

Klinik für Anaesthesiologie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

Expression des adulten und fetalen Azetylcholinrezeptors und der Rezeptortyrosinkinase MuSK nach Denervierung und Reinnervation

Alexander Dennis Rudolf Kretschmer

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ. – Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:	1. Priv. – Doz. Dr. H. Fink
	2. Univ. – Prof. Dr. B. Hemmer

Die Dissertation wurde am 01.08.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.09.2013 angenommen.

Handle tissue as you do people...gently and with respect.

(R.M.P. Donaghy)

1	Einleitung	1
1.1	Klinischer Hintergrund.....	1
1.2	Die neuromuskuläre Endplatte	1
1.2.1	Aufbau und neuromuskuläre Übertragung.....	1
1.2.2	Der nikotinische Azetylcholinrezeptor des Skelettmuskels.....	2
1.2.2.1	Der adulte Azetylcholinrezeptor	2
1.2.2.2	Der fetale Azetylcholinrezeptor	3
1.2.3	Die muskelspezifische Kinase MuSK	4
1.3	Das Denervierungs- und Reinnervationsmodell am Zwerchfell.....	5
1.4	Pathophysiologie der Zwerchfelldenervierung	6
2	Zielsetzung	8
3	Material und Methode	9
3.1	Tierexperimente	9
3.1.1	Versuchstiere, Haltungsbedingungen und Akklimatisation.....	9
3.1.2	Anästhesie	9
3.1.3	Phrenikotomie	10
3.1.4	Studienprotokoll.....	10
3.2	Muskelentnahme und histologische Aufarbeitung.....	12
3.3	Färbungen.....	12
3.3.1	Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung.....	12
3.3.2	Myofibrilläre ATPase-Färbung bei pH=4,5.....	13
3.3.3	Immunhistochemische Färbungen.....	13
3.4	Evaluation.....	14
3.4.1	Evaluation der H.E.-Färbung	14
3.4.2	Muskelfasertypisierung mittels ATPase-Färbung.....	15
3.4.3	Evaluation der immunhistochemischen Färbungen	15

3.4.4	Muskelfaserquerschnittsfläche und Bindegewebsbreite	16
3.5	Western Blots	17
3.6	Statistische Auswertung der Ergebnisse	18
4	Ergebnisse	19
4.1	Klinische Beobachtung der Reinnervation.....	19
4.2	Histologische Zeichen der Reinnervation	19
4.3	Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors.....	19
4.3.1	Western Blot.....	20
4.3.2	Immunhistochemie	21
4.4	Expression des adulten Azetylcholinrezeptors.....	25
4.4.1	Western Blot.....	25
4.4.2	Immunhistochemie	26
4.5	Expression von MuSK	29
4.6	Muskelfasertypenzusammensetzung und -querschnittsfläche	32
4.7	Histomorphologie.....	35
5	Diskussion	37
6	Zusammenfassung.....	42
7	Bibliographie.....	44
8	Danksagung.....	48
9	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis:

µm:	Mikrometer
µg	Mikrogramm
acc.:	Accessorius
AChR:	Azetylcholinrezeptor
ATP:	Adenosintriphosphat
ATPase:	Adenosintriphosphatase
BCA:	Bicinchoninsäure
°C	Grad Celsius
Ca:	Kalzium
CIPM:	Critical-illness Polyneuropathie und –Myopathie
cm:	Zentimeter
COPD:	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CSA:	Querschnittsfläche
FI _{iso} :	Inspiratorische Isoflurankonzentration
g:	Gramm
G:	Gauge
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H.E.:	Hämatoxylin-Eosin
Her2:	Human epidermal growth factor receptor 2
IgG	Immunglobulin G
K:	Kalium
kDa:	Tausend Dalton
mg	Milligramm
mm:	Millimeter
MM:	Periphere Muskelmembran
mRNA:	Messenger-Ribonucleinsäure
MuSK:	Muskelspezifische Kinase

Abkürzungsverzeichnis

N:	Normalität
N.:	Nervus
Na:	Natrium
NME:	Neuromuskuläre Endplatte
p:	Probability
rpm:	Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.:	Tabelle
USA:	Vereinigte Staaten von Amerika
V:	Volt
V.:	Vena

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Eine motorische Einheit besteht aus einem Motoneuron und allen davon innervierten Muskelfasern. Jede Schädigung einer motorischen Einheit beeinträchtigt daher die neuromuskuläre Übertragung. Aus anästhesiologischer und intensivmedizinischer Sicht wichtig sind Einflüsse wie Denervierung, Muskelimmobilisation, systemische Inflammationsreaktion und Verbrennungen (Fink 2008, S. 913, Martyn 1992, S. 823). Diesen Zuständen gemeinsam ist, neben Funktionsverlust und Faseratrophie des betroffenen Muskels, eine Dysregulation der Azetylcholinrezeptoren. Zusätzlich zur Expression des adulten Azetylcholinrezeptors kommt es zur Re-Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors. Dieser fetale Azetylcholinrezeptorsubtyp ist nicht auf die neuromuskuläre Endplatte beschränkt, sondern wird an der kompletten Muskelmembran exprimiert. Die qualitative und quantitative Veränderung der Azetylcholinrezeptorexpression ist, aus anästhesiologischer Sicht, ursächlich für die veränderte Pharmakodynamik von Muskelrelaxantien sowie der succinylcholininduzierten Hyperkaliämie mit der Gefahr von malignen Herzrhythmusstörungen (Martyn 2006, S. 158, Turner 2011, S. 292). Die Azetylcholinrezeptordysregulation ist zudem ein möglicher pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der Muskelschwäche während und nach intensivmedizinischer Therapie (Hansen 1998, S. 240, Hughes 1999, S. 636, Martyn 1992, S. 823). Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der Expression des fetalen und adulten Azetylcholinrezeptors nach Denervierung und Reinnervation.

1.2 Die neuromuskuläre Endplatte

1.2.1 Aufbau und neuromuskuläre Übertragung

Die neuromuskuläre Endplatte ist die Schnittstelle zwischen Muskel und Nerv und gliedert sich in präsynaptisches Nervenende, synaptischen Spalt und postsynaptische Membran (s. Abb. 1). Der Nerv synthetisiert den Neurotransmitter Azetylcholin und speichert ihn in Vesikeln in den präsynaptischen Nervenendigungen. Ein Aktionspotential im Nerv führt über die Öffnung spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels (Cohen-Cory 2002, S. 770).

In der Folge werden azetylcholinhaltige Vesikel zur Nervenoberfläche transportiert, verschmelzen mit der Membran und geben das Azetylcholin exozytisch in den synaptischen Spalt frei (Cohen-Cory 2002, S. 770). Die Azetylcholinmoleküle binden an nikotinische Azetylcholinrezeptoren auf der Muskeloberfläche. Entlang des Konzentrationsgradienten kommt es zum Natrium-Einstrom in die Zelle und zur Depolarisation der Endplatte. Das Endplattenpotenzial wird über die gesamte Zellmembran als Summenaktionspotenzial weitergeleitet und bewirkt eine Muskelkontraktion (Cohen-Cory 2002, S. 770). Die hohe Dichte von Azetylcholinrezeptoren entlang der postsynaptischen Membran der neuromuskulären Endplatte führt dazu, dass jeder einzelne Nervenstimulus zu einer postsynaptischen Reizantwort führt. Azetylcholin löst sich nach der Bindung an den Azetylcholinrezeptor wieder und wird innerhalb von Millisekunden durch die Azetylcholinesterase hydrolysiert. Die Spaltprodukte Cholin und Azetat werden zurück in das präsynaptische Endstück aufgenommen (Cohen-Cory 2002, S. 770).

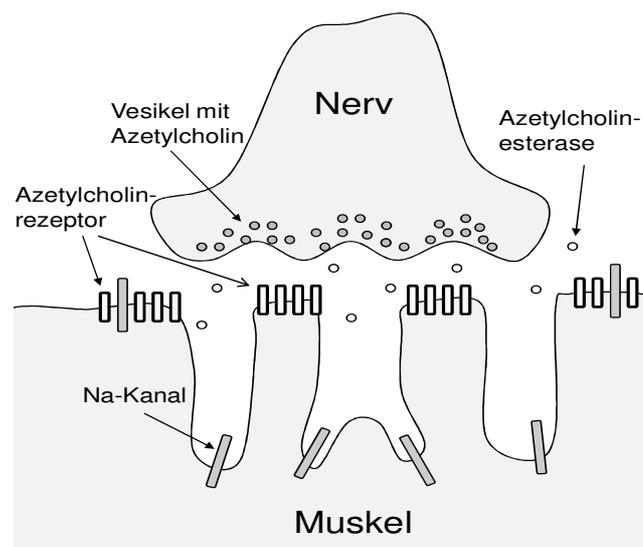


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der neuromuskulären Endplatte beim Erwachsenen (vereinfacht nach Martyn 2009, S. 2).

1.2.2 Der nikotinische Azetylcholinrezeptor des Skelettmuskels

1.2.2.1 Der adulte Azetylcholinrezeptor

Der adulte nikotinische Azetylcholinrezeptor des Skelettmuskels ist ein pentamerischer Ionenkanal, der aus den Untereinheiten α , β , δ und ϵ besteht (Changeux 1992, S. 396). Die Untereinheiten treten im Verhältnis 2:1:1:1 auf, wobei die beiden α -Untereinheiten die Bindungsstellen für Azetylcholin

darstellen (s. Abb. 2) (Dennis 1988, S. 2347). Die Bindung von Azetylcholin induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors und somit eine, eine einzige Millisekunde dauernde, Kanalöffnung. Dies führt, jeweils dem elektrochemischen Gradienten folgend, zu einem Natrium- und Kalzium-Einstrom mit anschließender Membrandepolarisation sowie einem konsekutiven repolarisierenden Kalium-Ausstrom. Im gesunden Muskel des Erwachsenen kommt der adulte Azetylcholinrezeptor nur im Bereich der neuromuskulären Endplatte vor. Hier werden Rezeptordichtewerte von bis zu fünf Millionen Rezeptoren pro Endplatte erreicht (Martyn 2006, S. 161). Die Halbwertszeit des adulten Azetylcholinrezeptors beträgt ungefähr zwei Wochen (Mishina 1986, S. 407).

1.2.2.2 Der fetale Azetylcholinrezeptor

Der fetale Azetylcholinrezeptor wird physiologisch nur während der Embryonalphase sowie pathophysiologisch in Abwesenheit nervaler Einflüsse oder Aktivität exprimiert. Im Gegensatz zum adulten Azetylcholinrezeptor besitzt er anstelle der ϵ - eine γ -Untereinheit (s. Abb. 2) (McCarthy 1986, S. 383). Im Laufe der Embryonalentwicklung und perinatalen Differenzierung der postsynaptischen Membran werden die fetalen Azetylcholinrezeptoren durch den adulten Subtyp ersetzt (Mishina 1986, S. 407). Funktionell hat dieser Subtypenwechsel Einfluss auf die neuromuskuläre Übertragungs- und Reizantwortrate, da sich die fetale und die adulte Isoform des Azetylcholinrezeptors im Hinblick auf Halbwerts- und Kanalöffnungszeit unterscheiden. So beträgt die Halbwertszeit des fetalen Azetylcholinrezeptors weniger als 24 Stunden, die des adulten Azetylcholinrezeptors ungefähr zwei Wochen (Mishina 1986, S. 407, Shyng 1989, S. 649). Die Kanalöffnungszeit des fetalen Azetylcholinrezeptors ist zehn Mal so lang wie die der adulten Isoform bei gleichzeitig erhöhter Ionenleitfähigkeit (Mishina 1986, S. 408). Mäuse, die nicht in der Lage sind, den adulten Azetylcholinrezeptor zu exprimieren (ϵ -knockout-Mäuse), zeigen aufgrund einer verringerten neuromuskulären Transmission phänotypisch eine Muskelschwäche und sterben nach zwei bis drei Monaten an Muskelatrophie (Witzemann 1996, S. 13290).

Der fetale Azetylcholinrezeptor wird nicht nur an der neuromuskulären Endplatte exprimiert, sondern kann sich in pathologischen Situationen wie beispielsweise Denervierung, Muskelimmobilisation, Verbrennung oder systemischer Inflammationsreaktion über die gesamte Muskelmembran ausbreiten.

In diesen Situationen führt die Gabe des depolarisierenden Muskelrelaxanz Succinylcholin zu einer simultanen Aktivierung aller Azetylcholinrezeptoren (Martyn 2006, S. 159). Durch die numerische Zunahme der Azetylcholinrezeptoren sowie der verlängerten Kanalöffnungszeit des fetalen Subtyps führt dies zu einer vermehrten Kaliumausschüttung in den Extrazellulärraum. Dies kann zu pathologischen Hyperkaliämien und in der Folge zu malignen Herzrhythmusstörungen bis hin zum Kammerflimmern führen (Martyn 2006, S. 165). Unklar bei der Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren nach Denervierung sind der zeitliche Verlauf sowie eine mögliche Reversibilität durch Reinnervation.

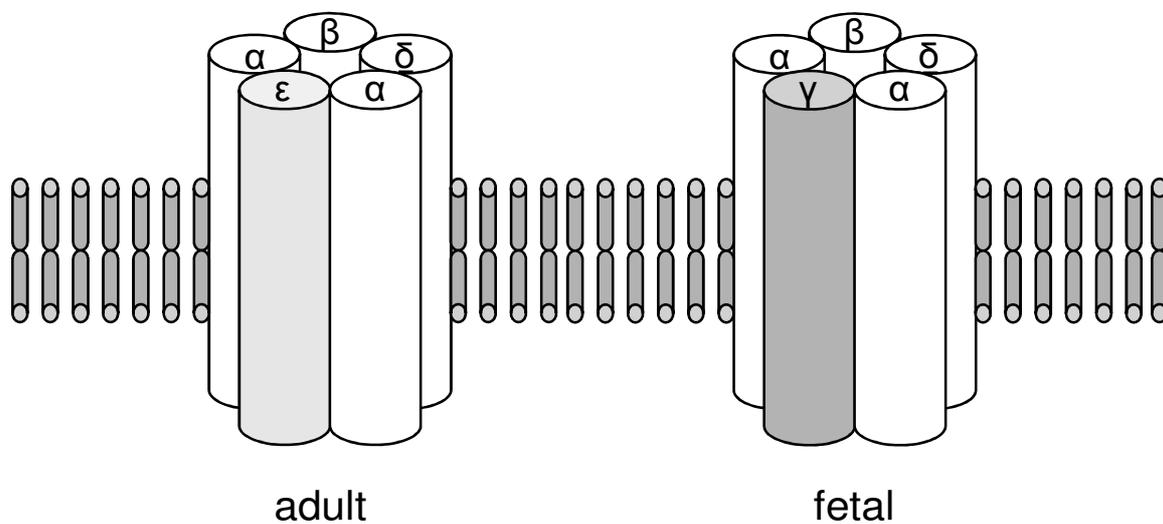


Abbildung 2: Der adulte Azetylcholinrezeptor ist ein Na/K/Ca-Kanal, der aus fünf Untereinheiten (zwei α -Untereinheiten und jeweils einer β -, δ - und ϵ -Untereinheit) besteht. Bei dem fetalen Azetylcholinrezeptor ist die ϵ -Untereinheit durch eine γ -Untereinheit ersetzt. Die Untereinheiten sind jeweils um einen zentralen Ionenkanal angeordnet (Na = Natrium, K = Kalium, Ca = Kalzium).

1.2.3 Die muskelspezifische Kinase MuSK

An der neuromuskulären Endplatte findet man Azetylcholinrezeptoren in 1000-fach höherer Konzentration verglichen mit der peripheren Muskelmembran (Fertuck 1976, S. 153). Dafür verantwortlich ist die muskelspezifische Rezeptortyrosinkinase MuSK (muscle specific kinase), die für die Bündelung der Azetylcholinrezeptor-Untereinheiten zu einem pentamerischen Rezeptor sowie die Aggregation der Azetylcholinrezeptoren im Bereich der neuromuskulären Endplatte sorgt (Valenzuela 1995, S. 574). MuSK ist ein transmembranöses Protein, das aus vier extrazellulären Immunglobulin-Domänen, einer cysteinreichen Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne besteht (s. Abb. 3) (Strochlic 2005, S. 1130).

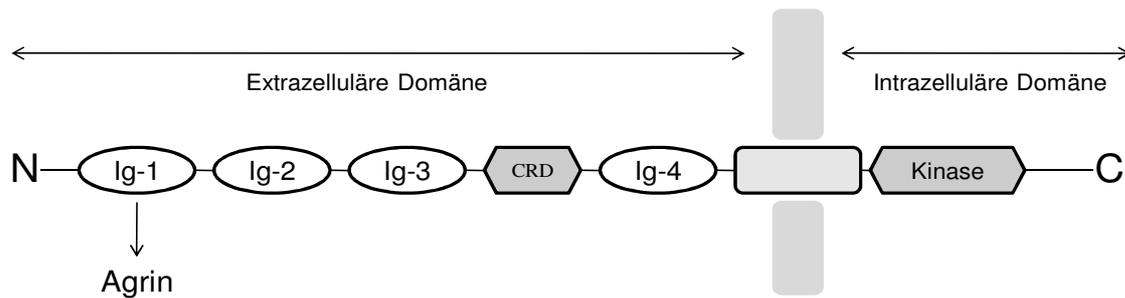


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Rezeptortyrosinkinase MuSK. Der extrazelluläre Anteil des Proteins besteht aus vier Immunglobulin-Domänen (Ig-1-4) sowie einer cysteinreichen Domäne (CRD). Ig-1 fungiert als Bindungsstelle für Agrin. Die intrazelluläre Domäne beinhaltet die Tyrosinkinase (vereinfacht nach Strochlic 2005, S. 1130).

Eine starke Expression von MuSK findet sich physiologischerweise in frühen embryonalen Myotomen sowie während der embryonalen Muskelentwicklung. Bei dem gesunden Erwachsenen ist MuSK mit dem adulten Azetylcholinrezeptor an der neuromuskulären Endplatte kolokalisiert (Valenzuela 1995, S. 574). MuSK wird durch neural sezerniertes Agrin aktiviert (Glass 1996, S. 514, Hopf 1996, S. 5234, McMahan 1990, S. 407).

Bei der Pathogenese der Myasthenia gravis ist MuSK ebenfalls beteiligt: Bei bis zu 70% der Patienten mit Myasthenia gravis, bei denen sich keine Autoantikörper gegen den Azetylcholinrezeptor nachweisen ließen, konnten Serumautoantikörper gegen MuSK gefunden werden (Hoch 2001, S. 367).

1.3 Das Denervierungs- und Reinnervationsmodell am Zwerchfell

Das Zwerchfell ist der physiologische Hauptatemmuskel. Die motorische Versorgung des Zwerchfells erfolgt durch den Nervus phrenikus, der aus den Rückenmarkssegmenten C3 bis C5 entspringt. Eine zusätzliche Innervation der dorsalen Zwerchfellareale erfolgt durch den akzessorischen Phrenikusnerven (Gottschall 1977, S. 63). Der akzessorische Phrenikusnerv der Ratte hat eine Inzidenz von 80%, nimmt seinen Ursprung im Rückenmarkssegment C6 und lagert sich unterhalb der ersten Rippe dem Nervus phrenikus an (s. Abb. 4) (Gottschall 1977, S. 64). Beim Menschen tritt der akzessorische Phrenikusnerv mit einer Häufigkeit von 53 bis 61% auf und lagert sich meist ebenfalls dem Nervus phrenikus unterhalb der ersten Rippe an (Kelley 1950, S. 924, Loukas 2006, S. 1871).

Ursprung, Verlauf und Beziehung zum Nervus phrenikus können beim Menschen stark variieren (Loukas 2006, S. 1871, Nayak 2008, S. 181).

Die dorsalen Zwerchfellareale werden darüber hinaus vom Nervus vagus mitversorgt (Young 2010, S. 1093). Der Vagusnerv verläuft extrakraniell zunächst gemeinsam mit den großen Halsgefäßen und tritt zusammen mit dem Ösophagus durch das Zwerchfell (s. Abb. 4).

Aufgrund der motorischen Mehrfachinnervation besitzt das Zwerchfell somit ein hohes Reinnervationspotenzial nach zervikaler Phrenikotomie.

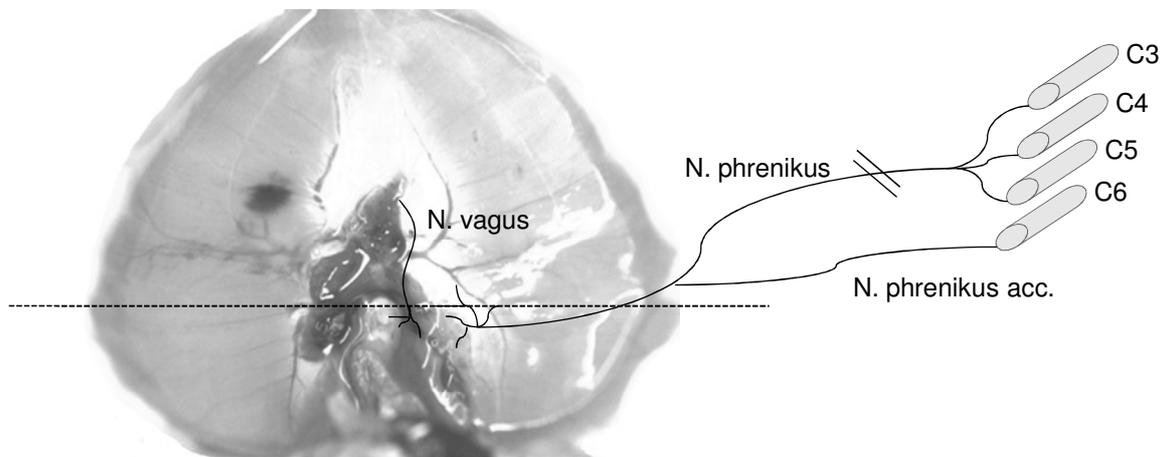


Abbildung 4: Schematische Innervationsverhältnisse am Zwerchfell der Ratte: Die gestrichelte Linie markiert die ungefähre Trennungslinie zwischen den dorsalen Arealen, die vom akzessorischen Phrenikus- und Vagusnerven mitversorgt werden, und den ventralen Arealen, die nur vom Nervus phrenikus versorgt werden. Die doppelte Linie symbolisiert den Ort der zervikalen Phrenikotomie, wie in diesem Versuch durchgeführt (N. = Nervus, acc. = accessorius).

1.4 Pathophysiologie der Zwerchfelldenervierung

Eine Schädigung des Nervus phrenikus induziert beim Menschen sowie bei der Ratte eine annähernd komplette Paralyse der korrespondierenden Zwerchfellhälfte unter Aussparung der motorisch mehrfachinnervierten dorsalen Zwerchfellareale. Die unilaterale Zwerchfelllähmung kann asymptomatisch verlaufen, jedoch können bei Patienten mit eingeschränkter Atemfunktion auch Symptome wie Schmerz, Hustenreiz, Dyspnoe und Orthopnoe mit respiratorischer Insuffizienz auftreten (Iverson 1976, S. 264, McCaul 2001, S. 187). Zusätzlich können aufgrund des einseitigen Zwerchfellhochstandes gastroenterale und kardiale Symptome beobachtet werden (Iverson 1976, S. 264).

Eine Denervierung des Zwerchfells durch Schädigung des Nervus phrenikus kann unter anderem iatrogen nach Operationen im Brust-/Halsbereich oder, aus anästhesiologischer Sicht bedeutsam, im Rahmen einer Plexus-brachialis-Anästhesie auftreten (Deng 2003, S. 459, McCaul 2001, S. 187, Robaux 2001, S. 1520). Auch (geburts-) traumatische Läsionen des Nervus phrenikus und Schädigungen im Rahmen von Tumorerkrankungen sind möglich (Bell 2000, S. 419, Elefteriades 2008, S. 289, Merino-Ramirez 2007, S. 267). Darüber hinaus verhält sich auch ein immobilisiertes Zwerchfell, wie es bei langzeitbeatmeten Patienten auf Intensivstationen der Fall ist, als ob es denerviert wäre (Martyn 2006, S. 159).

Die Zwerchfelldenervierung und -immobilisation geht neben der Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren mit zahlreichen weiteren zellstrukturellen, histochemischen und metabolischen Veränderungen einher: Eine messbare Muskelfaseratrophie, vornehmlich der schnellen Typ-2b/x-Fasern, kann bereits nach 18 Stunden maschineller Beatmung beobachtet werden und ist das Resultat eines gesteigerten Proteinabbaus sowie einer verringerten Proteinsynthese in den betroffenen Muskelfasern (Miyata 1995, S. 1646, Shanely 2002, S. 1370, Shindoh 1994, S. 296, Zhan 1997, S. 1147). Die verstärkte intrazelluläre Proteolyse über das Ubiquitin-Proteasom-System wirkt sich funktionell auf Kraftentwicklung und Kontraktilität des denervierten Muskels aus (Argadine 2009, S. 438, Geiger 2001, S. 1199, Shindoh 1994, S. 295, Tawa 1997, S. 198). Nach Denervierung werden Gene der Stressantwort und des Nukleinsäuremetabolismus vermehrt exprimiert, während die Expression der Gene für die Zellstrukturproteine der Muskelfasern sinkt (DeRuisseau 2005, S. 1316). Des Weiteren kann eine Steigerung des oxidativen Stresses mit Zunahme des Glutathion-Serumspiegels sowie eine vermehrte Aktivität des Apoptose-Markers Caspase-3 gemessen werden (Bernard 2003, S. 114, Levine 2008, S. 1327, Shanely 2002, S. 1371). Funktionell verhält sich dabei die Anzahl der geschädigten Myofibrillen umgekehrt proportional zur Kraftentwicklung des Zwerchfellmuskels (Hermans 2010, S. 127, Jaber 2010, S. 366, Sassoon 2002, S. 2589). Die verminderte Kraftentwicklung des Zwerchfells kann sich klinisch beispielsweise durch eine verlängerte Entwöhnungsphase von der maschinellen Beatmung auswirken (Gayan-Ramirez 2002, S. 1579).

2 Zielsetzung

Im Rahmen zahlreicher klinischer Pathologien wie Denervierung, Muskelimmobilisation, Verbrennung oder systemischer Inflammationsreaktion kommt es zur Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren. Unklar in diesem Zusammenhang und damit Zielsetzung dieser Arbeit ist:

- Der zeitliche Verlauf der Azetylcholinrezeptorsubtypen- und MuSK-Expression nach Denervierung.
- Die Möglichkeit der Reversierung der Azetylcholinrezeptordysregulation durch Reinnervation.

3 Material und Methode

3.1 Tierexperimente

3.1.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen und Akklimatisation

Der Versuch wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-115-08).

In den Versuchen wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten der Firma Charles River (Sulzfeld) mit einem präoperativen Gewicht von 300 – 350g eingesetzt. Die Tiere wurden im Alter von circa sieben Wochen angeliefert und nach einer Woche Adaption in den Versuch eingeschleust.

Die Tiere wurden in einem voll klimatisierten Raum mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Raumtemperatur, Lichtintensität, Luftwechsel und -feuchtigkeit wurden dabei täglich überwacht und konstant gehalten. Futter (Altromin-Haltung 1324, Fa. Altromin, Lage) und Wasser in Trinkflaschen wurden den Tieren in ausreichender Menge ad libitum angeboten.

3.1.2 Anästhesie

Die Narkose der Tiere wurde durch Inhalation von Isofluran (Fa. Dräger, München) in einer Plexiglasbox eingeleitet. Sobald die anästhesierten Tiere das Toleranzstadium erreichten, wurden sie unter Spontanatmung mit einer Venenverweilkanüle (Cavafix Certo 1,5×2,0 mm/16G, 5cm, Fa. Braun, Melsungen) endotracheal intubiert. Die Tiere wurden maschinell, volumenkontrolliert, unter Verwendung eines halboffenen Systems (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Apparatus Inc., South Natick, USA) mit einer Frischgaszufuhr von etwa einem Liter pro Minute beatmet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte inhalativ mit Isofluran (FI_{Iso} -Konzentration: 2,0 Vol%). Zur intraoperativen Analgesie wurden 15µg Fentanyl (Fa. Janssen –Cilag, Neuss) intravenös in die V. dorsalis penis injiziert. Die postoperative Analgesie wurde durch 50mg Metamizol (Fa. Ratiopharm, Ulm) per os gewährleistet. Mit Hilfe eines Atemgasmonitors (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) wurden die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO₂, O₂, und Isofluran sowie die Atemfrequenz und der Beatmungsdruck überwacht und gegebenenfalls angepasst.

3.1.3 Phrenikotomie

Der Nervus phrenikus der Versuchstiere wurde unilateral im zervikalen Verlauf unter Narkose operativ freigelegt und ein circa 20mm langes Teilstück entfernt. Zur Verhinderung einer direkten Reinnervation wurden sowohl das proximale als auch das distale Ende der Entnahmestelle elektrokauterisiert. Der akzessorische Phrenikus- und der Vagusnerv wurden dabei unversehrt belassen. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden die Versuchstiere am ersten, dritten, neunten, 27. oder 81. postoperativen Tag euthanasiert und beide Zwerchfellhälften zur Analyse entnommen (s. Abb. 5). Die kontralaterale (= nicht-denervierte) Zwerchfellhälfte diente als Kontrollgruppe. Da aufgrund von früheren mRNA-Expressionsstudien die deutlichsten Veränderungen in der Expression der Azetylcholinrezeptoren an Tag 9 erwartet wurden und zusätzlich der systemische operative Einfluss auf die Azetylcholinrezeptor-Dysregulation untersucht werden sollte, wurde eine Scheinoperationsgruppe zu diesem Zeitpunkt hinzugenommen (Witzemann 1991, S. 127). Die Tiere dieser Gruppe wurden lediglich einer sogenannten Scheinoperation unterzogen, bei der der Phrenikusnerv zervikal freigelegt, jedoch nicht durchtrennt wurde.

3.1.4 Studienprotokoll

Durch die Phrenikotomie, Scheinoperation sowie Expressionsanalyse entsteht folgendes Studienprotokoll (s. Abb. 5): Die Operation (Phrenikotomie oder Scheinoperation) wurde an Tag 0 durchgeführt. Am entsprechenden postoperativen Tag (1, 3, 9, 27, 81) wurden beide Zwerchfellhälften entnommen und hinsichtlich der Expression des fetalen und adulten Azetylcholinrezeptorsubtyps und der Rezeptortyrosinkinase MuSK untersucht. Dafür wurden die entnommenen Zwerchfellhälften gemäß der anatomischen Verhältnisse in einen ventralen, einen zentralen sowie einen dorsalen Abschnitt unterteilt (s. Abb. 6). Zusätzlich wurden die Muskeln auf histopathologische Veränderungen analysiert.

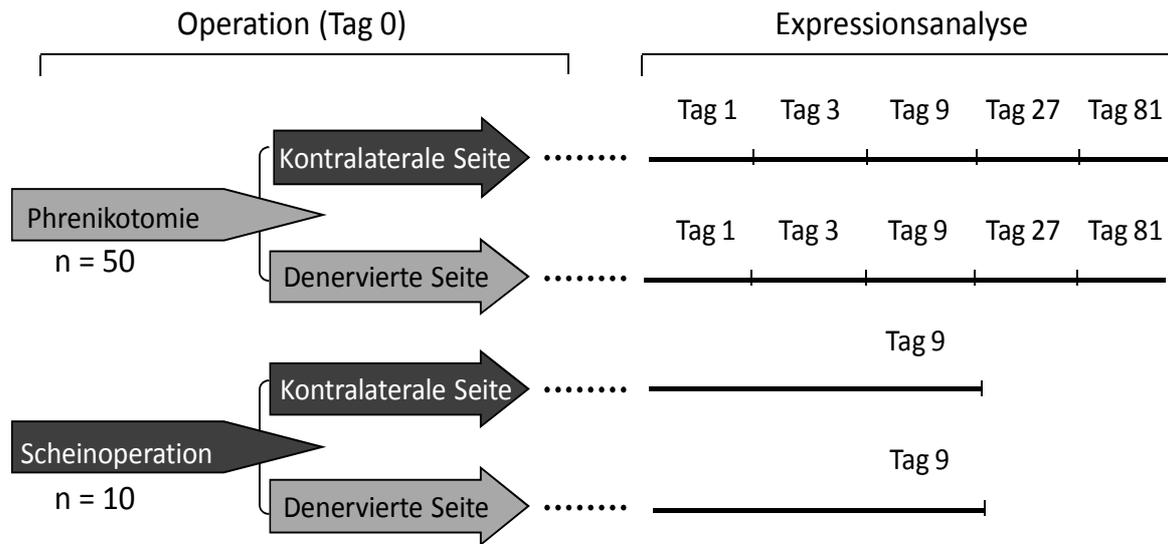


Abbildung 5: Der Versuch umfasste 60 Sprague-Dawley-Ratten. Die Zwerchfellhälften wurden zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Als Kontrolle für die nach neun Tagen euthanasierten Versuchstiere dienten zusätzliche zehn Tiere, die unter sonst identischen Bedingungen einer Scheinoperation unterzogen wurden.

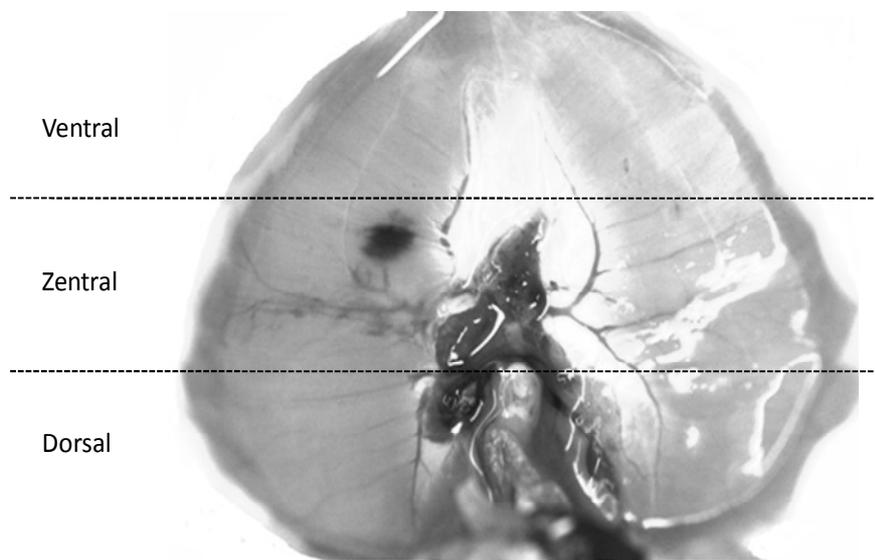


Abbildung 6: Schematische Einteilung des entnommenen Zwerchfells in einen dorsalen, zentralen sowie ventralen Anteil entsprechend der anatomischen Verhältnisse.

3.2 Muskelentnahme und histologische Aufarbeitung

Die Muskelentnahme fand je nach Gruppenzugehörigkeit am ersten, dritten, neunten, 27. oder 81. postoperativen Tag statt. Dabei wurden die Versuchstiere zunächst in der Einleitungsglasbox durch Isofluraninhalation anästhesiert und mittels 15µg Fentanyl intravenös analgesiert. Es wurde eine Querlaparotomie durchgeführt und das Kontraktionsverhalten beider Zwerchfellhälften unter Spontanatmung klinisch beurteilt. Die Versuchstiere wurden im Anschluss durch Entbluten unter Narkose euthanasiert, beide Zwerchfellhälften entnommen, für die histologische Aufarbeitung auf einer Korkplatte aufgespannt und in Isopentan (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) bei -50°C gefroren. An einem Kryotom (Microtom-Kryostat HM500QM, Fa. Microtom, Walldorf) wurden 10µm dicke serielle Gefrierschnitte angefertigt. Die Präparate für die Western Blots wurden direkt in Flüssigstickstoff gefroren.

3.3 Färbungen

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung

Von jedem Zwerchfell wurde für die histomorphologische Auswertung eine H.E.-Färbung angefertigt. Dabei wurden die Muskelpräparate zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%; Fa. Merck, Darmstadt) für jeweils zehn Minuten rehydriert. Nach Spülen in Aqua dest. (Fa. Delta-Select, Pfullingen) erfolgte die zehnmünütige Kernfärbung mittels sauren Hämalauns nach Mayer (Hausapotheke Klinikum rechts der Isar, München). Die Gegenfärbung des azidophilen Zytoplasmas wurde durch 30-sekündige Inkubation in 4%-iger Eosinlösung (Hausapotheke Klinikum rechts der Isar, München) erreicht. Nach erfolgtem Spülen mit Aqua dest. wurden die Zwerchfellschnitte in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) für jeweils zwei Minuten dehydriert, dann für fünf Minuten in Xylol (Fa. Roth, Karlsruhe) überführt und schließlich mit Roti-Eukitt® (Fa. Roth, Karlsruhe) eingedeckt.

3.3.2 Myofibrilläre ATPase-Färbung bei pH=4,5

Die myofibrillären ATPase-Färbungen dienen der Differenzierung der verschiedenen Muskelfasertypen (1-, 2a, 2b/x-Fasern). Die Gefrierschnitte wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur in die Präinkubationslösung getaucht. Für die ATPase-Färbung mit saurer Vorinkubation wurde der pH-Wert der Präinkubationslösung, bestehend aus Barbitolacetatlösung [0,97g Natriumacetat-Trihydrat (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) auf 50ml 2% Natriumbarbitalsäure (Hausapotheke Klinikum rechts der Isar, München)], 0,1N Salzsäure (Fa. Merck, Darmstadt) und Aqua dest. auf 4,5 eingestellt. Anschließend wurden die Objektträger in die Hauptinkubationslösung [2% Natriumbarbitalsäure, 2% Calciumchloridlösung (Fa. Merck, Darmstadt), Aqua dest., Adenosintriphosphat (Fa. Roche, Mannheim; 300mg auf 200ml); pH=9,4] getaucht und darin für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden sie wiederholt mit 1% Calciumchloridlösung gespült und für drei Minuten in 2% Cobalt-II-Chloridlösung (Hausapotheke, Klinikum rechts der Isar, München) getaucht. Die Schnitte wurden durch Spülen in Aqua dest. von Überständen der Cobalt-II-Chloridlösung gereinigt und anschließend für neun Sekunden in 1% Ammoniumsulfidlösung (Fa. Merck, Darmstadt) bei Raumtemperatur geschwärzt. Die Präparate wurden im Folgenden erneut mit Aqua dest. gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils zwei Minuten dehydriert. Zuletzt wurden die Objektträger für fünf Minuten in Xylol überführt und mit Roti-Eukitt® eingedeckt.

3.3.3 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemische Detektion der fetalen und adulten Azetylcholinrezeptoren sowie der Rezeptortyrosinkinase MuSK wurde eine standardisierte Avidin-Biotin-Komplexmethode verwendet. Die Gefrierschnitte wurden zunächst für zehn Minuten in 4% Paraformaldehyd (Fa. Merck, Darmstadt) fixiert und mit Leitungswasser gespült. Zur Blockade der endogenen Peroxidasen wurden die Objektträger für 15 Minuten in eine 3% Wasserstoffperoxid/Methanol-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) getaucht. Nach Spülung mit Leitungswasser und Fettstiftmarkierung wurden die Objektträger in 0,03% Triton-X100/Aqua dest.-Lösung (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz) getaucht und zur Minimierung unspezifischer Proteinbindungen für eine Stunde mit DAKO Serum-free Protein Block® (Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Es folgte die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper (fetal: sc-1453; adult: sc-1455; MuSK: sc-6009; Fa. Santa-Cruz Antibodies,

Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:200 (sc-1455 und sc-6009) beziehungsweise 1:500 (sc-1453) bei Raumtemperatur. Im Folgenden wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (horse, anti-goat; BA-9500, Fa. Vector, Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:200 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden gespült und für 30 Minuten mit einer Lösung aus Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplexen (Vectastain ABC Kit, Fa. Vector, Burlingame, USA) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Anfärbung erfolgte mit dem Diaminobenzidin-Substrat-Chromogen-System (DAB-System, Fa. Vector, Burlingame, USA) für eine Minute bei Raumtemperatur. Hierbei wird das Diaminobenzidin durch die beigefügte Meerrettich-Peroxidase oxidiert und somit braun angefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mittels zehnmütiger Inkubation in Hämalaun. Anschließend wurden die Zwerchfellschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (60%, 70%, 96%, 100%) dehydriert, in Xylol überführt und mit Roti-Eukitt® bedeckt.

Als Negativkontrolle wurde der Primärantikörper ausgespart. Als Positivkontrolle für den fetalen Azetylcholinrezeptor dienten stark angefärbte Myoblasten in Rattenfetuspriparaten, als Positivkontrolle für den adulten Azetylcholinrezeptor sowie MuSK dienten angefärbte Hippocampusneurone.

3.4 Evaluation

3.4.1 Evaluation der H.E.-Färbung

Die histomorphologische Auswertung wurde lichtmikroskopisch (Axiolab, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) durchgeführt und umfasste:

- Periphere Sarkolemmkerne [Anzahl/Gesichtsfeld; 400x Vergrößerung]
- Muskelfaseratrophien [Anzahl/Gesichtsfeld; 400x Vergrößerung]
- Muskelfasernekrosen [Anzahl/Gesichtsfeld; 400x Vergrößerung]
- Kernhaufen [Anzahl/Gesichtsfeld; 400x Vergrößerung]
- Zentrale Kerne [Anzahl/Gesichtsfeld; 400x Vergrößerung]

Dabei wurden die ventralen, zentralen sowie dorsalen Zwerchfellareale getrennt voneinander evaluiert.

3.4.2 Muskelfasertypisierung mittels ATPase-Färbung

In jeweils drei Gesichtsfeldern der ventralen, zentralen und dorsalen Zwerchfellanteile wurden alle Muskelfasern addiert und anhand des unterschiedlichen Färbemusters bei einem pH-Wert von 4,5 zwischen Typ-1-Fasern (dunkel), -2a-Fasern (hell) und -2b/x-Fasern (intermediär) unterschieden (s. Abb. 7). Aus den erhobenen Daten wurde der Mittelwert gebildet und die einzelnen Fasertypen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Zusätzlich wurde das Auftreten von Muskelfasertypengruppierungen untersucht.

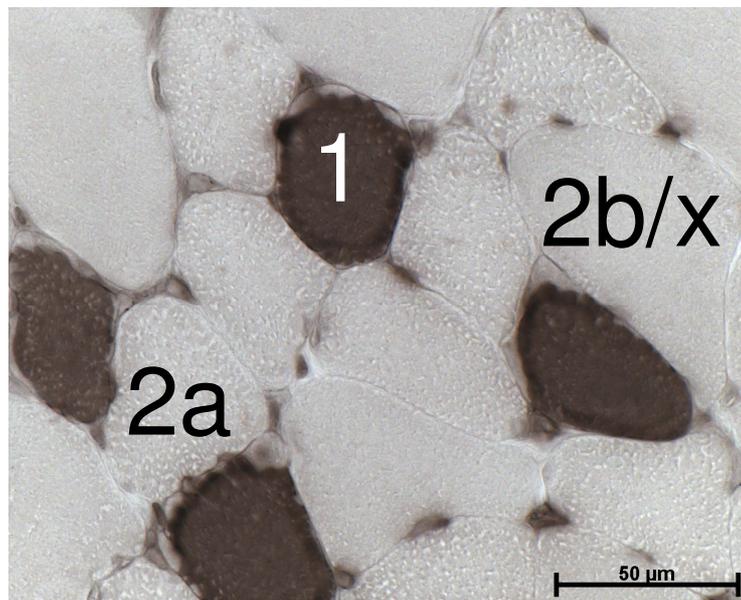


Abbildung 7: Myofibrilläre ATPase-Färbung bei einem pH-Wert von 4,5: Die Typ-1-Muskelfasern sind dunkel angefärbt, die Typ-2a-Fasern hell, die Typ-2b/x-Fasern intermediär.

3.4.3 Evaluation der immunhistochemischen Färbungen

Die Evaluation der adulten und fetalen Azetylcholinrezeptor- sowie MuSK-Expression erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Saida Zoubaa (Institut für Pathologie und pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar, München). In Anlehnung an den in der Brustkrebsdiagnostik etablierten Her2-Score wurden zwei immunhistochemische (IHC-) Scores zur differenzierten Evaluation der Expression an neuromuskulärer Endplatte und peripherer Muskelmembran erstellt (Wolff 2007, S. 21). Bei den Präparaten wurden semiquantitativ sowohl Färbeintensität als auch -verteilung getrennt an neuromuskulärer Endplatte und peripherer Muskelmembran unter dem Lichtmikroskop bei einer 200x

Vergrößerung verblindet evaluiert (s. Tab. 1 und 2). Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte dabei separat an den ventralen, zentralen sowie dorsalen Zwerchfellarealen.

IHC-Score	Färbebild
0	Keine Färbung erkennbar bzw. Membranfärbung bei weniger als 10% der Muskelzellen.
1	Eine geringfügige Membranfärbung ist bei mehr als 10% der Muskelzellen erkennbar. Die Zellmembranen sind nur partiell angefärbt.
2	Eine schwache bis mäßige Färbung der kompletten Membran wird bei mehr als 10% der Muskelzellen beobachtet.
3	Eine starke Anfärbung der kompletten Membran wird bei mehr als 10% der Muskelzellen beobachtet.

Tabelle 1: IHC-Score zur Evaluation der Färbeintensität an der peripheren Muskelmembran.

IHC-Score	Färbebild
0	Keine NME erkennbar, oder NME ganz schwach angefärbt.
1	Vereinzelte Anfärbung der NME: Bei 200x Vergrößerung in drei Gesichtsfeldern an insgesamt einer Position NME angefärbt.
2	Mäßige Anfärbung der NME: Bei 200x Vergrößerung in drei Gesichtsfeldern an höchstens 3 Positionen NME angefärbt.
3	Starke Anfärbung der NME: Bei 200x Vergrößerung in drei Gesichtsfeldern an mehr als fünf Positionen NME angefärbt.

Tabelle 2: IHC-Score zur Evaluation der Färbeintensität an der neuromuskulären Endplatte (NME).

3.4.4 Muskelfaserquerschnittsfläche und Bindegewebsbreite

Die Evaluation der Muskelfaserquerschnittsfläche (cross sectional area, CSA) sowie der endomysialen Bindegewebsbreite erfolgte bei einer Vergrößerung von 200x für die CSA und bei 400x für die Bindegewebsbreite. Für die CSA wurden ATPase-gefärbte, für die Bindegewebsbreite H.E.-Schnitte ausgewertet. Dabei wurde ein digitales Bild erstellt (AxioCam, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) und die Fläche sowie Breite mit einem Computerprogramm (AxioVision 3.1, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) berechnet. Zur Bestimmung der CSA wurde der Faserdurchmesser von jeweils zehn Typ-1-, -2a- und -2b/x-Fasern der ventralen, zentralen sowie dorsalen Zwerchfellareale gemessen. Zusätzlich wurde die

CSA-Ratio, entsprechend dem prozentualen Anteil jedes Fasertyps am Gesamtmuskelquerschnitt, anhand folgender Formel ermittelt:

$$CSA-R_i = \frac{CSA_i \times n_i}{\sum(CSA_i \times n_i)} \times 100$$

(CSA-R_i = CSA-Ratio des jeweiligen Muskelfasertyps (1, 2a, 2b/x), CSA_i = Mittelwert der Querschnittsfläche des jeweiligen Muskelfasertyps, n_i = Mittelwert der Anzahl pro Gesichtsfeld des jeweiligen Muskelfasertyps).

Zur Bestimmung der Bindegewebsbreite wurden jeweils 20 endomyotale Spalträume der ventralen, zentralen sowie dorsalen Zwerchfellareale bei einer 400x Vergrößerung gemessen und gemittelt.

3.5 Western Blots

Mittels eines Zerkleinerungskits (PlusOne Sample Grinding Kit, Fa. GE Healthcare, Chalfont St Giles, England) wurde das Gewebe homogenisiert und im Anschluss die Proteine extrahiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels der Bicinchoninsäure- (BCA-) Methode von Pierce (BCA Protein Assay Kit, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. 50µg Protein wurden bei 99°C für fünf Minuten im Schüttelheizblock denaturiert, abgekühlt und bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert. Die Proteine wurden auf vorgefertigte SDS-PAGE- (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese-) Gele (Nu-Page Fertiggele, Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA) geladen und bei 120V für zwei Stunden separiert. Die separierten Proteine wurden bei 100V über zwei Stunden auf eine Nitrocellulosemembran (Fa. GE Healthcare, Chalfont St Giles, England) transferiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (fetal: sc-1453; adult: sc-1455; 1:200) erfolgte über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurden die Membranen mit einer T-TBS-Lösung [24,2g Trizma Base (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), 80,2g NaCl (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim); pH=7,6] gewaschen. Im Anschluss wurden die Membranen eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (sc-2020, IgG horse, anti-goat; 1:5000, Fa. Santa-Cruz Antibodies, Heidelberg) bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Schwärzung

zu erzielen wurden die Membranen für fünf Minuten in West-Pico-Lösung[®] (Super Signal West-Pico, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gelegt. Die Western Blots wurden schließlich auf einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm; Fa. GE Healthcare, Chalfont St Giles, England) entwickelt (SRX101A „Cat“, Fa. Konica Minolta, Unterföhring).

Die quantitative Auswertung der Filme erfolgte densitometrisch mit Hilfe eines Computerprogramms (Scion Image for Windows, Fa. Scion Corporation, Maryland, USA). Die Ergebnisse wurden gegenüber dem Mittelwert der kontralateralen Zwerchfellhälfte sowie einem GAPDH- (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-) Blot normalisiert.

3.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS 11.0 für Windows (Fa. SPSS Inc., Chicago, USA). Die Effekte von Denervierung und Reinnervation wurden mittels Mann-Whitney-U- und χ^2 -Test ausgewertet. Zur Abschätzung der Effekte innerhalb der jeweiligen Gruppe, also dem Vergleich zwischen dorsalen, zentralen und ventralen Arealen des jeweiligen Hemidiaphragmas, wurde ein Wilcoxon-Test durchgeführt. Das statistische Signifikanzniveau betrug 95% ($p < 0,05$) (Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche).

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Beobachtung der Reinnervation

Die zervikal phrenikotomierten Tiere an Tag 1, 3 und 9 zeigten bei der präterminal durchgeführten Querlaparotomie eine annähernd komplette Hemiparese des Diaphragmas. Dabei kontrahierten lediglich die vom akzessorischen Phrenikus- sowie Vagusnerven versorgten dorsalen Anteile des hinteren Zwerchfelldrittels. An der nicht-denervierten Seite zeigten sich atemsynchrone, rhythmische Kontraktionen des kompletten Hemidiaphragmas. Nach 27-tägiger Denervierung konnten bereits Kontraktionen der gesamten dorsalen Zwerchfellareale beobachtet werden. Diese Bewegungen verstärkten sich bei den Tieren an Tag 81 und waren zu diesem Zeitpunkt zusätzlich in den zentralen Anteilen der denervierten Zwerchfellhälfte zu beobachten. Die nicht-denervierten Zwerchfellhälften und die Zwerchfelle der scheinoperierten Tiere zeigten keine Paresen.

4.2 Histologische Zeichen der Reinnervation

Muskelfasertypengruppierungen sind ein histologischer Parameter für eine Reinnervation (Kugelberg 1970, S. 320). Bis einschließlich Tag 9 konnten in den ATPase-Färbungen keine Muskelfasertypengruppierungen beobachtet werden. Bei den Tieren an Tag 27 zeigten sich im dorsalen Bereich des denervierten Hemidiaphragmas bereits bei 40% der Tiere Muskelfasertypengruppierungen der Typ-1-, -2a- und -2b/x-Fasern. An Tag 81 waren bei 80% der Tiere Muskelfasertypengruppierungen in den dorsalen und zentralen Arealen des Zwerchfells nachzuweisen. Die nicht-denervierten Zwerchfellhälften und die Zwerchfelle der scheinoperierten Tiere wiesen zu keinem Zeitpunkt Muskelfasertypengruppierungen auf.

4.3 Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors

Die Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors bei den scheinoperierten Tieren unterschied sich an Tag 9 nicht von den kontralateralen, nicht-denervierten Zwerchfellhälften der operierten Tiere. Daher

wird im Folgenden auf eine dezidierte Darstellung der Ergebnisse der scheinoperierten Tiere verzichtet.

4.3.1 Western Blot

Die Western Blot Analyse zeigte auf der nicht-denervierten Zwerchfellhälfte keine Veränderungen des fetalen Azetylcholinrezeptors (s. Abb. 8).

In der denervierten Zwerchfellhälfte war drei Tage nach Phrenikotomie erstmalig eine signifikante Hochregulation der fetalen Azetylcholinrezeptoren zu beobachten (Denerviert: $16,8 \pm 4,7$; Nicht-denerviert: $1,0 \pm 0,5$; $p < 0,05$; willkürliche Einheiten) (s. Abb. 8). Am neunten postoperativen Tag erreichte die Hochregulation ihre maximale Ausprägung (Denerviert: $144,6 \pm 178,7$; Nicht-denerviert: $0,8 \pm 0,5$; $p < 0,05$; willkürliche Einheiten) (s. Abb. 8 und 9). Die Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors sank nach 27 Tagen, blieb jedoch weiterhin signifikant im Vergleich zur nicht-denervierten Gegenseite erhöht (Denerviert: $5,3 \pm 1,1$; Nicht-denerviert: $1,0 \pm 0,4$; $p < 0,05$; willkürliche Einheiten) (s. Abb. 8). Sie normalisierte sich im Zuge der Reinnervation, so dass 81 Tage nach Denervierung keine Hochregulation mehr beobachtet werden konnte (s. Abb. 8).

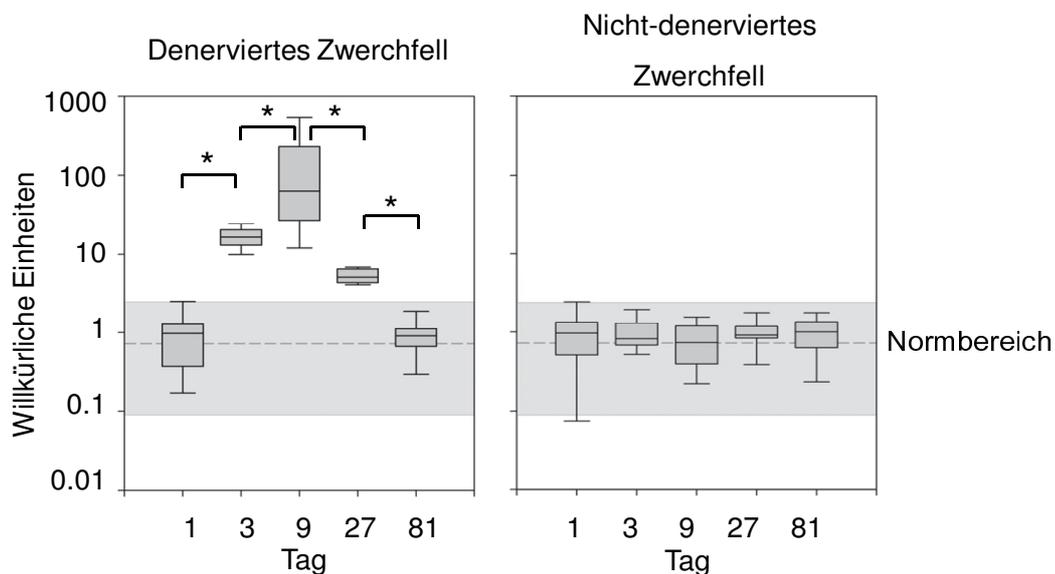


Abbildung 8: Western Blot Analyse des fetalen Azetylcholinrezeptors: Signifikante Hochregulation nach Denervierung mit anschließender Normalisierung bei Reinnervation (*: $p < 0,05$ vs. benachbarte Gruppe; Normbereich: Durchschnittswert ± 2 Standardabweichungen der nicht-denervierten Seite; willkürliche Einheiten).

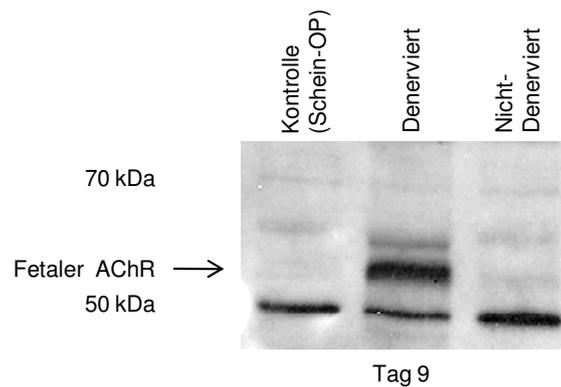


Abbildung 9: Western Blot des fetalen Azetylcholinrezeptors: Erhöhte Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors (AChR) neun Tage nach Denervierung.

4.3.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie zeigte in den nicht-denervierten (kontralateralen) Zwerchfellhälften keine Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors.

Die immunhistochemischen Färbungen der denervierten Zwerchfellhälfte zeigten am ersten postoperativen Tag eine signifikante Hochregulation der fetalen Azetylcholinrezeptoren an den neuromuskulären Endplatten. Zu diesem Zeitpunkt war keine Expression an den peripheren Muskelmembranen zu beobachten (s. Abb. 10 und 11). An Tag 3 konnte eine Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors sowohl an neuromuskulären Endplatten als auch an peripheren Membranen einzelner Muskelfasern gezeigt werden. Die myofibrilläre ATPase-Färbung identifizierte die membranös angefärbten Fasern als vorwiegend Typ-1- und -2a-Fasern (s. Abb. 12). Die Hochregulation des fetalen Azetylcholinrezeptors war an Tag 9 an den neuromuskulären Endplatten und den peripheren Muskelmembranen am deutlichsten nachzuweisen. An Tag 27 verminderte sich die Expression wieder, der fetale Azetylcholinrezeptor blieb jedoch in den ventralen Zwerchfellarealen an den neuromuskulären Endplatten und den peripheren Muskelmembranen hochreguliert. 81 Tage nach Denervierung normalisierte sich die Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors sowohl an den neuromuskulären Endplatten als auch an den peripheren Membranen (s. Abb.10 und 11).

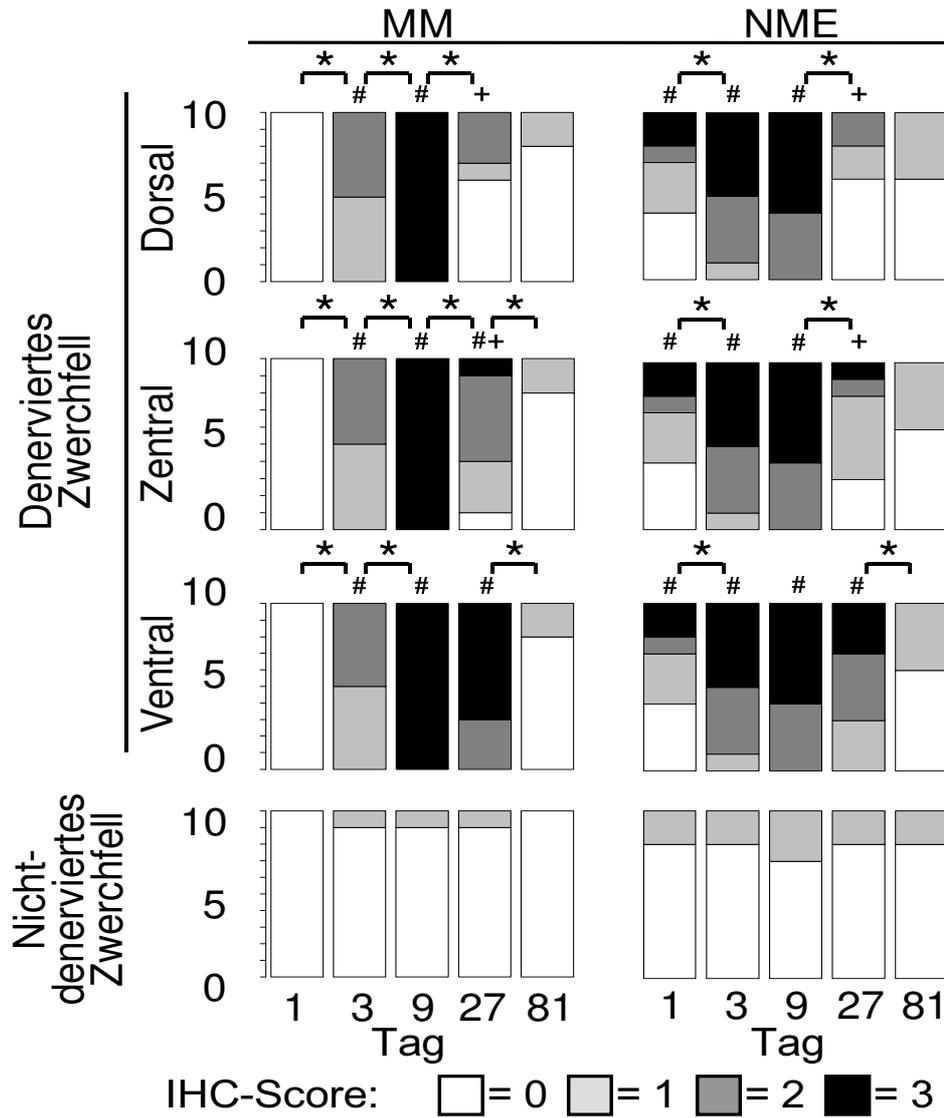


Abbildung 10: Immunhistochemische Analyse des fetalen Azetylcholinrezeptors: Eine Denervierung führte zu einer signifikanten Hochregulation an peripheren Muskelmembranen (MM) und neuromuskulären Endplatten (NME), die an Tag 9 ihre maximale Ausprägung erreichte und sich im Zuge der Reinnervation wieder normalisierte. (*: $p < 0,05$ vs. benachbarte Gruppe; #: $p < 0,05$ vs. nicht-denervierte Seite; +: $p < 0,05$ vs. ventraler Anteil der jeweiligen Zwerchfellhälfte).

a



b

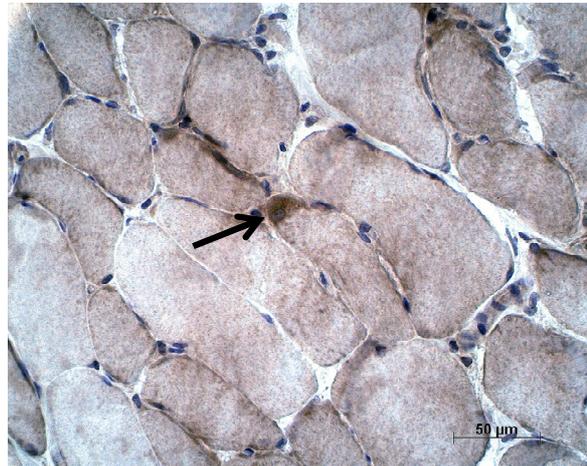


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung des fetalen Azetylcholinrezeptors im zentralen Zwerchfellanteil an Tag 9 (a = denervierte Zwerchfellhälfte, b = nicht-denervierte Zwerchfellhälfte; 630x Vergrößerung). Auffällig ist die homogen verteilte Anfärbung der denervierten Muskelmembranen. Auf der nicht-denervierten Zwerchfellhälfte ist die Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors auf die neuromuskuläre Endplatte (Pfeilspitze) beschränkt.

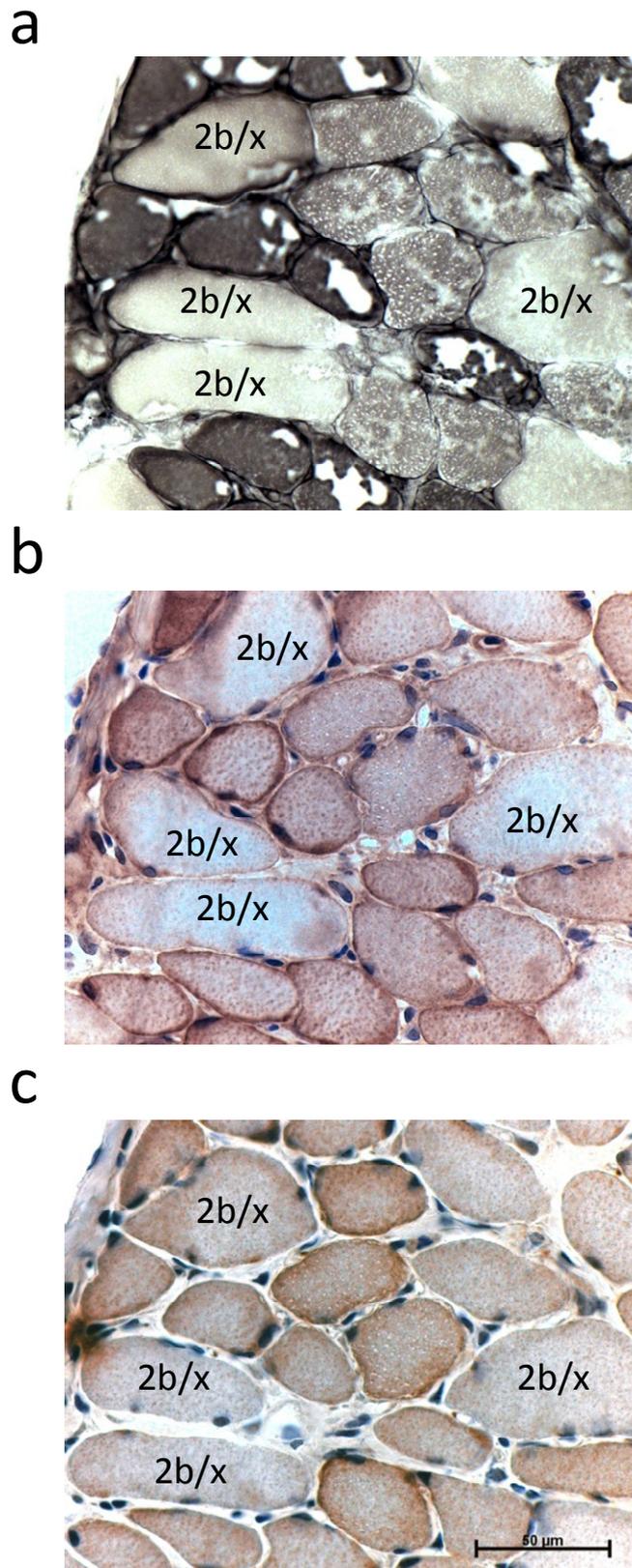


Abbildung 12: Vergleich der Muskelfasertypisierung (a) mit der immunhistochemischen Expressionsanalyse des fetalen Azetylcholinrezeptors (b) und der Rezeptortyrosinkinase MuSK (c) im zentralen Anteil des Diaphragmas drei Tage nach Denervierung. Man erkennt, dass die 2b/x-Fasern des denervierten Zwerchfellmuskels von der membranösen Anfärbung ausgespart bleiben.

4.4 Expression des adulten Azetylcholinrezeptors

Die Expression des adulten Azetylcholinrezeptors unterschied sich bei den scheinoperierten Tieren an Tag 9 nicht von den kontralateralen, nicht-denervierten Zwerchfellhälften der operierten Tiere. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse der scheinoperierten Tiere verzichtet.

4.4.1 Western Blot

Die Western Blot Analyse zeigte auf den nicht-denervierten und denervierten Zwerchfellhälften keine Veränderungen der Expression des adulten Azetylcholinrezeptors sowohl nach Denervierung als auch nach Reinnervation (s. Abb.13 und 14).

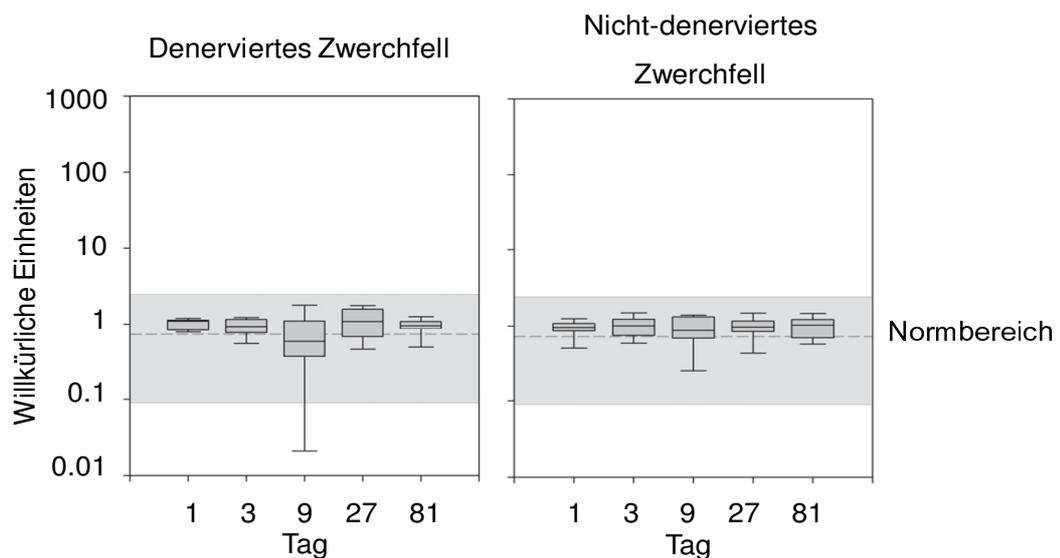


Abbildung 13: Western Blot Analyse des adulten Azetylcholinrezeptors: Die Rezeptorexpression blieb nach Denervierung und Reinnervation unverändert (Normbereich: Durchschnittswert ± 2 Standardabweichungen der nicht-denervierten Seite; willkürliche Einheiten).

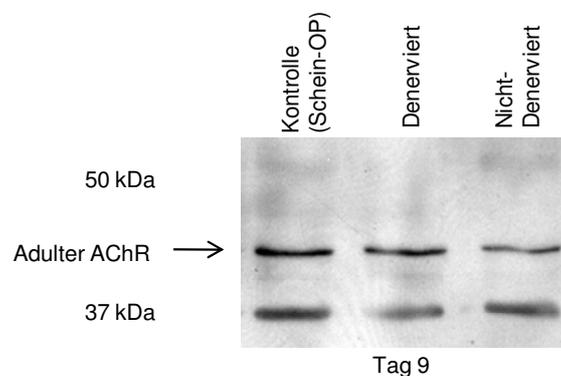


Abbildung 14: Western Blot des adulten Azetylcholinrezeptors (AChR): Keine signifikanten Unterschiede zwischen denervierter, nicht-denervierter und scheinoperierter Zwerchfellhälfte.

4.4.2 Immunhistochemie

In den immunhistochemischen Färbungen beschränkte sich die Expression des adulten Azetylcholinrezeptors auf die neuromuskuläre Endplatte – unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Tiere. Eine signifikante Hochregulation oder extrajunktionale Expression des adulten Azetylcholinrezeptors konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (s. Abb. 15 und 16).

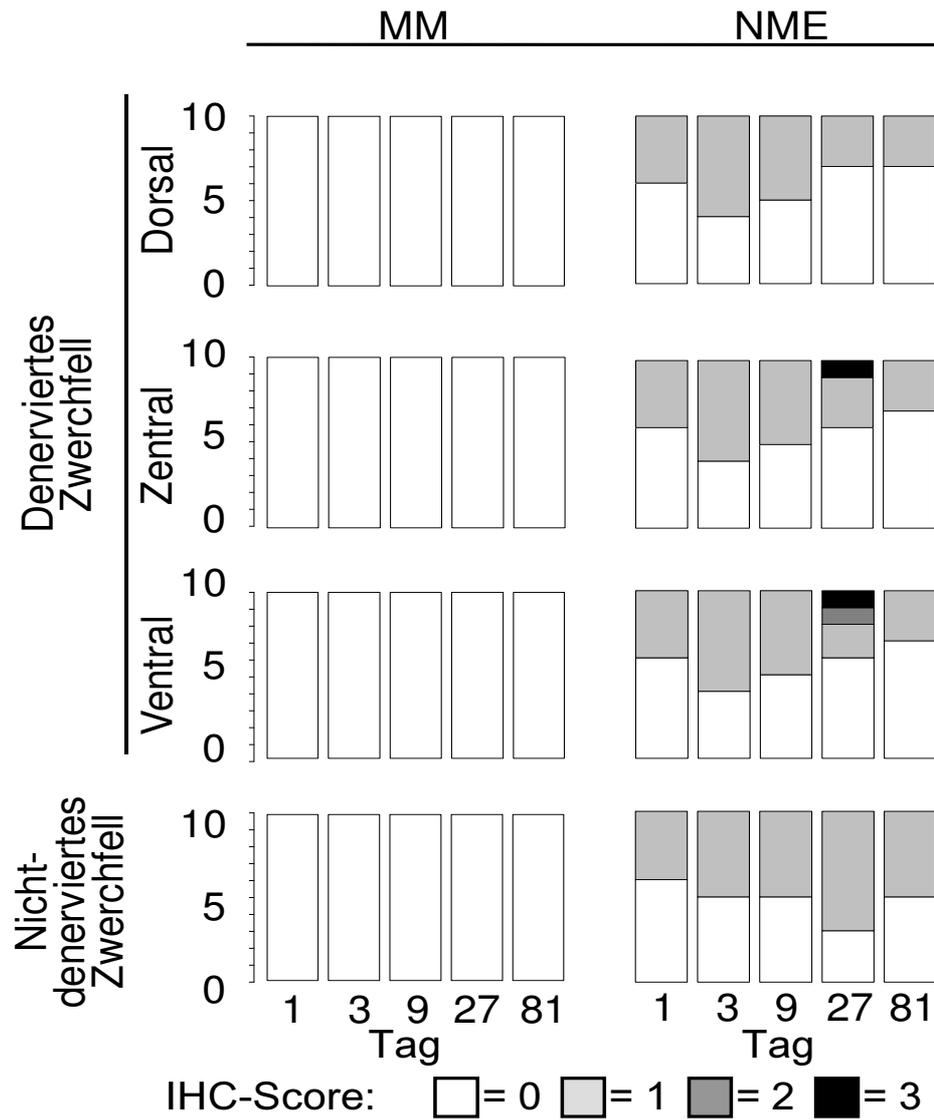
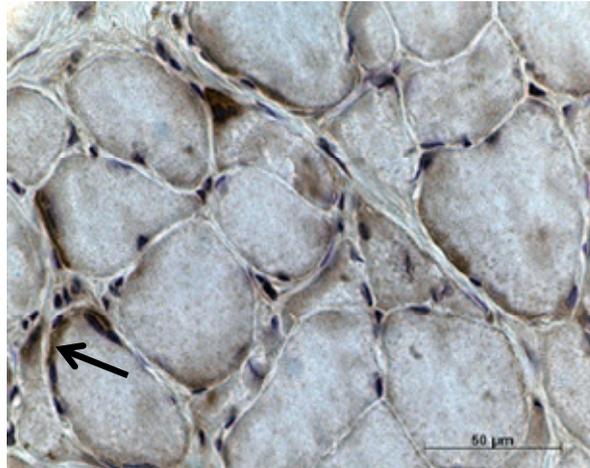


Abbildung 15: Immunhistochemische Expressionsanalyse des adulten Azetylcholinrezeptors: Unveränderte Expression nach Denervierung und Reinnervation an neuromuskulären Endplatten (NME) und peripheren Muskelmembranen (MM).

a



b

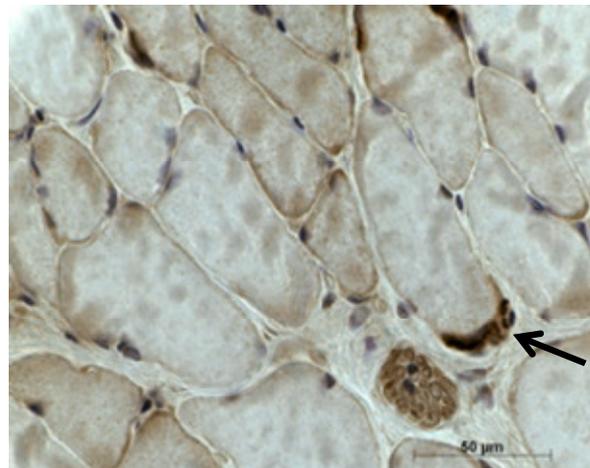


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung des adulten Azetylcholinrezeptors im zentralen Zwerchfellanteil an Tag 9 (a = denervierte Zwerchfellhälfte, b = nicht-denervierte Zwerchfellhälfte; 630x Vergrößerung). Man erkennt eine auf die neuromuskulären Endplatten (Pfeilspitzen) begrenzte Expression der adulten Azetylcholinrezeptoren. Die peripheren Muskelmembranen sind weder am denervierten noch am nicht-denervierten Zwerchfell angefärbt.

4.5 Expression von MuSK

Die Expression der Rezeptortyrosinkinase MuSK bei den scheinoperierten Kontrolltieren an Tag 9 unterschied sich nicht von den kontralateralen, nicht-denervierten Zwerchfellhälften der operierten Tiere. Im Folgenden wird somit auf eine explizite Darstellung der Ergebnisse der scheinoperierten Tiere verzichtet.

Die Expression der Rezeptortyrosinkinase MuSK war auf der nicht-denervierten Zwerchfellhälfte nach Denervierung und Reinnervation unverändert (s. Abb. 17 und 18).

Die Phrenikotomie führte nach einem Tag zu einer signifikanten Hochregulation der Rezeptortyrosinkinase MuSK an den neuromuskulären Endplatten. An den peripheren Muskelmembranen konnte keine Hochregulation beobachtet werden. Eine maximale Expression von MuSK zeigte sich nach drei Tagen sowohl an den neuromuskulären Endplatten als auch an den peripheren Muskelmembranen einzelner Muskelfasercluster. Die angefärbten Muskelfasern waren vorwiegend Typ-1 und -2a-Fasern (s. Abb. 13). An Tag 9 nahm die Expression an den peripheren Muskelmembranen wieder ab, während sie an der neuromuskulären Endplatte im Vergleich zum dritten postoperativen Tag auf gleichem Niveau blieb. 27 Tage nach der zervikalen Phrenikotomie konnten signifikant höhere Expressionen von MuSK in den ventralen gegenüber den dorsalen Zwerchfellarealen erfasst werden. An Tag 81 hatte die Expression der Rezeptortyrosinkinase MuSK wieder ihr Ausgangsniveau erreicht (s. Abb. 17 und 18).

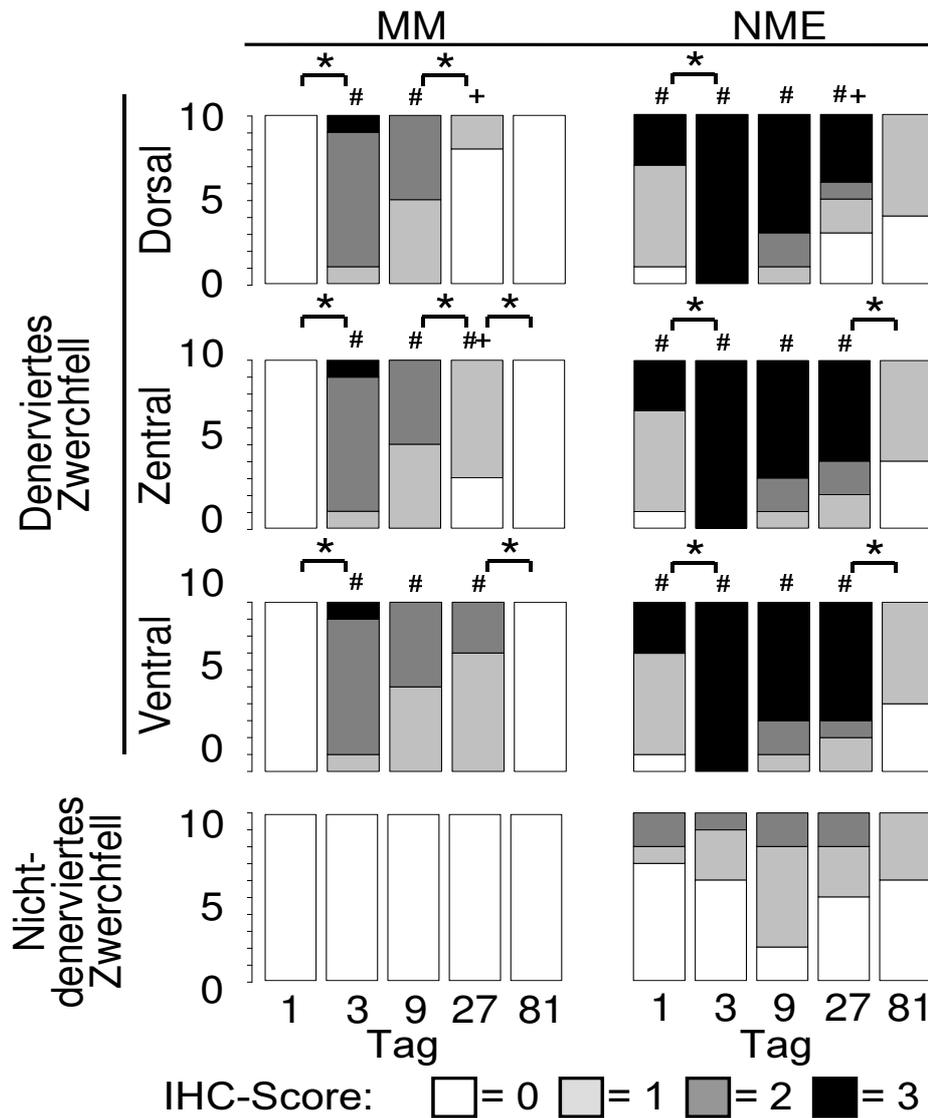
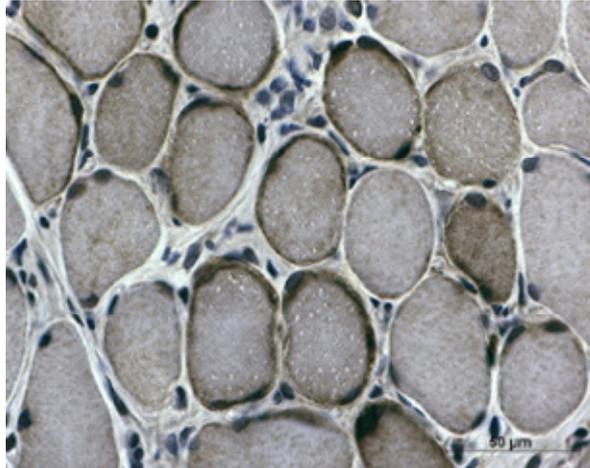


Abbildung 17: Immunohistochemische Expression der Rezeptortyrosinkinase MuSK: Eine Denervierung induzierte eine signifikante Hochregulation an peripheren Muskelmembranen (MM) und neuromuskulären Endplatten (NME), die an Tag 3 ihre maximale Ausprägung erreichte und sich im Rahmen der Reinnervation wieder normalisierte. An Tag 27 konnten zusätzlich signifikante Unterschiede der MuSK-Expression in den ventralen, zentralen und dorsalen Zwerchfellarealen beobachtet werden (*: $p < 0,05$ vs. benachbarte Gruppe; #: $p < 0,05$ vs. nicht-denervierte Seite; +: $p < 0,05$ vs. ventraler Anteil der jeweiligen Zwerchfelloberfläche).

a



b

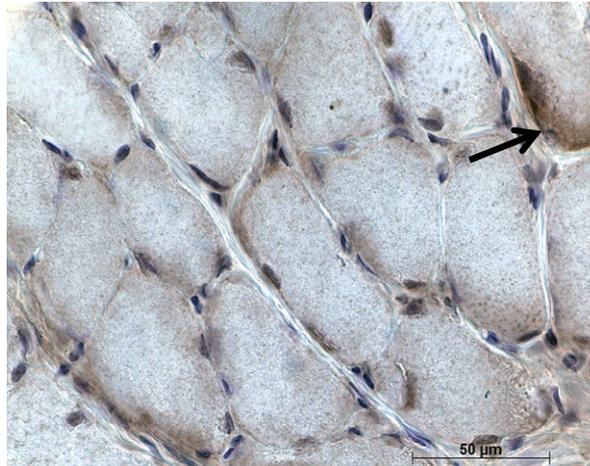


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung der Rezeptortyrosinkinase MuSK im zentralen Zwerchfellanteil an Tag 3 (a = denervierte Zwerchfellhälfte, b = nicht-denervierte Zwerchfellhälfte; 630x Vergrößerung). Man erkennt eine homogene Anfärbung entlang der peripheren Muskelmembranen des denervierten Zwerchfells. Auf dem nicht-denervierten Zwerchfell bleibt die Anfärbung auf die neuromuskuläre Endplatte (Pfeilspitze) beschränkt.

4.6 Muskelfasertypenzusammensetzung und -querschnittsfläche

Da sich die Muskelfasertypenzusammensetzung und -querschnittsfläche (cross sectional area, CSA) bei den scheinoperierten Tieren an Tag 9 nicht von den kontralateralen, nicht-denervierten Zwerchfellhälften der operierten Tiere unterschieden, wird im Folgenden auf eine dezidierte Darstellung der Ergebnisse der scheinoperierten Tiere verzichtet.

Die Denervierung und Reinnervation des Hemidiaphragmas veränderte die Zusammensetzung der Muskelfasertypen nicht (s. Tab. 3).

Eine Denervierung führte zu einer signifikanten Reduktion der CSA der 2b/x-Fasern, die erstmals nach drei Tagen beobachtet werden konnte und nach neun Tagen ihren Höhepunkt erreichte. Die CSA der Typ-1- und -2a-Fasern veränderte sich nach Denervierung nicht oder stieg leicht an. Im Zuge der Erholung stieg die CSA der Typ-2b/x-Fasern nach 27 Tagen in den dorsalen Zwerchfellarealen wieder an und erreichte nach 81 Tagen Normalwerte. Die Auswertung der CSA-Ratio, also des Anteils jedes Muskelfasertyps am Gesamtquerschnitt des Zwerchfells, zeigte nach Denervierung einen signifikanten Rückgang der von Typ-2b/x-Fasern besetzten Fläche. Während der Erholungsphase normalisierte sich die CSA-Ratio der Typ-2b/x-Fasern in den dorsalen und zentralen Zwerchfellarealen wieder. In den ventralen Arealen war sie auch nach 81 Tagen noch signifikant erniedrigt. Demgegenüber stieg die CSA-Ratio der Typ-1-Fasern nach Denervierung an und blieb auch während der Erholungsphase erhöht. Die CSA-Ratio der Typ-2a-Fasern veränderte sich im Zuge der Denervierung und Erholung nicht (s. Tab. 3 und Abb. 19).

		Tag 1	Tag 3	Tag 9	Tag 27	Tag 81	
Fasertyp [%]	1	Denerviert	32±6	36±1	33±4	35±4	36±4
		Nicht-Denerviert	32±6	32±4	31±5	34±2	34±3
	2a	Denerviert	37±6	36±4	40±4	36±2	37±3
		Nicht-Denerviert	37±4	37±4	39±5	38±3	37±5
	2b/x	Denerviert	32±3	27±2 [#]	27±1	29±4	27±4
		Nicht-Denerviert	32±4	31±4	31±4	28±4	29±4
CSA [10 ² μm ²]	1	Denerviert	12,6±1,1	10,9±1,6	15,6±3,3 [#]	12,2±3,8	14,1±2
		Nicht-Denerviert	12,3±0,7	10,6±1,3	11,4±1,5	11,6±2,1	12,1±3,7
	2a	Denerviert	13,5±1,2	12,3±1,5	16,1±2,9 [#]	12,8±5,2	13,7±4,1
		Nicht-Denerviert	13,7±0,8	12,2±1,3	12,7±1,5	13,0±2,1	14,6±3,7
	2b/x	Denerviert	33,2±3,3	23,2±4,7 [#]	25,0±6 [#]	25,6±5,8 [#]	34,8±3,6
		Nicht-Denerviert	33,3±2,4	27,9±5,3	33,8±4,0	34,6±6,4	35,6±2,7
CSA-Ratio [%]	1	Denerviert	21±5	27±3 [#]	28±3 [#]	26±3 [#]	26±5 [#]
		Nicht-Denerviert	20±4	21±4	19±3	22±2	21±3
	2a	Denerviert	26±4	31±5	36±4 [#]	28±5	26±6
		Nicht-Denerviert	26±4	28±4	26±4	26±4	27±6
	2b/x	Denerviert	54±4	43±5 [#]	37±5 [#]	46±5 [#]	48±7
		Nicht-Denerviert	54±6	52±6	55±5	52±5	52±6

Tabelle 3: Muskelfasertypenanalyse und Messung der CSA sowie der CSA-Ratio (# p<0,05 vs. nicht-denervierte Seite).

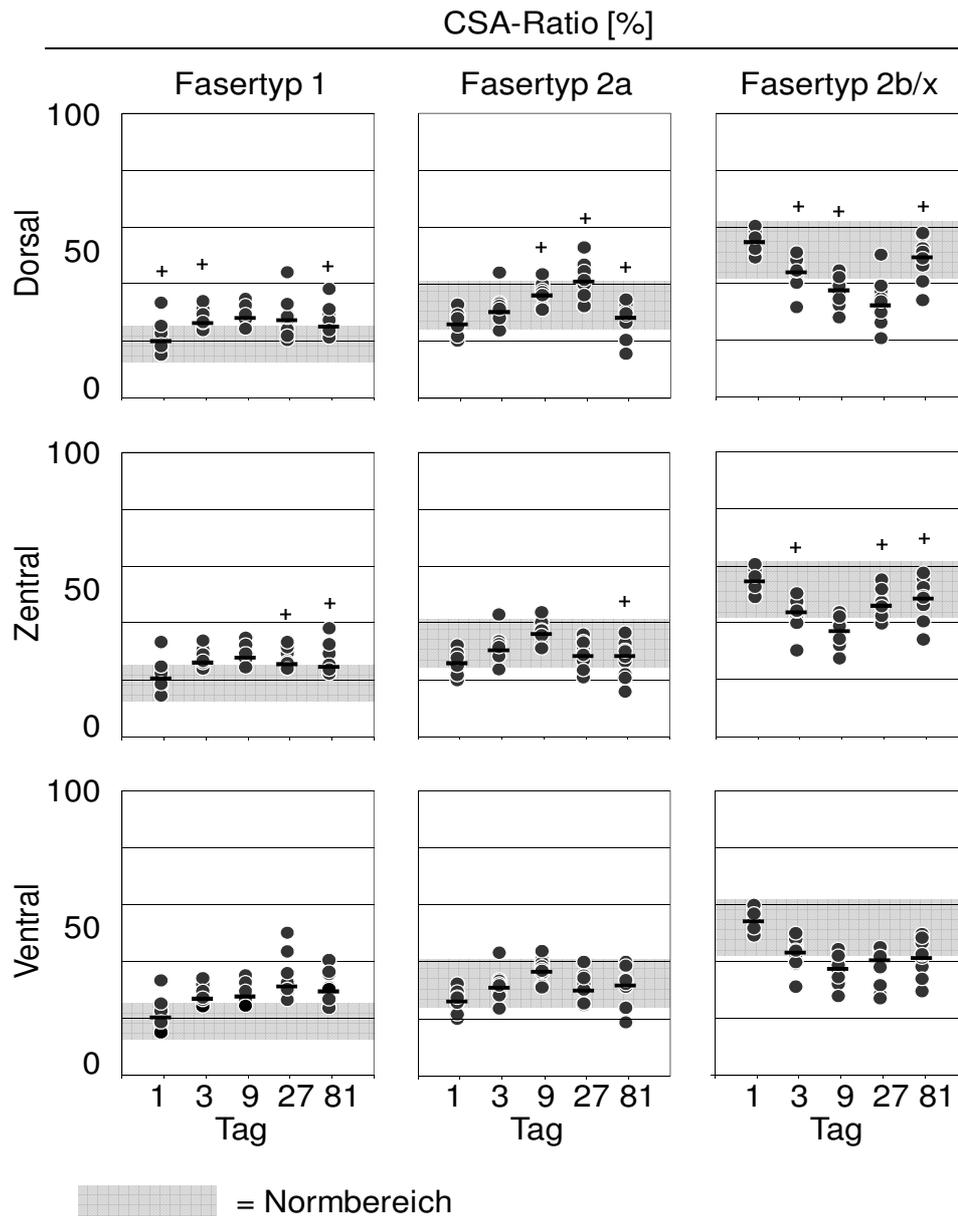


Abbildung 19: CSA-Ratio der jeweiligen Muskelfasertypen: Die CSA-Ratio der Typ-1-Fasern stieg nach Denervierung an und blieb auch während der Erholungsphase erhöht. Die CSA-Ratio der Typ-2a-Fasern veränderte sich im Zuge der Denervierung und Erholung nicht. Die Denervierung induzierte zusätzlich einen signifikanten Abfall der CSA-Ratio der Typ-2b/x-Fasern, während die Reinnervation zu einer Normalisierung der CSA-Ratio der Typ-2b/x-Fasern führte (+ $p < 0.05$ vs. Ventral; Normbereich: Durchschnittswert ± 2 Standardabweichungen der nicht-denervierten Seite).

4.7 Histomorphologie

Da sich die Zwerchfellpräparate der scheinoperierten Tiere an Tag 9 histomorphologisch nicht von den Präparaten der kontralateralen, nicht-denervierten Zwerchfellhälfte der operierten Tiere unterschieden, wird im Folgenden auf eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse der scheinoperierten Tiere verzichtet.

Histomorphologisch zeigten sich ab Tag 3 signifikante Veränderungen: Die Anzahl der Muskelfaseratrophien, der Kernhaufen, der zentralen Kerne, der peripheren Sarkolemmkerne sowie die endomysiale Bindegewebsbreite nahmen signifikant zu. Die Veränderungen im histomorphologischen Bild erreichten dabei an Tag 9 ihre maximale Ausprägung. Während der Reinnervationsphase (Tag 27 und 81) normalisierten sich die histomorphologischen Parameter in den dorsalen und zentralen Zwerchfellanteilen wieder, in den ventralen Arealen blieben sie jedoch bis Tag 81 signifikant erhöht (s. Abb. 20). Die Anzahl der Muskelfasernekrosen - ein Hinweis auf myopathische Veränderungen – blieb im Zuge der Denervierung und Reinnervation unverändert (nicht abgebildet).

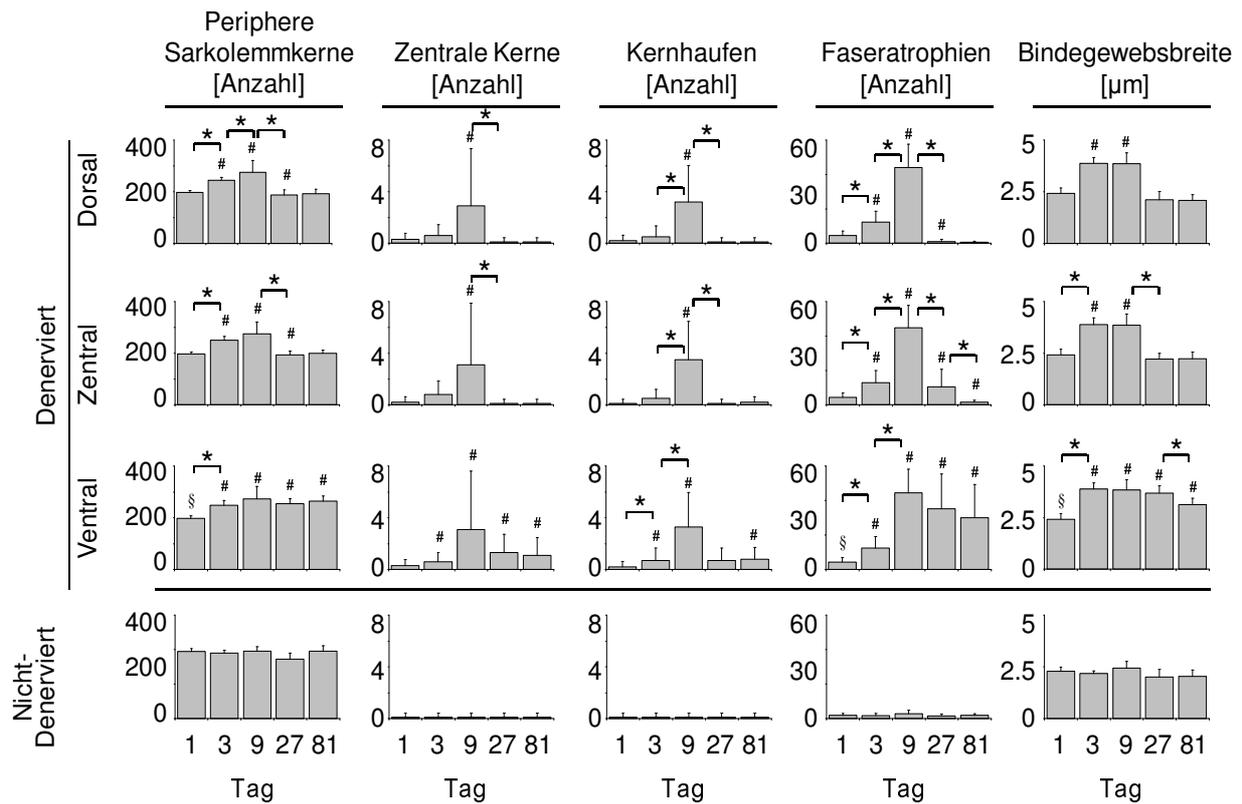


Abbildung 20: Histomorphologische Auswertung: Die Zwerchfelldenervierung führte zu einem signifikanten Anstieg der peripheren Sarkolemmkerne, zentralen Kerne, Kernhaufen, Faseratrophien sowie der endmysialen Bindegewebsbreite. Die Werte normalisierten sich in den reinnervierten dorsalen und zentralen Zwerchfellarealen. In den ventralen Anteilen des Zwerchfells blieben die Werte auch nach 81 Tagen noch erhöht (* $p < 0.05$ vs. benachbarte Gruppe; # $p < 0.05$ vs. nicht-denervierte Seite; § $p < 0.05$ Tag 1 vs. Tag 81).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des fetalen und adulten Azetylcholinrezeptors sowie der Rezeptortyrosinkinase MuSK nach Denervierung und konsekutiver Reinnervation am Zwerchfell der Ratte untersucht. Eine Denervierung führte zu einer selektiven junctionalen und extrajunctionalen Hochregulation des fetalen Azetylcholinrezeptorsubtyps, der eine Hochregulation der Rezeptortyrosinkinase MuSK voranging. Die Expression des adulten Azetylcholinrezeptors blieb nach Denervierung unverändert und scharf auf die neuromuskulären Endplatten beschränkt. Eine klinisch beobachtete und histologisch bestätigte Reinnervation hatte suppressive Effekte auf die Hochregulation des fetalen Azetylcholinrezeptors und MuSK und führte zur Normalisierung der erhöhten Rezeptorexpression.

Die selektive Hochregulation der fetalen Azetylcholinrezeptoren nach Denervierung ist ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Studie. Ebenso konnte eine unveränderte Expression des adulten Rezeptorsubtyps nach Denervierung und Reinnervation auf Proteinebene gezeigt werden. Die Expression der adulten Rezeptoren wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach auf mRNA-Ebene untersucht, jedoch mit heterogenen Ergebnissen: Während es Studien gibt, die eine Hochregulation nach Denervierung beschreiben (Kues 1995, S. 1376, Ma 2007, S. 1502, Witzemann 1991, S. 127), existieren auch Untersuchungen, die keine denervierungsinduzierte Änderung der mRNA-Expression des adulten Azetylcholinrezeptors zeigen (Adams 1995, S. 1345). Das Vorhandensein von mRNA scheint somit nicht zwangsläufig eine gesteigerte Proteintranslation zu implizieren.

Der fetale Azetylcholinrezeptor wird physiologisch während der pränatalen Synapsenformierung und -reifung exprimiert. Im Zuge der perinatalen Entwicklung der neuromuskulären Endplatte wird er durch die adulte Azetylcholinrezeptorisoform ersetzt (Mishina 1986, S. 407). Eine Umkehr dieser Entwicklung ist jedoch pathophysiologisch durch Denervierung möglich. In der vorliegenden Studie begann die Re-Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors an der neuromuskulären Endplatte auf Proteinebene bereits einen Tag nach der Denervierung. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den erhöhten mRNA-Transkripten des fetalen Rezeptorsubtyps, die sich 36 Stunden nach Denervierung finden lassen (Kues 1995, S. 1376). Der vergleichsweise kurze, auf Stunden beschränkte, zeitliche Abstand zwischen Denervierung und Re-Expression der fetalen Azetylcholinrezeptoren an den

neuromuskulären Endplatten lässt vermuten, dass es zytoplasmatisch unter den Endplatten ein Reservoir präformierter Azetylcholinrezeptoren oder zumindest Rezeptoruntereinheiten gibt, die bei Denervierung in die Membran eingebaut werden können (Yampolsky 2010, S. 652). Neben der neuromuskulären Endplatte könnte auch die perijunktionale Zone als Quelle präformierter Azetylcholinrezeptoren dienen (Akaaboune 1999, S. 503). Drei Tage nach Durchtrennung des Nervus phrenikus konnte der fetale Azetylcholinrezeptor auch in den extrajunktionalen Bereichen einiger Muskelzellcluster nachgewiesen werden. Dies ist eine Umkehrung der physiologischen postnatalen Entwicklung, bei der die fetalen Azetylcholinrezeptoren von extrajunktionale zur neuromuskulären Endplatte hin abnehmen (Salpeter 1985, S. 297). Durch eine Re-Expression der fetalen Rezeptorsubtypen sowie MuSK sind die denervierten Muskelzellen in der Lage, schnellstmöglich neue neuromuskuläre Endplatten und somit neue funktionstüchtige motorische Einheiten zu bilden und werden dadurch für neuerlichen nervalen „input“ maximal empfänglich. Diese Theorie wird gestützt durch die herausragende Rolle, die sowohl der fetale Azetylcholinrezeptor als auch die Rezeptortyrosinkinase MuSK während der embryonalen neuromuskulären Entwicklung spielen (Kim 2008, S. 20, Liu 2008, S. 1959). Eine erfolgreiche Reinnervation führt im weiteren Verlauf zur Entstehung von neuen funktionellen neuromuskulären Einheiten und folgerichtig zur Supprimierung der Hochregulation der fetalen Azetylcholinrezeptoren und MuSK. Fink et al. zeigten in diesem Zusammenhang im Tiermodell, dass auch elektrische Nervenstimulation die Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren limitieren kann (Fink 2004, S. 510). Die Hochregulation der fetalen Azetylcholinrezeptoren erreichte im Einklang mit früheren mRNA-Expressionsstudien am neunten Tag nach Denervierung ihr Maximum (Witzemann 1991, S. 127). Zu diesem Zeitpunkt wurde der fetale Azetylcholinrezeptor unabhängig vom Muskelfasertyp an der gesamten Muskelmembran aller Muskelfasern exprimiert.

Die Rezeptortyrosinkinase MuSK war in unseren Untersuchungen bereits am ersten Tag nach Denervierung signifikant an den neuromuskulären Endplatten hochreguliert. MuSK bündelt die Azetylcholinrezeptor-Untereinheiten zu einem pentamerischen Rezeptor und ist im Bereich der neuromuskulären Endplatte mit den Azetylcholinrezeptoren kolokalisiert (Valenzuela 1995, S. 574). MuSK erreichte ihre maximale junctionale und extrajunktionale Expression bereits am dritten

postoperativen Tag und ging somit der maximalen Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors voraus. Frühere Experimente zeigen, dass die Rezeptortyrosinkinase MuSK nach Denervierung eine nervenunabhängige Aggregation der Azetylcholinrezeptoren induzieren kann (Sander 2001, S. 1288, Yang 2001, S. 403). Die Expression der adulten Azetylcholinrezeptorisoform blieb in der vorliegenden Arbeit trotz der Hochregulation von MuSK unverändert. Die Ergebnisse lassen in Zusammenschau mit weiteren tierexperimentellen Untersuchungen die Vermutung zu, dass die Rezeptortyrosinkinase MuSK Teil eines intrazellulären Signalwegs ist, der selektiv die Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors kontrolliert (Kim 2008, S. 20, Liu 2008, S. 1959).

Da sowohl der fetale Azetylcholinrezeptor als auch MuSK an Tag 3 vorwiegend auf Typ-1- und -2a-Muskelfasern exprimiert wurden, scheint die Genexpression dieses Signaltransduktionsweges in den verschiedenen Muskelfasertypen zumindest in der Frühphase nach Denervierung unterschiedlich kontrolliert zu werden. Diese Theorie wird von den Ergebnissen früherer Studien gestützt: Beispielsweise fand sich bei Patienten mit chronischen neuromuskulären Erkrankungen eine auf Typ-1-Fasern beschränkte Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors (Gattenlohner 2002, S. 1314). Im Tiermodell führte das Fortbestehen der fetalen Azetylcholinrezeptoren bei ϵ -Knockout-Mäusen zu Veränderungen in der Muskelfasertypenzusammensetzung. Die Anzahl der langsamen Typ-1-Fasern nahm zu, während die schnellen -2a- und -2b/x-Fasern abnahmen (Jin 2008, S. 2045).

Eine klinische Erholung der Zwerchfellmuskulatur im Sinne einer Reinnervation wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals nach 27 Tagen beobachtet. Eine derartige Reinnervation kann grundsätzlich auf zwei unterschiedliche Arten erreicht werden: Einerseits durch das Aussprossen eines neuen Motoraxons hin zu dem vormals innervierten Muskel. Andererseits durch kollaterale Reinnervation, bei der angrenzende intakte Motorneurone aussprossen und benachbarte denervierte Muskelfasern reinnervieren. Dadurch entstehen neue, vergrößerte motorische Einheiten (Kugelberg 1970, S. 320). Eine direkte Reinnervation ist in dem vorliegenden etablierten Modell, bei dem ein 20mm langes Teilstück des Nervus phrenikus reseziert wurde, unwahrscheinlich, eine von den Interkostalnerven ausgehende Reinnervation ebenso (Gottschall 1977, S. 63). Die deutlich sichtbaren Muskelkontraktionen zeigten sich klinisch nach 27 Tagen initial in den dorsalen und im weiteren Zeitverlauf in den zentralen Zwerchfellarealen. Dies lässt zusammenfassend den Rückschluss zu, dass

die Reinnervation vom intakten akzessorischen Phrenikus- und/oder Vagusnerven ausging. Da beide Nerven auch beim Menschen vorhanden sind, könnten auch klinisch beobachtete Spontanremissionen nach unilateraler Phrenikuslähmung durch Reinnervation erklärt werden (de Vries 1998, S. 602, Dernaika 2008, S. 351, Douglass 1960, S. 296, Gibson 1989, S. 967).

Die klinischen Kontraktionsbeobachtungen wurden histologisch durch das Auftreten von Muskelfasertypengruppierungen sowie durch die Evaluation von Histomorphologie, Querschnittsfläche (cross sectional area, CSA) und CSA-Ratio der Muskelfasern bestätigt. Eine Denervierung hatte keinen Einfluss auf die CSA der langsamen Typ-1- und -2a-Fasern. Die CSA der schnellen Typ-2b/x-Fasern war dagegen bereits ab dem dritten Tag nach Phrenikotomie reduziert. Die CSA-Ratio der Typ-2b/x-Fasern nahm ebenso signifikant ab und bestätigt damit eine stattgehabte Denervierung (Miyata 1995, S. 1646, Shindoh 1994, S. 297, Zhan 1997, S. 1148). Diese sogenannte „fast-to-slow-Transformation“ führt dabei funktionell zu einer Kraftabnahme und vermehrten Ermüdbarkeit des Zwerchfells (Jin 2008, S. 2045, Shanely 2002, S. 1370, Shindoh 1994, S. 297). Im zeitlichen Verlauf normalisierte sich die CSA der Typ-2b/x-Fasern in den dorsalen und zentralen Zwerchfellarealen. In den ventralen, nicht-reinnervierten Anteilen des Diaphragmas waren CSA und CSA-Ratio der Typ-2b/x-Fasern bis zu Tag 81 vermindert. Die Denervierung induzierte darüber hinaus ab Tag 3 einen signifikanten Anstieg von Faseratrophien, peripheren Sarkolemmkernen, Kernhaufen, zentralen Kernen sowie endomysialer Bindegewebsbreite in allen Zwerchfellabschnitten. Die histomorphologischen Parameter normalisierten sich im Zeitverlauf in den dorsalen und zentralen Zwerchfellarealen. In den ventralen Bereichen konnten demgegenüber auch nach 81 Tagen noch signifikant erhöhte Werte von Faseratrophien und endomysialer Bindegewebsbreite beobachtet werden. Die Evaluation von CSA, CSA-Ratio und Histomorphologie der Muskelfasern bestätigt somit die von dorsal nach zentral voranschreitende Reinnervation, die die ventralen Zwerchfellabschnitte aussparte.

Parallel zu dem Auftreten klinischer und histologischer Reinnervationsparameter konnte ab Tag 27 ein deutlicher Rückgang der Hochregulation der fetalen Azetylcholinrezeptoren in den reinnervierten Bereichen beobachtet werden. Dabei verringerte sich die Expression entlang der peripheren Muskelmembran in höherem Ausmaß als an der neuromuskulären Endplatte. Im Hinblick auf die

Hochregulation des fetalen Azetylcholinrezeptors verlaufen somit die Reinnervation nach Denervierung und die physiologische postnatale Reifung der neuromuskulären Endplatte nach demselben Muster ab (Salpeter 1985, S. 297). Besonders eindrucksvoll war der Effekt der Reinnervation an Tag 27: Während sich die Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors in den reinnervierten dorsalen Zwerchfellarealen zu diesem Zeitpunkt wieder normalisiert hatte, konnte in den denervierten ventralen Bereichen des Hemidiaphragmas nach wie vor eine signifikante Hochregulation der fetalen Azetylcholinrezeptoren an den neuromuskulären Endplatten und den peripheren Muskelmembranen erfasst werden. An Tag 81 konnte eine Normalisierung der denervierungsinduzierten Hochregulation der fetalen Azetylcholinrezeptoren in den dorsalen, zentralen und ventralen Zwerchfellarealen beobachtet werden. Die ventralen Bereiche, die von der Reinnervation ausgespart blieben, spiegeln dabei das unbeeinflusste Verhaltensmuster des Zwerchfellmuskels nach Denervierung wieder. Dies wirft die Frage auf, ob eine Normalisierung der hochregulierten Azetylcholinrezeptoren ein physiologischer Prozess nach langbestehender Denervierung ist. Da die langanhaltende Denervierung zu einer dauerhaften Atrophie und Funktionsverlust der Muskelfasern führt, scheint eine erhöhte Expression von fetalen Azetylcholinrezeptoren und MuSK (mit dem Potenzial einer Reinnervation und Neubildung von neuromuskulären Einheiten) physiologisch eventuell nicht mehr sinnvoll.

Das Expressionsmuster von MuSK korrelierte auch im Rahmen der Reinnervation vollständig mit dem des fetalen Azetylcholinrezeptors. Diese Tatsache unterstreicht die Annahme, dass MuSK Teil der intrazellulären Signalkaskade der selektiven Re-Expression des fetalen Azetylcholinrezeptorsubtyps ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstens, dass eine Denervierung zu einer selektiven Hochregulation der fetalen Azetylcholinrezeptorisoform führt, zweitens, dass die Expression der adulten Isoform nach Denervierung unverändert bleibt und drittens, dass eine Reinnervation via akzessorischem und/oder Vagusnerven nach Phrenikotomie möglich ist und die pathophysiologische Hochregulation des fetalen Subtyps reversieren kann.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Eine Denervierung führt in der Skelettmuskulatur zur Hochregulation von Azetylcholinrezeptoren sowie der Rezeptortyrosinkinase MuSK. Unklar sind der zeitliche Verlauf der Hochregulation der einzelnen Subtypen sowie ein möglicher antagonistischer Effekt durch eine Reinnervation. Das Zwerchfell, das vom Nervus phrenikus und im dorsalen Anteil zusätzlich vom akzessorischen Phrenikusnerv und dem Nervus vagus motorisch innerviert wird, stellt aufgrund eines hohen Reinnervationspotenzials ein ideales Modell zur Untersuchung dieser Fragestellung dar.

Methoden: Nach Genehmigung durch die Tierschutzkommission wurden sechzig Ratten einseitig phrenikotomiert. Nach 1, 3, 9, 27 beziehungsweise 81 Tagen erfolgte die quantitative Bestimmung des adulten und fetalen Azetylcholinrezeptorsubtyps mittels Western Blot Analyse. Die Expressionsverteilung der Azetylcholinrezeptorisoformen sowie der Rezeptortyrosinkinase MuSK wurde immunhistochemisch evaluiert. Anhand der myofibrillären ATPase-Färbung bei einem pH von 4,5 erfolgte die Analyse der Muskelfasertypenzusammensetzung und -querschnittsfläche. Histomorphologische Veränderungen wurden anhand der H.E.-Färbungen quantifiziert. Die Effekte der Denervierung mit konsekutiver Reinnervation wurden mittels Mann-Whitney-U-, χ^2 - und Wilcoxon-Test bei einem statistischen Signifikanzniveau von 95% ($p < 0,05$) abgebildet.

Ergebnisse: Die Expression des adulten Azetylcholinrezeptors blieb über 81 Tage unverändert. Der fetale Rezeptorsubtyp wurde mit einem Maximum an Tag 9 nach Denervierung signifikant hochreguliert (Western Blot Analyse: Denerviert: $144,6 \pm 178,7$; Nicht-denerviert: $0,8 \pm 0,5$; willkürliche Einheiten; $p < 0,05$). Die Expression des fetalen Azetylcholinrezeptors sank nach 27 Tagen, blieb jedoch weiterhin signifikant im Vergleich zur nicht-denervierten Gegenseite erhöht (Western Blot Analyse: Denerviert: $5,3 \pm 1,1$; Nicht-denerviert: $1,0 \pm 0,4$; willkürliche Einheiten; $p < 0,05$) und normalisierte sich nach 81 Tagen. Die Rezeptortyrosinkinase MuSK erreichte ihre maximale Expression bereits an Tag 3 und normalisierte sich ebenfalls nach 81 Tagen. An Tag 3 wurde eine muskelfasertypenabhängige Expression der fetalen Azetylcholinrezeptoren und MuSK beobachtet. Mit der Normalisierung des Expressionsniveau gingen klinische und histologische Zeichen der Reinnervation einher.

Schlussfolgerung: Eine Denervierung führt zu einer selektiven, in der Frühphase nach Denervierung muskelfasertypenabhängigen Hochregulation des fetalen Azetylcholinrezeptorsubtyps sowie der Rezeptortyrosinkinase MuSK an der neuromuskulären Endplatte und peripheren Muskelmembran, während die Expression des adulten Rezeptors unverändert bleibt. Eine funktionelle Erholung durch Reinnervation via akzessorischem und/oder Vagusnerven ist nach Phrenikotomie möglich und geht mit einer Normalisierung der fetalen Azetylcholinrezeptor- sowie MuSK-Hochregulation einher, wobei die Expression des adulten Azetylcholinrezeptors ebenfalls unverändert bleibt.

7 Bibliographie

1. **Adams, L., Carlson, B. M., Henderson, L., Goldman, D.:** Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. *J Cell Biol* 5 (1995): 1341-1349
2. **Akaaboune, M., Culican, S. M., Turney, S. G., Lichtman, J. W.:** Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *Science* 5439 (1999): 503-507
3. **Argadine, H. M., Hellyer, N. J., Mantilla, C. B., Zhan, W. Z., Sieck, G. C.:** The effect of denervation on protein synthesis and degradation in adult rat diaphragm muscle. *J Appl Physiol* 2 (2009): 438-444
4. **Bell, D., Siriwardena, A.:** Phrenic nerve injury following blunt trauma. *J Accid Emerg Med* 6 (2000): 419-420
5. **Bernard, N., Matecki, S., Py, G., Lopez, S., Mercier, J., Capdevila, X.:** Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits. *Intensive Care Med* 1 (2003): 111-118
6. **Changeux, J. P., Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Bertrand, D.:** The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Q Rev Biophys* 4 (1992): 395-432
7. **Cohen-Cory, S.:** The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* 5594 (2002): 770-776
8. **de Vries, T. S., Koens, B. L., Vos, A.:** Surgical treatment of diaphragmatic eventration caused by phrenic nerve injury in the newborn. *J Pediatr Surg* 4 (1998): 602-605
9. **Deng, Y., Byth, K., Paterson, H. S.:** Phrenic nerve injury associated with high free right internal mammary artery harvesting. *Ann Thorac Surg* 2 (2003): 459-463
10. **Dennis, M., Giraudat, J., Kotzyba-Hibert, F., Goeldner, M., Hirth, C., Chang, J. Y., Lazure, C., Chretien, M., Changeux, J. P.:** Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor alpha subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. *Biochemistry* 7 (1988): 2346-2357
11. **Dernaika, T. A., Younis, W. G., Carlile, P. V.:** Spontaneous recovery in idiopathic unilateral diaphragmatic paralysis. *Respir Care* 3 (2008): 351-354
12. **DeRuisseau, K. C., Kavazis, A. N., Deering, M. A., Falk, D. J., Van Gammeren, D., Yimlamai, T., Ordway, G. A., Powers, S. K.:** Mechanical ventilation induces alterations of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm. *J Appl Physiol* 4 (2005): 1314-1321
13. **Douglass, B. E., Clagett, O. T.:** The prognosis in idiopathic diaphragmatic paralysis. *Dis Chest* (1960): 294-297
14. **Elefteriades, J., Singh, M., Tang, P., Siegel, M. D., Kenney, B., Pandey, A., Kopf, G. S.:** Unilateral diaphragm paralysis: etiology, impact, and natural history. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2 (2008): 289-295
15. **Fertuck, H. C., Salpeter, M. M.:** Quantitation of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors by electron microscope autoradiography after ¹²⁵I-alpha-bungarotoxin binding at mouse neuromuscular junctions. *J Cell Biol* 1 (1976): 144-158
16. **Fink, H., Helming, M., Unterbuchner, C., Lenz, A., Neff, F., Martyn, J. A., Blobner, M.:** Systemic inflammatory response syndrome increases immobility-induced neuromuscular weakness. *Crit Care Med* 3 (2008): 910-916
17. **Fink, H., Yasuhara, S., Blobner, M., Martyn, J. A.:** Up-regulation of acetylcholine receptors during subchronic infusion of pancuronium is caused by a posttranscriptional mechanism related to disuse. *Crit Care Med* 2 (2004): 509-513
18. **Gattenlohner, S., Schneider, C., Thamer, C., Klein, R., Roggendorf, W., Gohlke, F., Niethammer, C., Czub, S., Vincent, A., Muller-Hermelink, H. K., Marx, A.:** Expression of foetal type acetylcholine receptor is restricted to type 1 muscle fibres in human neuromuscular disorders. *Brain Pt* 6 (2002): 1309-1319
19. **Gayán-Ramírez, G., Decramer, M.:** Effects of mechanical ventilation on diaphragm function and biology. *Eur Respir J* 6 (2002): 1579-1586

20. **Geiger, P. C., Cody, M. J., Macken, R. L., Bayrd, M. E., Sieck, G. C.:** Effect of unilateral denervation on maximum specific force in rat diaphragm muscle fibers. *J Appl Physiol* 4 (2001): 1196-1204
21. **Gibson, G. J.:** Diaphragmatic paresis: pathophysiology, clinical features, and investigation. *Thorax* 11 (1989): 960-970
22. **Glass, D. J., Bowen, D. C., Stitt, T. N., Radziejewski, C., Bruno, J., Ryan, T. E., Gies, D. R., Shah, S., Mattsson, K., Burden, S. J., DiStefano, P. S., Valenzuela, D. M., DeChiara, T. M., Yancopoulos, G. D.:** Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 4 (1996): 513-523
- Gottschall, J., Gruber, H.:** The accessory phrenic nerve in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 1 (1977): 63-69
23. **Hansen, D.:** Suxamethonium-induced cardiac arrest and death following 5 days of immobilization. *Eur J Anaesthesiol* 2 (1998): 240-241
24. **Hermans, G., Agten, A., Testelmans, D., Decramer, M., Gayan-Ramirez, G.:** Increased duration of mechanical ventilation is associated with decreased diaphragmatic force: a prospective observational study. *Crit Care* 4 (2010): 127
25. **Hoch, W., McConville, J., Helms, S., Newsom-Davis, J., Melms, A., Vincent, A.:** Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 3 (2001): 365-368
26. **Hopf, C., Hoch, W.:** Agrin binding to alpha-dystroglycan. Domains of agrin necessary to induce acetylcholine receptor clustering are overlapping but not identical to the alpha-dystroglycan-binding region. *J Biol Chem* 9 (1996): 5231-5236
27. **Hughes, M., Grant, I. S., Biccard, B., Nimmo, G.:** Suxamethonium and critical illness polyneuropathy. *Anaesth Intensive Care* 6 (1999): 636-638
28. **Iverson, L. I., Mittal, A., Dugan, D. J., Samson, P. C.:** Injuries to the phrenic nerve resulting in diaphragmatic paralysis with special reference to stretch trauma. *Am J Surg* 2 (1976): 263-269
29. **Jaber, S., Petrof, B. J., Jung, B., Chanques, G., Berthet, J. P., Rabuel, C., Bouyabrine, H., Courouble, P., Koechlin-Ramonatxo, C., Sebbane, M., Similowski, T., Scheuermann, V., Mebazaa, A., Capdevila, X., Mornet, D., Mercier, J., Lacampagne, A., Philips, A., Matecki, S.:** Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 3 (2010): 364-371
30. **Jin, T. E., Wernig, A., Witzemann, V.:** Changes in acetylcholine receptor function induce shifts in muscle fiber type composition. *FEBS J* 9 (2008): 2042-2054
31. **Kelley, W. O.:** Phrenic nerve paralysis; special consideration of the accessory phrenic nerve. *J Thorac Surg* 6 (1950): 923-928
32. **Kim, N., Burden, S. J.:** MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nat Neurosci* 1 (2008): 19-27
33. **Kues, W. A., Sakmann, B., Witzemann, V.:** Differential expression patterns of five acetylcholine receptor subunit genes in rat muscle during development. *Eur J Neurosci* 6 (1995): 1376-1385
34. **Kugelberg, E., Edstrom, L., Abbruzzese, M.:** Mapping of motor units in experimentally reinnervated rat muscle. Interpretation of histochemical and atrophic fibre patterns in neurogenic lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 3 (1970): 319-329
35. **Levine, S., Nguyen, T., Taylor, N., Friscia, M. E., Budak, M. T., Rothenberg, P., Zhu, J., Sachdeva, R., Sonnad, S., Kaiser, L. R., Rubinstein, N. A., Powers, S. K., Shrager, J. B.:** Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med* 13 (2008): 1327-1335
36. **Liu, Y., Padgett, D., Takahashi, M., Li, H., Sayeed, A., Teichert, R. W., Olivera, B. M., McArdle, J. J., Green, W. N., Lin, W.:** Essential roles of the acetylcholine receptor gamma-subunit in neuromuscular synaptic patterning. *Development* 11 (2008): 1957-1967
37. **Loukas, M., Kinsella, C. R., Jr., Louis, R. G., Jr., Gandhi, S., Curry, B.:** Surgical anatomy of the accessory phrenic nerve. *Ann Thorac Surg* 5 (2006): 1870-1875
38. **Ma, J., Shen, J., Garrett, J. P., Lee, C. A., Li, Z., Elsaidi, G. A., Ritting, A., Hick, J., Tan, K. H., Smith, T. L., Smith, B. P., Koman, L. A.:** Gene expression of myogenic regulatory factors, nicotinic acetylcholine receptor subunits, and GAP-43 in skeletal muscle following denervation in a rat model. *J Orthop Res* 11 (2007): 1498-1505

39. **Martyn, J. A., Fagerlund, M. J., Eriksson, L. I.:** Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia* (2009): 1-9
40. **Martyn, J. A., Richtsfeld, M.:** Succinylcholine-induced hyperkalemia in acquired pathologic states: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology* 1 (2006): 158-169
41. **Martyn, J. A., White, D. A., Gronert, G. A., Jaffe, R. S., Ward, J. M.:** Up-and-down regulation of skeletal muscle acetylcholine receptors. Effects on neuromuscular blockers. *Anesthesiology* 5 (1992): 822-843
42. **McCarthy, M. P., Earnest, J. P., Young, E. F., Choe, S., Stroud, R. M.:** The molecular neurobiology of the acetylcholine receptor. *Annu Rev Neurosci* (1986): 383-413
43. **McCaul, J. A., Hislop, W. S.:** Transient hemi-diaphragmatic paralysis following neck surgery: report of a case and review of the literature. *J R Coll Surg Edinb* 3 (2001): 186-188
44. **McMahan, U. J.:** The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (1990): 407-418
45. **Merino-Ramirez, M. A., Juan, G., Ramon, M., Cortijo, J., Morcillo, E. J.:** Diaphragmatic paralysis following minor cervical trauma. *Muscle Nerve* 2 (2007): 267-270
46. **Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., Sakmann, B.:** Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 6068 (1986): 406-411
47. **Miyata, H., Zhan, W. Z., Prakash, Y. S., Sieck, G. C.:** Myoneural interactions affect diaphragm muscle adaptations to inactivity. *J Appl Physiol* 5 (1995): 1640-1649
48. **Nayak, S. R., Krishnamurthy, A., Prabhu, L. V., Ramanathan, L., Pai, M. M., Potu, B. K., Das, S.:** Incidence of accessory phrenic nerve and its clinical significance: a cadaveric study. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 3 (2008): 181-184
49. **Robaux, S., Bouaziz, H., Boisseau, N., Raucoules-Aime, M., Laxenaire, M. C.:** Persistent phrenic nerve paralysis following interscalene brachial plexus block. *Anesthesiology* 6 (2001): 1519-1521
50. **Salpeter, M. M., Loring, R. H.:** Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol* 4 (1985): 297-325
51. **Sander, A., Hesser, B. A., Witzemann, V.:** MuSK induces in vivo acetylcholine receptor clusters in a ligand-independent manner. *J Cell Biol* 7 (2001): 1287-1296
52. **Sassoon, C. S., Caiozzo, V. J., Manka, A., Sieck, G. C.:** Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation. *J Appl Physiol* 6 (2002): 2585-2595
53. **Shanely, R. A., Zergeroglu, M. A., Lennon, S. L., Sugiura, T., Yimlamai, T., Enns, D., Belcastro, A., Powers, S. K.:** Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 10 (2002): 1369-1374
54. **Shindoh, C., Hida, W., Kurosawa, H., Ebihara, S., Kikuchi, Y., Takishima, T., Shirato, K.:** Effects of unilateral phrenic nerve denervation on diaphragm contractility in rat. *Tohoku J Exp Med* 3 (1994): 291-302
55. **Shyng, S. L., Salpeter, M. M.:** Degradation rate of acetylcholine receptors inserted into denervated vertebrate neuromuscular junctions. *J Cell Biol* 2 (1989): 647-651
56. **Strochlic, L., Cartaud, A., Cartaud, J.:** The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: new partners, new functions. *Bioessays* 11 (2005): 1129-1135
57. **Tawa, N. E., Jr., Odessey, R., Goldberg, A. L.:** Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest* 1 (1997): 197-203
58. **Turner, M. R., Lawrence, H., Arnold, I., Ansorge, O., Talbot, K.:** Catastrophic hyperkalaemia following administration of suxamethonium chloride to a patient with undiagnosed amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Med* 3 (2011): 292-293
59. **Valenzuela, D. M., Stitt, T. N., DiStefano, P. S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D. L., Nunez, L., Park, J. S., Stark, J. L., Gies, D. R., et al.:** Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* 3 (1995): 573-584
60. **Witzemann, V., Brenner, H. R., Sakmann, B.:** Neural factors regulate AChR subunit mRNAs at rat neuromuscular synapses. *J Cell Biol* 1 (1991): 125-141
61. **Witzemann, V., Schwarz, H., Koenen, M., Berberich, C., Villarroel, A., Wernig, A., Brenner, H. R., Sakmann, B.:** Acetylcholine receptor epsilon-subunit deletion causes muscle weakness and atrophy in juvenile and adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 23 (1996): 13286-13291

62. **Wolff, A. C., Hammond, M. E., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P. L., Hanna, W. M., Langer, A., McShane, L. M., Paik, S., Pegram, M. D., Perez, E. A., Press, M. F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S. E., Tubbs, R., Vance, G. H., van de Vijver, M., Wheeler, T. M., Hayes, D. F.:** American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1 (2007): 18-43
63. **Yampolsky, P., Pacifici, P. G., Witzemann, V.:** Differential muscle-driven synaptic remodeling in the neuromuscular junction after denervation. *Eur J Neurosci* 4 (2010): 646-658
64. **Yang, X., Arber, S., William, C., Li, L., Tanabe, Y., Jessell, T. M., Birchmeier, C., Burden, S. J.:** Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* 2 (2001): 399-410
65. **Young, R. L., Page, A. J., Cooper, N. J., Frisby, C. L., Blackshaw, L. A.:** Sensory and motor innervation of the crural diaphragm by the vagus nerves. *Gastroenterology* 3 (2010): 1091-1101
66. **Zhan, W. Z., Miyata, H., Prakash, Y. S., Sieck, G. C.:** Metabolic and phenotypic adaptations of diaphragm muscle fibers with inactivation. *J Appl Physiol* 4 (1997): 1145-1153

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Manfred Blobner für die Übernahme in die Arbeitsgruppe „Muskelrelaxantien und neuromuskuläre Transmission“ und die damit verbundene Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit an der Klinik für Anaesthesiologie an der Technischen Universität München bedanken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. Heidrun Fink für die Übernahme meiner Doktorarbeit, die sowohl fachlich kompetente als auch sehr warmherzige Betreuung, die schnellen Korrekturen sowie die stete Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Fragen.

Mein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Dr. Christopher Kramer für die intensive Betreuung während meiner gesamten wissenschaftlichen Arbeit. Das Einarbeiten in die Methodik, die sofortige Hilfe bei etwaigen Problemen, aber auch das freundliche und kollegiale Verhältnis zueinander waren eine große Stütze für mich. Zudem bedanke ich mich aufrichtig für die vielfältigen und geduldigen Korrekturarbeiten.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern der Klinik und insbesondere bei Frau Dr. Kristine Kellermann für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben.