären Calciums (Ratio) und der Kraft (Tension) [57]

Die zyttoplasmatische Calcium-Konzentrationsänderung kann, nach vorheriger passiver Beladung des Präparates mit einem fluoreszierenden Calcium-Indikator, nicht-invasiv mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops gemessen werden.

Die Messung des Fluoreszenzsignals als Marker der räumlich-zeitlichen intrazellulären Calcium-Konzentrationsänderung erfolgt mit einem konfokalen Spinning-Disc-Mikroskop. Dieses ermöglicht die zweidimensionale Erfassung der Fluoreszenzintensität in einer gewählten, dünnen Fokusebene über einen Zeitraum von Minuten bis Stunden.

Da jede Kontraktion mit einer Membranpotential-Depolarisation und einer konsekutiven Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration einhergeht,

kann die Kopplung zweier Zellen beziehungsweise Stellen in einem Präparat durch Analyse ihrer Calcium-Fluoreszenzsignale auf Ähnlichkeit und zeitlichen Versatz bestimmt werden. Ein geeignetes Mittel zur Untersuchung der Kopplung ist die Kreuzkorrelationsanalyse, ein mathematisches Konstrukt zur Analyse der zeitlichen bzw. räumlichen Ähnlichkeit zweier Signale.

1.9 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Kopplungseigenschaften im antralen Gewebe unter Spontanbedingungen und cholinergem Antrieb, sowie unter Blockade der Gap Junctions in Zusammenschau mit bisherigen Erkenntnissen zu diskutieren. Dabei ergeben sich folgende konkrete Fragestellungen:

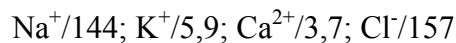
1. Wie stark ist die Kopplung im intakten glattmuskulären Zellverband des Antrums des isolierten Magens der Ratte in vitro unter Kontrollbedingungen?
2. Wie verändert sich das Gesamtverhalten des Gewebes durch Veränderung der Kopplung?
3. Welche Effekte haben der parasymphatische Transmitter Acetylcholin und der unspezifische GJ-Blocker Octanol auf das Gesamtverhalten des Gewebes beziehungsweise die interzelluläre Kopplung?
4. Lässt sich eine Richtung und gegebenenfalls eine Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung ermitteln?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Lösungen

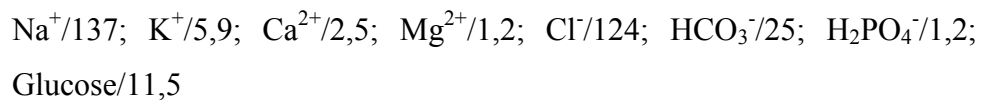
2.1.1 Präparierlösung

Während der Präparation der Muskelstreifen, sowie zur Inkubation der Präparate mit dem Indikator Fluo-3 wurde Präparierlösung mit folgender Zusammensetzung verwendet: (Angaben in mmol/l)



2.1.2 Physiologische Salzlösung

Um die Spontanaktivität der Präparate zu erhalten, wurden die Experimente mit physiologischer Salzlösung durchgeführt, welche die interstitielle Lösung, also die unmittelbare Umgebung der Zellen in vivo, bezüglich des osmotischen Drucks, der Ionenzusammensetzung, des pH-Wertes und der Temperatur nachahmt [58]. Sie hat folgende Zusammensetzung (in mmol/l):



Durch Begasung mit 95% O₂ und 5% CO₂ stellt sich ein pH-Wert von etwa 7,4 ein.

2.1.3 Farbstofflösung

Zur Erfassung intrazellulärer räumlich-zeitlicher Ca²⁺-Muster ist die Fluoreszenzmikroskopie geeignet. Dafür stehen eine ganze Reihe hochsensibler Ca²⁺-Indikatoren zur Verfügung [59].

Für die vorliegende Arbeit musste ein Calcium-Indikator ausgewählt werden, der die folgenden Anforderungen erfüllt: Der Indikator muss in einer chemischen Form erhältlich sein, in der er nach Inkubation eines Gewebestückes in Farbstofflösung passiv durch die Zellmembranen in das Zellinnere eindringen

kann ohne die Integrität der Zellen zu stören. Er darf die Zelle in ihrer Funktionalität nicht beeinflussen. Die Calcium-Affinität, beschrieben durch die Dissoziationskonstante K_d , sollte im Bereich der mittleren intrazellulären Calcium-Konzentration liegen. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge des Indikators muss mit der verwendeten Lichtquelle im konfokalen Mikroskop kompatibel sein. Für die Korrelationsanalyse ist ein nicht-ratiometrischer Farbstoff ausreichend. Unter den gegebenen Bedingungen haben wir uns für Fluo-3-Acetoxymethylester mit einer K_d von 400 nM (22°C, pH 7,0-7,5) in einer Konzentration von 5 μ M entschieden.

Bei dem verwendeten Indikator Fluo-3 handelt es sich um einen nicht-ratiometrischen Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff, der - bei Bindung an Ca^{2+} - durch Laserlicht mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird und Licht mit der Wellenlänge von 525 nm emittiert.

Im Gegensatz zu ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffen, die eine Quantifizierung der Calcium-Konzentration ermöglichen, lassen nicht-ratiometrische Farbstoffe nur semi-quantitative Angaben zu. Dies ist für die Klärung der gegebenen Fragestellung mittels normierter Kreuzkorrelationsanalyse ausreichend, da diese die zeitlichen Fluoreszenzverläufe auf Ähnlichkeit und Synchronizität untersucht und keine Absolutwerte vergleicht.

Zur Beladung der Zellen mit dem Indikator wurde eine Farbstofflösung verwendet, welche 5 μ mol/l Fluo-3 in Form eines Acetoxymethyl-Esters (AM-E) enthält. Dies ist eine Ca^{2+} -insensitive, nicht-fluoreszierende unpolare Verbindung, welche Zellmembranen permeieren kann, um dann intrazellulär durch unspezifische Esterasen hydrolysiert zu werden. Durch Spaltung der AM-E-Verbindung wird der Farbstoff freigesetzt, der eine so geringe Lipidlöslichkeit aufweist, dass er kaum in den Extrazellularraum zurückgelangen kann.

Zur Verbesserung der Löslichkeit des Farbstoffesters in der Präparierlösung wurden 5 μ g Fluo-3 zunächst in 10 μ l DMSO (99,9%) gelöst und zur besseren

Verteilung des Fluo-3 AM-E anschließend 10 µl Pluronic (20%) zugegeben. Nach 1 minütiger Ultraschall-Behandlung wurde 1 ml Präparierlösung hinzugefügt, sodass die Farbstofflösung eine Konzentration von 5 µmol/l Fluo-3 aufweist.

2.2 Präparation und Inkubation

Gegenstand der Untersuchungen war die Muskelschicht des Magenantrums männlicher Wistar-Ratten (Charles River), welche weder eine spezielle Diät noch eine medikamentöse Vorbehandlung erhalten hatten. Die Ratten wurden am Tag der Experimente mit Ethylether betäubt und guillotiniert. Anschließend wurde der Magen entfernt. Die Entnahme der Gewebstücke erfolgte von der Ventralseite des Antrums nahe der großen Kurvatur ohne Eröffnung der Mukosa. Für die Experimente im Organbad wurden mit Hilfe eines Auflicht-Präparationsmikroskops 2 x 15 mm lange Streifen, für die Experimente am konfokalen Mikroskop 4 x 10mm große Stücke des Magenwandgewebes präpariert, wobei die Serosa vorsichtig durch stumpfe Präparation entfernt wurde, um die zytoarchitektonische Anordnung der einzelnen Gewebekomponenten nicht zu zerstören (Abbildung 2.1).

Für die Experimente am konfokalen Mikroskop wurde das Präparat mit der Serosaseite nach oben auf einen Silikonquader (etwa 5 x 6 x 2 mm) gepinnt. Im Anschluss erfolgte die Beladung der im Präparat enthaltenen Zellen mit Fluo-3 durch 2-stündige Inkubation des Gewebestückes in 20 °C kühler Farbstofflösung in einem lichtundurchlässigen Gefäß.

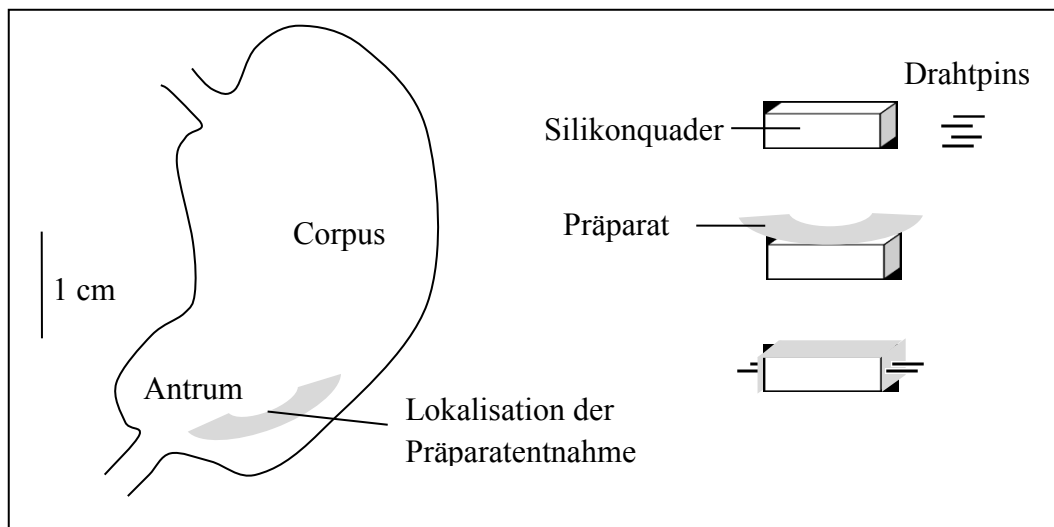


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Präparatentnahme und -vorbereitung

Links: Skizze vom Magen der Ratte. Eingezeichnet ist die Lokalisation und Orientierung der Präparatentnahme im Magenantrum. Nach vorsichtiger Entfernung der oberflächlich gelegenen Serosa, wurden längs zur Magenachse orientierte Streifen der darunterliegenden Tunica musculosa unter Erhalt der intakten Mucosa präpariert. Für die Organbadversuche hatten die Präparate eine Breite von 2 mm und eine Länge von 15 mm. Die Ausdehnung der Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie betrug 4×10 mm.

Rechts: Präparation des Gewebestückes mit der Serosaseite nach oben auf einem Silikonblock mit Hilfe von kurzen Drahtstiften.

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Messung der mechanischen Aktivität im Organbad

Das verwendete Organbad ist ein doppelwandiges Glasgefäß, das 40 ml physiologische Salzlösung enthielt und über einen Zugang mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast wurde. Über einen Zu- und Ablauf konnte die enthaltene Lösung rasch ausgetauscht werden. Die Temperatur wurde durch einen Thermostaten (Colora) auf 37° C gehalten.

Das Präparat wurde mit seinem einen Ende unten am Elektrodenhalter mit einem Faden fixiert. Das andere Ende wurde mit einem Faden oben an einem Transducer befestigt, dessen Signale über eine Messbrücke (World Precision Instruments) an

einen Analog-Digital-Wandler (ADInstruments) weitergeleitet wurden. Die Speicherung, Auswertung und Bearbeitung erfolgte auf einem handelsüblichen Computer mit der Software „LabChart“ (ADInstruments). Der schematische Versuchsaufbau des Organbades ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

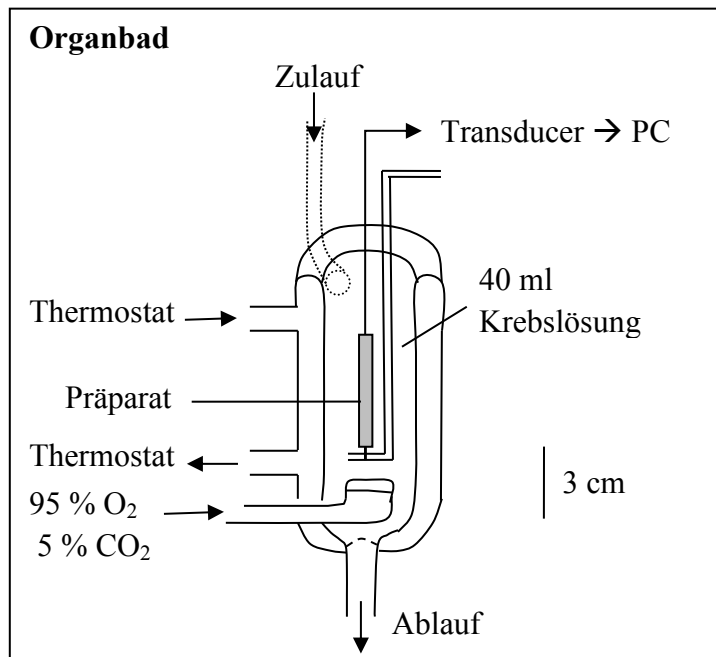


Abbildung 2.2 Schematischer Versuchsaufbau des Organbades
Das Organbad ist ein doppelwandiges Glasgefäß mit 40 ml Fassungsvermögen, welches physiologische Salzlösung enthält, die über einen Zu- und einen Ablauf zügig ausgetauscht werden konnte und kontinuierlich mit einem Gemisch aus 95% Kohlendioxid und 5% Sauerstoff über einen Zugang am Boden des Gefäßes begast wurde. Das Präparat wurde in vertikaler Orientierung im Organbad befestigt. Als untere Fixierung diente der Elektrodenhalter, als obere der Transducer zur Messung der Kraft und Weiterleitung an den angeschlossenen PC.

2.3.2 Räumlich-zeitliche Darstellung des intrazellulären Ca²⁺-Signals mittels Fluoreszenzmikroskopie

2.3.2.1 Objektträgerkammer

Da die Spontanaktivität des Gewebes eine unerlässliche Voraussetzung für die Untersuchung der Kopplung mittels Kreuzkorrelationsanalyse ist, wurde das Gewebe samt Silikonquader für die Dauer des Versuchs mit der Präparatseite

nach unten in einer Art kleinem Organbad fixiert, im Folgenden als Objektträgerkammer bezeichnet.

Die Objektträgerkammer mit einem Fassungsvermögen von 2,5 ml und einem 160 µm dicken gläsernen Boden wurde über einen Zu- und Ablauf gleichmäßig von physiologischer Salzlösung durchflossen. Diese befand sich in einem beheizbaren Vorratsgefäß, wurde kontinuierlich mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast und über eine Rollerpumpe (Watson-Marlow, Modell Sci-Q 400) mit einer Geschwindigkeit von 0,7 ml/min zur Objektträgerkammer transportiert. Die Temperatur in der Objektträgerkammer wurde über einen Thermostaten (Temperature Controller TC-344B, Warner Instrument Corporation) auf 35-37 °C eingestellt.

2.3.2.2 Mikroskop und konfokales Element

Zur Messung der räumlich-zeitlichen Veränderung des intravitalem Fluoreszenzsignals wurde ein konfokales Lasermikroskop (Nikon eclipse TE-2000-S) mit integrierter Scannereinheit (CSU-10, Yokogawa) verwendet. Dieses Spinning-Disc-System besteht aus einer speziellen Konstruktion aus 2 verbundenen rotierenden Scheiben (1800 rpm). Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt.

Ein Argon-Laser (643 Ion Laser, Melles Griot) dient als Quelle für das monochromatische Anregungslicht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm. Dieses wird durch etwa 20.000 Mikrolinsen in der unteren Scheibe auf die korrespondierenden Lochblenden der oberen Nipkov-Scheibe fokussiert. Das Licht, welches die Lochblenden passiert, wird durch ein Objektiv auf das Präparat fokussiert. Dort erfolgt die Anregung des Calcium-Indikators. Das emittierte Fluoreszenzsignal, mit einer Wellenlänge von 525 nm, nimmt den retrograden Weg über das Objektiv und die Lochblenden der Nipkov-Scheibe, wird durch einen dichroischen Spiegel reflektiert und gelangt zur CCD-Kamera, welche die vom jeweiligen Probenort emittierten Photonen pixelweise detektiert und über einen A/D-Wandler mit dem PC verbunden ist. Über die Benutzeroberfläche des

Programms Ultra View (Perkin Elmer) erfolgte die Aufzeichnung und Speicherung der Daten, sowie die Steuerung der Aufnahmeparameter (Belichtungszeit, Binning, Dauer einer Aufnahme, z-Ebene). Die Aufnahmen erfolgten ausschließlich im temporal module. Die z-Ebene war für die Dauer einer Versuchsreihe konstant. Die Messungen erfolgten unter standardisierten Bedingungen: Bei einer Belichtungszeit von 200 ms entstanden 5 zweidimensionale Bilder pro Sekunde. Jede Aufzeichnung erfolgte über 120 Sekunden, sodass jede Messung aus einer Folge von 600 zweidimensionalen Einzelbildern besteht. Hierbei wurde das Binning mit 2 x 2 gewählt, d.h. die Signale von je vier Bildpunkten wurden zusammengefasst. Hierdurch wurde zwar die räumliche Auflösung etwas reduziert, jedoch ermöglichte es gleichzeitig eine Verminderung des Rauschens. Einzelne Kontrollmessungen wurden mit Belichtungszeiten von 100 ms durchgeführt.

Die Verwendung des Ölimmersionsobjektivs mit 60-facher Vergrößerung verbesserte die Eindringtiefe und ermöglichte die Darstellung von Präparatausschnitten mit einer Ausdehnung von ca. 150 x 110 μm .

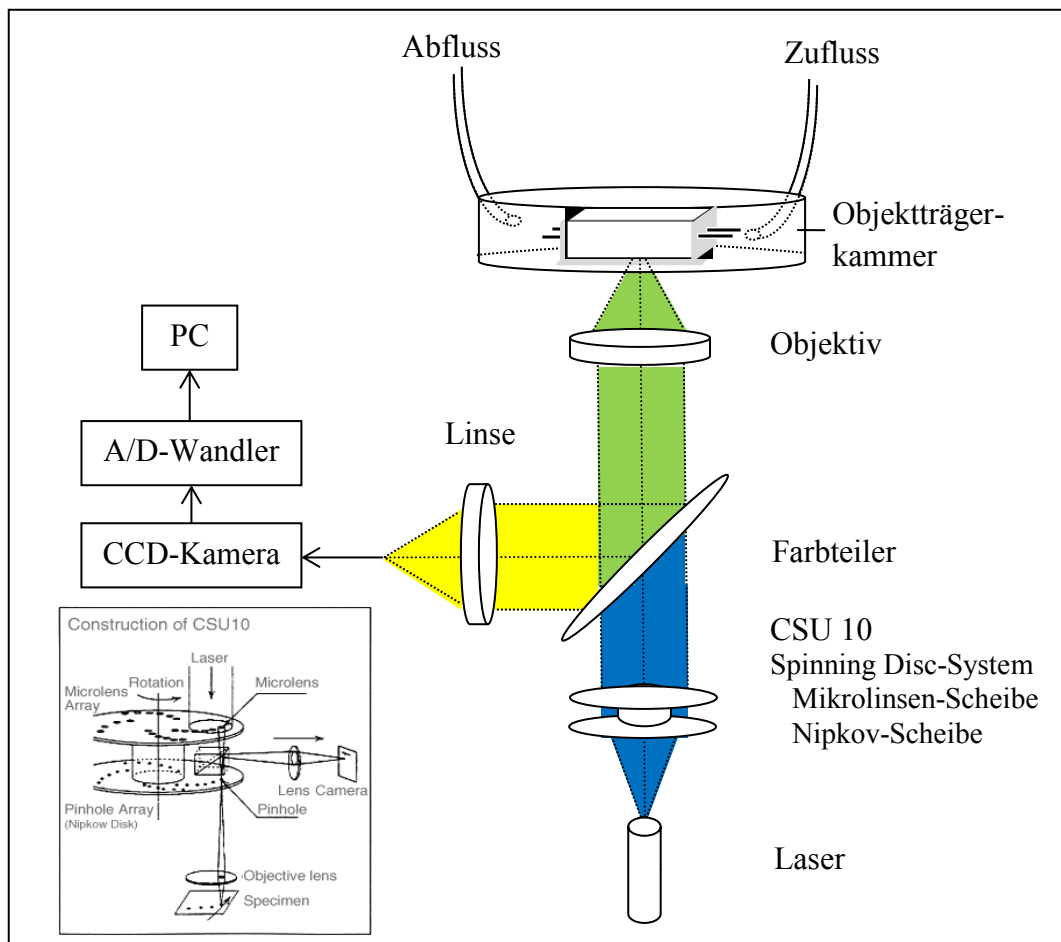


Abbildung 2.3 Schematischer Versuchsaufbau am konfokalen Mikroskop

Oben: Nach Inkubation des Präparates samt Silikonquader in Farbstofflösung gelangte das Objekt mit der Präparatseite nach unten in die Objektträgerkammer. Diese wurde kontinuierlich mit begaster (95% CO₂ und 5% O₂), auf 37°C aufgewärmter, physiologischer Salzlösung durchspült. Der physiologischen Salzlösung konnten die Testsubstanzen in entsprechender Konzentration zugefügt werden.

Unten: Der Strahlengang: Ein Argon-Laser (Melles Griot) diente als Quelle für das monochromatische Anregungslicht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 488 \text{ nm}$. Dieses wird durch etwa 20.000 Mikrolinsen in der unteren Scheibe auf die korrespondierenden Lochblenden der oberen Nipkov-Scheibe fokussiert. Das Licht, welches die Lochblenden passiert, wird durch ein Objektiv auf das Präparat fokussiert. Dort erfolgt die Anregung des Calcium-Indikators. Das emittierte Fluoreszenzsignal, mit einer Wellenlänge von 525 nm, nimmt den retrograden Weg über das Objektiv und die Lochblenden der Nipkov-Scheibe, wird durch einen dichroischen Spiegel reflektiert und gelangt zur CCD-Kamera, welche die vom jeweiligen Probenort emittierten Photonen pixelweise detektiert und über einen A/D-Wandler mit dem PC verbunden ist.

2.4 Versuchsablauf Fluoreszenzmikroskopie

Da die Versuche im Organbad gezeigt haben, dass die Präparate zum Teil erst nach einigen Minuten bis zu einer halben Stunde eine stabile Spontanaktivität aufweisen, wurden die ersten Messungen, welche als Kontrollmessung dienten, 20 bis 30 Minuten nach Fixierung des Präparates in der Objektträgerkammer durchgeführt. Dann wurde die Testsubstanz in entsprechender Konzentration hinzugegeben und weitere 20 Minuten später erfolgte die nächste Messung. Im Anschluss wurde die Objektträgerkammer gespült und nach 20 Minuten die Nachkontrollmessung durchgeführt. Der schematische Ablauf ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

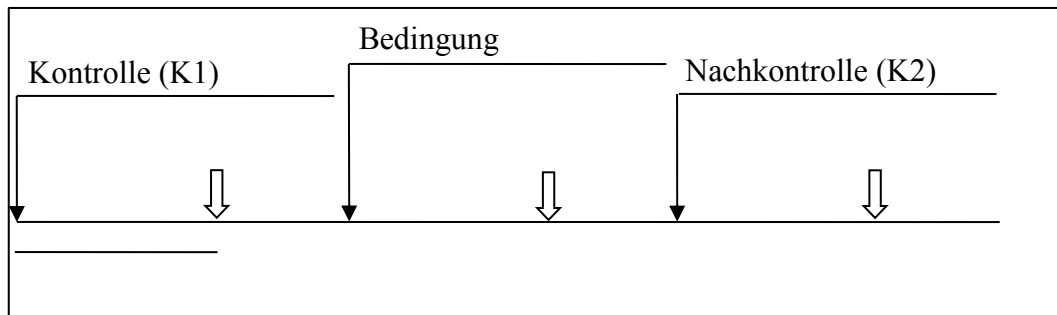


Abbildung 2.4 Schematischer Versuchsablauf am konfokalen Mikroskop. Kontrollmessung (K1) 20 Minuten nach Fixierung des Präparates in der begasten Objektträgerkammer. Nächste Messung 20 Minuten nach Zugabe der Testsubstanz in entsprechender Konzentration. Danach Spülen der Objektträgerkammer. Nachkontrollmessung (K2) nach 20 Minuten. Jede Aufnahme, in der Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichnet, dauerte 120 Sekunden.

Jede Messung dauerte 120 Sekunden und lieferte bei einer Bildrate von 5/Sekunde und einem Binning von 2 x 2 eine Sequenz von 600 Einzelaufnahmen. Wenige Aufnahmen erfolgten zusätzlich mit einer Bildrate von 10/Sekunde.

2.5 Verwendete Substanzen

Fluo-3 (F1242 Molecular Probes, Oregon USA, M=1130 g/mol)

Pluronic 20 % (P 3000 MP, Invitrogen, Oregon USA)

DMSO 99,9 % (D 8418 Sigma, Taufkirchen Germany)

Acetylcholin (A 6625 Sigma, Taufkirchen Germany, M=181,66 g/mol)

Octanol (O 4500 Sigma, Taufkirchen Germany, M=130 g/mol)

2.6 Auswertung

Mithilfe der dreidimensionalen Netzwerkanalyse sollte die Kopplung der glatten Muskelzellen untereinander näher untersucht werden.

Um einzelne Signalverläufe systematisch miteinander vergleichen zu können, wurden Matrizen von Messfeldern (=ROI=Region of Interest) erstellt, welche wie eine Schablone auf die einzelnen Aufnahmen aufgelegt werden konnten und somit die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse gewährleisten.

Alle benutzten Matrizen bestehen aus einem zentralen $4,4 \times 2,2 \mu\text{m}$ großen Messfeld [=Zentralfeld, Zentrum, Z], um welches eine bestimmte Anzahl weiterer Messfelder derselben Größe in definierten Abständen festgelegt wurden. Hierbei ist das Zentrum und damit auch die Matrix beliebig verschiebbar. Theoretisch ist jedes mögliche Messfeld als Zentralfeld gleichberechtigt wählbar. Lediglich die Ausrichtung der Matrix ist durch den Verlauf der glatten Muskelzellen vorgegeben. Es wurden 2 senkrechte Achsen definiert, welche sich im Zentralfeld schneiden. Die Achse, welche parallel, also in Richtung der Längsachse der glatten Muskelzellen verläuft, wird im Folgenden als longitudinale Achse bezeichnet. Die andere, dazu senkrechte, als transversale Achse.

Es wurden 2 Matrizen verwendet.

Matrix 1 (siehe Abbildung 2.5):

Die Messfelder 1 bis 8 befinden sich in longitudinaler und in transversaler Richtung $20\ \mu\text{m}$ entfernt vom Zentralfeld. Die Messfelder 11 bis 18 liegen in longitudinaler und transversaler Richtung jeweils $5\ \mu\text{m}$ vom Zentralfeld entfernt.

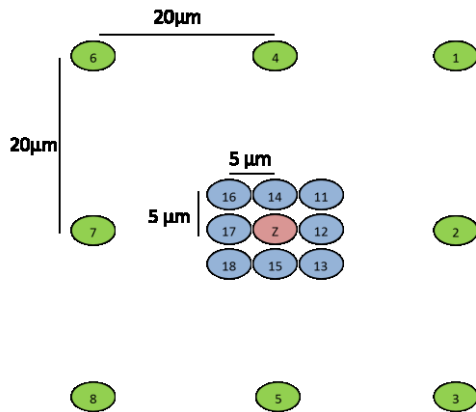


Abbildung 2.5 Matrix 1

Matrix 2 (siehe Abbildung 2.6):

Die Messfelder waren hier angeordnet auf 2 Strahlen, die sich senkrecht zueinander im Zentralfeld schneiden. Die 10 peripheren Messfelder wurden in Abständen von $20\ \mu\text{m}$ zum Zentrum und zueinander auf den Strahlen positioniert.

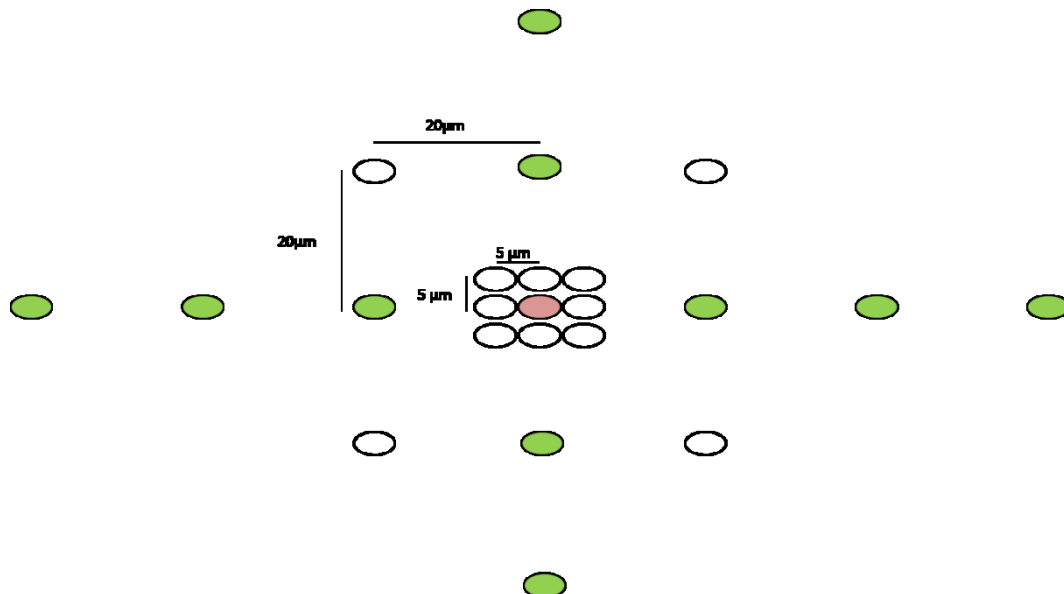


Abbildung 2.6 Matrix 2

Für jede Versuchsreihe wurden je 4 verschiedene zentrale ROIs mit den daraus resultierenden Matrizen festgelegt, die für die folgenden Messungen (Bedingung und Nachkontrolle) unverändert blieben. Dadurch entstanden je 4 x 17 bzw. 11 ROIs.

Für jede definierte Region of Interest ergibt sich zu jedem der 600 Zeitpunkte einer Messung das Fluoreszenzsignal als Summe der Fluoreszenzintensitäten der im Messfeld gelegenen Bildpunkte. Die entsprechenden Daten der Calcium-Fluoreszenzsignalverläufe wurden von Ultra View (Perkin Elmer) nach Microsoft-Excel exportiert und ausgewertet.

Die Untersuchung der zeitabhängigen Signalverläufe der Messfelder mit dem des zugehörigen Zentralfeldes auf Ähnlichkeit und zeitliche Verschiebung erfolgte in Excel durch Berechnung der normierten Kreuzkorrelationsfunktion (nKKF) mit dem statistischen Software-Add-In Winstat. Hierzu wurde ein Makro programmiert, welches für jede ROI die nKKF mit dem Zentralfeld berechnete.

Die typische Form der nKKF, welche man durch Kreuzkorrelation der Fluoreszenz-Signalverläufe zweier ROIs des Antrums erhält, ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

Ein weiteres Makro diente zur Auswertung der erhaltenen KKF's, indem es für jede KKF das Maximum 0. Ordnung, im Folgenden als maximale Korrelation bezeichnet, sowie den zeitlichen Versatz (Time lag) bestimmte und zusätzlich das Maximum 1. Ordnung mit dem zugehörigen Time lag ermittelte. Aus den entsprechenden Werten von je 4 korrespondierenden ROIs wurde der Mittelwert berechnet.

Des Weiteren wurden Messfelder auch zu Gruppen zusammengefasst und jeweils die Gruppen miteinander verglichen. So wurden zum Beispiel die Signale aus Feld 1, 2 und 3 addiert und mit der Summe der Signale aus den Feldern 4, Z und 5 auf Ähnlichkeit und zeitlichen Versatz überprüft.

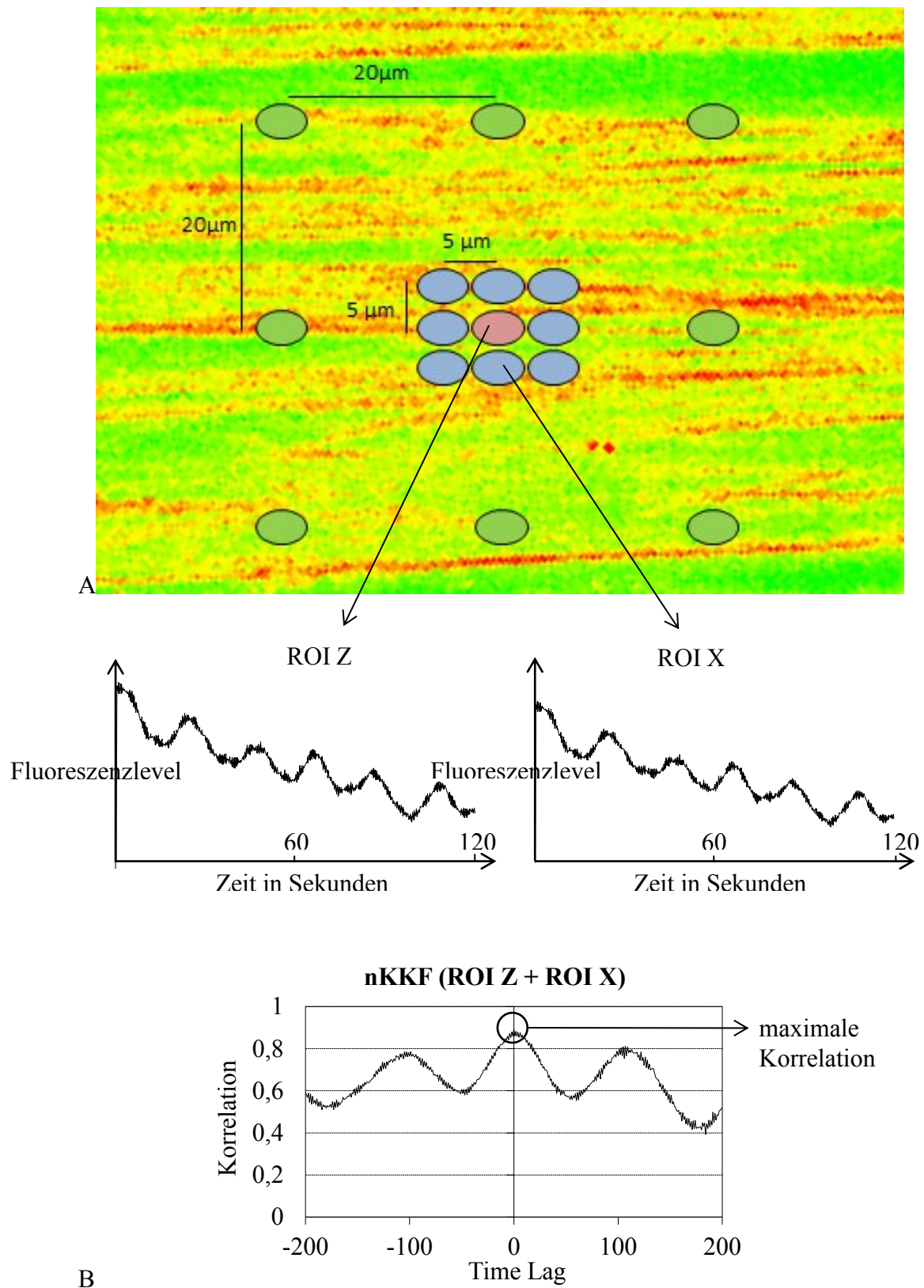


Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der Auswertung

Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der Auswertung (siehe Seite 32)

A exemplarisches konfokales Bild der glatten Muskulatur des Rattenantrums, markiert mit Fluo-3, mit positionierter Matrix aus 17 ROIs, gruppiert um das zentrale Messfeld (rot), die blauen ROIs befinden sich in 5 μm Entfernung vom Zentrum, die grünen Messfelder sind 20 μm entfernt

B zeigt den typischen Verlauf des Calcium-Fluoreszenz-Signals der zentralen und einer weiteren ROI X als Funktion der Zeit (in Sekunden), sowie die daraus resultierende normierte Kreuzkorrelationsfunktion (nKKF). Auf der Abszisse ist der Time lag (zeitlicher Versatz) aufgetragen. Aus der Abbildung geht hervor, dass die ROI X und Z zum Zeitpunkt $t=0$ ($\text{lag}=0$) die maximale Korrelation aufweisen. Das Maximum 1. Ordnung wird für den Time lag ≈ 100 erreicht. Daraus kann man bei einer Bildrate von 5/Sekunde eine Periodendauer der aufgezeichneten Oszillationen von etwa 20 Sekunden ableiten. Folglich beträgt die Periodendauer der Calcium-Oszillationen und damit auch der phasisch-rhythmischen motorischen Aktivität des gewählten Präparates des Magenantrums der Ratte circa 20 Sekunden. Dies entspricht einer Frequenz von 3/min.

2.7 Die Kreuzkorrelationsfunktion

Mit der Netzwerkanalyse soll untersucht werden, inwieweit die Erregung des Gewebes in den einzelnen Abständen zum Zentralpunkt ähnlich oder zeitlich verschoben ist und zu welchem Zeitpunkt die größte Ähnlichkeit vorhanden ist.

Zur Beschreibung der Korrelation/Ähnlichkeit zweier solcher diskreter zeitabhängiger Signale $x[i]$ und $y[i]$ mit $i=1\dots N$ wird die Kreuzkorrelationsfunktion ($\text{KKF}_{xy}(t)$) verwendet.

Die KKF ergibt sich für jedes t aus der Summe der Produkte $x[i] * y[i + t]$ für alle $i=1..N$. Wenn man nun das Ergebnis durch den Effektivwert der Signale dividiert, erhält man die normierte Kreuzkorrelationsfunktion ($\text{nKKF}_{xy}(t)$):

$$\text{nKKF}_{xy}(t) = \frac{\sum_{i=1}^N x[i] * y[i + t]}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x[i])^2 * \sum_{i=1}^N (y[i + t])^2}}$$

Das Prinzip der Kreuzkorrelationsanalyse wird im Folgenden an einem Beispiel erläutert. Bei einem Gewitter folgt je nach Entfernung des Betrachters jedem Blitz ein Donner mit gewisser zeitlicher Verzögerung. Die Kreuzkorrelationsfunktion ist ein Mittel zur Bestimmung der Verzögerungszeit (des zeitlichen Versatzes) zwischen Blitz und Donner. Und zwar werden zwei zeitliche Ereignisse (Signale) so miteinander verrechnet, dass die Kreuzkorrelationsfunktion zum Zeitpunkt der Verzögerung ihr Maximum annimmt, welches gleichzeitig ein Maß für die Ähnlichkeit der Signale ist.

Der Einfluss verschiedener technischer und methodisch bedingter Faktoren wurde durch Simulation in Winstat/Excel untersucht und wird im Ergebnisteil dargestellt.

2.8 Maximal detektierbare Geschwindigkeit

Unter der Annahme einer konstanten Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erregung im Gewebe gilt die Gleichung $v = \frac{\Delta s}{\Delta t}$, d.h. die Geschwindigkeit (v) ergibt sich aus dem Quotienten der zurückgelegten Strecke (Δs in μm) und der dafür benötigten Zeit (Δt in ms).

Aus der Anordnung der ROIs in Matrix 2 ergibt sich der maximale Abstand zweier ROIs mit $120 \mu\text{m}$. Die zeitliche Auflösung (exposure time) der Fluoreszenzaufnahmen beträgt bei 5 Bildern/Sekunde 200 ms. Daraus ergibt sich unter der Annahme der longitudinalen Erregungsausbreitung nach obiger Gleichung die messtechnisch maximal detektierbare Leitungsgeschwindigkeit mit $v = \frac{\Delta s}{\Delta t} = \frac{120\mu\text{m}}{200\text{ms}} = 0,6 \text{ mm/s}$. Durch Verdopplung der Bildrate kann die maximal detektierbare Geschwindigkeit auf 1,2 mm/s gesteigert werden.

Dies liegt jedoch unterhalb der Angaben zur mittleren Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erregung in der Literatur.

Aus Beobachtungen am ganzen Magen der Ratte *in vivo* schätzten Hukuhara et.al. 1966 die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit der peristaltischen Welle von der bandförmigen Schrittmacherregion kaudal der Kardie bis zum Pylorus auf 1 mm/s, wobei sie beschrieben, dass sich jeder Punkt, welcher sich in diesem zirkulären Kontraktionsband befand, nahezu simultan kontrahierte. Am isolierten ganzen Magen stellten sie eine größere Variabilität und eine Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit fest [21]. 2005 ermittelten Wang et. al. mittels extrazellulärer Elektroden eine mittlere Geschwindigkeit der spontanen Slow Waves von 1,5 mm/s [60]. Und 2010 untersuchten Lentle et. al. die antrokorporalen Kontraktionen nach Füllung des Magens mit unterschiedlich viskösen Flüssigkeiten. Sie konstatierten eine mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit von 1,8 mm/s [61].

2.9 Statistik

Zur Überprüfung möglicher Unterschiede in den Beobachtungen wurden der T-Test für unverbundene Stichproben, der T-Test für verbundene Stichproben, sowie die üblichen Verfahren wie Mittelwert, Standardabweichung und Standard error of the mean (sem) verwendet.

T-Test für unverbundene Stichproben

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s} * \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}} \quad \text{mit } s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) * s_1^2 + (n_2 - 1) * s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

T-Test für verbundene Stichproben

$$t = \frac{|\bar{d}|}{s} * \sqrt{n}$$

wobei d die Differenz der Mittelwerte der Variablen, s die Standardabweichung und n die Anzahl der Differenzen ist.

Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Standard error of the mean

$$\text{sem} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Ein Ergebnis, im Folgenden jeweils angegeben als Mittelwert \pm sem, wurde statistisch als signifikant angesehen, wenn das errechnete Signifikanzniveau $p < 0,05$ betrug.

3 Ergebnisse

3.1 Die mechanische Spontanaktivität und ihre Beeinflussung durch Temperatur, Acetylcholin und Octanol

Den Ergebnissen der konfokalen Messungen geht zunächst die Beschreibung der Ergebnisse von Messungen der mechanischen Spontanaktivität des Magenantrums der Ratte voran.

Das Antrum der Ratte zeigte im Organbad unter Kontrollbedingungen (physiologische Salzlösung bei 37 °C, Begasung mit 5 % CO₂ und 95 % O₂, wie in Kapitel 2 beschrieben) phasisch-rhythmische Kontraktionen mit einer mittleren Frequenz um 3/Minute. Nach jeder Kontraktion wird das Ausgangsniveau erreicht. Ein exemplarischer 2-minütiger Verlauf der Kontraktionskraft (Ordinate) in Abhängigkeit der Zeit (Abszisse) ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

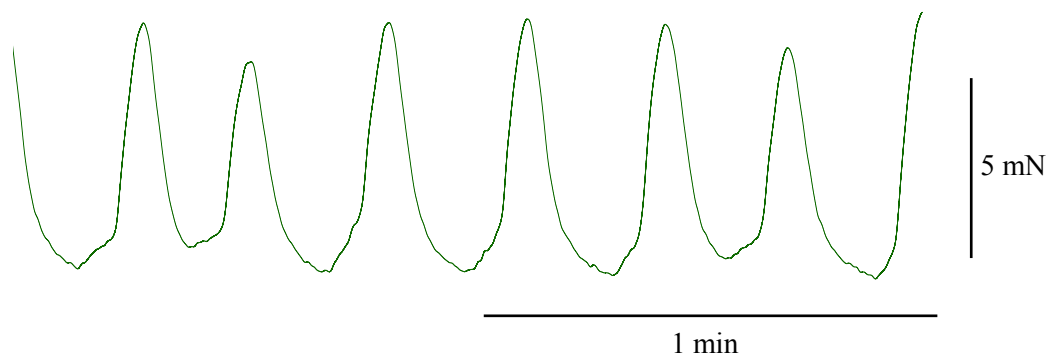


Abbildung 3.1 Spontanaktivität des Magenantrums der Ratte (dargestellt ist die isometrische Kraftentwicklung in Abhängigkeit von der Zeit)

Die bereits von Loh et al. 1970 beschriebene Abhängigkeit der glattmuskulären mechanischen Aktivität von der Temperatur (am Beispiel der Taenia coli [62]) konnte durch eigene Versuche im Organbad am Magenantrum der Ratte nachvollzogen werden.

Die Abbildung 3.2 zeigt die Aufzeichnung eines charakteristischen Verlaufs der mechanischen Aktivität (Ordinate) über einen Zeitraum von insgesamt 110 Minuten. Die Temperatur wurde über 40 Minuten von 37 °C auf 20 °C gesenkt. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Frequenz der mechanischen Aktivität und eine geringe Zunahme der tonischen Aktivität. In den folgenden 15 Minuten führte die weitere Senkung der Temperatur auf 15°C zum vollständigen Erliegen der registrierbaren mechanischen Aktivität. Das langsame Aufwärmen des Organbades führte zum Wiedereinsetzen der phasisch-rhythmischen Spontanaktivität und einer Zunahme der Oszillationsfrequenz und -amplitude bis auf das Ausgangsniveau.

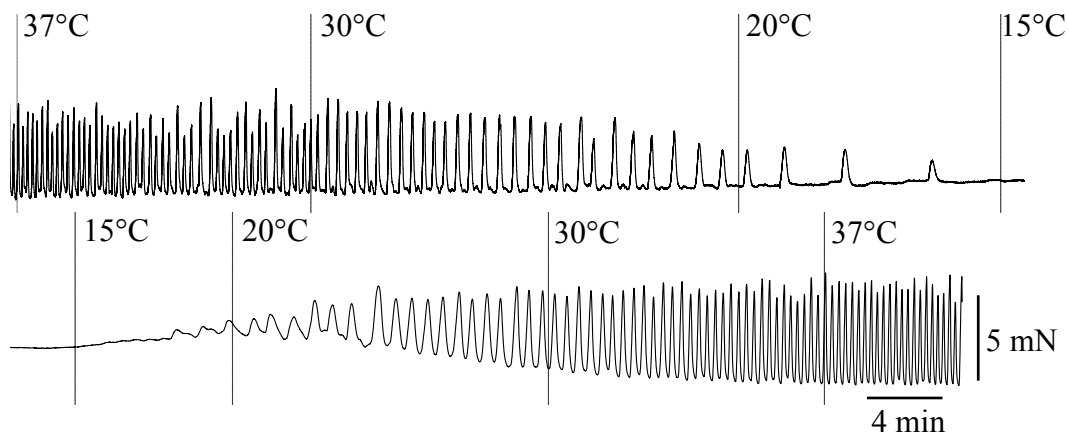


Abbildung 3.2 Abhängigkeit der mechanischen Spontanaktivität des Magenantrums der Ratte von der Temperatur im Organbad, dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kontraktionskraft (in mN) über einen Zeitraum von insgesamt 110 Minuten

Die Zugabe des parasympathischen Transmitters Acetylcholin ins Organbad in aufsteigender Konzentration bewirkte bei einer konstanten Temperatur von 37 °C eine reversible, dosisabhängige Zunahme der Amplitude der Kontraktionen bei stabilem Grundtonus und stabiler Frequenz des Präparates. Abbildung 3.3 zeigt beispielhaft, wie sich die mechanische Aktivität unter Einfluss von Acetylcholin in aufsteigender Dosierung verhält.

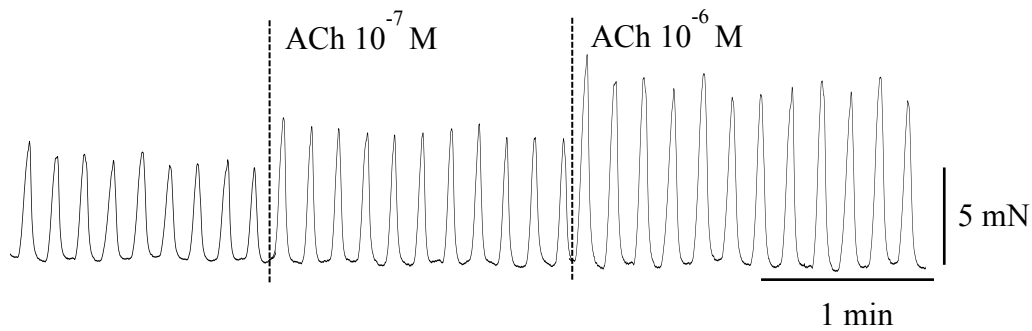


Abbildung 3.3 Einfluss des Acetylcholin auf die mechanische Aktivität des Magenanspruchs der Ratte im Organbad, graphische Darstellung der Kontraktionskraft (in mN) in Abhängigkeit von der Zeit (in Minuten)

Der unspezifische Gap Junction-Blocker Octanol führt im Präparat zu einer Senkung des Tonus, einer Abnahme der Amplitude und der Frequenz der Kontraktionen. Ein exemplarischer charakteristischer Kurvenverlauf ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die Kontraktionen nach Applikation des Octanol unregelmäßiger sind.

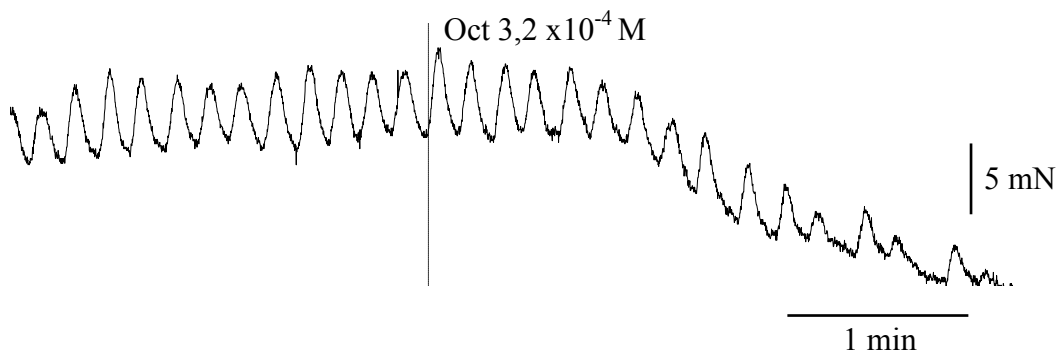


Abbildung 3.4 Mechanische Aktivität im Organbad unter Octanol (in einer Konzentration von $3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$), dargestellt ist die Kontraktionskraft (in mN) als Funktion der Zeit (in Minuten)

Es ist zu erkennen, dass die Kontraktionen unter cholinergem Antrieb ebenso rhythmisch und regelmäßig erfolgen wie unter Normalbedingungen. Lediglich die Amplitude nimmt zu. Wird die mechanische Aktivität unter Kontrollbedingungen mit jener unter parasymphathischem Einfluss kreuzkorreliert, ergibt sich eine Korrelation von $0,95 \pm 0,03$ ($n=9$). Durch Octanol wird die Periodizität und

Regelmäßigkeit der mechanischen Aktivität gestört. Die Kontraktionen variieren stärker in Dauer und Amplitude. Für die analog berechnete Korrelation ergibt sich ein Wert von $0,85 \pm 0,02$ ($n=9$) (siehe Abbildung 3.5).

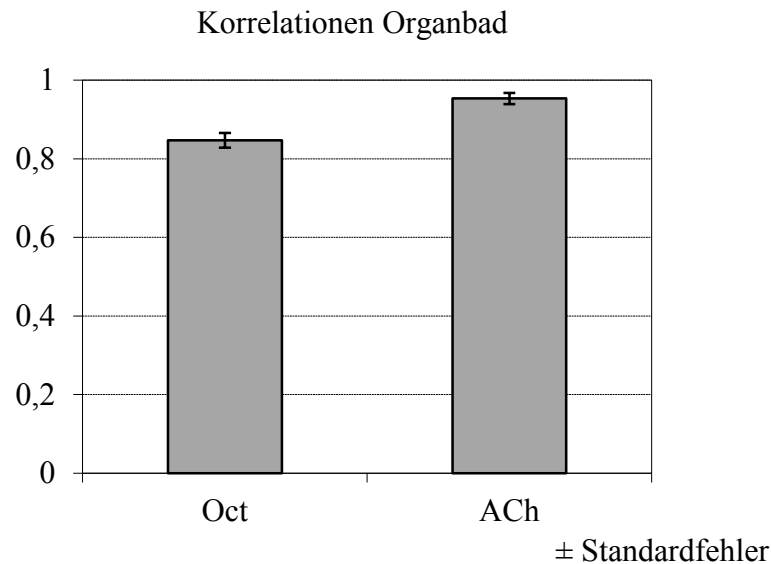


Abbildung 3.5 Korrelation der mechanischen Aktivität unter Spontanbedingungen mit der mechanischen Aktivität unter Einfluss von Octanol ($3,2 \times 10^{-4} M$) oder Acetylcholin ($10^{-5} M$), $n=9$ Präparate

3.2 Sichtbare Strukturen / Konfokale Einzelbilder

Durch die laserinduzierte Fluoreszenz-Anregung werden vorrangig intrazelluläre, zu einem kleinen Teil aber auch extrazelluläre Calcium-Konzentrationsänderungen im Gewebe sichtbar gemacht. Mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops gelang die Darstellung verschiedener fluoreszierender Strukturen im antralen Gewebe der Ratte. Da das vorrangige Interesse auf der Untersuchung glatter Muskelzellen in ihrem natürlichen Zellverband lag, wurden diese Strukturen zunächst lichtmikroskopisch gezielt aufgesucht und anschließend fluoreszenzmikroskopisch exakt fokussiert. Die Fokussierung der glatten Muskelzellen gelang in den ersten Versuchsreihen nur teilweise. Zwar war eine Faserrichtung erkennbar, jedoch konnten einzelne

Muskelzellen nicht differenziert werden. Dies wurde auf die limitierte Eindringtiefe des konfokalen Mikroskops zurückgeführt. Zur besseren Darstellung der Muskelfaserschicht wurde die Serosa vor der Inkubation des Präparates vorsichtig entfernt und das Gewebestück mit der Serosaseite nach unten in der Objektträgerkammer fixiert. Auf diese Weise gelang die Fokussierung der glatten Muskelzellen und -zellbündel in der äußeren Längsmuskelschicht.

Abbildung 3.6 zeigt 4 exemplarische konfokale Einzelbilder der Calcium-Verteilung des kontraktiven Magenwandgewebes im gleichen Maßstab. Die Fluoreszenzintensitäten werden in Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzwerte im Präparat farbkodiert. Regionen mit relativ höherer Calcium-Konzentration heben sich durch die rote Farbgebung von ihrer calciumärmeren, grün dargestellten Umgebung (Hintergrundfluoreszenz) ab.

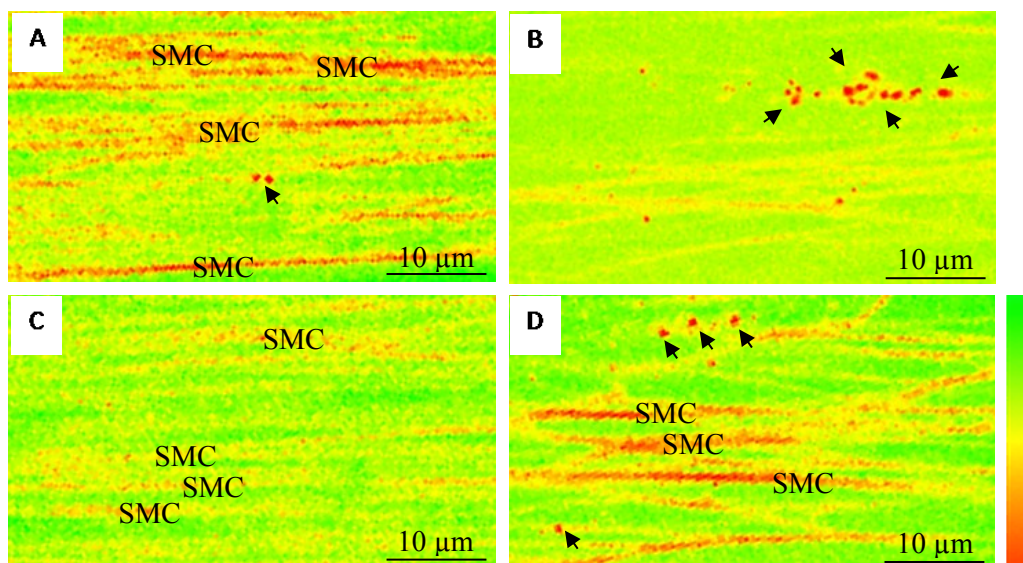


Abbildung 3.6 A-D Einzelaufnahmen des Calcium-Signals der kontraktiven Schicht der Magenwand der Ratte, markiert mit Fluo-3. Einige glatte Muskelzellen sind mit SMC gekennzeichnet. Die Pfeile markieren sowohl einzelne (D) als auch gruppiert angeordnete Hot Spots (B)

Es können 2 verschiedene Strukturen unterschieden werden. Die länglichen, nahezu parallel angeordneten glatten Muskelzellen (SMC) in lockerem bis engem

Zellverband haben einen mittleren Durchmesser von 2 μm . Zwischengelagert befinden sich runde Zonen erhöhter Fluoreszenzintensität, im Folgenden als Hotspots (HS) bezeichnet. Sie kommen einzeln oder gruppiert vor und haben einen mittleren Durchmesser von 2,3 μm . Die Anzahl der HS pro Gesichtsfeld war von Präparat zu Präparat sehr unterschiedlich.

Abbildung 3.6 A-D verdeutlicht die Variabilität in der Verteilung und Anordnung der glatten Muskelzellen und der HS von Präparat zu Präparat und auch innerhalb eines Präparates. Während in Abbildung 3.6 A und C fast ausschließlich glatte Muskelzellen zu finden sind, zeigt Abbildung 3.6 B eine Gruppe von etwa 15 HS, die im oberen rechten Bildabschnitt konzentriert sind.

3.3 Fluoreszenz-Signalverläufe/Konfokale Serienaufnahmen/ Spontanaktivität

Über 90% der Präparate zeigte nach 20 bis 30 Minuten in der beheizten und temperierten Objektträgerkammer eine stabile phasisch-rhythmische Spontanaktivität in Form von periodischen wellenförmigen Oszillationen des Calcium-Fluoreszenz-Signals. Die mittlere Frequenz unter Spontanbedingungen betrug 1,5/min, $\text{sem} = 0,17$, $n=16$. Stellte sich keine Spontanaktivität ein, wurde das Präparat gewechselt.

Abbildung 3.7 zeigt mehrere konfokale Einzelbilder derselben Stelle des kontraktiven Magenwandgewebes zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer insgesamt 2-minütigen Aufnahme, sowie den Fluoreszenz-Signalverlauf der markierten ROI. Das Calcium-Fluoreszenzsignal zeigt einen typischen oszillierenden Verlauf, bei dem eine langsame, hochamplitudige sinusförmige Änderung des Signals von einem hochfrequenten, niederamplitudigen Rauschen überlagert ist.

Weiterhin ist der Effekt des Bleaching im Signalverlauf erkennbar. Insbesondere bei hohen Laserintensitäten kommt es durch vielfältige Prozesse zur Zerstörung eines Teils des Indikators mit konsekutiver Abnahme der Fluoreszenzintensität

[59]. Dies äußert sich in der langsamen, in diesem Fall nahezu linearen Abnahme der Fluoreszenz mit der Zeit. Zur Minimierung dieses Effektes wurde die Laserintensität so niedrig wie möglich gewählt, ohne dass die Qualität der Bilder oder das Signal-Rausch-Verhältnis der Fluoreszenzsignale darunter litt. Bei einer Aufnahmezeit von 120 Sekunden zeigten alle Messungen, zwar in unterschiedlicher Ausprägung, einen Bleichungseffekt. So zeigten die meisten Aufzeichnungen eine unterschiedlich starke gleichmäßige Abnahme der Fluoreszenz über die gesamte Dauer der Messung, einhergehend mit einer leichten Abnahme der Amplitude der Calcium-Fluoreszenzsignale im Zeitverlauf. Einige wenige Messungen wiesen in den ersten Sekunden einen prozentual stärkeren Abfall des Fluoreszenzsignals auf als in der zweiten Hälfte. Dies ist möglicherweise auf ein langsames Herausgleiten des Präparates aus der Fokusebene mit konsekutiver Abnahme der Fluoreszenzintensität in allen Bildpunkten zurückzuführen.

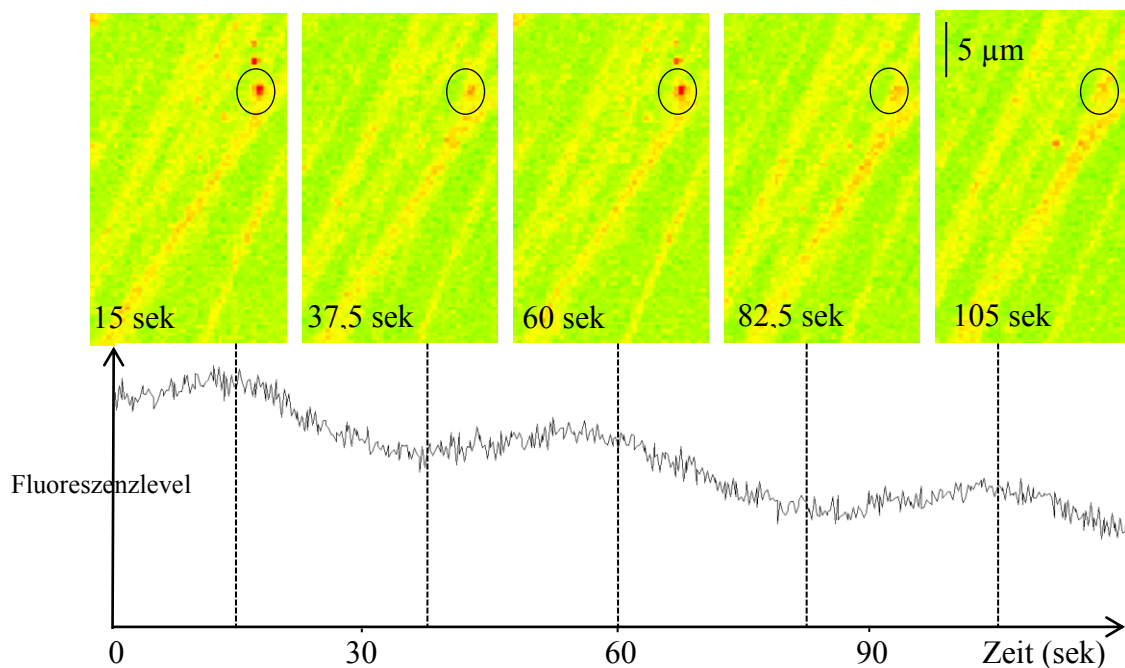


Abbildung 3.7 Oben: 5 konfokale Einzelbilder desselben $15 \times 30 \mu\text{m}$ großen Ausschnittes der Magenwand, aufgenommen im Abstand von 22,5 Sekunden Unten: registriertes Calcium-Fluoreszenz-Signal (Ordinate) der markierten ROI in Abhängigkeit von der Zeit (Abszisse in Sekunden)

3.4 Auswahl der Präparate und Bildausschnitte

Für die Untersuchung der Kopplung im glattmuskulären Zellverband mittels korrelativer Netzwerkanalyse wurden im Folgenden nur jene Bereiche der Präparate verwendet, welche eine gleichmäßige Anordnung vieler glatter Muskelzellen, sowie eine rhythmische Spontanaktivität mit Frequenzen über 1/min zeigten. Ein weiteres Ausschlusskriterium war die sichtbare Verschiebung des Präparates in der Objektträgerkammer durch die Kontraktionen des Präparates oder äußere Störfaktoren während einer Aufnahme bzw. zwischen zwei Aufnahmen, denn die ROIs sollten über einen kompletten Versuchsablauf unverändert bleiben, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

3.5 Abhängigkeit der normierten KKF am Modell der Sinusschwingung

Im Folgenden wird der Einfluss verschiedener Parameter der Ausgangssignale auf die nKKF am Modell der Sinusschwingung untersucht und dargestellt.

Das typische Calcium-Fluoreszenzsignal besteht vereinfacht aus 3 Komponenten:

1. Eine hochamplitudige, niedrigfrequente Oszillation des Fluoreszenz-Signals
2. Hochfrequentes, niedrigamplitudiges Rauschen
3. Abnahme des Signals im Zeitverlauf durch Bleichungseffekte

Die niedrigfrequente Oszillation des Fluoreszenz-Signals lässt sich mathematisch vereinfacht annäherungsweise als Sinusschwingung beschreiben.

3.5.1 Amplitude und absolute Höhe des Ausgangssignals

Bei zwei streng periodischen sinusförmigen Signalen ergibt die normierte Kreuzkorrelationsfunktion ebenfalls eine sinusförmige Kurve. Die Höhe des absoluten Fluoreszenzsignals zu Beginn der Sinusschwingung und die Amplitude der Oszillation beeinflussen die nKKF nicht.

3.5.2 Zeitlicher Versatz

Sind zwei Signale zeitlich (um Δt) gegeneinander verschoben, so erhält man eine nKKF, welche ihr Maximum bei Δt erreicht. Sind die zwei Signale bis auf den Phasenversatz identisch, erhält man die zugehörige nKKF durch Parallelverschiebung der normierten Autokorrelationsfunktion auf der Abszisse um Δt . Sind die Signale genau antiphasisch, nimmt die nKKF zum Zeitpunkt $t=0$ ihr Minimum an.

3.5.3 Frequenz

Weisen zwei Signale unterschiedliche Frequenzen auf, so beeinflusst dies die maximale Korrelation dieser beiden Signale. Zur Analyse des Einflusses der Periodendauer auf die Korrelation, wurden in Excel mehrere Sinusschwingungen mit unterschiedlicher Periodendauer durch Einfügen eines Faktors ω simuliert: $x_t := \sin(\omega t)$. Der Einfluss der Abweichung der Periodendauer auf die Höhe der maximalen Korrelation ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Mit zunehmender prozentualer Abweichung der Periodendauer nimmt die Kopplung ab. Die experimentellen Daten zeigen eine mittlere Periodenabweichung von $3,27 \pm 0,33\%$ ($n=54$).

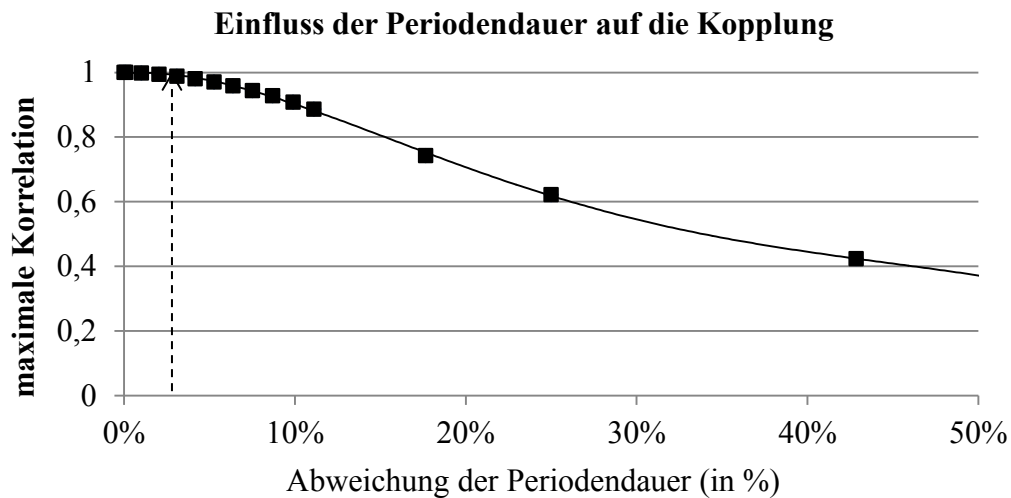


Abbildung 3.8 Einfluss der prozentualen Abweichung der Periodendauer auf das Maximum der nKKF, mit einem Pfeil markiert ist die maximale Korrelation der mittleren Periodenabweichung der experimentellen Daten ($3,27 \pm 0,33\%$ ($n=54$))

3.5.4 Rauschen

Um den Effekt des Rauschens auf die Kopplung zu untersuchen, wurden in Excel mehrere Datenreihen mit unterschiedlich starkem Rauschen simuliert. Da für die vorliegende Arbeit eine grobe Abschätzung des Rauschens ausreichend ist, wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) stark vereinfacht als Quotient aus der Amplitude des Signals und der Amplitude des Rauschens definiert (Signal-Rausch-Quotient).

In Abbildung 3.9 ist die maximale Korrelation als Maß für die Kopplung in Abhängigkeit vom Signal-Rausch-Quotienten graphisch dargestellt. Mit zunehmendem Rauschen nimmt die Kopplung ab und der Standardfehler der Korrelationswerte sowie der Time lag der maximalen Korrelation zu.

Nach Abschätzung des Signal-Rausch-Quotienten für die eigenen Messungen liegt der Wert etwa bei $2,58 \pm 0,13$ ($n=104$).

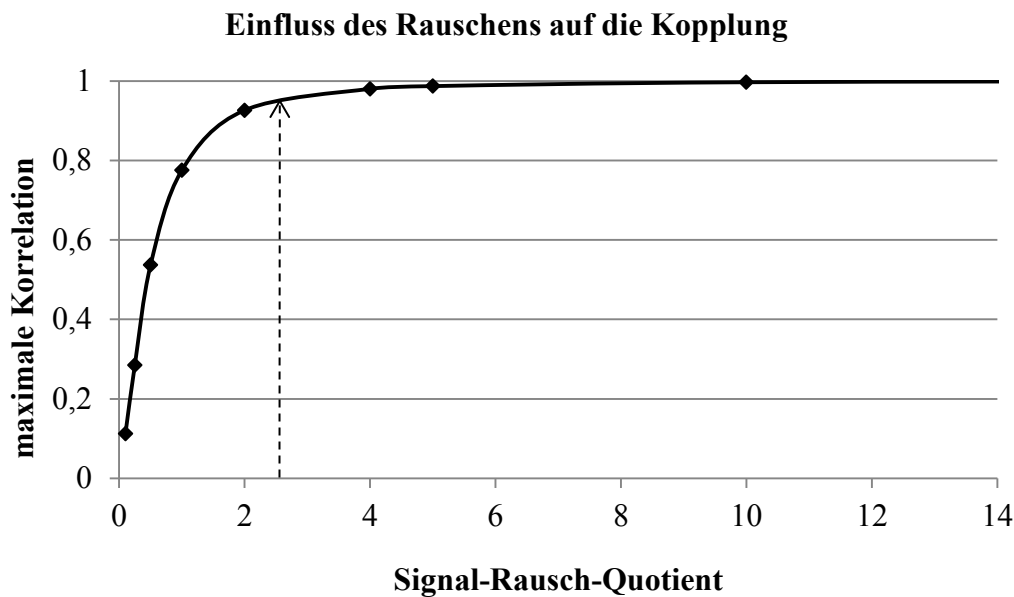


Abbildung 3.9 Einfluss des Signal-Rausch-Quotienten auf das Maximum der normierten Kreuzkorrelationsfunktion, mit einem Pfeil markiert ist die maximale Korrelation des Signal-Rausch-Quotienten ($2,58 \pm 0,13$ ($n=104$)) der eigenen Messungen

3.5.5 Abnahme durch Bleichungseffekte

Durch die Fluoreszenzfarbstoffbleichung in Abhängigkeit von der Zeit werden die Calcium-Oszillationen gedämpft. Werden zwei gedämpfte Sinusschwingungen miteinander gekorreliert, so entsteht eine gedämpfte Kreuzkorrelationsfunktion. Im Folgenden wurden die Bleichungseffekte näherungsweise als lineare Abnahme der Sinusschwingung beschrieben und das Maximum der jeweiligen normierten Kreuzkorrelationsfunktion in Abhängigkeit der linearen Komponente berechnet. Der lineare Abfall des Fluoreszenzsignals infolge des Bleichungseffekts liegt in den eigenen Messungen im Bereich von $-0,078 \pm 0,004$ ($n=333$). Entscheidender für die Abschätzung des Einflusses auf die nKKF ist der mittlere Betrag der Differenz der Anstiege zweier Fluoreszenzsignale. Dieser beträgt $0,005 \pm 0,001$ ($n=296$) und führt gemäß Abbildung 3.10 zu einer Verringerung der maximalen Korrelation um weniger als 3%.

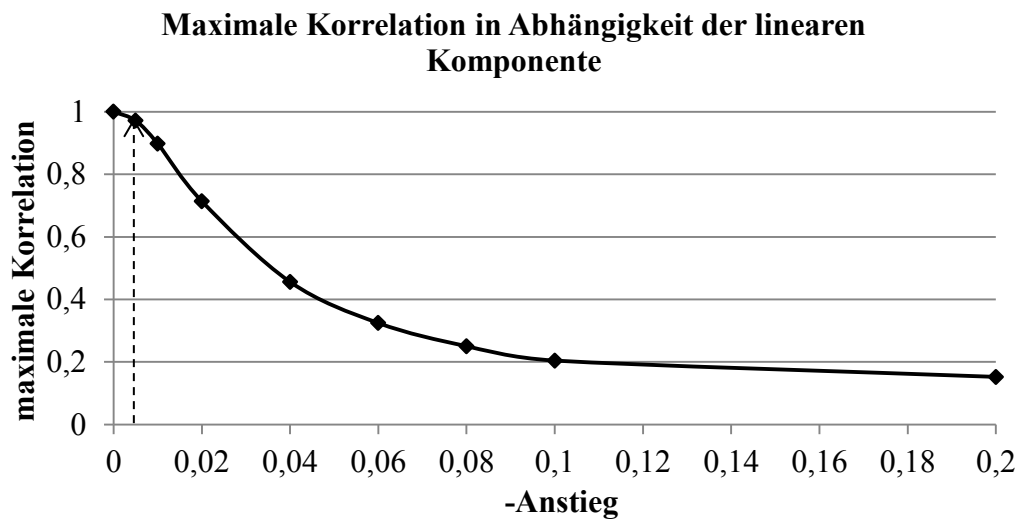


Abbildung 3.10 Abnahme der maximalen Korrelation in Abhängigkeit von der linearen Komponente, der Pfeil markiert die maximale Korrelation der gemessenen Daten (der mittlere Betrag der Differenz der Anstiege zweier Fluoreszenzsignale beträgt $0,005 \pm 0,001$ ($n=296$))

3.6 Räumliche Kopplung im homogenen glattmuskulären Zellverband

Wie bereits in Kapitel 2.6 beschrieben, ist die Annahme der Homogenität des Gewebes eine Voraussetzung für die korrelative Netzwerkanalyse, da nur unter dieser Bedingung jede ROI gleichberechtigt als Zentrum wählbar ist, unabhängig von der Höhe des Fluoreszenzsignales und der Lage der ROI auf oder neben einer glatten Muskelzelle. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden für jede Messung die Mittelwerte und Standardabweichungen über alle ROIs in 5 μm bzw. 20 μm berechnet und in einem zweiten Schritt die Streuung der Standardabweichungen über alle Messungen ermittelt. Wie aus Tabelle 3.1 ersichtlich, unterscheiden sich die Standardabweichungen nicht signifikant. Somit ist die Voraussetzung der Homogenität des Gewebes erfüllt.

	n	Mittelwert	sem
5 μm	18	0,0160	0,0023
20 μm	18	0,0175	0,0035

Tabelle 3.1 Mittelwerte und Standardfehler der Standardabweichungen der Korrelationsmaxima in 5 bzw. 20 μm Entfernung vom Zentrum über n Messungen/Präparate

Die räumliche Kopplung spontan aktiver glatter Muskelzellen im Umkreis von 20 μm ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Dabei wird die Kopplungsstärke, d.h. das Kreuzkorrelationsmaximum (= maximale Korrelation, Ordinate) in Abhängigkeit von der Distanz zum Zentrum (rot) abgebildet.

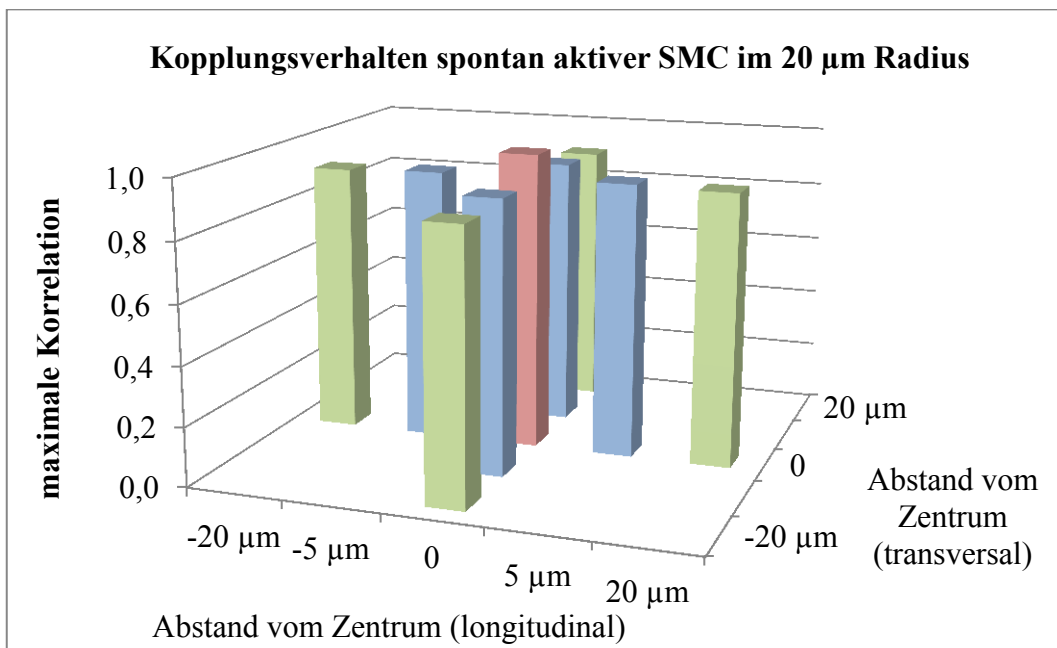


Abbildung 3.11 Kopplungsverhalten spontan aktiver glatter Muskelzellen im Radius von 20 μm um eine betrachtete zentrale ROI (rot), ROIs in 5 μm Entfernung vom Zentrum sind blau, Messfelder in 20 μm Distanz zum Zentralfeld sind grün dargestellt.

Horizontale Ebene: Entfernung der ROIs vom Zentrum in longitudinaler und transversaler Richtung

Vertikale Achse: Mittelwert der maximalen Korrelation der nKKF der entsprechenden ROI mit dem Zentrum, n=16 Präparate, sem<0,015 (nicht abgebildet, siehe Tabelle 3.3 und 3.4).

	-20 μm	-5 μm	0	5 μm	20 μm
-20 μm			0,899		
-5 μm			0,915		
0	0,911	0,921	1,000	0,922	0,916
5 μm			0,913		
20 μm			0,898		

Tabelle 3.2 Mittelwerte der Kreuzkorrelationsmaxima zu Abbildung 3.11

Die maximale Korrelation im zentralen Messfeld betrug definitionsgemäß 1 und nahm sowohl in longitudinaler, als auch in transversaler Richtung mit zunehmender Entfernung von der zentralen ROI ab. Hierbei ist zu beachten, dass die Abnahme der Kopplungsstärke von 0 auf 5 μm mit etwa 8-9% deutlich größer ist als im Bereich von 5 bis 20 μm . Hier beträgt die Differenz der maximalen Korrelationen nur 1-2%.

Für zwei Messpunkte, welche sich in gleichem Abstand, aber in entgegengesetzten Richtungen vom Zentralfeld befanden, unterschieden sich die errechneten maximalen Korrelationen nicht signifikant (Abbildung 3.12, Tabelle 3.3). Dementsprechend wurden für die folgenden Auswertungen die ROIs in gleicher Entfernung vom Zentrum, welche sich in entgegengesetzten Richtungen des Zentralfeldes befanden, zusammengefasst.

Zudem waren die Korrelationen in gleicher Entfernung vom Zentrum in longitudinaler Richtung im Mittel größer als in transversaler Richtung, wobei sich dieser Unterschied als nicht signifikant erwies (Abbildung 3.13, Tabelle 3.4).

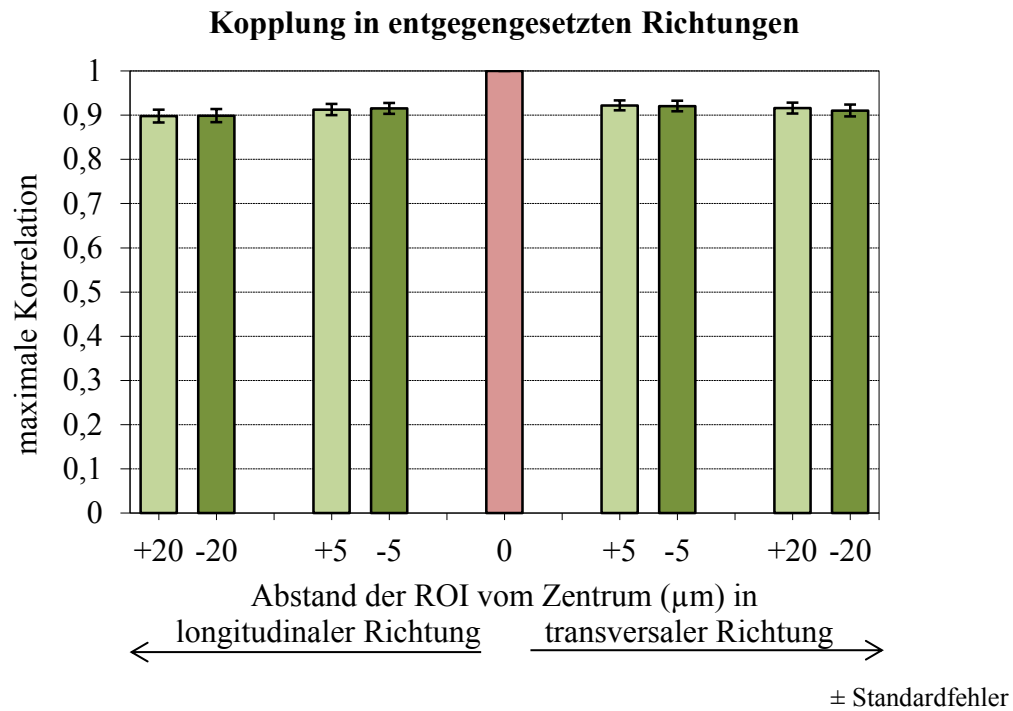


Abbildung 3.12 Gegenüberstellung der Kopplung unter Spontanbedingungen in entgegengesetzten Richtungen vom Zentrum, $n=16$ Präparate

		n	Mittelwert	sem	mittlerer Unterschied	s	p
transversal	+20 μm	16	0,898	0,014	-0,001	0,017	0,853
	-20 μm	16	0,899	0,015			
	+5 μm	16	0,913	0,013	-0,002	0,009	0,304
	-5 μm	16	0,915	0,012			
0		16	1,000	0,000			
longitudinal	+5 μm	16	0,922	0,011	0,001	0,009	0,557
	-5 μm	16	0,921	0,012			
	+20 μm	16	0,916	0,012	0,005	0,010	0,052
	-20 μm	16	0,911	0,014			

Tabelle 3.3 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten Präparate zu Abbildung 3.12, T-Test für verbundene Stichproben

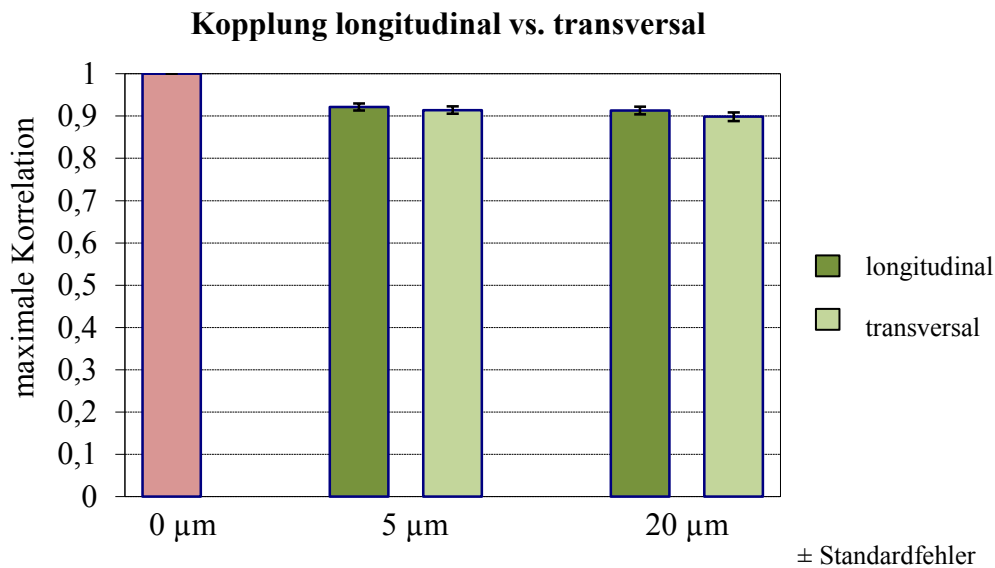


Abbildung 3.13 Gegenüberstellung der Kopplung unter Spontanbedingungen longitudinal vs. transversal, $n=32$, 16 Präparate

		n	Mittelwert	sem	Differenz	P
0 μm		32	1	0		
5 μm	transversal	32	0,914	0,009	0,007	0,53
	longitudinal	32	0,921	0,008		
20 μm	transversal	32	0,899	0,010	0,015	0,28
	longitudinal	32	0,913	0,009		

Tabelle 3.4 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima zu Abbildung 3.13, $n = 32$, 16 Präparate, T-Test für verbundene Stichproben

Bei genauerer Betrachtung jeder Einzelmessung zeigte sich, dass einzelne ROIs (<3%), unabhängig von ihrer Entfernung in Bezug auf das Zentralfeld, zum Teil deutlich geringere maximale Korrelationen als ihre unmittelbare Umgebung aufwiesen. Auch inverse Kopplung konnte registriert werden. Nach Zusammenfassung und Mittelwertbildung von ROIs wie in Abschnitt 2 beschrieben, ergab die nachfolgende Kreuzkorrelation der verschiedenen Gruppen

mit der zentralen Gruppe 5% höhere Kopplungswerte als für die Einzelfelder, die Standardfehler halbierten sich.

Abbildung 3.14 zeigt die maximalen Korrelationen in 5 und 20 μm Entfernung von Zentrum.

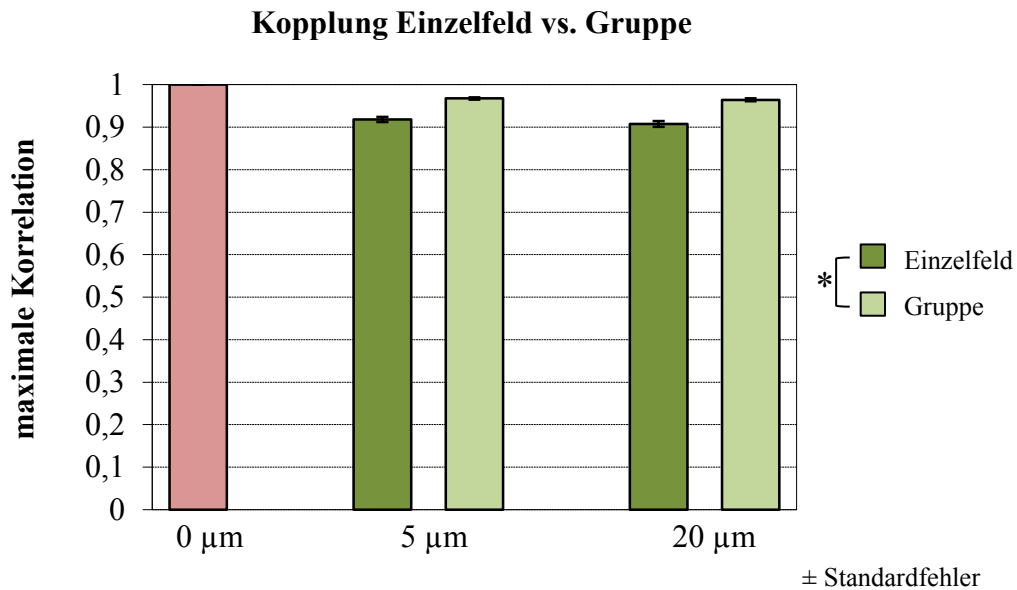


Abbildung 3.14 Veränderung der Kopplung durch Zusammenfassung von ROIs zu Gruppen, $n=64$, 16 Präparate, signifikante Unterschiede sind mit * markiert

		n	Mittelwert	sem	Differenz	p
0		1	1	0		
5 μm	Einzelfeld	64	0,918	0,006	-0,049	1,76 E-19
	Gruppe	64	0,968	0,003		
20 μm	Einzelfeld	64	0,908	0,007	-0,057	5,42 E-20
	Gruppe	64	0,964	0,003		

Tabelle 3.5 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten ROIs (= 4 x 16 Präparate) zu Abbildung 3.14, T-Test für verbundene Stichproben

Die vorhergehenden Auswertungen zeigten eine Abnahme der Kopplung mit zunehmender Entfernung vom Bezugspunkt in allen Richtungen, wobei die

Differenz der maximalen Korrelationen vom Zentrum zu den ROIs in 5 μm Entfernung 4-fach größer ist als die Abnahme der Kopplung zwischen den Messfeldern in 5 und 20 μm Distanz. Zur Klärung der Frage, wie sich die Kopplung mit zunehmender Entfernung vom Zentralfeld verhält, wurden die zuvor generierten Aufnahmen mit einer zweiten Matrix aus ROIs erneut ausgewertet. Die 10 peripheren Messpunkte wurden in Abständen von 20 μm zum Zentrum und zueinander auf 2 Geraden positioniert, die sich senkrecht im Zentrum schneiden (Abbildung 3.15).

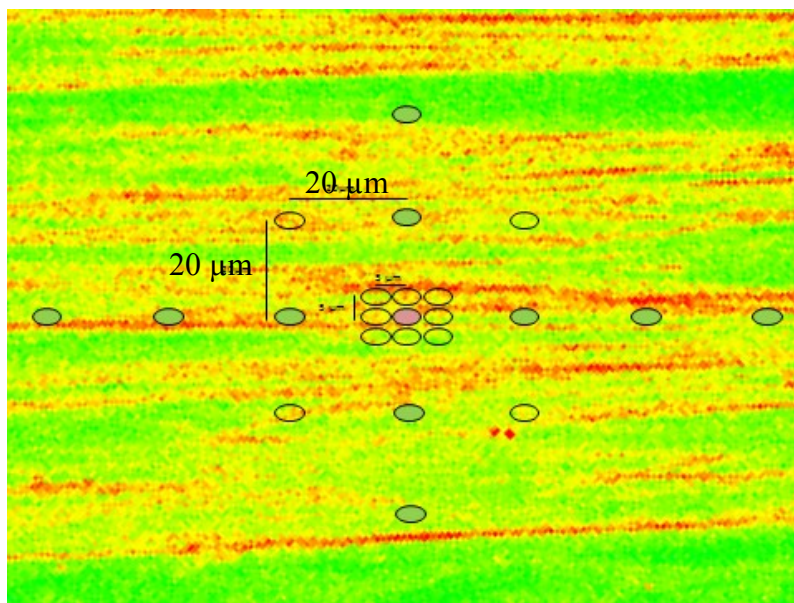


Abbildung 3.15 Anordnung der ROIs der Matrix 2 mit vergrößerten ROI-Abständen von jeweils 20 μm in longitudinaler und transversaler Richtung

Die Auswertung für die einzelnen ROIs erfolgte analog der obigen Darstellung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

Mit zunehmender Entfernung der betrachteten ROI vom Zentralfeld nimmt die maximale Korrelation weiter ab. Dabei wird deutlich, dass die Kopplungsstärke im Bereich von 0 bis 20 μm stärker abfällt als zwischen 20 und 40 μm in transversaler bzw. 20 und 60 μm in longitudinaler Richtung.

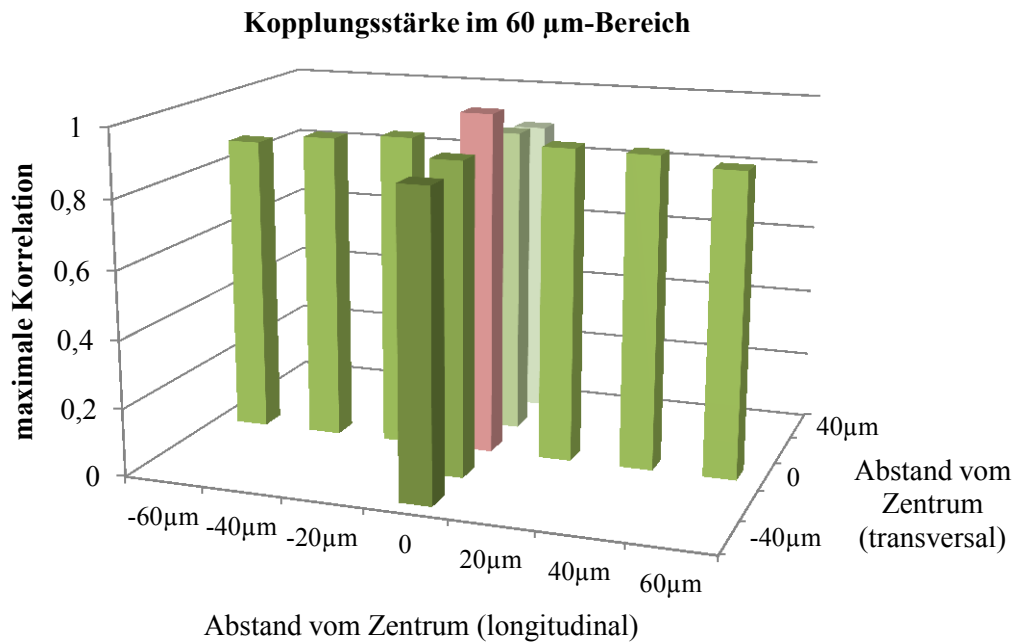


Abbildung 3.16 Kopplungsverhalten spontan aktiver glatter Muskelzellen im Radius von 60 μm , dargestellt sind die Mittelwerte der maximalen Korrelationen aus $n=16$ Präparaten, $\text{sem} < 0,02$ (nicht dargestellt, siehe Tabelle 3.7)

	-60 μm	-40 μm	-20 μm	0	20 μm	40 μm	60 μm
-40 μm				0,887			
-20 μm				0,910			
0	0,876	0,902	0,918	1,000	0,917	0,913	0,885
20 μm				0,905			
40 μm				0,883			

Tabelle 3.6 Mittelwerte der Korrelationsmaxima im 60 μm -Radius, $n=16$ Präparate, für Standardfehler siehe Tabelle 3.7

Ebenso wie im 20 μm - Radius unterscheidet sich auch in einer Entfernung von 40 bzw. 60 μm vom Zentrum die Kopplungsstärke in entgegengesetzten Richtungen nicht signifikant. (Tabelle 3.7).

		n	Mittelwert	sem	mittlerer Unterschied	s	p
transversal	-40 μm	16	0,887	0,017	-0,001	0,017	0,853
	+40 μm	16	0,883	0,015			
	-20 μm	16	0,910	0,012	-0,002	0,009	0,304
	+20 μm	16	0,905	0,015			
0		16	1,000	0,000			
longitudinal	-20 μm	16	0,918	0,013	0,001	0,009	0,557
	+20 μm	16	0,917	0,013			
	-40 μm	16	0,902	0,015	0,005	0,010	0,052
	+40 μm	16	0,913	0,014			
	-60 μm	16	0,876	0,020	-0,010	0,041	0,356
	+60 μm	16	0,885	0,016			

Tabelle 3.7 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten Präparate zu Abbildung 3.16, T-Test für verbundene Stichproben

Zudem besteht bei gleichem Abstand vom Zentrum kein signifikanter Unterschied der maximalen Korrelationen in longitudinaler oder transversaler Richtung. (Tabelle 3.8)

		n	Mittelwert	sem	mittlerer Unterschied	s	p
-40 μm	long	16	0,902	0,033	0,015	0,034	0,093
	trans	16	0,887	0,035			
-20 μm	long	16	0,918	0,028	0,008	0,016	0,053
	trans	16	0,910	0,027			
0		16	1,000	0,000			
+20 μm	long	16	0,917	0,029	0,011	0,022	0,056
	trans	16	0,905	0,032			
+40 μm	long	16	0,913	0,030	0,029	0,050	0,034
	trans	16	0,883	0,031			

Tabelle 3.8 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, sowie Anzahl n der untersuchten Präparate, T-Test für verbundene Stichproben

3.7 Zeitliche Kopplung der glatten Muskelzellen

Im Folgenden wurde das Kopplungsverhalten im glattmuskulären Zellverband im Hinblick auf die zeitliche Signalausbreitung untersucht. Hierbei wurde mittels Korrelationsanalyse die zeitliche Verschiebung der registrierten Calcium-Fluoreszenzsignale ausgewertet. Das heißt, es wurde für jede betrachtete ROI derjenige zeitliche Versatz (Time Lag) bestimmt, für den die normierte Kreuzkorrelationsfunktion ihr Maximum annimmt.

Abbildung 3.17 zeigt die kumulierten Häufigkeiten der zeitlichen Signalverschiebung zweier exemplarischer Messfelder in 5 bzw. 20 μm Entfernung vom betrachteten Zentrum. Es wurde jeweils der Time Lag einer einzelnen ROI dargestellt (grüne Linie). Zusätzlich wurden Gruppen aus je 3 ROIs gebildet und der zeitliche Versatz durch Kreuzkorrelation der gemittelten Signalverläufe dieser Gruppen ermittelt (orange Linie). Die Diagramme enthalten Werte aus insgesamt 18 Aufnahmen unter Kontrollbedingungen.

Kumulierte Häufigkeitsverteilungen des zeitlichen Versatzes unter Spontanbedingungen

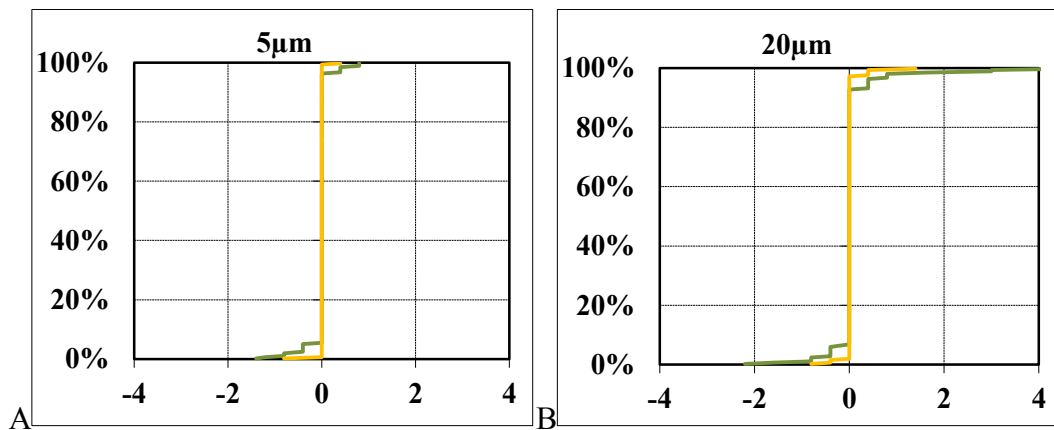


Abbildung 3.17 A, B Kumulierte Häufigkeitsverteilungen des zeitlichen Versatzes (Abszisse in Sekunden), Einzelfeld (grün) und Gruppe (orange). $n=4 \times 18$ Präparate
A Kreuzkorrelation des Zentrums Z mit ROI 12 (grün), Kreuzkorrelation der Felder (11+12+13) mit den Feldern (14+Z+15) (orange)
B Kreuzkorrelation des Zentrums Z mit ROI 2 (grün), Kreuzkorrelation der Felder (1+2+3) mit den Feldern (4+Z+5) (orange)

Aus der Abbildung 3.17 geht hervor, dass die nKKF für den überwiegenden Anteil der Messfelder zum Zeitpunkt $t=0$ ihr Maximum annimmt. Auch bei Auswertung der KKF für Distanzen bis zu $120\ \mu\text{m}$ konnte kein zeitlicher Versatz der Signale detektiert werden.

3.8 Pharmakologische Beeinflussbarkeit der Kopplung

Zur weiteren Charakterisierung der Kopplung im glattmuskulären Zellverband, erfolgten Versuchsreihen mit Acetylcholin und Octanol. Basierend auf den oben dargestellten Ergebnissen (siehe Abbildung 3.12, Abbildung 3.13) kann die Auswertung weiter vereinfacht werden, indem alle ROIs in gleicher Entfernung vom Zentrum zusammengefasst werden. Dadurch ergibt sich n durch Multiplikation der Anzahl der untersuchten Präparate mit 4.

3.8.1 Effekt von Acetylcholin

Im Folgenden wurde der Einfluss von Acetylcholin (in einer Konzentration von $10^{-5}\ \text{M}$) auf die Kopplungsstärke im glattmuskulären Zellverband untersucht. 20 bis 30 Minuten nach Einbringen des vorbereiteten Präparates in die begaste und temperierte Objektträgerkammer erfolgte eine Kontrollmessung (K1) über 120 Sekunden. Etwa 20 Minuten nach Zugabe der Testsubstanz in der angegebenen Konzentration folgte die 2. Messung (ACh). Weitere 20 Minuten nach dem Auswaschen des Acetylcholins fand die Kontrollmessung K2 statt. Die Ergebnisse der Kopplung sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Die Korrelations-Mittelwerte aus insgesamt 7 Versuchsreihen (je 1 Präparat) sind in Abhängigkeit von der Distanz zum Zentrum dargestellt. Zu erkennen ist eine signifikante reversible Zunahme der Kopplung unter Acetylcholin um etwa 4%.

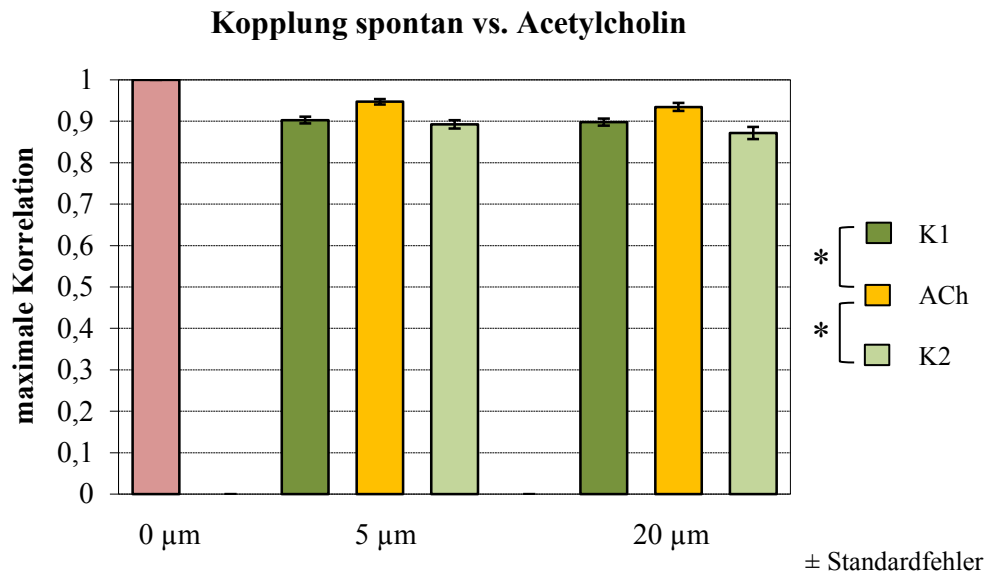


Abbildung 3.18 Vergleich der Kopplung ACh (10^{-5} M) vs. Spontanbedingungen, $n=4 \times 7$ Präparate, für jede Distanz (5 und 20 µm) sind die Werte aus allen 4 Richtungen (longitudinal und transversal, links und rechts) zusammengefasst, signifikante Unterschiede sind mit * markiert

		n	Mittelwert	sem
0 µm		1	1	0
5 µm	K1	16	0,903	0,008
	ACh	28	0,947	0,007
	K2	28	0,893	0,01
20 µm	K1	16	0,898	0,009
	ACh	28	0,935	0,009
	K2	28	0,872	0,015
		mittlerer Unterschied	s	p
5 µm	K1-ACh	-0,0500212	0,0336508	0,0000268
	ACh-K2	0,0545493	0,0407611	0,0000001
	K1-K2	0,0125143	0,0331509	0,1518242
20 µm	K1-ACh	-0,0510697	0,0326275	0,0000153
	ACh-K2	0,0627859	0,0593138	0,0000061
	K1-K2	0,0252955	0,0635859	0,1324002

Tabelle 3.9 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, T-Test für verbundene Stichproben, Anzahl n der ROIs zu Abbildung 3.18

3.8.2 Einfluss von Octanol

Der Effekt von Octanol auf die glattmuskuläre interzelluläre Kopplung wird in Abbildung 3.19 gezeigt. In insgesamt 7 Versuchsreihen nach dem obigen Schema ergab sich unter Einwirkung der Testsubstanz in einer Konzentration von $3,2 \times 10^{-4}$ M eine signifikante Reduktion der maximalen Korrelationen von etwa 9% gegenüber der jeweiligen Kontrollaufnahme (K1). Nach dem Ausspülen der Testsubstanz erreichte die Kopplung in 5 und 20 μm Entfernung vom Zentrum etwa die Höhe der Ausgangswerte.

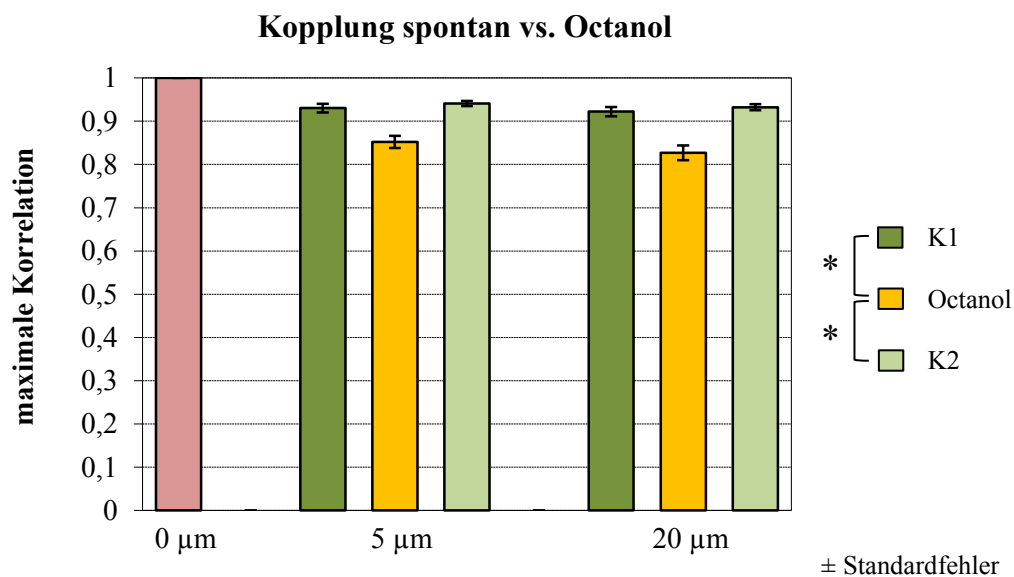


Abbildung 3.19 Vergleich der Kopplung Octanol ($3,2 \times 10^{-4}$ M) vs. Spontanbedingungen, $n=4 \times 7$ Präparate, für jede Distanz (5 und 20 μm) sind die Werte aus allen 4 Richtungen (longitudinal und transversal, links und rechts) zusammengefasst, signifikante Unterschiede sind mit * markiert

		n	Mittelwert	sem
0 μm		1	1	0
5 μm	K1	28	0,930	0,010
	Oct	28	0,852	0,014
	K2	24	0,941	0,006
20 μm	K1	28	0,922	0,011
	Oct	28	0,827	0,017
	K2	24	0,932	0,007
		mittlerer Unterschied	s	p
5 μm	K1-Oct	0,07823463	0,0495118	0,00000001
	Oct-K2	-0,07376623	0,06512761	0,00001208
	K1-K2	0,007173359	0,01523102	0,03038434
20 μm	K1-Oct	0,095001791	0,06181954	0,00000001
	Oct-K2	-0,08917129	0,07298104	0,00000420
	K1-K2	0,010094082	0,01579211	0,00468570

Tabelle 3.10 Mittelwerte und Standardfehler der Kreuzkorrelationsmaxima, Anzahl n der ROIs zu Abbildung 3.19, 7 Präparate, T-Test für verbundene Stichproben

4 Diskussion

4.1 Korrelative Netzwerkanalyse homogener Strukturen

Die Korrelative Netzwerkanalyse stellt in Verbindung mit der Real-Time-Fluoreszenzmikroskopie ein probates Mittel zur Untersuchung der Kopplungseigenschaften im glattmuskulären Zellverband dar [23]. Diese Methode ist insbesondere auf Grund ihrer Non-Invasivität sehr gut geeignet, die spontane rhythmische Aktivität zu untersuchen und unterscheidet sich in dieser Hinsicht von den meisten anderen elektrophysiologischen Verfahren (einschließlich Patch Clamp und intra- oder extrazellulären Mikroelektroden). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, ist die korrelative Netzwerkanalyse auch auf das Magenantrum anwendbar. Das untersuchte Stratum longitudinale stellt trotz seines komplexen Aufbaus aus glatten Muskelzellen, Cajal-Zellen, enterischen und vegetativen Nervenfasern ein funktionell homogenes Gewebe dar, wie durch Vergleich der Streuungsmaße der verschiedenen Messungen in Tabelle 3.1 gezeigt werden konnte.

4.2 Kopplung im Magenantrum

Im Magenantrum stehen die Durchmischung und portionsweise Abgabe des Mageninhaltes ins Duodenum im Vordergrund. Dies wird durch koordinierte peristaltische Kontraktionen der Magenwand erreicht und erfordert eine hohe Koordination und Kopplung der beteiligten Zellstrukturen und -aktivitäten. Bereits Versuche mit der „Rostocker Hose“ legten eine hohe Kopplung im Magenantrum im Vergleich zum vaskulären glatten Gefäßmuskel der Portalvene nahe [22]. Diese Vermutung kann durch die Anwendung der korrelativen Netzwerkanalyse auf die Portalvene und das Magenantrum der Ratte bestätigt werden (siehe eigene Ergebnisse und Vergleich mit Untersuchungen an der Portalvene der Ratte [23]).

Abbildung 4.1 zeigt das Kopplungsverhalten der glatten Muskelzellen im Magenantrum unter verschiedenen Bedingungen. Dabei wird deutlich, dass die Korrelation der Spontanaktivität unter Kontrollbedingungen nach einem starken Abfall im Bereich der ersten 5 μm in eine Plateau-Phase übergeht und durch Acetylcholin verbessert bzw. durch Octanol verringert wird.

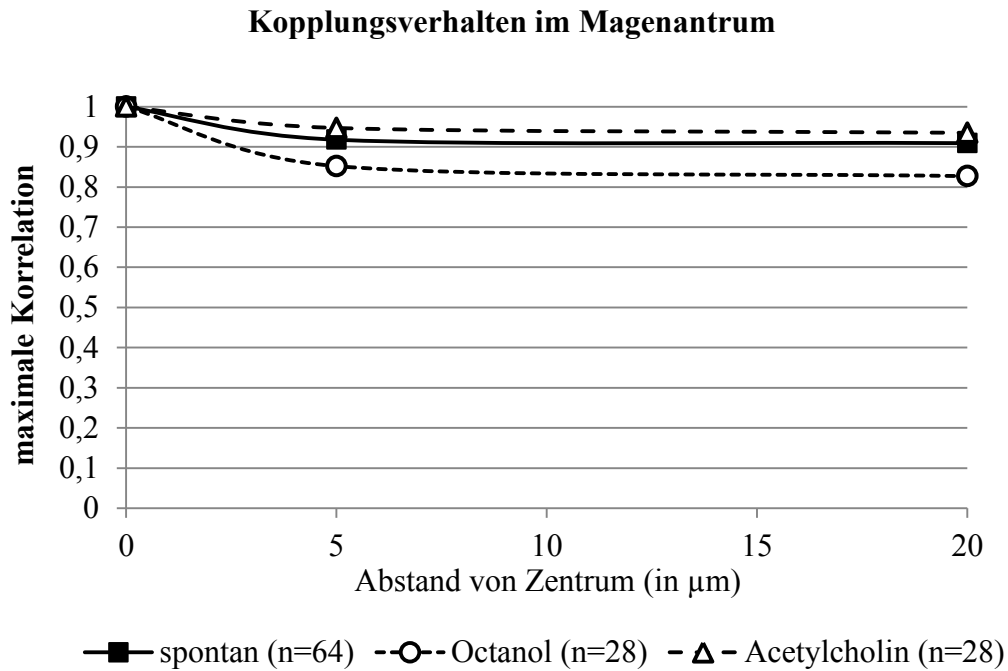


Abbildung 4.1 Kopplungsverhalten im Magenantrum

Darstellung der maximalen Korrelation in Abhängigkeit von der Distanz zum Zentrum unter Spontanbedingungen (n=64, 16 Präparate), Acetylcholin (10^{-5}M , n=28, 7 Präparate) oder Octanol ($3,2 \times 10^{-4}\text{M}$, n=28, 7 Präparate). Da die Überprüfung der Korrelationen in den 4 untersuchten Richtungen vom Zentrum keine signifikanten Unterschiede ergab (siehe Tabelle 3.3 und 3.4), wurden die ermittelten Werte aller ROIs mit gleicher Entfernung vom Zentrum aus allen 4 Richtungen zusammengefasst.

Dabei liegt die abgebildete Distanz (20 μm) etwa in der Größenordnung einer Zelllänge. Die Messungen im 60 μm – Radius zeigten vergleichbar hohe Korrelationen (siehe Abbildung 3.11 und 3.16).

4.3 Gap Junctions

Die Existenz zahlreicher Gap Junctions im Magenantrum ist durch elektronenmikroskopische, immunfluoreszenzmikroskopische und funktionelle/physiologische Untersuchungen belegt [11, 13, 14]. Ihr Beitrag zur Signalausbreitung und –synchronisation in vivo wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während diverse Autoren den Gap Junctions die zentrale Rolle in der Signalpropagation zuschreiben, vermuten Daniel et. al., dass es neben Gap Junctions noch einen weiteren bisher unbekanntem Mechanismus geben müsse [56]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Gap Junctions einen Beitrag zur Signalausbreitung im Gewebe liefern, eine allein durch Gap Junctions vermittelte Signalpropagation jedoch nicht ausreicht, um das Kopplungsverhalten hinreichend zu erklären.

4.4 Cholinerge Modulation der Kopplung

Acetylcholin ist der Transmitter der parasympathischen Innervation und wirkt im Magen-Darm-Trakt anregend auf die Verdauungsprozesse. Im Magen bewirkt der Botenstoff vorrangig über m_3 -Rezeptoren (zu einem geringeren Anteil auch über m_2 - und m_1 -Rezeptoren) eine Zunahme der Amplitude der Slow Waves und der intrazellulären Calcium-Konzentration und somit auch der Kontraktionskraft im murinen und humanen Antrum [46, 42, 63, 64, 65].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Acetylcholin die Kopplung der glatten Muskelzellen auf Zellebene verbessert und dass dieser Effekt reversibel ist (siehe Abbildung 3.18).

Aus den Betrachtungen in Abschnitt 3.5.1 geht hervor, dass eine Veränderung der Amplitude der Calcium-Oszillationen die Höhe der maximalen Korrelation (berechnet mit der normierten Kreuzkorrelationsfunktion) nicht beeinflusst. Der Mechanismus der Acetylcholin-bedingten Zunahme der zytosolischen Calcium-Konzentration reicht folglich nicht aus, um die verbesserte Kopplung unter

Einfluss des Transmitters zu erklären. Zu Bedenken bleibt, dass bei gleichem Signalrauschen durch die zunehmende der Amplitude des Signales auch der Signal-Rausch-Quotient und somit die maximale Korrelation steigt, wie in Abbildung 3.9 gezeigt. Die Zunahme der Kopplung spiegelt folglich die stärkere Ähnlichkeit der Calcium-Signale und eine höhere Synchronisierung der glatten Muskelzellen wieder. Erklärt werden könnte dies durch eine verbesserte interzelluläre Kommunikation via Gap Junctions durch cholinerg vermittelte Erhöhung ihrer Leitfähigkeit, beispielsweise durch Phosphorylierung des Connexin 43. Dieser Mechanismus hat seinen Angriffspunkt an allen interzellulären Kontakten vom Typ der Gap Junctions, also sowohl untereinander zwischen den glatten Muskelzellen oder ICC, als auch zwischen ICC und glatten Muskelzellen. Da man aber davon ausgeht, dass das durch Nervenfasern freigesetzte Acetylcholin über die Synapsen-artigen Kontakte nur die ICC-IM erreicht und außerhalb dieser Regionen schnell durch Cholinesterasen gespalten wird und somit in vivo keinen direkten Effekt auf die glatten Muskelzellen hat [12], ist eher eine Zunahme der Kopplung durch eine bessere Koordination der ICC anzunehmen.

4.5 Anpassung der Kontraktionskraft

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie die Kontraktionskraft auf zellulärer Ebene gesteigert wird. Für den Skelettmuskel ist dies eingehend untersucht: die Kontraktionsstärke wird zentralnervös über die Impulsrate der Motoneurone und die Rekrutierung motorischer Einheiten variiert. Im glattmuskulären Gewebe sind die Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt. Ebenso wie im Skelettmuskel kann die Kontraktionskraft über die Höhe der intrazellulären Calcium-Konzentration variiert werden. Diverse Second Messenger greifen in den Prozess der elektromechanischen Kopplung ein, indem sie die Wiederaufnahme des Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum beeinflussen und somit die Kontraktionskraft modulieren (wie in Kapitel 1.5 beschrieben). Als weiterer Mechanismus ist die Veränderung der interzellulären

Kopplung zu diskutieren. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Zunahme der Kopplung auf Zellebene unter cholinergem Stimulation und unterstützen somit diesen Ansatz. Als potentieller Mediator kommen die interstitiellen Cajal-Zellen in Betracht.

4.6 Fehlerquellen, Grenzen und Potential der Methodik

Aus den obigen Erläuterungen geht hervor, dass die Kombination aus konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und korrelativer Netzwerkanalyse geeignet ist zur Untersuchung der glattmuskulären Kopplung des Magenantrums auf Zellebene. Mögliche Fehlerquellen und methodische Grenzen im Zusammenhang mit der Präparation, dem verwendeten Indikator, der Kreuzkorrelationsanalyse und der durchgeführten Modellrechnung werden im Folgenden erläutert und im Hinblick auf die eigenen Daten bewertet.

4.6.1 Präparation

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der natürlichen interzellulären Kopplung im spontan aktiven glattmuskulären Zellverband des Magenantrums der Ratte. Hierzu mussten Muskelstreifen aus der Magenwand isoliert werden. Trotz aller Vorsicht bei der Präparation kann es insbesondere durch die Entfernung der Serosa im oberflächlichen Bereich des Präparates zur Beeinträchtigung der ursprünglichen Gewebearchitektur mit folgender Behinderung der interzellulären Kommunikation kommen. Die begrenzte Eindringtiefe des konfokalen Mikroskops führte dazu, dass nur die oberflächennahe, serosaseitige Zone der Tunica muscularis untersucht werden konnte. Dennoch stellt die verwendete Methode einen entscheidenden Vorteil gegenüber den meisten anderen bisher verwendeten Untersuchungsmethoden dar, da die zelluläre Integrität und die interzellulären Verbindungen und damit auch die Funktionalität der beteiligten Strukturen im Einzelnen und ihr Zusammenwirken im komplexen multizellulären Netzwerk im überwiegenden Teil des Präparates durch die vorgestellte Vorbereitung nicht

beeinflusst wurden und damit die Untersuchung des eigentlichen Phänomens der Erregungsbildung und –ausbreitung ermöglicht wird.

4.6.2 **Indikator**

Für die vorliegenden Untersuchungen kam der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 zum Einsatz. Dieser eignet sich auf Grund der in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Eigenschaften für die Erfassung der intrazellulären Calcium-Konzentrationsänderung. Jeder Farbstoff unterliegt einem Bleichungseffekt in Abhängigkeit von der Laserintensität und der Zeit der Einwirkung. Dieser Effekt zeigt sich in der Abnahme der detektierten Fluoreszenzintensität mit zunehmender Bestrahlungsdauer und Laserintensität und konnte in allen Messungen in unterschiedlich starker Ausprägung registriert werden. Wie in Abbildung 3.10 durch Simulation gezeigt, ist dieser Effekt jedoch (bei einer durchschnittlichen Differenz der Anstiege von 0,005) zu vernachlässigen.

Des Weiteren ist insbesondere für Fluo-3 ein zytotoxischer Effekt beschrieben worden. So behinderte der Farbstoff in einer Konzentration von 8 μM die Entwicklung von Seeigeleiern [66]. Für die vorliegende Arbeit wurde Fluo-3 jedoch in einer geringeren Konzentration von 5 μM verwendet und das Gewebe zeigte eine stabile rhythmische Spontanaktivität, welche den besten Indikator für die Vitalität der Zellen darstellt.

Damit ist eine wichtige Grundvoraussetzung für die durchgeführten Untersuchungen gegeben und auch ein bedeutender Vorzug gegenüber einer Reihe bisheriger Untersuchungen zur Erregungsausbreitung im Magenantrum hervorzuheben, welche beispielsweise über Farbstoffdiffusion oder Multielektrodenmessungen durch Input externer Reize (Farbstoffe oder Ströme) die interzelluläre Kopplung beschreiben [13, 14]. In der vorliegenden Arbeit erfolgt eine mehrdimensionale (Kopplungs-)Analyse der Ausbreitung eines im multizellulären Netzwerk des Magenantrums durch Schrittmacheraktivität der ICC generierten *intrinsischen* Signals im Gewebe.

4.6.3 Korrelative Netzwerkanalyse

In Kapitel 3.5 wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die Kreuzkorrelationsfunktion durch Simulation geprüft und somit die Unempfindlichkeit, aber auch die Sensibilität der nKKF gegenüber Störfaktoren gezeigt. In der Modellrechnung ergab sich, dass die normierte Kreuzkorrelationsfunktion unabhängig von der Amplitude und der absoluten Höhe der Signale ist. Demgegenüber konnte durch die Simulation eine deutliche Abhängigkeit der nKKF von Störgrößen wie Signalqualität (Rauschen), Photobleaching und Frequenzvariation festgestellt werden. Die Analyse der erhobenen Messdaten erbrachte jedoch Korrelationswerte um 0,9. Diese hohe Korrelation spiegelt die hohe interzelluläre Kopplung im Magenantrum einerseits und die Qualität der fluoreszenzmikroskopischen Messungen andererseits wider. Die eigenen Messungen haben im Durchschnitt einen Signal-Rausch-Quotienten von $2,58 \pm 0,13$ ($n=104$). In der Modellrechnung führt dies zu einer Abnahme der maximalen Korrelation um 5%. Zusätzlich zeigten die experimentellen Daten, gemittelt über alle Messungen eine durchschnittliche Periodenabweichung der Einzelfelder von $3,27 \pm 0,33\%$ ($n=54$). Dies vermindert die maximale Korrelation in der Simulation um etwa 1,2%. Weiterhin ist das Ausmaß des Photobleaching nicht in allen ROIs identisch. Der Anstieg variiert leicht. Der mittlere Betrag der Differenz der Anstiege zweier Fluoreszenzsignale beträgt $0,005 \pm 0,001$ ($n=298$) mit folgender simulierter durchschnittlicher Senkung der Korrelationsmaxima um ca. 3%. Die vorhergehenden Betrachtungen zeigen, dass die Qualität der Aufnahmen die maximal möglichen Korrelationswerte bestimmt und lassen auch den Umkehrschluss zu, dass die tatsächliche Kopplung im Magenantrum im betrachteten Radius von 60 μm sehr gut ist.

4.6.4 Modellrechnung

Die durchgeführte Modellrechnung stellt nur eine Annäherung an die experimentellen Daten dar und die simulierten Werte dienen nur zur grob orientierenden Einschätzung der erhobenen Daten und Korrelationen.

4.6.5 Laufzeitanalyse

Zwar ist die korrelative Netzwerkanalyse prinzipiell ein geeignetes Mittel, die Laufzeit eines Signales zu analysieren, jedoch begrenzen die technischen Aufnahmeparameter die maximal detektierbare Ausbreitungsgeschwindigkeit. So ist in Kapitel 2.8 für die eigene Versuchsanordnung die maximal detektierbare Geschwindigkeit eines Signales bei Propagation in longitudinaler Richtung und einer Bildrate von 5/s optimistisch mit 0,6 mm/s abgeschätzt worden und damit entsprechend der Angaben in der Literatur von 1 bis 1,8 mm/s [21, 60, 67] nicht geeignet eine Signalpropagation im Rattenmagen zu visualisieren. In Konkordanz zu dieser Annahme ist der Time lag nicht signifikant von Null verschieden. Die scheinbare zeitliche Verschiebung vereinzelter Signale ist nicht typisch für eine Laufzeit und kann vielmehr durch Überlagerung inhomogener Strukturen im konfokalen Bild beziehungsweise Rausch-bedingte Veränderung des Time lag erklärt werden. Auch in Messungen mit verbesserter zeitlicher Auflösung (durch Erhöhung der Bildrate auf 10/s) konnte kein zeitlicher Versatz gemessen werden.

Somit kann die Geschwindigkeit der Signalpropagation im Magenantrum der Ratte auf mikroskopischer Ebene auf der Grundlage dieser Arbeit als mindestens 1,2 mm/s abgeschätzt werden.

Um nähere Aussagen über die Geschwindigkeit der Signalpropagation machen zu können, ist demnach eine Anpassung der Messfelder bzw. eine Erhöhung der Bildrate notwendig.

4.6.6 Frequenz

Die mittlere Frequenz der Calcium-Oszillationen liegt mit 1,5/min im unteren Bereich der durchschnittlichen Frequenz der phasisch-rhythmischen mechanischen Aktivität unter isometrischen Bedingungen im Organbad (3/min) bzw. der Frequenz der Slow waves im Rattenmagen (1,3 bis 5,3/min gemessen mit extrazellulären Elektroden [60]). Hierbei kommen einige Faktoren ursächlich in Betracht. Zunächst erfolgte die Präparatentnahme pylorusnah. Untersuchungen am Magen diverser Nagetiere haben gezeigt, dass die Eigenfrequenz am proximalen Korpus am größten ist und in Richtung Pylorus abnimmt [9, 21]. Des Weiteren wurde eine Dehnungsabhängigkeit der Spontanaktivität beschrieben [68, 69]. Durch Vordehnung der isolierten Muskelstreifen nach Einbringen ins Organbad wird die Spontanaktivität angeregt. Eine (standardisierte) Vordehnung der Präparate war durch die Fixierung auf dem Silikonquader jedoch nicht möglich. Eine weitere Erklärung für die vergleichsweise geringe Frequenz könnte in den Umgebungsbedingungen liegen. Der Silikonblock wurde mit der Präparatseite nach unten in der Objektträgerkammer befestigt. Möglicherweise entsteht durch den Andruck des Präparates an das Bodenglas der Objektträgerkammer ein Mikromilieu mit eingeschränkter Zirkulation der temperierten, physiologischen Salzlösung und folgender Abnahme der Temperatur, sowie Veränderung des Sauerstoff- und Kohlendioxid-Gehaltes, des pH und der Zusammensetzung der physiologischen Lösung und konsekutiver Beeinflussung der Spontanaktivität, welche typischerweise sehr sensibel auf Änderungen der Umgebung reagiert [70].

4.7 Die Kopplungsreserve

Wie bereits nach Versuchen mit der Rostocker Hose vermutet, ist die Motorik im Magenantrum, verglichen mit anderen Organen (wie beispielsweise der Portalvene) charakterisiert durch einen hohen Grad der Kopplung. Dabei ist das Ausmaß der Kopplung unabhängig von der betrachteten Ausbreitungsrichtung und durch GJ-Blocker wie Octanol nur wenig beeinflussbar. Die Tatsache, dass auch nach partieller Ausschaltung der Kopplungselemente (GJ) eine funktionelle Kopplung erhalten bleibt, spricht für eine biologische Sicherheitsmarge – der Kopplungsprozess ist deutlich stärker ausgebildet, als er es unter physiologischen Bedingungen sein müsste. Dieses Phänomen bezeichnen wir im Folgenden als Kopplungsreserve.

Vor dem Hintergrund des bereits 1966 von Hukuhara et. al. [21] beschriebenen, makroskopisch sichtbaren, zirkulären Kontraktionsbandes, welches sich in Form der peristaltischen Welle von oral nach aboral verlagert und dabei aus vielen nahezu simultan kontrahierenden glatten Muskelzellen besteht, erscheint die Beobachtung, dass die Kopplung in longitudinaler und transversaler Richtung nicht signifikant verschieden ist, zunächst unerwartet. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch das Kopplungsverhalten über eine Distanz von maximal 60 μm untersucht. Dies liegt sicherlich im Bereich der Ausdehnung des zirkulären peristaltischen Kontraktionsbandes.

4.8 Bedeutung der Kopplungsreserve

Der Verdauungstrakt dient neben der Ausscheidung von Stoffwechselabbauprodukten vorrangig der Versorgung des Organismus mit Nährstoffen, Vitaminen, Spurenelementen und Wasser. Der Magen leistet hierzu einen entscheidenden Beitrag, indem er neben der Reservoirfunktion auch die Durchmischung und Zerkleinerung, die beginnende chemische Aufschließung und anschließende portionsweise Abgabe ins Duodenum ermöglicht. Bei Erkrankungen wie der diabetischen Gastropathie sind diese Funktionen

beeinträchtigt. Aber nicht jeder Patient mit einer verzögerten Magenentleerung auf dem Boden einer diabetischen Gastroparese hat auch Beschwerden. Eine mögliche Ursache ist die diabetisch bedingte Schädigung der afferenten Fasern. Eine weitere Erklärung ist in der Kopplungsreserve zu sehen. Die physiologische, spontane, phasisch-rhythmische, gastrale Motilität ist in einem solch hohen Maße koordiniert, dass selbst morphologische Veränderungen (wie beispielsweise die Verminderung der ICC-Dichte bei der diabetischen Gastropathie) noch lange symptomarm oder sogar beschwerdefrei kompensiert werden können und erst durch zusätzliche äußere Einflussfaktoren wie beispielsweise eine schwere Allgemeinerkrankung zur Dekompensation mit folgender Magenlähmung führen. Die Kopplungsreserve ist also als Schutzmechanismus zu verstehen, der die Aufrechterhaltung des Verdauungsprozesses und damit die lebensnotwendige Versorgung mit Nährstoffen so lange wie möglich gewährleisten soll.

5 Thesen

1. Die antrale Magenmotilität ist gekennzeichnet durch phasisch-rhythmische Spontanaktivität und ermöglicht so die peristaltischen Bewegungen zur Durchmischung und zum Weitertransport des Mageninhaltes.
2. Die zelluläre und elektrophysiologische Grundlage bildet ein multizelluläres Netzwerk aus Cajal-Zellen (ICC) und glatten Muskelzellen.
3. Die interzelluläre glattmuskuläre Kopplung kann mittels korrelativer Netzwerkanalyse quantifiziert werden. Dabei dient die maximale Korrelation (d.h. das Maximum 0. Ordnung der Kreuzkorrelationsfunktion) als Maß für die Kopplung.
4. Cholinerge Stimulation bewirkt eine reversible Zunahme der Amplitude der Slow Waves, der intrazellulären Calcium-Konzentration und somit auch der Kontraktionskraft. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die interzelluläre Kopplung zunimmt.
5. Der Gap Junction-Blocker Octanol verringert die Kopplung, hebt sie aber nicht vollständig auf. Folglich liefern Gap Junctions einen Beitrag zur Signalausbreitung im Gewebe, eine allein durch Gap Junctions vermittelte Signalpropagation kann das Kopplungsverhalten jedoch nicht hinreichend erklären. Eine Beteiligung von Cajal-Zellen ist sehr wahrscheinlich.
6. Die Geschwindigkeit der Signalpropagation im Magenantrum der Ratte kann auf mikroskopischer Ebene als mindestens 1,2 mm/s abgeschätzt werden.
7. Das Magenantrum weist im Vergleich zu anderen Geweben eine hohe Kopplungsreserve auf. Künftige Studien an anderen Organen und mit anderen

Aktivierungsmethoden sind notwendig, um die Kopplung in anderen, auch nicht spontan aktiven Organen zu charakterisieren.

8. Eine Beeinträchtigung der vorhandenen Strukturen oder Kommunikationswege, beispielsweise im Rahmen einer diabetischen Gastroparese, geht z. T. mit erheblichen klinischen Symptomen einher und beeinflusst die Lebensqualität nachhaltig.
9. Ein besseres Verständnis der gastralen Motilität stellt eine Grundlage für die Aufklärung der Pathogenese gastraler Erkrankungen und die Entwicklung neuer Therapieansätze dar.

6 Literaturverzeichnis

- [1] K. L. Koch, „Diabetic gastropathy; gastric neuromuscular dysfunction in diabetes mellitus; a review of symptoms, pathophysiology, and treatment,“ *Dig. Dis. Sci.*, Nr. 44, pp. 1061-75, 1999.
- [2] V. J. Horváth, H. Vittal, A. Lörincz, H. Chen, G. Almeida-Porada, D. Redelman und T. Ördög, „Reduced Stem Cell Factor Links Smooth Myopathy and Loss of Interstitial Cells of Cajal in Murine Diabetic Gastroparesis,“ *Gastroenterology*, Nr. 130, pp. 759-770, 2006.
- [3] T. Yamamoto, K. Watabe, M. Nakahara, H. Ogiyama, T. Kiyohara, S. Tsutsui, S. Tamura, Y. Shinomura und N. Hayashi, „Disturbed gastrointestinal motility and decreased interstitial cells of Cajal in diabetic db/db mice,“ *Gastroenterology*, Nr. 23, pp. 660-667, 2008.
- [4] H. Iwasaki, M. Kajimura, S. Osawa, S. Kanaoka, T. Futura, M. Ikuma und A. Hishida, „A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus,“ *J Gastroenterol*, Nr. 41, pp. 1076-1087, 2006.
- [5] M. Horowitz, P. E. Harding und A. Maddox, „Gastric and oesophageal emptying in insulin-dependent diabetes mellitus,“ *J Gastroenterol Hepatol*, Nr. 1, pp. 97-113, 1986.
- [6] R. Fraser, M. Horowitz, A. Maddox, P. Harding, B. Chatterton und J. Dent, „Hyperglycaemia slows gastric emptying in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus,“ *Diabetologia*, Nr. 33, pp. 675-680, 1990.
- [7] „Die europäische Arzneimittel-Agentur empfiehlt Änderungen für die Anwendung von Metoclopramid,“ *European Medicines Agency*, Nr. 13239, 2014.
- [8] J. W. Konturek, K.-H. Dietl und W. Domschke, „Magenschrittmacher-Implantation,“ *Dt Ärztebl*, Bd. 94, Nr. 27, pp. A-1871-1873, 1997.

- [9] K. Golenhofen, D. v. Loh und K. Milenov, „Elektrophysiologische Untersuchungen zur Spontanaktivität isolierter Muskelpräparate aus verschiedenen Abschnitten des Meerschweinchen-Magens,“ *Pflügers Arch*, Bd. 315, Nr. 4, pp. 336-356, 1970.
- [10] F. E. Lüdtke, E. Lammel, K. Mandrek, H. J. Peiper und K. Golenhofen, „Myogenic basis of motility in the pyloric region of human and canine stomachs,“ *Dig Dis*, Bd. 9, Nr. 6, pp. 414-431, 1991.
- [11] A. J. Burns, T. M. Herbert, S. M. Ward und K. M. Sanders, „Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry,“ *Cell Tis Res*, Bd. 290, Nr. 1, pp. 11-20, 1997.
- [12] S. M. Ward und K. M. Sanders, „Interstitial cells of cajal: primary targets of enteric motor innervation,“ *Anat Rec*, Bd. 262, pp. 125-135, 2001.
- [13] E. J. Dickens, G. D. S. Hirst und T. Tomita, „Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach,“ *J Physiol*, Bd. 514, Nr. 2, pp. 515-531, 1999.
- [14] H. M. Cousins, F. R. Edwards, H. Hickey, C. E. Hill und G. D. Hirst, „Electrical coupling between the myenteric interstitial cells of cajal and adjacent muscle layers in the guinea pig gastric antrum,“ *J Physiol*, Bd. 550, Nr. 3, pp. 829-844, 2003.
- [15] E. A. H. Beckett, Y. Takeda, H. Yana, K. M. Sanders und S. M. Ward, „Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach,“ *J Comp Neurol*, Bd. 493, Nr. 2, p. 193–206, 2005.
- [16] L. Thuneberg, „Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells?,“ *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, Bd. 71, pp. 1-130, 1982.
- [17] K. M. Sanders, „A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract,“ *Gastroenterology*, Bd. 111, pp. 492-515, 1996.

- [18] G. D. S. Hirst und F. R. Edwards, „Generation of slow waves in the antral region of guinea-pig stomach – a stochastic process,“ *J Physiol*, Bd. 535, Nr. 1, pp. 165-180, 2001.
- [19] K. M. Sanders und N. G. Publicover, „Electrophysiology of the gastric musculature,“ in *Handbook of Physiology, Section 6, Gastrointestinal System, Part 1*, Bethesda, American Physiological Society, 1989, pp. 187-216.
- [20] G. D. S. Hirst, A. P. Garcia-Londono und F. R. Edwards, „Propagation of slow waves in the guinea-pig gastric antrum,“ *J Physiol*, Bd. 571, Nr. 1, pp. 165-177, 2006.
- [21] T. Hukuhara und T. Neya, „On the rat gastric motility,“ *Jap J Physiol*, Bd. 16, pp. 497-508, 1966.
- [22] G. Genrich, „Experimentelle Untersuchungen zur rhythmischen Spontanaktivität der glatten Muskulatur,“ Hausarbeit, Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universität Rostock, 2008.
- [23] S. Igelbrink, „Untersuchung zur Erregungskopplung am glatten Gefäßmuskel der Portalvene mittels mehrdimensionaler korrelativer Netzwerkanalyse,“ Dissertation, Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universität Rostock, 2013.
- [24] A. P. Somlyo und A. V. Somlyo, „Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase,“ *Physiol Rev*, Bd. 83, pp. 1325-1358, 2003.
- [25] D. A. Taylor and J. T. Stull, "Calcium dependence of myosin light chain phosphorylation in smooth muscle cells," *J Biol Chem*, vol. 263, pp. 14456-14462, 1988.
- [26] N. Niuro und M. Ikebe, „Zipper-interacting protein kinase induces Ca²⁺ free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation,“ *J Biol Chem*, Bd. 276, pp. 29567-29574, 2001.
- [27] E. Ihara und J. A. MacDonald, „The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase,“ *Can J Physiol Pharmacol*, Bd. 85, pp. 79-87, 2007.

- [28] M. Ito, T. Nakano, F. Erdodi und D. J. Hartshorne, „Myosin phosphatase: structure, regulation and function,“ *Mol Cell Biochem*, Bd. 259, pp. 197-209, 2004.
- [29] K. M. Sanders, „Regulation of smooth muscle excitation and contraction,“ *Neurogastroenterol Motil*, Bd. 20, pp. 39-53, 2008.
- [30] J. R. Kovac, H. G. Preiksaitis und S. M. Sims, „Functional and molecular analysis of L-type calcium channels in human oesophagus and lower oesophageal sphincter smooth muscle,“ *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Bd. 289, pp. G998-1006, 2005.
- [31] A. Rich, J. L. Kenyon, J. R. Hume, K. Overturf, B. Horowitz und K. M. Sanders, „Dihydropyridine-sensitive calcium channels expressed in canine colonic smooth muscle cells,“ *Am J Physiol*, Bd. 264, pp. C745-54, 1993.
- [32] K. E. Overturf, S. N. Russel, A. Carl und et al, „Cloning and characterization of KV1.5 delayed rectifier K⁺channel from vascular and visceral smooth muscles,“ *Am J Physiol*, Bd. 267, pp. C1231-1238, 1994.
- [33] F. Schmalz, J. Kinsella und S. D. Koh, „Molecular identification of of an component of delayed rectifier current in gastrointestinal smooth muscles,“ *Am J Physiol*, Bd. 274, pp. G901-911, 1998.
- [34] T. Noack, P. Deitmer und E. Lammel, „Characterization of membrane currents in single smooth muscle cells from the guinea-pig gastric antrum,“ *J Physiol*, Bd. 451, pp. 387-417, 1992.
- [35] K. M. Sanders, „Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles,“ *J Appl Physiol*, Bd. 91, pp. 1438-1449, 2001.
- [36] L. Liu, Y. Ishida, G. Okunade, G. E. Shull und R. J. Paul, „Role of plasma membrane Calcium ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice,“ *Am J Physiol Cell Physiol*, Bd. 290, pp. C1239-1247, 2006.

- [37] L. Raeymaekers, F. Hofmann und R. Casteels, „Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle,“ *Biochem J*, Bd. 252, pp. 269-273, 1988.
- [38] M. Tada, M. A. Kirchberger und A. M. Katz, „Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase,“ *J Biol Chem*, Bd. 250, Nr. 7, pp. 2640-2647, 1975.
- [39] C. J. Le Peuch, J. Haiech und J. G. Demaille, „Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylations,“ *Biochemistry*, Bd. 18, Nr. 23, pp. 5150-5157, 1979.
- [40] Y. Iwasa und M. M. Hosey, „Phosphorylation of cardiac sarcolemma proteins by the calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase,“ *J Biol Chem*, Bd. 259, Nr. 1, pp. 534-540, 1984.
- [41] M. Wibo und T. Godfraind, „Comparative localization of inositol 1,4,5 - trisphosphate and ryanodine receptors in intestinal smooth muscle: an analytical subfractionation study,“ *Biochem J*, Bd. 297, pp. 415-423, 1994.
- [42] T. W. Kim, S. D. Koh, T. Ordög, S. M. Ward und K. M. Sanders, „Muscarinic regulation of pacemaker frequency in murine gastric interstitial cells of Cajal,“ *J Physiol*, Bd. 546, Nr. 2, pp. 415-425, 2003.
- [43] X. Y. Wang und L. Zhou, „Signal transduction pathway for antral smooth muscle cell contraction induced by motilin and gastrin,“ Nr. 52.4: 272-276, 2000.
- [44] X.-M. Si, L. Huang, H.-S. Luo, S. C. Paul und P. Lü, „The role of protein kinase C-mediated phosphorylation of type III inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in cholecystinin octapeptide induced calcium mobilization in gastric antral smooth muscle cells,“ *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, Bd. 87, Nr. 10, pp. 664-669, 2007.

- [45] P. Garcia-Lopez, V. Garcia-Marin, R. Martinez-Murillo und M. Freire, „Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal,“ *Brain Res Reviews*, Bd. 61, pp. 154-169, 2009.
- [46] H. F. Wrzos, T. Tandon und A. Ouyang, „Mechanismns mediating cholinergic antral circular smooth muscle contraction in rats,“ *World J Gastroenterol*, Bd. 10, Nr. 22, pp. 3292-3298, 2004.
- [47] A. J. Burns, A. E. Lomax, S. Torihashi, K. M. Sanders und S. M. Ward, „Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach,“ *Proc Natl Acad Sci USA*, Bd. 93, Nr. 21, pp. 12008-12013, 1996.
- [48] S. M. Ward, E. A. Beckett, X. Wang, F. Baker, M. Khoyi und K. M. Sanders, „Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons,“ *J Neurosci*, Bd. 20, pp. 1393-1403, 2000.
- [49] E. Bozler, „Physiological evidence for the syncytial character of smooth muscle,“ *Science*, Bd. 86, Nr. 2238, p. 476, 1937.
- [50] E. Bozler, „Electric stimulation and conduction of excitation in smooth muscle,“ *Am J Physiol*, Bd. 122, Nr. 3, pp. 614-623, 1938.
- [51] N. M. Kumar und N. B. Gilula, „The gap junction communication channel,“ *Cell*, Bd. 84, pp. 381-388, 1996.
- [52] D. B. Alexander and G. S. Goldberg, "Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels," *Curr Med Chem*, vol. 10, no. 19, pp. 2045-58, 2003.
- [53] G. Söhl, Willecke und K, „Gap junctions and the connexin protein family,“ *Cardiovasc Res*, Bd. 62, pp. 228-232, 2004.
- [54] A. Salameh und S. Dhein, „Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer?,“ *Biochem Biophys Acta*, Bd. 1719, pp. 36-58, 2005.
- [55] E. E. Daniel, „Communication between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal muscle,“ *Neurogastroenterol Motil*, Bd. 16, Nr. 1, pp. 118-122, 2004.

- [56] E. E. Daniel , A. E. Yazbi, M. Mannarino, G. Galante, G. Boddy, J. Livergant und T. E. Oskouei, „Do gap junctions play a role in nerve transmission as well as pacing in mouse intestine?“, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Bd. 292, Nr. 3, pp. G734-745, 2007.
- [57] H. Osaki, R. J. Stevens, D. P. Blondfield, N. G. Publicover und K. M. Sanders, „Simultaneous measurement of membrane potential, cytosolic Ca²⁺, and tension in intact smooth muscles“, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, Bd. 260, Nr. 5, pp. C917-C925, 1991.
- [58] K. Golenhofen, „Untersuchungen am isolierten glatten Muskel“, in *Gastrointestinale Motilität-klinische Untersuchungsmethoden Edition Medizin Weinheim*, Weinheim-Deerfield Beach, Florida-Basel, Wienbeck, M; Lux, G, 1983, pp. 139-149.
- [59] A. Takahashi, P. Camacho, J. D. Lechleiter und B. Herman, „Measurement of Intracellular Calcium“, *Physiol Rev*, Bd. 79, pp. 1089-1125, 1979 1999.
- [60] X.-Y. Wang, W. J. E. P. Lammers, P. Bercik und J. D. Huizinga, „Lack of pyloric interstitial cells of Cajal explains distinct peristaltic motor patterns in stomach and small intestine“, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Bd. 289, pp. G539-G549, 2005.
- [61] R. G. Lentle, P. W. M. Janssen, K. Goh, P. Chambers und C. Hulls, „Quantification of the effects of the volume and viscosity of gastric contents on antral and fundic activity in the rat stomach maintained ex vivo“, *Dig Dis Sci*, Bd. 55, pp. 3349-3360, 2010.
- [62] D. v. Loh und K. Golenhofen, „Temperatureinflüsse auf die Spontanaktivität der isolierten Taenia coli vom Meerschweinchen“, *Pflügers Arch*, Bd. 318, pp. 35-50, 1970.
- [63] K. Milenov und K. Golenhofen, „Spontanaktivität isolierter Muskelpräparate aus verschiedenen Abschnitten des Meerschweinchen-Magens“, *Pflügers Arch*, Bd. 312, Nr. 1, pp. R72-73, 1969.

- [64] H. Ozaki, R. J. Stevens, D. P. Blondfield, N. G. Publicover und K. M. Sanders, „Simultaneous measurement of membrane potential, cytosolic calcium and tension in intact smooth muscles,“ *Am J Physiol Cell Physiol*, Bd. 260, Nr. 29, pp. C917-C925, 1991.
- [65] D. H. Sinn, B.-H. Min, E.-J. Ko, J. Y. Lee, J. J. Kim, J. C. Rhee und et al., „Regional differences of the effects of actylcholine in the human gastric circular muscle,“ *Am J Physiol Gastrointest liver physiol*, Bd. 299, Nr. 5, pp. G1198-G1203, 2010.
- [66] S. A. Stricker, V. E. Centonze, S. W. Paddock and G. Schatten, "Confocal microscopy of fertilization-induced calcium dynamics in sea-urchin eggs," *Dev Biol*, vol. 149, no. 2, pp. 370-380, 1992.
- [67] M. Camilleri, J. R. Malagelada, M. L. Brown, G. Becker und A. R. Zinsmeister, „Relation between antral motility and gastric emptying of solid and liquids in humans,“ *Am J Physiol Gastronitest Liver Physiol*, Bd. 249, pp. G580-G585, 1985.
- [68] E. Bülbring, „Correlation between membrane potential, spike discharge and tension in smooth muscle,“ *J Physiol*, Bd. 128, pp. 200-221, 1955.
- [69] K. J. Won, K. M. Sanders und S. M. Ward, „Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach,“ *Proc Natl Acad Sci USA*, Bd. 102, pp. 14913-14918, 2005.
- [70] M. Wienbeck, K. Golenhofen und E. Lammel, „The effects of CO₂ and pH on the spontaneous activity of the taenia coli of guinea-pig,“ *Pflügers Arch*, Bd. 334, pp. 181-192, 1972.
- [71] R. Mitsui und T. Komuro, „Direct and indirect innervation of smooth muscle cells of rat stomach, with special reference to the interstitial cells of Cajal,“ *Cell Tissue Res*, Nr. 309, p. 219–227, 2002.
- [72] W. B. Cannon, „Peristalsis, segmentation and the myenteric reflex,“ *Am J Physiol*, Bd. 30, Nr. 1, p. 114–28, 1912.

- [73] S. M. Ward, A. J. Burns, S. Torihashi und K. M. Sanders, „Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine,“ *J Physiol*, Bd. 480, Nr. 1, pp. 91-97, 1994.
- [74] J. D. Huizinga, L. Thuneberg, M. Kluppel, J. Malysz, H. B. Mikkelsen und A. Bernstein, „W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity,“ *Nature*, Bd. 373, p. 347–349, 1995.
- [75] S. Torihashi, S. M. Ward, S. I. Nishikawa, K. Nishi, S. Kobayashi und K. M. Sanders, „c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract,“ *Cell Tissue Res*, Bd. 280, pp. 97-111, 1995.
- [76] S. M. Ward, A. J. Burns, S. Torihashi, S. C. Harney und K. M. Sanders, „Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants,“ *Am J Physiol*, Bd. 269, p. C1577 – C1585, 1995.
- [77] C. J. Streutker, J. D. Huizinga, D. K. Driman und R. H. Riddell, „Interstitial Cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders,“ *Histopathology*, Bd. 50, Nr. 2, pp. 176-189, 2007.
- [78] C. J. Streutker, J. D. Huizinga, D. K. Driman und R. H. Riddell, „Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part II: ICC and gastrointestinal stromal tumours,“ *Histopathology*, Bd. 50, Nr. 2, pp. 190-202, 2007.
- [79] M. Iino, „Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci,“ *J Gen Physiol*, Bd. 94, pp. 363-383, 1989.
- [80] T. Ordog, S. M. Ward und K. M. Sanders, „Interstitial cells of Cajal generate electrical slow waves in the murine stomach,“ *J Physiol*, Bd. 518, Nr. 1, p. 257–269, 1999.
- [81] S. M. Ward, S. C. Harney, J. R. Bayguinov, G. J. McLaren und K. M. Sanders, „Development of electrical rhythmicity in the murine gastrointestinal tract is specifically encoded in the tunica muscularis,“ *J Physiol*, Bd. 505, Nr. 1, p. 241–258, 1997.

- [82] S. M. Ward, M. F. Brennan, V. M. Jackson und K. M. Sanders, „Role of PI3-kinase in the development of interstitial cells and pacemaking in murine gastrointestinal smooth muscle,“ *J Physiol*, Bd. 516, Nr. 3, pp. 835-46, 1999.
- [83] Y. T. Lee, G. W. Hennig, N. W. Fleming, K. D. Keef, N. J. Spencer und S. M. Ward, „The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of Cajal in human small intestine,“ *Gastroenterol*, Bd. 132, Nr. 5, pp. 1852-1865, 2007.
- [84] G. W. Hennig, G. D. S. Hirst, K. J. Park, C. B. Smith, K. M. Sanders, S. M. Ward und T. K. Smith, „Propagation of pacemaker activity in the guinea-pig antrum,“ *J Physiol*, Bd. 556, Nr. 2, pp. 585-599, 2004.
- [85] J. B. Furness, *The enteric nervous system*, Blackwell Publishing Ltd, 2006.
- [88] E. J. Dickens, F. R. Edwards und G. D. S. Hirst, „Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation of slow waves in mouse stomach,“ *J Physiol*, Bd. 531, Nr. 3, pp. 827-833, 2001.
- [89] G. D. S. Hirst, E. A. H. Beckett, K. M. Sanders und S. M. Ward, „Regional variation in contribution of myenteric and interstitial cells of Cajal to generation of slow waves in mouse gastric antrum,“ *J Physiol*, Bd. 540, Nr. 3, pp. 1003-1012, 2002.
- [90] T. Komoro, „Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization,“ *Microsc Res Tech*, Bd. 47, pp. 267-285, 1999.
- [91] T. Tomita, „Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles,“ pp. 127-156, 1981.
- [92] H. F. Witzos, T. Tandon und A. Ouyang, „Mechanisms mediating cholinergic antral circular smooth muscle contactions in rats,“ *J Gastroenterol*, Bd. 10, pp. 3292-3298, 2004.
- [93] O. Hiroshi, R. J. Stevens, D. P. Blondfield, N. G. Publicover und K. M. Sanders, „Simultaneous measurement of membrane potential, intracellular Ca and tension in intact smooth muscles,“ *Am J Physiol*, Bd. 260, pp. C917-C925, 1991.

[94] J. B. Furness, „Review article: The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies,“ *Neurogastroenterol Motility*, Bd. 20, Nr. Suppl. 1, pp. 32-38, 2008.

[95] J. D. Wood, „Enteric nervous system: reflexes, pattern generators and motility,“ *Current Opinion in Gastroenterology*, Bd. 24, Nr. 2, pp. 149-158, 2008.

Teile dieser Dissertation wurden bereits als Kongressvorträge, Poster und Abstracts veröffentlicht:

A. Kankel, Th. Noack, „Erregung und Erregungskopplung am glatten Muskel des Gastrointestinaltraktes,“ unveröffentlichter Vortrag, XIV. Treffen der Ostsee-Physiologen, Greifswald, 2009.

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*, Bd. 198, Nr. Suppl. 677, 2010.

M. Mertens, A. Kankel, H.-H. Hopp, Th. Noack, „Correlative network analysis in homogeneous and non-homogeneous networks of gastric antrum - new aspects of local blood pressure/flow regulation in the GIT,“ *Trace Elements & Electrolytes*, Bd. 29, Nr. 3, pp 223, 2012.

7 Anhang

7.1 Selbstständigkeitserklärung/

Eidesstattliche Erklärung nach § 4 Abs. 2.5

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Altefähr, den 08.12.2014

Antje Kankel

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Noack bedanken, der es mir ermöglicht hat, die experimentellen Untersuchungen unter seiner Leitung am Oscar Langendorff-Institut für Physiologie der Universität Rostock durchzuführen und mich stets mit wertvollen Anregungen und viel Zuversicht bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt hat.

Besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. Robert Patejdl, dessen gleichsam motivierende wie geduldige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Physiologie, insbesondere bei Herrn Dr. Hans-Heinrich Hopp, Frau Ulrike Mikkat und Frau Katrin Porath. Sie gaben mir stets Hilfestellung bei technischen Fragen und der Präparation.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die vielfältige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.