

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

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Untersuchung zur
Rolle spannungsabhängiger Calciumkanäle
bei der Regulation der VIP- Freisetzung und NO-Synthese
in enterischen Neuronen**

Monika Schwarz

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. M. Kurjak
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 12.09.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht, und durch die Fakultät für Medizin am 21.11.2007 angenommen.

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen,
das möglichste getan hat.“

Goethe, ‚Italienische Reise‘, Zweiter Teil (16. März 1787)

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

<u>1.</u>	<u>Einleitung</u>	1
<u>2.</u>	<u>Material und Methoden</u>	3
2.1.	<u>Tierversuch</u>	3
2.1.1.	Präparation	3
2.1.1.1.	Versuchstiere	3
2.1.1.2.	Versuchsdurchführung	3
2.1.1.2.1.	Gewebe- und Membranpräparationstechnik	3
2.1.1.2.2.	Differentielle Zentrifugation des Gewebehomogenisats	4
2.2.	<u>Analytische Techniken</u>	4
2.2.1.	Proteinbestimmung	4
2.2.2.	Bestimmung der VIP- Immunoreaktivität	4
2.2.3.	Bestimmung der NO- Synthase- Aktivität	5
2.3.	<u>Verwendete Substanzen</u>	5
2.4.	<u>Versuchsauswertung</u>	6
<u>3.</u>	<u>Ergebnisse</u>	8
3.1.	<u>Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)</u>	8
3.1.1.	VIP-Freisetzung aus isolierten Synaptosomen	8
3.1.2.	Beeinflussung der VIP-Freisetzung durch subtypspezifische Calciumkanalblocker	9
3.1.3.	Beeinflussung der K ⁺ - induzierten VIP- Freisetzung durch verschiedene Transmitter	13
3.1.4.	Beeinflussung der durch exogen zugeführtes NO ausgelösten VIP- Freisetzung durch subtypspezifische Calciumkanalblocker	15
3.2	<u>Stickstoffmonoxid- Synthase (NOS)</u>	16
3.2.1	Beeinflussung der NOS- Aktivität durch subtypspezifische Calciumkanalblocker	16
3.2.2	Beeinflussung der NOS- Aktivität durch verschiedene Transmitter	17
3.2.3	Beeinflussung der NOS- Aktivität durch einen Rezeptor- aktivierten Calciumeinstrom	19

4.	<u>Allgemeine Diskussion</u>	20
4.1.	<u>Aufbau des enterischen Nervensystems und Regulation der Darmmotilität</u>	20
4.2.	<u>Die nicht- adrenerge, nicht- cholinerge (NANC) Transmission des enterischen Nervensystems</u>	27
4.2.1.	Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) im enterischen Nervensystem	29
4.2.1.1.	VIP- Synthese und Signaltransduktionswege im Rahmen der inhibitorischen NANC- Transmission	29
4.2.1.2.	Rolle des VIP bei der inhibitorischen NANC- Transmission des enterischen Nervensystem	31
4.2.2.	Stickstoffmonoxid (NO) im enterischen Nervensystem	32
4.2.2.1.	Isoformen der NO- Synthase (NOS) und deren funktionelle Bedeutung	32
4.2.2.2.	NO- Synthese und Beeinflussung durch Kofaktoren	34
4.2.2.3.	NO- Signaltransduktionswege im Rahmen der inhibitorischen NANC- Transmission	35
4.2.2.4.	Rolle des NO in der inhibitorischen NANC- Transmission des enterischen Nervensystems	37
4.2.3.	Klinische Relevanz der NANC- Neurotransmission bei gastrointestinalen Krankheitsbildern	38
4.3.	<u>Spannungsabhängige Calciumkanäle</u>	41
4.3.1.	Charakterisierung der Subtypen der spannungsabhängigen Calciumkanäle	42
4.3.1.1.	Pharmakologische Charakterisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle	42
4.3.1.2.	Elektrophysiologische Charakterisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle	45
4.3.1.3.	Molekularbiologische Charakterisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle	47
4.3.2.	Beeinflussung spannungsabhängiger Calciumkanäle durch intrazelluläre Moleküle	53
4.3.3.	Mechanismus der Transmitterfreisetzung durch spannungsabhängige Calciumkanäle	53
4.3.4.	Spannungsabhängige Calciumkanäle innerhalb des enterischen Nervensystems	57
4.3.5.	Allgemeine Pathologie der spannungsabhängigen Calciumkanäle	60

<u>5.</u>	<u>Spezielle Diskussion</u>	62
5.1.	<u>Synaptosomenmodell</u>	62
5.2.	<u>Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle bei der Freisetzung von VIP und der NO- Synthese an enterischen Synaptosomen</u>	63
5.2.1.	Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom N- Typ	64
5.2.2.	Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom P- und vom Q- Typ	67
5.2.3.	Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L- Typ	69
5.2.4.	Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom T- Typ	71
5.2.5.	Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom R- Typ	72
5.2.6.	Charakterisierung des Einflusses Kalium- Depolarisations- induzierter indirekter Mechanismen	73
5.2.7.	Beeinflussung der NOS- Aktivität durch einen Rezeptor- aktivierten Calciumeinstrom	77
5.2.8.	Beeinflussung der durch exogen zugeführtes NO ausgelösten VIP- Freisetzung durch subtypspezifische Calciumkanalblocker	78
<u>6.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	82
<u>7.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	84
<u>8.</u>	<u>Danksagung</u>	116
<u>9.</u>	<u>Lebenslauf</u>	117

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	Seite
Abb.1: Charakterisierung der VIP- Freisetzung aus isolierten Synaptosomen des Dünndarms der Ratte	9
Abb.2: Effekt der Subtyp- spezifischen Calciumkanalblocker ω - AgaTx- IVA Und ω - CTx- GVIA auf die basale VIP- Freisetzung	10
Abb.3: Zeitverlauf der Hemmung der K^+ - induzierten VIP- Freisetzung durch Calciumkanalblocker	11
Abb.4: Effekt der Subtyp- spezifischen Calciumkanalblocker auf die K^+ - induzierte VIP- Freisetzung	12
Abb.5: Effekt der subtypspezifischen Calciumkanalblocker auf die Aktivität der NOS	17
Abb.6: Anatomischer Aufbau des enterischen Nervensystems	22
Abb.7: Schematische Darstellung der Verknüpfung enterischer Neurone	24
Abb.8: Schematische Darstellung der VIP- Signalkaskade zur Relaxation der intestinalen Muskulatur	30
Abb.9: Rolle der Kofaktoren der NOS	34
Abb.10: Schematische Darstellung der NO- Signalkaskade zur Relaxation der intestinalen Muskulatur	36
Abb.11: Abbildung der Meeresschnecke Conus geographicus	43
Abb.12: Schematische Darstellung des Aufbaus spannungsabhängiger Calciumkanäle	47
Abb.13: Schematische Darstellung der α 1-Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle	48
Abb.14: Schematische Darstellung des SNARE- Komplexes bei der calciumabhängigen Vesikelexozytose	54
Abb.15.: Schematische Darstellung des Aufbaus des SNARE- Komplexes	55

<u>Tabellenverzeichnis</u>	Seite
Tab. 1: Effekt der exzitatorischen Transmittersubstanzen Carbachol und Substanz P auf die VIP Freisetzung aus enterischen Synaptosomen	14
Tab. 2: Effekt der Agonisten der μ -, δ - und κ - Opioid- Rezeptoren, Endomorphin-1, DPDPE and U-50488, auf die VIP Freisetzung aus enterischen Synaptosomen	15
Tab. 3: Effekte von Carbachol und Substanz P auf die Aktivität der NOS in enterischen Synaptosomen	18
Tab. 4: Effekte der Agonisten der μ - , δ - , und κ - Opioid- Rezeptoren, Endomorphine-1, DPDPE und U-50488 auf die Aktivität der NOS in enterischen Synaptosomen	19
Tab. 5: Wichtige Neurotransmitter des enterischen Nervensystems	26
Tab. 6: Isoformen der NOS und deren Lokalisation	33
Tab. 7: Calciumkanalblocker der einzelnen Calciumkanalsubtypen in den jeweiligen üblicherweise verwendeten Konzentrationen	45
Tab. 8: Übersicht der Klassifikationen spannungsabhängiger Calciumkanäle	52

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AgaTx	Agatoxin
AH	Nachhyperpolarisation
AHP	Nachhyperpolarisationsphase
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BTZ	Benzothiazepine
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAK	cAMP- abhängige Proteinkinase
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches AMP
CCH	Carbachol
cGMP	3'5'cyclischen Guanosinmonophosphats
CM	Zirkuläre Muskulatur
CO ₂	Kohlendioxid
CTx	Conotoxin
DHP	Dihydropyridinderivate
EGTA	Na ⁺ - Äthylenglycol-bis-(\square -AminoÄthylether)-N,N,N,N'-
ENS	Enterisches Nervensystem
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GABA	Gammaaminobuttersäure
GC-S	lösliche Guanylatzyklase
GÖR	Gastroösophageale Reflux
GRF	Gastrin releasing Factor
5HT	Serotonin
HVA	„High-voltage-activated“ (Calciumkanal)
IJP	Inhibitorische Synaptische Potentiale
IPANs	Intrinsisch Primär Afferente Neuronen
LM	Longitudinale Muskulatur
LM/MP	Longitudinale Muskulatur mit myenterischem Plexus
LVA	“Low voltage activated”
MMC	Migrierender Myoelektrischer Komplex
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure

MP	Myenterischer Plexus
NANC	nicht- adrenerg, nicht –cholinerg
Ni ²⁺	Nickel
eNOS	endotheliale NOS
iNOS	induzierbare NOS
nNOS	neuronale NOS
NPY	Neuropeptide Y
oxy- Hb	Oxyhämoglobin
PAA	Phenylalkylamine
PACAP	Pituitary adenylate cyclase peptide
PDZ	PSD-95/Dlg/ZO-1-kodierte Domäne eines Membranabschnitts
PDE	Phosphodiesterase
PHI	Peptid Histidine Isoleucin
PYY	Peptide YY
PKA	Proteinkinase A
PKG	cGMP abhängige Proteinkinase
RIA	Radioimmunoassay
SGC	lösliche Guanylatcyclase
SMP	Submuköser Plexus
SP	Substanz P
VDCC	“Voltage-dependent-calcium-channel” : Spannungsabhängiger Calciumkanal
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

1. Einleitung

Das Enterische Nervensystem des Gastrointestinaltrakts bildet zusammen mit dem parasympathischen und dem sympathischen Nervensystem das autonome Nervensystem (Langley 1921, Gershon 1981). Es stellt dabei eine komplexe, funktionell unabhängige Einheit dar. Die Regulation des enterischen Nervensystems erfolgt über intrinsische Neurone deren Zellkörper in den Ganglien des myenterischen (Auerbach-) und des submukösen (Meissner-) Plexus liegen. Informationsaustausch findet auch über Nervenfasern des extrinsischen Nervensystems durch die beiden Nervi vagi und die Nn. Sympathici statt. So entstehen Regelkreise und Vernetzungen zwischen sensorischen Nerven, Interneuronen, exzitatorischen und inhibitorischen Motoneuronen, die durch ihre außergewöhnlichen Eigenschaften dem enterischen Nervensystem auch die Bezeichnung als „brain in the gut“ verliehen haben (Gershon 1999). Die Steuerung der Durchblutung des Darms gehört ebenso zu den Aufgaben des enterischen Nervensystems (ENS) wie die Abwehr von Krankheitserregern und Anpassung bei entzündlichen Prozessen durch neuroimmunologische Vorgänge. Eine weitere Funktion des enterischen Nervensystems ist die koordinierte Motilität als Voraussetzung für Nahrungsaufnahme, Passage und Resorption der Nahrungsbestandteile und für die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes. Der peristaltische Reflex ergibt durch eine Koordination oral kontrahierender und aboral relaxierender Mechanismen eine wellenförmige Bewegung und wird durch die Verschaltung der unterschiedlichen Neurone ermöglicht. Der Reflex führt hauptsächlich über cholinerge Neurone oral zur Kontraktion, und in aboraler Richtung durch nicht-adrenerge, nicht-cholinerge (NANC) Neurone zu einer Relaxation. Die wichtigsten erregenden – damit kontrahierenden - Transmitter der glatten Muskulatur sind Acetylcholin (ACh) und Substanz P (SP). Als wichtigste hemmende Transmitter, also zur Erschlaffung der glatten Muskulatur beitragend, gelten Stickstoffmonoxid (NO) und das Vasoaktive intestinale Peptid (VIP).

Calciumströme durch die Zellmembran über spannungsabhängige oder Ligandengesteuerte Calciumkanäle spielen eine entscheidende Rolle für die Regulierung der synaptischen Erregbarkeit und der Freisetzung von Neurotransmittern (Smith 2003). Die spannungsabhängigen Calciumkanäle werden aufgrund ihrer Eigenschaften in L-, N-, P-, Q-, R- und T- Subtypen unterteilt: Innerhalb des enterischen Nervensystems konnten verschiedener Calciumkanalsubtypen nachgewiesen, und mit Hilfe der Immunhistochemie genauer bezüglich der Verteilung dieser Subtypen lokalisiert werden.

Von besonderem Interesse bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit waren die inhibitorischen Transmitter NO und VIP, deren Freisetzungen aus enterischen Nervenendigungen in engem Zusammenhang mit Veränderungen des intrazellulären Calciumspiegels stehen.

Am Modell der Ratte ermöglicht die Präparation isolierter Synaptosomen aus dem myenterischen Plexus des Dünndarms der Ratte die Untersuchung der komplexen Regulation der inhibitorischen Transmission innerhalb des enterischen Nervensystems. Synaptosomen setzen sich aus abgetrennten Nervenendigungen mit Synapsenbläschen, Mitochondrien und weiteren zytosolischen Bestandteilen zusammen (Whittaker 1964). Durch Ausbildung von Plasmamembranen entstehen abgeschlossene Synaptosome, die in der Lage sind unter bestimmten Voraussetzungen Stoffwechselforgänge wie die Transmitterausschüttung und Zellatmung über einen gewissen Zeitraum aufrecht zu erhalten (Campbell 1976, De Belleruche 1972). So werden Untersuchungen der intra- und subzellulären Mechanismen der Transmitterfreisetzung ohne störende Einflüsse aus dem komplexen enterischen Netzwerk ermöglicht.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war:

- 1) diejenigen spannungsabhängigen Calciumkanäle zu charakterisieren, welche die Freisetzung von VIP nach K^+ - induzierter Depolarisation sowie nach Stimulation durch NO aus den enterischen Nervenendigungen regulieren, und ebenso
- 2) die Rolle der genannten Calciumkanäle bei der NO- Produktion durch die neuronale NO- Synthase (NOS), sowie eine Beteiligung Liganden- gesteuerter Calciumkanäle an der enterischen neuronalen NOS- Aktivität zu beschreiben, und weiterhin
- 3) mögliche indirekte Einflüsse der spannungsabhängigen Calciumkanäle über eine K^+ - Depolarisations- bedingte, und Calciumkanal- abhängige Freisetzung weiterer Transmitter des enterischen Nervensystems, wie Acetylcholin, Substanz P oder die Opiode auf die Freisetzung von VIP oder NO zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuch

2.1.1. Präparation

2.1.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden jeweils 5 männliche Wistar Ratten à 180-200 g verwendet (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten und ca. 12 h vor Versuchsbeginn erhielten sie keine feste Nahrung mehr. Zur Narkotisierung der Ratten wurde CO₂ in den Käfig geschleust, anschließend wurden sie durch Dekapitation getötet.

2.1.1.2. Versuchsdurchführung

2.1.1.2.1. Gewebe- und Membranpräparationstechnik

Über einen abdominalen Längsschnitt wurde der Dünndarm bis ca. 1-2 cm vor der Ileocoecalklappe entnommen, und sofort in vorgekühlte (4° C) Pufferlösung (25 mM 3-N-Morpholino-Propansulfonsäure (MOPS), pH:7,4, 10 mM MgCl₂, 8% w/v Saccharose) gelegt. Die weiteren präparativen Schritte fanden bei 0- 4°C statt.

Anschließend wurde der Darm in 5-8 cm lange Segmente geteilt, am Mesenterialansatz aufgeschnitten und auf einer Dissektionsplatte mit der Mukosaseite nach oben fixiert, so dass Mukosa, Submukosa und Faeces dann vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt werden konnten. Die anfallenden Muskulaturstücke wurden sofort wieder in frische Pufferlösung gegeben. Nach diesem Präparationsschritt wurden die gesammelten Darmstücke durch ein Sieb gelassen. Die verbleibende Feuchtmasse wurde abgewogen und die 8-fache Menge an Inhibitorenpufer (200 ml MOPS, 10mM Pepstatin, 100µM Thiorphan, 50µM PMSF, 1mM Dithiotreitol, 0,5µM Trypsininhibitor und 1mM Captopril) zugesetzt. Mit einer Schere wurden nun die in dem Becher mit der Pufferlösung befindlichen Darmstücke ausgiebig zerkleinert und anschließend mit einem Polytron-PT-10-35-Homogenizer (Kinematik) bei ca. 1500 rpm 3x 5 sec auf Eis homogenisiert. Dabei waren zusätzlich kurze Pausen zur Kühlung des Suspensats auf Eis erforderlich, um eine Überhitzung der Membranen zu vermeiden.

2.1.1.2.2. Differentielle Zentrifugation des Gewebehomogenisats

Das Homogenisat wurde zweimal in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 800 g (3000rpm) jeweils für 10 min zentrifugiert. Nach dem ersten Schritt wurde eine Komresse als Sieb für ein auf der Oberfläche schwimmendes, aus Kollagenfasern bestehendes Konglomerat verwendet. Dieses, und das entstandene Sediment wurden verworfen, der Überstand wurde gesammelt, und nach dem zweiten Schritt als sogenannte PNS-Fraktion (post nuclear supernatant) wiederum bei 3500 g für 10 min zentrifugiert, um die ungereinigte Fraktion (P1) zu erhalten. Der verbleibende Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge bei 100000 g über 90 min rezentrifugiert. Das erhaltene Pellet (ungereinigte mikrosomale Fraktion MIC 1) wurde mit einer Pasteurpipette und wenig MOPS- Puffer resuspendiert, mit dem Hand- Homogenisator vorsichtig homogenisiert und anschließend 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Das hierbei entstandene Pellet, und der Überstand stellen die angereicherte synaptosomale Fraktion (P2) und die mikrosomale Fraktion 2 (MIC2) dar.

Das Pellet wurde wie vorher beschrieben homogenisiert und in einem Messzylinder auf mit der benötigten Menge MOPS- Puffer auf ein Endvolumen von 20-25 ml verdünnt.

2.2. Analytische Techniken

2.2.1. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford Test (Bradford, 1976) mit Rinder Serum Albumin als Standard bestimmt. Das Prinzip dieser Methode ist eine Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine und damit eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Farbe (465 nm ohne Protein, 595nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

2.2.2. Bestimmung der VIP- Immunoreaktivität

Die VIP- Immunoreaktivität wurde mit einem gegen VIP vom Schwein gerichteten Antikörper über einen Radioimmunoassay (RIA) bestimmt.

Der VIP-Antikörper (100µl), VIP-Standard (100µl) beziehungsweise die jeweiligen Proben (100µl) und 100µl des ¹²⁵I-VIP (1fmol) wurden in 0,6% BSA (=Rinderalbumin) enthaltendem 0,06M Phosphat EDTA- Puffer (pH 7,2) bei 4°C für einen Zeitraum von

96h inkubiert. Die Trennung der gebundenen und der ungebundenen Proteinmoleküle erfolgte über die Zugabe von 500µl einer Dextran vorbehandelten Aktivkohle. Diese wurde in einem 0,25% Gelatine enthaltendem Puffer aufgelöst. Das Detektionslimit des Assays betrug 5 fmol/ml.

2.2.3. Bestimmung der NO- Synthase- Aktivität

Nach Isolierung und Anreicherung der Synaptosomen aus dem myenterischen Plexus wurde die Aktivität der NOS durch die enzymatische Umwandlung von [³H]-L- Arginin in [³H]-L-Citrullin bestimmt. Das Synaptosomensuspendat wurde mit den unten aufgeführten Kofaktoren, den jeweiligen Testsubstanzen und [³H]-L-Arginin (circa 500000 dpm, 68 Ci/mmol) in einem Endvolumen von 800 µl im Wasserbad bei 37°C über 15 min inkubiert.

Die verwendeten Konzentrationen für die Kofaktoren betragen 1 mM β-NADPH, 4 µM FMN, 4 µM FAD, 2 mM CaCl₂, 1 µM Calmodulin und 0.1 µM BH₄.

β-NADPH diente als Starter der Reaktion und wurde unmittelbar vor der Inkubation und der Zugabe von [³H]-L- Arginin pipettiert. Nach der Inkubation im Warmwasserbad wurde die Reaktion durch unmittelbares Erhitzen bis 90°C für 6 min im kochenden Wasser gestoppt und mit 1 ml 1 mM L- Arginin und 1 mM L- Citrullin- Lösung versetzt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 2500 g zentrifugiert und der Überstand auf mit 1 g Dowex AG50W-X8-Resin gefüllte Poly- Prep- Chromatographiesäulen gegeben. Durch die Ionenaustausch-chromatographie erfolgte eine Trennung von [³H]-L- Citrullin und [³H]-L- Arginin. [³H]-L- Citrullin wurde mit 1.5 ml destilliertem Wasser ausgewaschen und in Szintillationsröhrchen aufgefangen. Nach Zugabe von 3 ml Szintillationsflüssigkeit erfolgte die Messung der Radioaktivität in einem Beckman LS 3801 Spektrometer.

2.3. Verwendete Substanzen

- Alexis (San Diego USA): Ω- agatoxin IVA
- Alomone labs (Jerusalem Israel): Ω- conotoxin GVIA, Ω- conotoxin MVIIC
- Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg): ¹²⁵I- VIP, L- [³H] Arginin

- Bachem (Heidelberg): (D-Lys(nicotinoyl)¹,β-(3-pyridyl)-Ala³,3,4,dichloro-D-Phe⁵-Asn⁶-D-Trp^{7,9},Nle¹¹)-Substanz P (Spantide)
- Bio-Rad (München): Dowex AG50W-X8-Resin (Na⁺-Form), Poly-Prep-Chromatographiesäulen
- Calbiochem (La Jolla USA): Atropinsulfat, Glutathion, NMDA
- Fluka (Buchs, Schweiz): Cadmiumsulfat, DL- Thiorphan
- ICN Biomedicals (Meckenheim): Endomorphin1
- Research Biochemicals Int. (Natick, MA, USA.): BayK 8644,
- Serva (Heidelberg): PMSF, (Aktivkohle, Dextran vorbehandelt)
- Sigma (München): CaCl₂, Calmodulin, Carbachol, Citrullin, Coomassie brilliant blue G-250, Dithiotreitol, [D-penicillamine(2,5)] enkephalin (DPDPE), EGTA, FAD, FMN, Galanin, L- Glutamin- Säure, und Naloxon, PACAP, Pepstatin A, β-NADPH, Substanz P, BH₄, Trypsininhibitor, VIP
- Tocris (Ballwin USA): ACBC (1-Aminocyclobutanecarboxylic-Säure), DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin) und SCH 50911,
- Upjohn, (Kalamazoo, USA.): U-50488
- Zinsser Analytik (Frankfurt): Szintillationsflüssigkeit

Isradipin wurde freundlicherweise von Prof. F. Hofmann, Pharmakologisches Institut der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt.

2.4. Versuchsauswertung

Zum Vergleich der Mittelwerte wurde die ANOVA- Varianzanalyse für wiederholte Messungen und ein post hoc Test (Bonferroni-Holms) (Sigma Stat, Jandel) eingesetzt. Ergebnisse mit $P \leq 0.05$ wurden als signifikant gewertet. Die Daten der Enzymaktivitäten und der Freisetzungsversuche sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung der Mittelwerte angegeben. Die Anzahl unabhängiger Versuche der verschiedenen Experimente von unterschiedlichen Präparationen sind in n ausgedrückt, wobei für jeweils eine Synaptosomenpräparation 5 Tiere verwendet

wurden. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Beim Vergleich von zwei Mittelwerten, beispielweise „Basal“ und „Rezeptorantagonist“ wurde ein gepaarter t-Test angewendet.

3. Ergebnisse

3.1. Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)

3.1.1 VIP Freisetzung aus isolierten Synaptosomen

An den wie zuvor beschrieben präparierten Synaptosomen des Dünndarms der Ratte wurde zuerst die VIP- Freisetzung unter verschiedenen Bedingungen getestet. Zum einen wurde der Einfluss einer Depolarisation durch K^+ (65 mM) auf die basale VIP-Freisetzung, zum anderen indirekt der Einfluss von Calcium sowohl auf die basale als auch auf die VIP-Freisetzung nach K^+ - induzierter Depolarisation untersucht.

Verglichen mit der basalen VIP-Freisetzung konnte nach Depolarisation durch K^+ (65 mM) eine signifikante Zunahme der Freisetzung von VIP gezeigt werden. Nun war von Interesse inwiefern diese beiden - also einerseits die unstimulierte basale, andererseits die nach K^+ - Stimulation gesteigerte VIP-Freisetzung- von der Präsenz extrazellulären Calciums abhängig sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurden beide Freisetzungen in EGTA (0,5mM) enthaltendem calciumfreien Medium durchgeführt. Es zeigten sich in den Untersuchungen sowohl eine Abnahme der K^+ - induzierten VIP-Freisetzung, als auch eine signifikante Reduzierung der basalen VIP-Freisetzung um 40%. Zwischen der basalen VIP-Freisetzung und der nach K^+ - induzierter Depolarisation beobachteten VIP-Freisetzung trat unter jeweils calciumfreien Bedingungen kein signifikanter Unterschied auf. Eine Abhängigkeit der basalen wie auch der K^+ - induzierten VIP-Freisetzung von extrazellulärem Calcium scheint daher gegeben (Abb. 1).

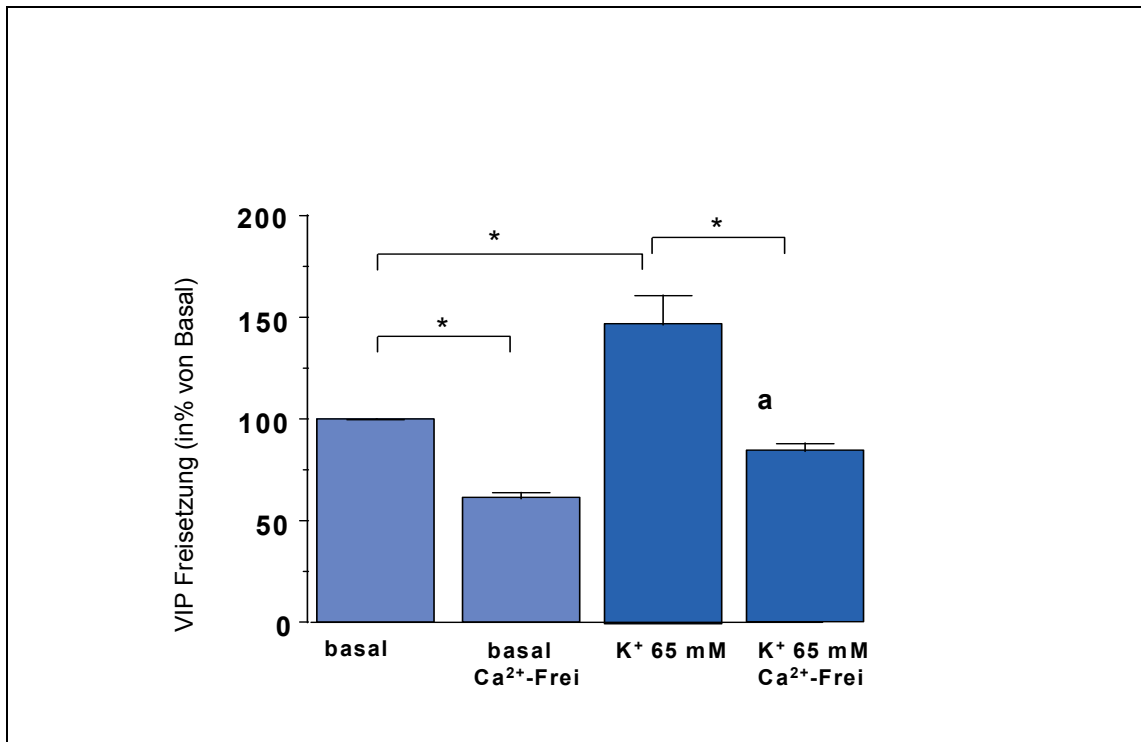


Abb. 1: Charakterisierung der VIP- Freisetzung aus isolierten Synaptosomen des Dünndarms der Ratte. Synaptosomen wurden nach Depolarisation durch K⁺ (65 mM) untersucht. Unter calciumfreien Bedingungen war sowohl die basale als auch die VIP- Freisetzung nach K⁺-Depolarisation signifikant reduziert (* = p<0,05). Kein signifikanter Unterschied trat unter jeweils calciumfreien Bedingungen zwischen der basalen- und der nach K⁺-induzierter VIP Freisetzung auf (a =nicht signifikant verglichen mit Basal/ Calciumfrei, n=5).

3.1.2. Beeinflussung der VIP- Freisetzung durch subtypspezifische Calciumkanalblocker

Der Nachweis einer Abhängigkeit sowohl der basalen als auch der K⁺- induzierten VIP-Freisetzung von extrazellulärem Calcium in den vorausgehenden Untersuchungen führte zu der Frage nach den potentiellen Eintrittswegen des Calciums, und damit zur Rolle der einzelnen spannungsabhängigen Calciumkanäle an der VIP-Freisetzung.

Um den Einfluss der jeweiligen Calciumkanal- Subtypen auf die basale VIP-Freisetzung zu bewerten, wurde zuerst eine Versuchsreihe mit spezifischen Calciumkanalblockern für N-, Q-, P-, L-, und R-/T- Calciumkanäle angesetzt. Die Calciumkanalblocker wurden in den für die einzelnen Subtypen spezifischen Konzentrationen untersucht.

Für Calciumkanäle vom N-Typ wurde ω-CTx- GVIA (10⁻⁶ M), für den Q- Typ ω-CTx-MVIIC (10⁻⁶ M), für den P- Typ ω- Agatx- IVA (3 x 10⁻⁸ M), für den L- Typ Calciumkanal

Isradipin ($10^{-8}M$) und für den Calciumkanal vom R- und vom T- Typ Nickel (Ni^{2+}) ($10^{-6}M$) verwendet. In den Untersuchungen der getesteten subtypspezifischen Calciumkanalblocker konnte nur über ω - Agatx- IVA - also über eine Blockierung des P- Typ- Calciumkanals - die basale VIP-Freisetzung signifikant gesenkt werden. Die durch diese Blockierung der P-Typ-Calciumkanäle erhaltene Reduzierung der basalen VIP Freisetzung ähnelt den Ergebnissen unter calciumfreien Bedingungen. Der P- Typ Calciumkanal scheint daher eine entscheidende Rolle bei der basalen VIP Freisetzung zu spielen (basal: 36.8 ± 3.9 pg/mg [=100%], ω - AgaTx- IVA: $86.5 \pm 8.8\%$, $P < 0.05$, $n = 6$). Keiner der anderen subtypspezifischen Calciumkanalblocker veränderte die basale VIP Freisetzung signifikant ([basal = 100%], + ω - CTx- GVIA : $122.1 \pm 12.1\%$, + ω - CTx- MVIIC: $140.6 \pm 23.6\%$, + Isradipin: $113.8 \pm 10.9\%$, + Ni^{2+} : $92.1 \pm 16.4\%$). (Abb. 2)

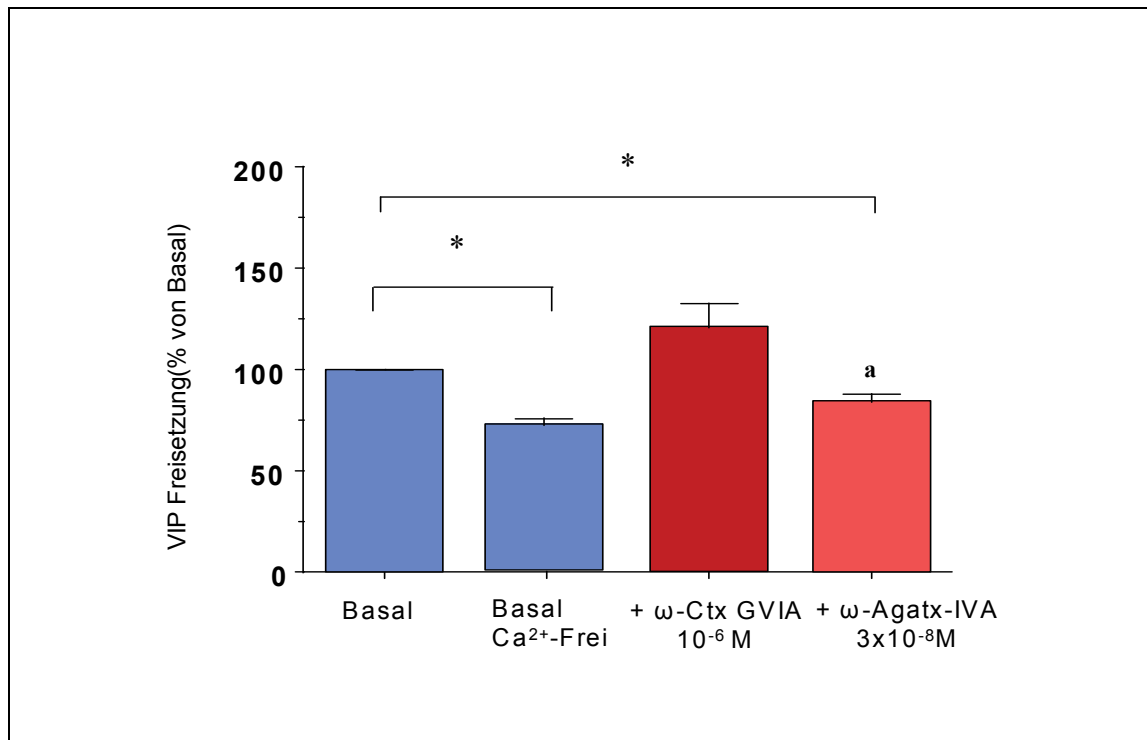


Abb. 2: Effekt der Subtypspezifischen Ca^{2+} Kanalblocker ω - AgaTx- IVA und ω - CTx- GVIA auf die basale VIP- Freisetzung: Die basale VIP Freisetzung wurde durch den P- Typ- Ca^{2+} Kanalblockers ω - Agatx- IVA gehemmt. Durch einen Blocker des N- Typ- Ca^{2+} Kanals- ω - CTx- GVIA- wurde keine Hemmung erreicht. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm S.E.M. bei einer unabhängigen Versuchszahl von $n=6$ in Doppelbestimmung ($p < 0,05$ verglichen mit dem Basalwert, nicht signifikant verglichen mit dem Basalwert unter calciumfreien Bedingungen)

Um wiederum den Einfluss der Calciumkanalblocker auf die K^+ - induzierte VIP-Freisetzung zu untersuchen, wurde zunächst der Zeitpunkt der maximalen Hemmung der eingesetzten Blocker ermittelt. Eine Versuchsreihe wurde zur Ermittlung der Zeitverläufe der Calciumkanalblockade durch die Calciumkanalblocker vom N-, P-, und L- Typ , also ω - CTx- GVIA, ω - Aga- IVA und Isradipin durchgeführt. Nach Inkubationszeiten von 0, 5, 15, und 20 Minuten mit den jeweiligen Calciumkanalblockern führten die Substanzen ω - CTx- GVIA (N-Typ-) und ω - Agatx- IVA (P-Typ- Ca^{2+} Kanalblocker) zu einer signifikanten Reduzierung der K^+ induzierten VIP-Freisetzung zeitabhängig mit einer maximalen Hemmung bei 15 min Inkubationszeit. Isradipin zeigte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die K^+ -induzierte VIP-Freisetzung. (Abb. 3)

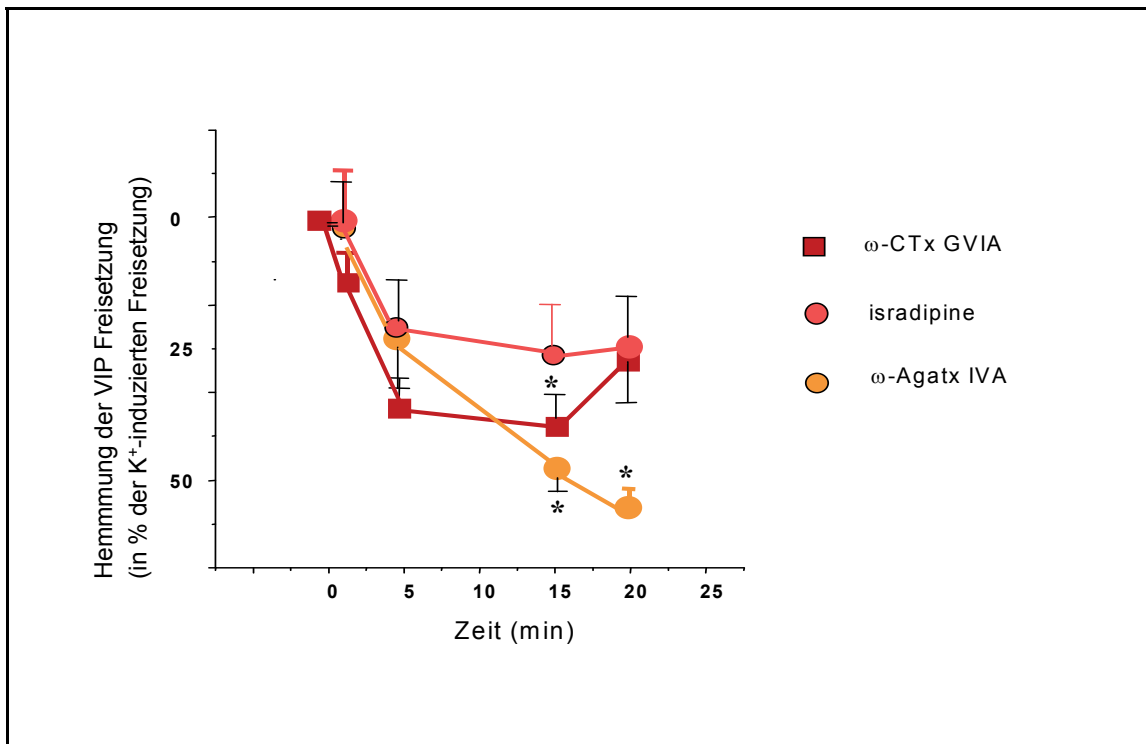


Abb. 3: Zeitverlauf der Hemmung der K^+ -induzierten VIP-Freisetzung durch Ca^{2+} -Kanalblocker
 Die maximale Hemmung der K^+ induzierten VIP Freisetzung wurde 15 min nach Zugabe der Ca^{2+} Kanalblocker vom N- und P- Typ ω - CTx- GVIA (10^{-6} M) und ω - Agatx- IVA(10^{-6} M) erreicht. Der L-Typ Blocker Isradipin (10^{-8} M) war wirkungslos. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm S.E.M. bei einer unabhängigen Versuchsanzahl von n = 3 in Doppelbestimmung ($p < 0,05$ verglichen mit dem Basalwert)

Nachdem eine Inkubation der Synaptosomen mit den N-/ und P-Typ Calciumkanalblockern nach einer Zeit von 15 Minuten die maximale Reduzierung der VIP- Freisetzung gezeigt hatte, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die K^+ - induzierte VIP-Freisetzung bei 15 min. Inkubationszeit durch die Blocker des N- Typ

Calciumkanäle ω -CTx- GVIA (10^{-6} M) und des P-Typ- Calciumkanals ω - Agatx- IVA (10^{-6} M) untersucht. Dabei wurde die K^{+} -induzierte VIP-Freisetzung durch ω -CTx- GVIA (10^{-6} M) signifikant um 25% und durch ω - Agatx- IVA (10^{-6} M) sogar um 50 % vermindert (basal: 183.1 ± 3.3 pg/mg [= 100%], K^{+} $168.6 \pm 7.2\%$, K^{+} + ω - CTx- GVIA 10^{-6} M: $152.0 \pm 5.4\%$, $P < 0.05$, $n = 5$; K^{+} + ω - AgaTx- IVA 3×10^{-8} M: $135.2 \pm 13.1\%$, $P < 0.05$, $n = 5$). Beide Calciumkanäle, sowohl der P-Typ, als auch der N-Typ, scheinen daher bei der K^{+} -induzierten VIP-Freisetzung eine Rolle zu spielen. Bei der gleichzeitigen Anwendung beider Calciumkanalblocker zeigte sich eine weitere Hemmung (+ ω - CTx- GVIA 10^{-6} M + ω - AgaTx- IVA 3×10^{-8} M: $119.6 \pm 15.7 \%$, $n = 5$). Diese unterschied sich jedoch nicht signifikant von der alleinigen Hemmung des P-Typ- Calciumkanals durch ω - AgaTx- IVA. (Abb. 4)

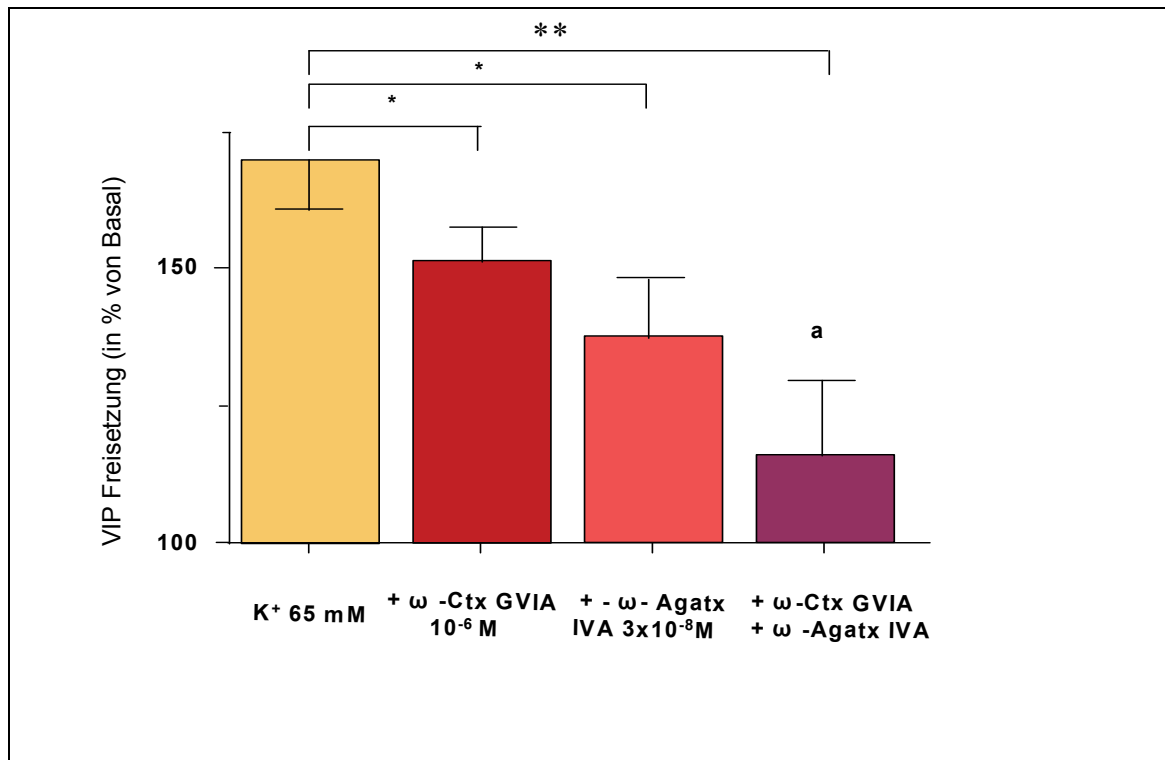


Abb. 4: Auswirkung der subtypspezifischen Ca^{2+} -Kanalblocker auf die K^{+} -induzierte VIP-Freisetzung
 Die K^{+} induzierte VIP Freisetzung wurde durch Ca^{2+} -Kanalblocker vom N- und P- Typ ω -CTx- GVIA und ω -Agatx- IVA signifikant vermindert. Die gleichzeitige Verwendung beider Blocker verstärkte den Effekt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm S.E.M. bei einer unabhängigen Versuchszahl von $n = 5$ in Doppelbestimmung ($p < 0,05$ verglichen mit dem Basalwert, nicht signifikant bei einem Vergleich mit ω -AgaTx- IVA alleine)

Eine Blockade des Calciumkanals vom Q-Typ durch ω -CTx-MVIIC hatte keinen signifikanten Einfluss auf eine K^+ -induzierte VIP-Freisetzung (basal: 183.1 ± 3.3 pg/mg [= 100%], K^+ $168.6 \pm 12.2\%$, K^+ + ω -CTx-MVIIC 10^{-6} M: 163.8 ± 17.5 , n = 5). Der L-Typ Calciumkanalblocker Isradipin (10^{-8} M) zeigte weder einen hemmenden Einfluss, noch verstärkte er die durch ω -CTx-GVIA und ω -Agatx-IVA gezeigte Abnahme der VIP-Freisetzung (basal: 183.1 ± 3.3 pg/mg [= 100%], K^+ : $168.6 \pm 7.2\%$, + Isradipin: $141.3 \pm 9.7\%$, + ω -CTx-GVIA + ω -AgaTx-IVA: $119.6 \pm 15.7\%$, + ω -CTx-GVIA + ω -AgaTx-IVA + Isradipin: $136.4 \pm 21.5\%$, n = 5). Die K^+ -induzierte VIP-Freisetzung scheint daher unabhängig von einer Blockade der L-Typ Calciumkanäle zu sein. BayK 8644 (10^{-6} M), eine selektiver Aktivator der L-Typ Calciumkanäle führte im Versuch weder zu einer Steigerung der basalen, noch der K^+ -induzierten VIP-Freisetzung (basal 149.8 ± 32.9 pg/mg [=100%], BayK 8644: $98.6 \pm 20.8\%$, K^+ : $166.7 \pm 18.4\%$, K^+ + BayK 8644: $134.8 \pm 24.9\%$, n = 4).

T- und R-Typ-Calciumkanäle werden durch Ni^{2+} blockiert. Im Versuch zeigte die Zugabe von Ni^{2+} in Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-4} M keinen signifikanten Effekt bezüglich der K^+ -induzierten VIP-Freisetzung (basal: 217.1 ± 3.3 pg/mg [= 100%], K^+ : $134.0 \pm 4.3\%$, + Ni^{2+} (10^{-6} M): $125.3 \pm 26.6\%$, + Ni^{2+} (10^{-5} M): $159.1 \pm 34.9\%$, + Ni^{2+} (10^{-4} M): $141.9 \pm 30.9\%$, n = 3). Eine Rolle der T- und R-Typ-Calciumkanäle bei der K^+ -induzierten VIP-Freisetzung scheint daher ebenfalls unwahrscheinlich.

3.1.3. Beeinflussung der K^+ -induzierten VIP-Freisetzung durch verschiedene Transmitter

Da die im Versuch verwendeten synaptosomalen Fraktionen aus Nervenendigungen verschiedener Neurone zusammengesetzt sind, könnten diese prinzipiell bei einer durch K^+ -induzierten Depolarisation verschiedene Neurotransmitter freisetzen. Der durch die Hemmung spannungsabhängiger Calciumkanäle beobachtete Effekt auf die VIP-Freisetzung könnte also auch als Folge einer indirekten Beeinflussung durch andere Transmitter aus nicht VIP-ergen Nervenendigungen bedingt sein.

Als wichtigste exzitatorische Transmitter des enterischen Nervensystems gelten Acetylcholin und Substanz P. Um dieser Frage nachzugehen wurde dementsprechend untersucht, ob Carbachol oder Substanz P einen direkten stimulierenden Effekt auf die VIP-Freisetzung aus den Nervenendigungen besitzen. Carbachol zeigte in keiner der untersuchten Konzentrationen (10^{-4} M - 10^{-6} M) einen signifikanten Effekt auf die basale VIP-Freisetzung. Auch eine Antagonisierung cholinergischer Muskarinrezeptoren durch Atropin beeinflusste die basale VIP-Freisetzung nicht. Substanz P führte ebenfalls zu

keiner signifikanten Änderung der VIP-Freisetzung. Interessanterweise wurde die VIP Freisetzung dagegen in Anwesenheit des Substanz P Rezeptor-Antagonisten Spantide II signifikant gesteigert. Dies legt wiederum einen hemmenden Effekt der tonisch freigesetzten Substanz P nahe. (Tab.1)

Substanz	VIP Freisetzung in % vom Basalwert ausgehend		n
Basal (Absolutwert in Klammern)	100	(237.3 ± 19.0 pg/mg)	4
Carbachol 10 ⁻⁶ M	116.3	± 11.4 (n.s.)	4
Carbachol 10 ⁻⁵ M	119.9	± 16.5 (n.s.)	4
Carbachol 10 ⁻⁴ M	117.3	± 16.2 (n.s.)	4
Atropin 10 ⁻⁶ M	96.0	± 24.0 (n.s.)	4
Basal	100	(198.9 ± 15.6 pg/mg)	5
Substanz P 10 ⁻⁷ M	99.1	± 5.7 (n.s.)	5
Substanz P 10 ⁻⁶ M	113.2	± 8.6 (n.s.)	5
Substanz P 10 ⁻⁵ M	109.1	± 13.1 (n.s.)	5
Spantide II 10⁻⁶M	147.0	± 14.4 *	5

Tab. 1: Effekt der exzitatorischen Transmittersubstanzen Carbachol und Substanz P auf die VIP Freisetzung aus enterischen Synaptosomen.
(Versuche in Doppelbestimmung, * $P < 0.05$, n.s. nicht signifikant).

Entsprechend den exzitatorischen Transmittern wurden aus den möglichen inhibitorischen Transmittern die Opioide und NO auf deren Einfluss auf die K⁺- induzierte VIP-Freisetzung untersucht.

Von den verwendeten Agonisten der μ- (Endomorphin-1), δ- (DPDPE) und κ- (U-50488) Opioid- Rezeptoren, hemmte der κ- Opioid Rezeptor- Agonist U-50488 die VIP-Freisetzung signifikant, während die Agonisten der μ- und δ- Rezeptoren keinen Effekt zeigten. Über eine Antagonisierung der Opiat- Rezeptoren durch Naloxon wurde die basale VIP- Freisetzung nicht beeinflusst (Tab.2).

Substanz	VIP Freisetzung in % vom Basalwert ausgehend	n
Basal	100 (135.4 ± 15.1 pg/mg)	8
Endomorphin 10 ⁻⁶ M	110.8 ± 18.5 (n.s.)	8
DPDPE 10 ⁻⁶ M	109.5 ± 22.5 (n.s.)	8
U-50488 10⁻⁶M	78.8 ± 7.6 *	8
Naloxon 10 ⁻⁶ M	107.7 ± 7.8 (n.s.)	8

Tab. 2: Effekt der Agonisten der μ -, δ - und κ -Opioid- Rezeptoren, Endomorphin-1, DPDPE und U- 50488, auf die VIP Freisetzung aus enterischen Synaptosomen.
(Versuche in Doppelbestimmung; * P < 0.05; n.s.: nicht signifikant).

Um den Einfluss von NO auf die VIP-Freisetzung zu untersuchen, wurde der NO- Donor SNAP verwendet. Dieser zeigte einen signifikanten Effekt auf die Freisetzung von VIP aus enterischen Synaptosomen, welcher wiederum durch Oxyhämoglobin, einen „NO-Fänger“ antagonisiert werden konnte ([basal = 100%], + SNAP 10⁻⁴ M: 200.4 ± 22.5%, + SNAP + oxy- Hb 10⁻³ M: 112.4 ± 21.2%, P < 0.01, n = 7). Ohne gleichzeitiges exogenes NO-Angebot konnte eine Stimulation der Synaptosomen mit Oxyhämoglobin (10⁻³ M) die VIP-Freisetzung nicht beeinflussen. Exogenes NO führte also an dem Modell der Synaptosomen zu einer Freisetzung von VIP.

3.1.4. Beeinflussung der durch exogen zugeführtes NO ausgelösten VIP- Freisetzung durch subtypspezifische Calciumkanalblocker

Da die vorangehenden Daten für eine Rolle der N- und P-Typ Calciumkanäle bei der VIP-Sekretion sprechen, wurden weitere Calciumkanälen und einer durch exogene NO-Stimulation hervorgerufenen VIP-Freisetzung zu klären.

Unter durch Zusatz von EGTA (0,5 M) herbeigeführten calciumfreien Bedingungen zeigte sich die VIP-Freisetzung bei Stimulation durch exogen zugeführtes NO nicht signifikant reduziert (Basal: 135.2 ± 26.2 pg/mg [=100%], SNAP 10⁻⁴ M: 160.4 ± 15.1 %, SNAP/Ca²⁺-frei: 131.2 ± 27.9%, n = 6). Die durch exogen zugeführtes NO stimulierte VIP- Freisetzung scheint also ein von extrazellulärem Calcium unabhängiger Mechanismus zu sein. Dementsprechend gelang es durch keinen Versuchsansatz mit gleich welchem

subtypspezifischen Calciumkanalblocker die durch exogenes NO induzierte VIP-Freisetzung zu antagonisieren (Basal: 168.0 ± 24.7 pg/mg [= 100%], SNAP 10^{-4} M $149.4 \pm 11.4\%$, SNAP + ω -CTx- GVIA 10^{-6} M: $153.1 \pm 12.4\%$, SNAP + ω -AgaTx- IVA 3×10^{-8} M: $150.6 \pm 12.5\%$, SNAP + ω -AgaTx- IVA + ω -CTx- GVIA: $162.2 \pm 25.6\%$, SNAP + Isradipin: $142.4 \pm 10.9\%$, SNAP + ω -CTx MVIIC: $163.6 \pm 27.7\%$, SNAP + Ni^{2+} : $180.4 \pm 42.2\%$, n = 7).

3.2. Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)

3.2.1 Beeinflussung der NOS- Aktivität durch subtypspezifische Calciumkanalblocker

Da die Aktivität der Stickstoffmonoxidsynthase unter durch EGTA (0,5 M) hervorgerufenen calciumfreien Bedingungen verglichen mit der Aktivität unter Kofaktorstimulation um 61% reduziert ist (Kontrolle [Kofaktoren]: 7.0 ± 0.8 fmol/mg/min, + Ca^{2+} -frei: 2.8 ± 1.4 fmol/mg/min, P < 0.05, n = 6), wurden auch hier Versuche zur Charakterisierung der Rolle der einzelnen Calciumkanalsubtypen bei der NOS-Aktivierung durchgeführt.

Calciumkanalblocker der P-Typ- (ω -AgaTx IVA), der N-Typ- (ω -CTx GVIA) und auch der L-Typ- (Isradipin) –Kanäle verringerten die NOS- Aktivität verglichen mit der Kontrolle (Kontrolle: 7.0 ± 0.8 fmol/mg/min, + ω -AgaTx- IVA: 1.5 ± 1.2 fmol/mg/min, + ω -CTx GVIA 2.1 ± 1.3 fmol/mg/min, + Isradipin: 2.1 ± 1.2 fmol/mg/min, jeder Versuch P < 0.05, n = 5). ω -AgaTx- IVA, der Blocker der P-Typ- Ca^{2+} -Kanäle verringerte die vorstimulierte NOS-Aktivität um 79%, eine Blockade der N-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch ω -CTx GVIA reduzierte die NOS- Aktivität genauso wie der L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker Isradipin um jeweils 70%. Es zeigte sich im Vergleich mit den Ergebnissen unter calciumfreien Bedingungen kein signifikanter Unterschied. Die Blockierung der Q- Typ- Calciumkanäle durch ω -CTx MVIIC und der R- und T- Typ- Calciumkanäle durch Ni^{2+} konnten die durch Kofaktoren stimulierte NOS- Aktivität dagegen nicht signifikant verändern (Kontrolle: 7.0 ± 0.8 fmol/mg/min, + ω -CTx MVIIC 10^{-6} M: 3.4 ± 1.8 , + Ni^{2+} 10^{-6} M: 4.4 ± 1.9 fmol/mg/min, n = 5). Auch höhere Konzentrationen von Ni^{2+} zeigten keinen Einfluss auf die NOS- Aktivität (Kontrolle: 3.1 ± 1.3 fmol/mg/min, + Ni^{2+} 10^{-6} M: 3.7 ± 1.6 fmol/mg/min, + Ni^{2+} 10^{-5} M: 3.6 ± 1.7 fmol/mg/min, + Ni^{2+} 10^{-4} M: 3.1 ± 1.2 fmol/mg/min, n = 4). (Abb.5)

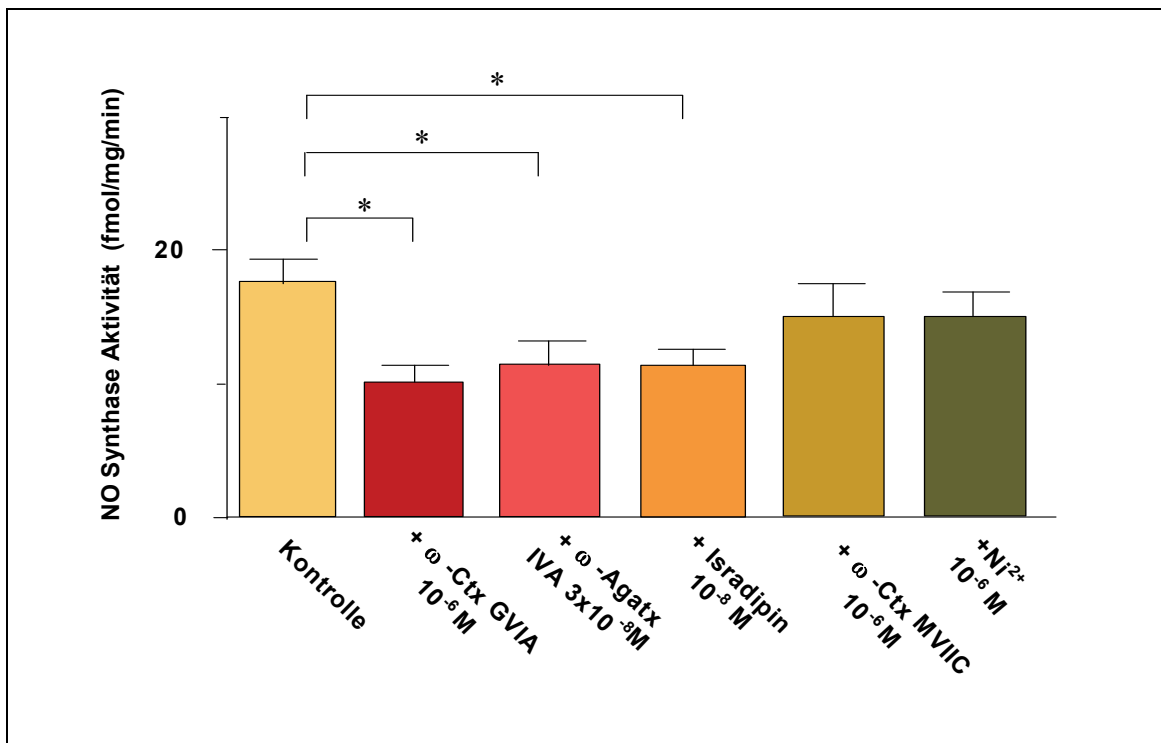


Abb. 5: Effekt der subtypspezifischen Ca^{2+} Kanalblocker auf die Aktivität der NOS

Die NO- Synthese wurde durch ω - CTx GVIA, ω - AgaTx- IVA und Isradipin, die Blocker der N-, P- and L-Typ Ca^{2+} Kanäle signifikant reduziert. ω - CTx MVIIC und Ni^{2+} , die Blocker der Q, R- und T-Typ Ca^{2+} Kanäle zeigten dagegen keinen Einfluss. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm S.E.M. bei einer unabhängigen Versuchszahl von n = 5 in Doppelbestimmung (* P < 0.05 verglichen mit der Kontrolle).

Nach diesen Daten scheinen sowohl der P- und N- Typ Calciumkanal als auch der L-Typ Kanal eine bedeutende Rolle für die bei der Aktivität der NOS notwendigen Calciumzufuhr zu spielen. Q- und T-Typ Calciumkanäle sind jedoch vermutlich nicht in die Aktivierung der NOS innerhalb des myenterischen Plexus des Dünndarms der Ratte involviert.

3.2.2. Beeinflussung der NOS- Aktivität durch verschiedene Transmitter

Da die NOS- Aktivität auch indirekt über eine durch die Calcium- Zugabe bedingte Freisetzung von Transmittern beeinflusst sein könnte, wurde eine Versuchsreihe zur Untersuchung der direkten Effekte verschiedener Transmitter angesetzt. Analog zu 3.1.3. waren auch hier Acetylcholin und Substanz P als wichtigste Vertreter der exzitatorischen Transmitter von besonderem Interesse. Die Stimulierung cholinergischer Rezeptoren durch Zugabe von Carbachol zeigte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der

nNOS. Auch die Hemmung muskarinergere Rezeptoren über den Antagonisten Atropin führte zu keiner signifikanten Änderung der basalen NOS- Aktivität.

Eine Stimulierung der tachykininergere Rezeptoren durch Substanz P und auch deren Antagonisierung durch Spantide II konnten die NOS Aktivität ebenfalls nicht beeinflussen (Die erhaltenen Daten werden in Tab 3 dargestellt. Ein Einfluss einer tonischen Freisetzung von Acetylcholin oder Substanz P auf die NO- Produktion scheint somit ausgeschlossen.

Substanz	NOS Aktivität in fmol/mg/min	n
Basal	10.7 ± 2.9	4
Carbachol 10 ⁻⁷ M	10.2 ± 1.5 (n.s.)	4
Carbachol 10 ⁻⁶ M	10.6 ± 1.4 (n.s.)	4
Carbachol 10 ⁻⁵ M	8.1 ± 1.8 (n.s.)	4
Kontrolle	5.5 ± 2.0	3
Atropin 10 ⁻⁶ M	6.8 ± 1.0 (n.s.)	3
Kontrolle	2.2 ± 0.9	4
Substanz P 10 ⁻⁷ M	2.2 ± 0.9 (n.s.)	4
Substanz P 10 ⁻⁶ M	2.6 ± 1.2 (n.s.)	4
Substanz P 10 ⁻⁵ M	2.3 ± 0.9 (n.s.)	4
Spantide II 10 ⁻⁶ M	2.1 ± 0.9 (n.s.)	4

Tab. 3: Effekte von Carbachol und Substanz P auf die Aktivität der NO Synthase in enterischen Synaptosomen.

(Versuche in Doppelbestimmung; * P < 0.05; n. s. nicht signifikant).

Auch der Einfluss inhibitorischer Transmitter wurde in Bezug auf Veränderungen der NOS- Aktivität getestet.

Zunächst wurde eine Versuchsreihe zur Untersuchung des Einflusses der Opiode auf die kofaktorstimulierte NOS- Aktivität angesetzt. Die Agonisten der μ-, k- und δ-Opioid-rezeptoren, also Endomorphin-1/-2 (μ), Dynorphin-A (k) und Cyclic[DPen², DPen⁵]-Enkephalin (DPDPE, δ) zeigten im Versuch keinen signifikanten Effekt auf die NOS. Zugabe des Opioid- Rezeptor Antagonisten Naloxon (10⁻⁵ M) sowie der Antagonisten der jeweiligen μ-, k- und δ-Rezeptoren, CTOP (10⁻⁷ M)(μ), Nor- Binaltorphin (Nor-BNI,

10^{-5} M, γ (k) und Naltrindol (10^{-5} M) (δ), beeinflusste die basale NOS- Aktivität ebenfalls nicht. Diese Daten schließen einen Einfluss tonisch freigesetzter Opiode auf die NOS weitgehend aus (Tab. 4).

Substanz	NOS Aktivität in fmol/mg/min	n
Kontrolle	8.0 ± 2.2	4
Endomorphin-1 10^{-6} M (μ Agonist)	7.1 ± 2.8 (n.s.)	4
DPDPE 10^{-6} M (delta Agonist)	6.1 ± 1.7 (n.s.)	4
U-50488 10^{-6} M (kappa Agonist)	6.0 ± 0.8 (n.s.)	4
Naloxon 10^{-6} M	7.7 ± 0.8 (n.s.)	4

Tab. 4 Effekte der Agonisten der μ -, δ -,und κ -Opioid- Rezeptoren, Endomorphine-1, DPDPE und U-50488 auf die Aktivität der NOS in enterischen Synaptosomen. (Versuche in Doppelbestimmung; * P < 0.05; n. s. nicht signifikant).

3.2.3 Beeinflussung der NOS- Aktivität durch einen Rezeptor- aktivierten Calciumeinstrom

Da im ZNS über eine Aktivierung eines Glutamat- Rezeptor- Subtyps, des NMDA- Rezeptors ein Calciumeinstrom und darüber hinaus eine Stimulierung der NOS nachgewiesen ist, wurden sowohl die Auswirkungen einer Aktivierung als auch einer Blockierung des NMDA- Rezeptors untersucht. Weder die Zugabe von NMDA noch Glutamat beeinflusste die durch Kofaktoren stimulierte NOS- Aktivität (Kontrolle: 2.2 ± 0.1 fmol/mg/min, + NMDA 10^{-7} M: 2.0 ± 0.3 fmol/mg/min, + NMDA 10^{-6} M: 1.9 ± 0.3 fmol/mg/min, + NMDA 10^{-5} M: 1.8 ± 0.4 fmol/mg/min, + Glutamat 10^{-7} M: 2.1 ± 0.3 fmol/mg/min, + Glutamat 10^{-6} M: 2.0 ± 0.3 fmol/mg/min + Glutamat 10^{-5} M: 1.9 ± 0.2 fmol/mg/min, kein Versuch war signifikant im Vergleich zur Kontrolle, n = 5). Der NMDA Rezeptorantagonist R-4-carboxy-3-hydroxyphenylglycin zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die NOS- Aktivität (Kontrolle: 2.2 ± 0.1 fmol/mg/min, + R-4-carboxy-3-hydroxyphenylglycin 10^{-6} M: 2.0 ± 0.3 fmol/mg/min, nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle, n = 4). Ähnliche Ergebnisse wurden mit 1-Aminocyclobutanecarboxylic-Säure (ACBC) erhalten, einem NMDA Rezeptorantagonisten an der Glycin- Bindungsstelle (Kontrolle: 2.2 ± 0.1 fmol/mg/min, + ACBC 10^{-6} M: 2.9 ± 1.1 fmol/mg/min, nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle, n = 4). Ein Einfluss eines Liganden- gesteuerten Calciumkanals auf die Aktivität der NOS an enterischen Synaptosomen scheint somit nicht relevant.

4. Allgemeine Diskussion

4.1. Aufbau des enterischen Nervensystems und Regulation der Motilität

Die Aufgabe des Verdauungstraktes besteht neben der Immunabwehr hauptsächlich in der Verwertung der Nahrung. Hierfür muss die Nahrung gerichtet transportiert, vermischt und durch Enzymsekretion aufgespalten, und anschließend in geeigneter Form resorbiert, bzw. ihre unverwertbaren Teile ausgeschieden werden. Bezogen auf die Motilität können dabei streng lokal kontrollierte Vorgänge wie die Durchmischung der Nahrung und die peristaltische Bewegung zum Transport der Nahrung von segmentübergreifenden Motilitätsvorgängen wie dem Schluckvorgang, der ösophagealen Peristaltik, den Migrationskomplexen oder auch dem Vomit oder der Defäkation unterschieden werden (Kunze und Furness 1999).

Innerhalb des Dünndarms lassen sich einerseits postprandiale Motilitätsphasen zur Verwertung der Nahrung und andererseits interdigestive Phasen beobachten.

Diese interdigestiven Phasen des oberen Gastrointestinaltrakts kennzeichnet ein zyklisches motorisches Muster, der sogenannte migrierende myoelektrische Komplex (MMC). Der MMC durchläuft beispielsweise den menschlichen Verdauungstrakt alle 80-110 Minuten, und benötigt für einen Durchlauf ca. 6-10 Minuten (Kunze und Furness 1999), wobei die jeweils betroffene Region intensive rhythmische Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur zeigt. Vier Phasen werden unterschieden: Eine Ruhephase (Phase I), die ca. 40-60 % der Zykluslänge beansprucht, eine Phase II mit unregelmäßiger motorischer Aktivität (20-30% der Zykluslänge), eine Phase III mit durchschnittlich 10 kräftigen Kontraktionen/min im Dünndarm (Szurzewski 1969), der wiederum eine Phase IV mit geringerer Aktivität folgt. Phase III dient einer Art „Hausputzfunktion“, indem es durch die Kontraktionen abgeschilferte Zellen, Sekrete, unverdaute Nahrung und Bakterien nach aboral schiebt, und damit gleichzeitig auch ein Aufsteigen von Bakterien aus dem Kolon verhindert. Ein Fehlen der Phase III-Aktivität der MMC' s führt zu einer bakteriellen Überwucherung des Dünndarms (Vantrappen et al 1977). Ein Einfluss der inhibitorischen Transmission über NO auf die Steuerung der MMC' s wurde sowohl an Tiermodellen (Hellstrom und Ljung 1996, Maczka et al 1993), als auch am Menschen (Russo et al 1999) nachgewiesen.

Generell werden sowohl die interdigestiven Phasen, als auch die zur Nahrungsverwertung dienende Motilität durch das enterische Nervensystem weitgehend unabhängig von peripheren oder zentralen Einflüssen gesteuert. Selbst nach bilateraler Vagotomie, Entfernung der prävertebralen Ganglien, Abtrennung der Nerven des Splanchnikus oder auch nach kompletter extrinsischer Denervierung wie sie beispielsweise durch Transplantation bedingt ist, finden sowohl migrierende myoelektrische Komplexe als auch nahrungstriggerte Motilität statt. Eine Hemmung der Darmmotilität kann jedoch durch Perfusion des Darmsegments mit Tetrodotoxin über eine Blockierung der Weiterleitung neuronaler Aktionspotentiale oder über Hexamethonium via Blockierung der schnellen exzitatorischen Signale erreicht werden (Sarna et al 1981, Weisbrodt et al 1975, Furness et al 1995b).

Diese Fähigkeit des enterischen Nervensystems motorische und sensorische Reflexe zur Regulierung der intestinalen Peristaltik ohne Einfluss durch das zentrale Nervensystem zu steuern, unterscheidet es erheblich von dem übrigen peripheren Nervensystem (Furness und Costa 1987). Voraussetzungen hierfür sind der besondere Aufbau und das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen Neurone des enterischen Nervensystems.

Der zielgerichtete Transport des Nahrungsbolus wird prinzipiell über eine lokale propulsive Bewegung durch Kontraktion oralwärts des Stimulus (aszendierender exzitatorischer Reflex) und Relaxation distal des Reizes (deszendierender inhibitorischer Reflex) gesteuert (Bayliss und Starling 1899), wobei die involvierten exzitatorischen und inhibitorischen Reflexe sowohl über die Dehnung des Lumens als auch über mechanische und chemische Reizung der Mukosa ausgelöst werden (Yuan et al 1991, Baldwin et al 1975). Die Verschaltung des peristaltischen Reflexes verläuft über funktionell verschiedene Neurone, welche jedoch alle innerhalb des Gastrointestinaltrakts und dort innerhalb des myenterischen Plexus liegen. Dieser befindet sich zwischen der äußeren Zirkulärmuskulatur und der inneren Longitudinalmuskulatur (siehe Abb. 6) und scheint bei den verschiedenen Spezies anatomisch und funktionell sehr ähnlich aufgebaut zu sein, während der submuköse Plexus sich bei kleineren und größeren Säugetieren in Umfang und Aufgaben unterscheidet (Hens et al 2002).

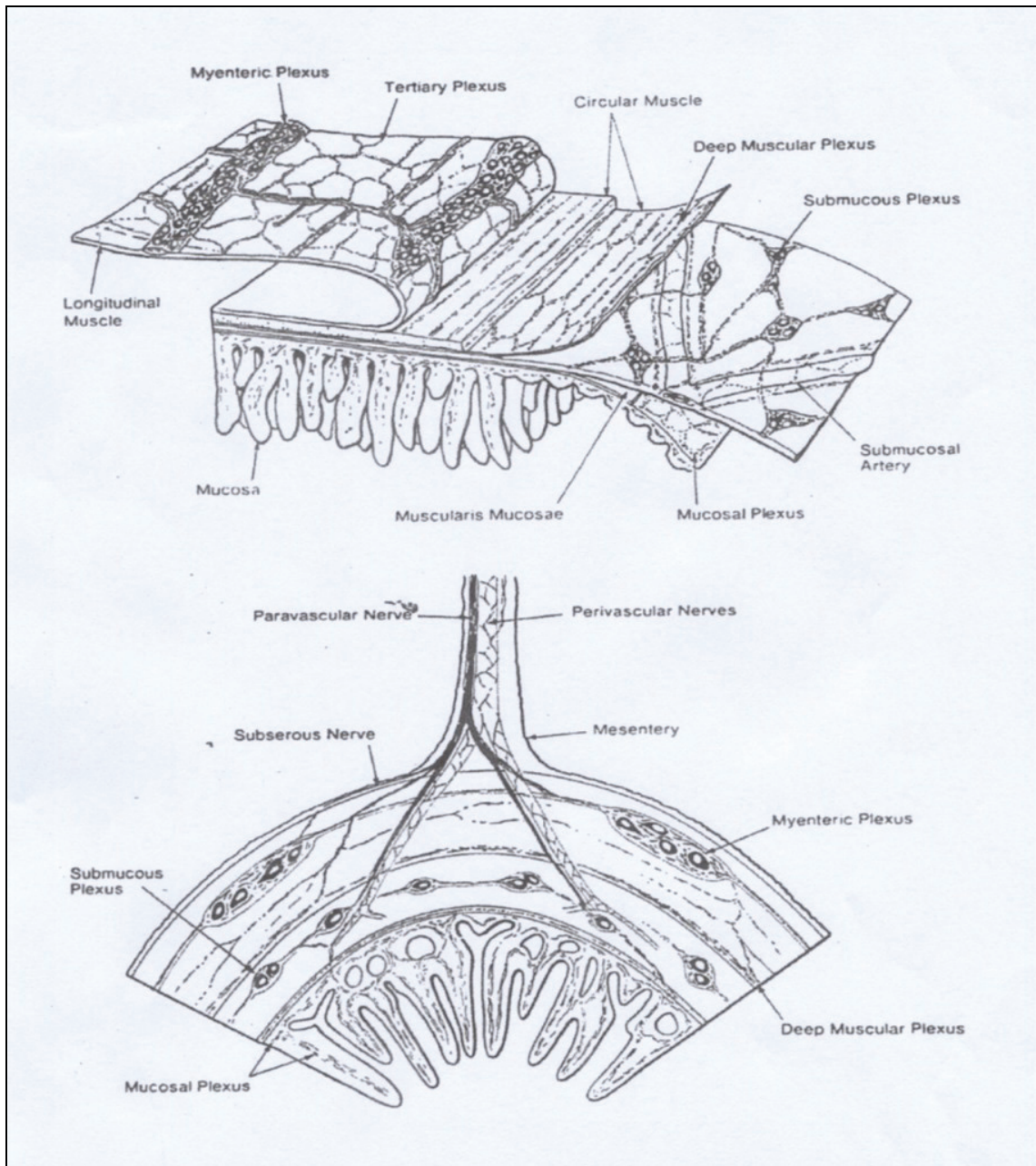


Abb. 6: Anatomischer Aufbau des enterischen Nervensystems (aus Furness 1982)

Die Auslösung eines peristaltischen Reflex findet zunächst über Stimulation der **intrinsic primär afferenten Neurone (IPANs)** durch einen geeigneten Reiz an der intestinalen Mukosa statt. Die IPANs gehören elektrophysiologisch zu den AH (afterhyperpolarisation)-/ Typ 2- Neuronen, deren Potentialverhalten durch ein höheres Ruhemembranpotential, einen geringeren Eingangswiderstand und ein verlängertes hyperpolarisierendes Nachpotential charakterisiert ist.

Der anschließende kontrahierende oder relaxierende Effekt des peristaltischen Reflexes wird über jeweils exzitatorische oder inhibitorische **Motorneurone** vermittelt, welche elektrophysiologisch als S-/ Typ1-Neuronen klassifiziert werden. Sie zeichnen sich im Vergleich zu den AH- Neuronen durch ein niedriges Ruhepotential und einen höheren Eingangswiderstand aus. Im Gegensatz zu AH- Neuronen besitzen sie eine hohe Spontanaktivität und sind repetitiv stimulierbar. Die **exzitatorischen Motorneurone** projizieren zum einen in oralwärts liegende Muskelbereiche, zum anderen auf Höhe ihrer Zellkörper in die Zirkulärmuskulatur, wobei das Axon dem Muskel folgend den Darm ringförmig umläuft (Gabella 1972).

Die **inhibitorischen Motorneurone** projizieren ihre Axone wiederum ebenfalls in nahe ihren Zellkörpern und weiter in bis zu einigen Millimetern analwärts gelegene Muskelzellen (Bornstein et al 1986). Eine bedeutende Rolle in der Vermittlung der Signale der Motorneurone auf die intestinale Muskulatur spielen die **interstitiellen Zellen nach Cajal (ICCs)** (Cajal 1893). Die ICCs exprimieren die jeweiligen Rezeptoren sowohl für exzitatorische (Sternini et al 1995) als auch für inhibitorische (Young et al 1993, Shuttleworth et al 1993) Transmitter, und tragen weiterhin durch ihre elektrische Verknüpfung mit der Muskelzelle zur Modulation der gastrointestinalen Motilität bei (Ward und Sanders 2001). Charakteristisch für die ICCs ist außerdem die Generierung rhythmischer elektrischer Wellen und damit eine Funktion als Schrittmacher in der Koordination glatter Muskelzellen (Hanani et al 2000).

Zu der funktionellen Differenzierung der Neurone des peristaltischen Reflexes gehören auch die sogenannten **Interneurone**. Deren Zellkörper liegen innerhalb des myenterischen Plexus, ihre Fasern projizieren nach oral und anal und bilden dort sowohl mit exzitatorischen und inhibitorischen als auch mit weiteren Interneuronen Verknüpfungen. Am Modell des Meerschweins beispielsweise wurden verschiedene Arten der Interneurone gefunden, drei, evt. vier Arten der absteigenden und eine Art der aufsteigenden Interneurone. (Costa et al 1996). Die aufsteigenden und zwei Arten der absteigenden Interneurone gehören wie die Motorneurone ebenfalls zu den S-/Typ 1 Neuronen.

Durch komplexe Verschaltung der intrinsischen primär afferenten Neurone (IPANs) mit auf- und absteigenden Interneuronen, Motorneuronen und weiteren IPANs entsteht eine lokale propulsive Bewegung (siehe Abb. 7)

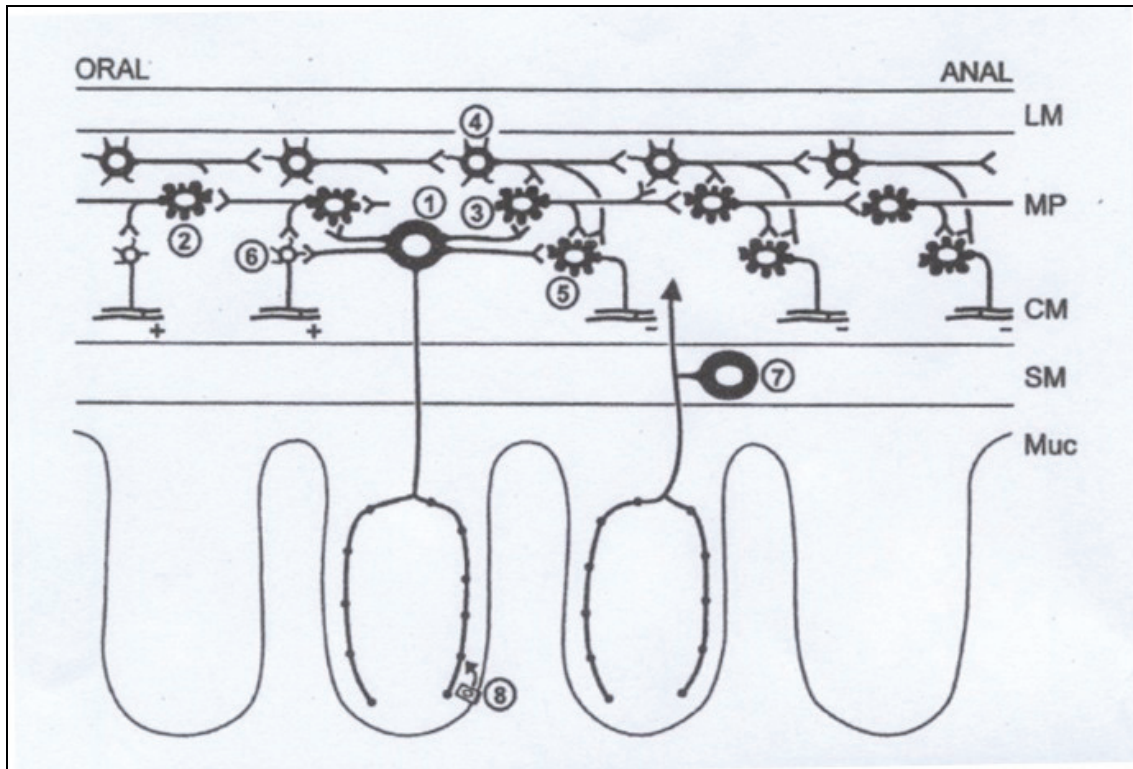


Abb. 7: Schematische Darstellung der Verknüpfung enterischer Neurone (aus Kunze und Furness 1999)

(1: IPAN, Zellkörper innerhalb des myenterischen Plexus liegend

2: aufsteigendes cholinerges Interneuron

3: absteigendes Interneuron des lokalen Reflexes

4: absteigendes Interneuron des MMCs

5: inhibitorisches Motorneuron

6: exzitatorisches Motorneuron

7: IPAN, Zellkörper innerhalb des submukösen Plexus liegend

8: Enteroendokrine Zelle, zur mukosalen Reizauslösung der IPANs

LM: Longitudinalmuskulatur, MP: myenterischer Plexus, CM: Zirkulärmuskulatur, SM: Submuköser Plexus, Muc: Mukosa)

Das Ziel der koordinierten Motilität des Gastrointestinaltrakts bedingt eine komplexe Zusammensetzung und Verschaltung zahlreicher exzitatorischer und inhibitorischer Antworten auf verschiedene Stimuli oder Signale, dabei wird die jeweilige - exzitatorische oder inhibitorische - Transmission des enterischen Nervensystems durch eine große Anzahl verschiedener Substanzen aus der Gruppe der Peptide, der Purine, der Aminosäuren oder der gasförmigen Moleküle und deren Rezeptoren vermittelt.

Unterschiedliche Transmitter treten auch gemeinsam in Nervenendigungen auf (Burnstock 1997), wobei einige der Substanzen einen modulatorischen Einfluss auf die Freisetzung oder den Effekt der eigentlichen Transmitter ausüben können. Diese Transmitterzusammensetzung der einzelnen Neurone wird als sogenanntes „chemical coding“ des enterischen Nervensystems beschrieben (Furness und Costa 1987, Furness et al 1995a), wobei sich die wichtigsten Transmitter und ihre Lokalisation in den einzelnen Neuronentypen in verschiedenen Spezies und gastrointestinalen Regionen gleichen, während sich die jeweiligen Cotransmitter und Neuromodulatoren hier teilweise deutlich unterscheiden (Furness et al 1994a).

Als typische Transmitter der exzitatorischen Transmission des Gastrointestinaltrakts gelten Acetylcholin und Substanz P, beide lassen sich weit verbreitet und häufig auch kolokalisiert in Neuronen und Nervenzellkörpern der submukösen und myenterischen Ganglien nachweisen (Costa 1987, Ribeiro-da Silva A. 2000). Substanz P zählt gemeinsam mit VIP auch zu den Komponenten sekretomotorischer Neurone.

Inhibitorische Motorneurone enthalten vorwiegend NO, VIP und die Opioide, wobei die Funktion der Opioide eher modulatorisch unter pathophysiologischen Bedingungen beschrieben wird. Auch Adenosintriphosphat (ATP) gilt als inhibitorischer Transmitter (Crist et al 1992) in vielen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts verschiedener Spezies (Burnstock 2004), fehlende molekulare Marker und Antagonisten erschweren seine Charakterisierung im Rahmen immunhistochemischer und funktioneller Untersuchungen.

Adenosine, Glutamat, Galanin und GABA treten ähnlich dem ZNS neben weiteren Substanzen auch im enterischen Nervensystem auf, wobei ihre Rolle hier nicht eindeutig geklärt ist. Möglich scheinen neuromodulatorische Funktionen.

Weitere Transmitter zeigen sich immunhistochemisch nur spärlich in den zur glatten Muskulatur ziehenden Nervenfasern und werden daher in diesem Kontext nicht behandelt.

Einen Überblick über die Pharmakologie des Gastrointestinaltraktes und damit wichtiger gastrointestinaler Transmitter und ihrer Rezeptoren zeigt Tabelle 5.

Prinzipielle Funktion	Pharmakologischer Typ	Agonist	Rezeptoren	Antagonisten	
Exzitatorisch	Cholinerge Transmission	Acetylcholin	Muskarinerg M1-M5	Atropin	
			Nikotinerg	Hexamethonium	
	Adrenerge Transmission	Noradrenalin/ Adrenalin	s.e.L.		
	Tachykinerge Transmission	SubstanzP NKA NKB	NK ₁ NK ₂ NK ₃	Spantide	
Inhibitorisch	NANC- (Nicht- adrenerg, nicht- cholinerg) Transmission	VIP PHI, PACAP, Glukagon, Sekretin, GRF	VIP 1, VIP2 s.e.L.	-- s.e.L.	
		NO	---	---	
Un- determinierte Funktion	Purinerge Transmission	ATP	s.e.L.		
		Adenosin	s.e.L.		
	Serotonerge Transmission	5-HT	s.e.L.		
	Aminosäuren als enterische Transmitter	GABA	GABA A, GABA B	s.e.L.	
		Glutamat	Ionotrop: • NMDA • AMPA • Kainat Metabotrop: mglu ₁₋₄	s.e.L.	
	Histaminerge Transmission	s.e.L.			
	Peptide als enterische Neurotransmitter	Opioide	μ, δ, κ, ORL1	Naloxon	
Somatostatin Gastrin Cholecystokinin NPY, PYY, Calcitonin, GRP, Neurotensin, Motilin, GRP, Galanin, Bradykinin, Angiotensin Endothelin		s.e.L.			

Tab. 5: Wichtige Neurotransmitter des enterischen Nervensystems (siehe auch Brookes S und Costa M, Innervation of the Gastrointestinal Tract, Vol. 14, The Autonomic Nervous System, Taylor&Francis 2002) s.e.L.: siehe entsprechende Literatur

4.2. Die nicht- adrenerge , nicht- cholinerge (NANC) Transmission des enterischen Nervensystems

Während die Aktivität der gestreiften Muskulatur nur durch exzitatorische cholinerge Motorneurone kontrolliert wird, werden glatte Muskelzellen sowohl von adrenergen und cholinergen exzitatorischen, als auch von „nicht adrenergen - nicht cholinergen“ (NANC) inhibitorischen Neuronen reguliert. Bezogen auf das enterische Nervensystem zeigte sich die Präsenz einer „nicht adrenergen nicht cholinergen“ Transmission erstmals in zwei 1963 durchgeführten Studien. Nach Stimulierung enterischer Nerven unter adrenerger und cholinерger Blockade ließen sich zum einen am Dünndarm des Meerschweins inhibitorische synaptische Potentiale (Burnstock und Holman 1963), und zum anderen am Katzenmagen eine Relaxation nach vagaler Stimulation beobachten (Martinson und Muran 1963).

Weitere Untersuchungen zeigten einen biphasischen Verlauf der inhibitorischen NANC- Transmission des Dün- und Dickdarms des Meerschweins (Niel et al 1983, Crist et al 1991), die erste Phase bilden die meist über Purine wie z.B. ATP oder die Adenosine regulierten „schnellen inhibitorischen synaptischen Potentiale“ (fast IJPs) (Costa et al 1986b, Crist et al 1992), die zweite Phase zeigt „langsame inhibitorische synaptischen Potentiale“ (slow IJPs) welche über VIP und NO vermittelt werden (Crist et al 1991, 1992, He und Goyal 1993). Nach Stimulation dauert die Zeitspanne der schnellen IJPs ca. 1 Sekunde, wobei der Nadir nach 0,4 Sekunden erreicht wird (Niel et al 1983, Christ et al 1991). Eine Sensitivität gegenüber dem Polypeptid Apamin – einem Neurotoxin aus dem Gift der Biene- weist auf die den schnellen inhibitorischen Potentialen zu Grunde liegende Öffnung calciumabhängiger Kaliumkanäle (Bywater und Taylor 1986). Die apaminresistenten langsamen IJPs erreichen ihren Nadir nach 1 Sekunde und dauern bis zu 2 Sekunden (Bywater und Taylor 1986, Christ et al 1991). Die Komponenten und Modulatoren der schnellen und der langsamen IJPs differieren jedoch in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts wie auch unter den verschiedenen Spezies. ATP spielt eine Rolle in der Übertragung schneller IJPs wie bereits erwähnt des Ileums und Colons des Meerschweins sowie des inneren Analsphinkters (Lim und Muir 1986, Rae und Muir 1996) des Meerschweins, während im Kolon des Hundes schnelle IJPs über eine Freisetzung von NO vermittelt zu sein scheinen (Ward et al 1992a). Ergebnisse verschiedener funktioneller Studien zur inhibitorischen NANC- Transmission des Dünndarms der Ratte (Manzini et al 1985, Fox et al 1986, Yagasaki et al 1983, Serio et al 1990) und auch an anderen Spezies wie dem Mensch (Xue et al 1999, Murr et al 1999) stellen die Rolle endogenen ATPs in der NANC- Transmission in Frage. Insbesondere für den Dünndarm der Ratte ist seine

Bedeutung im Gegensatz zu NO und VIP nicht eindeutig geklärt. Eine über NO als Transmitter vermittelte Inhibition zirkulärer Muskeln am Jejunum der Ratte zeigte ebenfalls eine Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle via einer Erhöhung des cGMP- Spiegels (Vanneste et al 2004) wie sie für die schnellen IJPs beschrieben wird. Die langsamen IJPs werden je nach Region einzeln oder auch gemeinsam in unterschiedlicher Gewichtung durch NO und VIP gesteuert. Im Falle eines gemeinsamen Auftretens sprechen zahlreiche Daten für eine serielle Freisetzung der beiden Neurotransmitter. So scheint die rasche einem kurzen niedrig frequentem Impuls folgende Relaxation NO- vermittelt zu sein, während die folgende durch stärkere Frequenzen hervorgerufene andauernde Relaxation über eine Freisetzung von VIP gesteuert wird (Li und Rand 1990, Boeckxstans 1992, Meulemans et al 1995, Takahashi und Owyang 1995, Tonini et al 2000).

Die Aufgabe der inhibitorischen NANC- Neurone in der Regulation der gastrointestinalen Motilität besteht prinzipiell in der Relaxation der einzelnen enterischen Abschnitte, so führt eine Aktivierung der NANC- Neurone zur Relaxation der intestinalen Sphinkteren, trägt zu Anpassungsvorgängen des Magenfundus, des Dünn- und des Dickdarms bei, und ist vor allem an dem deszendierendem inhibitorischen Reflex nach Dehnung des Darmlumens bei der Peristaltik beteiligt (Ciccocioppo et al 1994, Tonini et al 2000). Wie bereits zuvor angedeutet, ist es den zahlreichen Daten folgend nicht möglich einen einzelnen Transmitter als den Hauptträger der Relaxation innerhalb des Gastrointestinaltrakts zu ermitteln, vielmehr scheint die inhibitorische Transmission in den verschiedenen Abschnitten des enterischen Nervensystems aus zwei oder mehreren zusammenspielenden Transmittern zu bestehen (Costa et al 1986b, Maggi und Giuliani 1993, 1996), die jeweils ihren individuellen Platz bei der Vermittlung der Relaxation einnehmen, wobei NO und VIP innerhalb des ENS eine zentrale Rolle zugeschrieben wird.

Weitere zur inhibitorischen NANC- Transmission beitragende Substanzen sind beispielsweise das zur VIP-Familie gehörende „Pituitary adenylate cyclase peptide“ (PACAP) (Fox- Threlkeld et al 1999) und Neurotensin (Goedert et al 1984); ihre Bedeutung ist verglichen mit der Rolle des NO und VIP jedoch geringer, und wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

4.2.1 Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) im enterischen Nervensystem

Said und Mutt identifizierten 1970 in Untersuchungen des Duodenums ein gefäßerweiterndes Peptid: das Vasoaktive intestinale Peptid (VIP) (Said und Mutt 1970), einige Zeit später wurde VIP sowohl in zentralen als auch in peripheren Nervengewebe nachgewiesen (Said und Rosenberg 1976), und im weiteren Verlauf zeigte sich VIP weit verbreitet in verschiedenen Organen wie Herz, Lunge, Schilddrüse, Niere, Immunsystem, Urogenital- und Gastrointestinaltrakt (Henning und Sawmiller 2001). Die Funktionen des VIP als Neurotransmitter oder Neuromodulator scheinen ebenso vielfältig, so erfüllt es unter anderem Aufgaben in der Vasodilatation, Bronchodilatation, der hormonellen Regulation, bei Lernvorgängen, der Schmerzempfindung (Dickinson und Fleetwood- Walker 1999), der Entzündungs-suppression (Said et al 1998) sowie im Gastrointestinaltrakt in der Regulation sekretorischer Vorgänge (Furness et al 1984) und – im hier vorliegenden Kontext – in der Steuerung der Motilität.

4.2.1.1 VIP- Synthese und Signaltransduktionswege im Rahmen der inhibitorischen NANC- Transmission

VIP gehört zu einer Familie strukturell ähnlicher Peptide, zu der unter anderem auch das oben bereits erwähnte PACAP, Sekretin, Glucagon, das Glucagon like Peptid (GLP), das Gastric inhibitory peptide (GIP) oder der Growth hormone-releasing factor (GRF) zählen. Es besteht aus 28 Aminosäuren und wird aus einem Vorläufermolekül über mehrere Schritte unter gleichzeitiger Produktion weiterer Substanzen der Peptidfamilie im endoplasmatischen Retikulum von Nervenzellkörpern synthetisiert, und von dort aus in die Nervenendigungen – in großen Vesikeln gespeichert – transportiert, und nach Stimulation durch Kalium- induzierter Depolarisation oder nach Aktivierung bestimmter Rezeptoren calciumabhängig freigesetzt.

Nach Interaktion mit einem G-Protein gekoppelten VIP-Rezeptor auf einer gastrointestinalen glatten Muskelzelle scheint VIP über eine Aktivierung der Adenylatcyclase und damit Erhöhung des intrazellulären cAMP- Spiegels via der Proteinkinase A (PKA) zwei mögliche direkte Wege zur muskulären Relaxation zu aktivieren: Zum einen wird über eine Öffnung calciumaktivierter Kaliumkanäle mit konsekutiver Hyperpolarisation und folgender Schließung spannungsabhängiger Calciumkanäle eine Senkung des intrazellulären Calciumspiegels und damit eine

Relaxation erreicht, zum anderen ergibt sich eine Möglichkeit aus der Beteiligung hoher cAMP- Spiegel an der Abnahme der Calciumsensitivität woraus wiederum eine Muskelrelaxation resultiert (Hata et al 2000) (siehe Abb. 8).

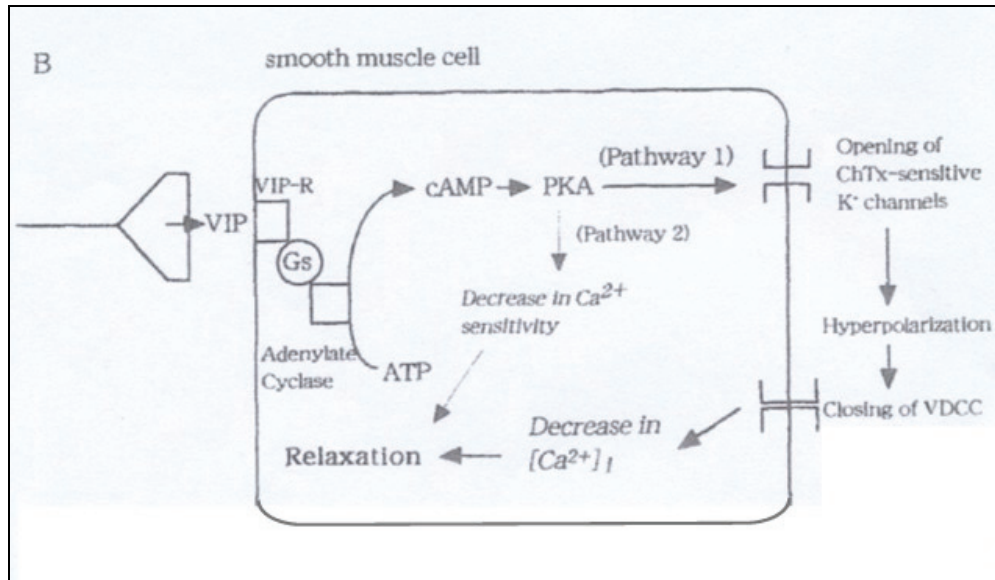


Abb. 8. Schematische Darstellung der VIP-Signalkaskade zur Relaxation der intestinalen Muskulatur (aus Hata 2000)

Daten für die VIP- induzierte Zunahme des cAMP wurden früh an isolierten Muskelzellen des Meerschweinchenmagens gefunden (Bitar und Makhlof 1982), und unter anderem in Studien des unteren Ösophagus sphinkter des Opossum (Torphy et al 1986) und des Hasenmagens (Moumami et al 1989) bestätigt. Die Assoziation der VIP induzierten PKA- Aktivierung via einer cAMP- Erhöhung wurde über den Einsatz von PKA- Inhibitoren an Zellen des Hasen- und des Meerschweinmagens (Murthy et al 1993, Murthy und Makhlof 1995), des Ileum des Meerschweins (Rekik et al 1996) und des distalen Kolons der Ratte gezeigt (Kishi et al 2000).

Murthy et al beobachteten nach Stimulierung von VIP- Rezeptoren gastrischer Muskelzellen neben einer Erhöhung der cAMP Aktivität auch eine Zunahme der cGMP, und schlossen in ihren Untersuchungen auf eine VIP-induzierte, G-Protein gesteuerte Zunahme des Calciumeinstroms mit konsekutiver NOS- Aktivierung, und deuteten das freigesetzte NO als Auslöser der Relaxation (Murthy et al 1993)

Es scheinen also verschiedene Mechanismen der VIP-induzierten Relaxation des Muskels innerhalb des Gastrointestinaltrakts möglich, eine Erklärung hierfür wären die beispielweise in den jeweiligen Neuronentypen der verschiedenen gastrointestinalen

Regionen unterschiedlichen Anforderungen oder Voraussetzungen zur Regulierung der intestinalen Motilität.

4.2.1.2. Rolle des VIP bei der inhibitorischen NANC- Transmission des ENS

Zahlreiche immunhistochemische Untersuchungen deuten bereits auf eine Rolle des VIP als Neurotransmitter innerhalb des enterischen Nervensystems, so zeigt sich VIP häufig kolokalisiert mit NO und weiteren Transmittern im submukösen sowie im myenterischen Plexus verschiedener Spezies und gastrointestinaler Regionen (Costa et al 1980, Talmage und Mawe 1993, Wattchow et al 1997, Simula et al 2001). Im Dünndarm des Meerschweinchens finden sich VIP- immunoreaktive Nervenfasern sowohl unter den kurzen und langen inhibitorischen Motorneuronen zur Zirkulärmuskulatur, als auch in cholinergen und nicht- cholinergen Interneuronen (Costa et al 1980,1996, Jessen et al 1980, Costa und Furness 1983, Brookes et al 1991); auch unter den zur Längsmuskulatur ziehenden Motorneuronen enthält ein kleiner Anteil VIP (Schultzberg et al 1980, Costa und Furness 1983).

Nachgewiesen wurde ebenfalls eine Ausbildung von Synapsen zwischen VIP- ergen Nervenfasern und NO- und VIP- enthaltenden myenterischen Neuronen (Llewellyn – Smith et al 1985, Costa et al 1996).

Einen Einfluss auf die exzitatorische Komponente der gastrointestinalen Motilität scheint VIP über eine Stimulierung der Freisetzung exzitatorischer Transmitter, insbesondere des Acetylcholin auszuüben (Kusunoki et al 1986, Katsoulis et al 1992, Yau et al 1985, 1989), seine Bedeutung als Transmitter der inhibitorischen Motorneurone des enterischen Nervensystems überwiegt jedoch. Zahlreiche funktionelle Studien belegen die Rolle des VIP bei der „nicht- adrenergen- nicht- cholinergen“ (NANC) inhibitorischen Transmission des Gastrointestinaltrakts, beispielsweise wurde eine VIP-induzierte Relaxation glatter Muskelzellen am Katzen- (Fahrenkrug et al 1978) und am Rattenmagen (Bitar und Makhlof 1982) beobachtet. Weitere Daten an verschiedenen Spezies deuten ebenfalls auf einen nicht unerheblichen Beitrag an der NANC- Transmission in verschiedenen Bereichen des Gastrointestinaltrakts, so hemmt VIP am Meerschweinchendarm die zirkuläre Muskulatur (Costa et al 1986a) und relaxiert intestinale Sphinkter wie beispielsweise den inneren Analsphinkter des Opossum (Nurko und Rattan 1988), den Sphinkter Oddi des Hundes (Wiley et al 1988) und den unteren Ösophagussphinkter des Kaninchens (Biancani et al 1984) und des Opossums (Goyal et al 1980). Weiterhin finden sich

Hinweise auf eine VIP- Beteiligung an der NANC- vermittelten Signalübertragung an Kolon von Meerschwein und Ratte (Grider und Rivier 1990).

VIP gilt entsprechend als inhibitorischer Transmitter der NANC- Transmission in zahlreichen Spezies, und seine Freisetzung wird über eine Vielzahl physiologischer Stimuli initiiert (Grider und Makhlof 1988a,b), wobei eine Abhängigkeit der VIP- Freisetzung von einem Einstrom extrazellulären Calciums über spannungsabhängige Calciumkanäle wiederum die Frage nach der Rolle der einzelnen spannungsabhängigen Calciumkanalsubtypen aufwirft, und in der vorliegenden Arbeit zum Gegenstand der Untersuchungen wurde.

4.2.2 Stickstoffmonoxid (NO) im enterischen Nervensystem

NO scheint im gesamten Organismus ein fast allgegenwärtiges multipel einsetzbares Molekül zu sein. Es dient der Regulierung des Blutflusses über eine Beeinflussung der Gefäßrelaxation, bewirkt eine Hemmung der Plättchenaggregation und trägt durch zytotoxische Eigenschaften auch zur unspezifischen Infektabwehr bei. NO spielt als Neurotransmitter eine Schlüsselrolle innerhalb des zentralen wie des peripheren Nervensystems, wo das NO synthetisierende Enzym (NOS) immunhistochemisch nachgewiesen wurde (Bredt et al 1990).

4.2.2.1 Isoformen der NO- Synthase (NOS) und deren funktionelle Bedeutung

Durch die Präsenz des NO im gesamten Organismus in unterschiedlichen Funktionen scheint die Notwendigkeit verschieden lokalisierter und steuerbarer Synthesenzyme logisch. Man unterscheidet entsprechend prinzipiell zwei Arten der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS): zum einen eine induzierbare und zum anderen eine konstitutive NOS. Die induzierbare iNOS oder NOS II, ist calciumunabhängig und produziert NO nach Stimulation wie beispielsweise durch einen Entzündungsreiz. Die NO-Bildung verläuft dabei verglichen mit der konstitutiven NOS über einen längeren Zeitraum. Die iNOS kommt unter anderem in Epithelien, in Makrophagen, in Mastzellen, hepatischen und pankreatischen Zellen vor. Das durch die iNOS produzierte NO übt in dem Zusammenhang durch eine cytotoxische Wirkung teilweise eine protektive Funktion aus. Durch Hemmung von metabolischen Enzymen oder sogar durch direkte DNA-Schädigung wirkt NO cytotoxisch auf Parasiten, Bakterien und DNA-Viren. Auch bestimmte antitumorale Eigenschaften sind bekannt, wobei wiederum mit p53 Mutation

assoziierte Tumore häufig mit einer Resistenz gegen cytotoxische Eigenschaften des Stickstoffmonoxids und gleichzeitig einer verstärkten Expression der iNOS einhergehen (Lala und Chakraborty 2001).

Die zweite Art der NOS, die sogenannte konstitutive NOS produziert calciumabhängig kurzfristig NO nach Stimulation. Eine Form der konstitutiven NOS fand man in endothelialen Zellen, die sogenannte eNOS oder NOS III (Bredt und Snyder 1992), deren Funktionen unter anderem in der Regulierung des vasalen Tonus, der Plättchenaggregationshemmung und der Freisetzung oxidativer Substanzen aus Leukozyten in der Mikrovaskulatur besteht. Eine wenn auch geringere Aktivität (10-20 %) der eNOS wird jedoch auch unter calciumfreien Bedingungen beobachtet: durch Phosphorylierung von Seronin und Threonin durch die cGMP- abhängige Proteinkinase II und die cAMP abhängige Proteinkinase zeigte sich die Möglichkeit einer teilweisen calciumunabhängigen Aktivierung (Butt et al 2000).

Eine weitere Form der konstitutiven NOS wurde im ZNS und in peripheren Nervengeweben nachgewiesen und als nNOS (NOS I) bezeichnet (Moncada et al 1991, Knowles und Moncada 1994). Immunhistochemisch konnte diese NOS auch weit verbreitet an enterischen Motorneuronen gezeigt werden (Desai et al 1994, Lefebvre et al 1995). Sowohl im ZNS (Eliasson et al 1997) als auch im enterischen Nervensystem (Huber et al 1998) wurden Unterarten der nNOS entdeckt, die infolge eines alternativen Spleißens entstehen. Man unterscheidet eine α -, eine β - und eine γ - Form der nNOS. Spleißvarianten erklären beispielsweise nNOS- Restaktivitäten bei nNOS- Knock- Out-Mäusen.

nNOS (NOS I)	ZNS ENS
iNOS (NOS II)	Immunkompetente Zellen z.B. Makrophagen
eNOS (NOS III)	Gefäßendothel

Tab. 6: Isoformen der NOS und deren Lokalisation

Pathophysiologische Bedeutung erreichen die iNOS in der Pathogenese des septischen Schocks oder rheumatischer Erkrankungen (Abramson et al 2001), und die nNOS bei Krankheitsbildern wie dem Apoplex oder bei chronisch neurodegenerativen Prozessen (Salerno et al 2002). Eine pathophysiologische Rolle der eNOS ist nicht bekannt. Daraus ergibt sich ein potentielles Interesse an selektiven Blockern der

verschiedenen NOS -Formen für die individuelle Therapie unterschiedlicher Erkrankungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde über den Versuchsaufbau des Synaptosomenmodells die nNOS (NOS I) untersucht. Die Rollen der eNOS in der enteralen Gefäßversorgung und der iNOS in der enteralen Immunabwehr wurden nicht berücksichtigt. Im weiteren Text der vorliegenden Arbeit wird daher unter der Bezeichnung NOS die NOS I verstanden.

4.2.2.2 NO- Synthese und Beeinflussung durch Kofaktoren

Die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) katalysiert über einen Calcium/ Calmodulin abhängigen Mechanismus die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO). Hierfür werden neben dem Calcium und Calmodulin (CaM) noch weitere Cofaktoren – nämlich NADPH, die Flavine FAD/FMN und Tetrahydrobiopterin (BH₄) benötigt (Bredt und Snyder 1990, Knowles et al 1989) (Siehe Abb. 9)

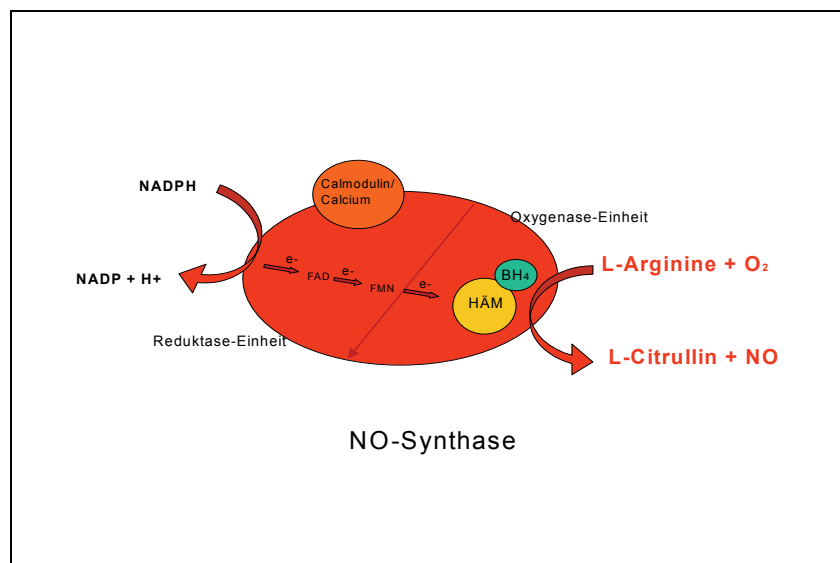


Abb. 9: Rolle der Kofaktoren der NOS (nach Alderton 2000)

Die NOS bildet ein Homo- Dimer, bestehend aus einer Reduktase- und einer Oxygenase-Einheit. Über eine PDZ-Domäne ist die neurale NO-Synthase an die Zellmembran verankert.

Bei der Reduktion von NADPH werden Elektronen (e⁻) an die Reduktase- Einheit und über FAD/ FMN zur Oxygenase- Einheit der NOS übertragen. FAD und FMN regulieren

den Transfer der Elektronen von NADPH, einem 2-Elektronen-Donor zu einem 1 Elektronen-Akzeptor, dem Häm über die Bildung von radikalischen Übergangssubstraten. Der Elektronentransfer in der Reduktase-Einheit erfordert die Bindung von Calmodulin und Calcium, bei Abwesenheit des CaM/ Ca^{2+} ist dieser verlangsamt (Matsuda und Iyanagi 1999) Durch Interaktion mit dem HÄM und Tetrahydrobiopterin (BH_4) wird die Reaktion von L-Arginin + O_2 zu Citrullin + NO katalysiert. Tetrahydrobiopterin stabilisiert einerseits die dimerische Form und trägt damit zu einer Optimierung der NOS- Aktivität bei, andererseits wird für BH_4 auch eine katalytische Rolle im Rahmen des Redoxgeschehens vermutet (Alderton et al 2001).

4.2.2.3 NO- Signaltransduktionswege im Rahmen der inhibitorischen NANC-Transmission

NO unterscheidet sich in einigen Punkten von anderen Transmittern. Zum einen stellt es mit einer Halbwertszeit von 0,5- 50 Sekunden eine eher instabile Verbindung dar, eignet sich daher nicht zur Speicherung in Vesikeln und wird entsprechend nach Bedarf synthetisiert. Anschließend diffundiert NO leicht durch Membranen und interagiert zum anderen nicht mit einem „klassischen“ membranständigen Rezeptor, sondern vermittelt direkt intrazellulär über verschiedene Signaltransduktionswege.

Ziel des NO ist dabei die lösliche Guanylatcyclase (sGC), die durch Bindung des NO an die Hämgruppe des Enzyms über eine Konformationsänderung aktiviert wird. Das Ergebnis ist über eine Umwandlung des Guanosintriphosphats eine Erhöhung des intrazellulären 3'5'-cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP) (Knowles et al 1989, Schmidt et al 1993).

cGMP steuert wiederum verschiedene Ziele innerhalb der Zelle an, es kann sowohl cGMP- abhängige Ionenkanäle beeinflussen - Daten an glatten Muskelzellen des Hundekolons zeigen einen cGMP vermittelten Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit für Kaliumkanäle mit konsekutiv durch die Hyperpolarisierung bedingter verminderter Calciumeinfuhr über spannungsabhängige Calciumkanäle (Thornbury et al 1991) - als auch zu einer Aktivierung von Phosphodiesterasen und der cGMP- abhängigen Proteinkinase (PKG) führen. Untersuchungen an Knock-out- Mäusen, welchen eine Isoform der PKG fehlt, zeigten eine Beeinträchtigung der Relaxation enterischer Muskelzellen durch die fehlende nitrerge Komponente (Ny et al 2000). Die weitere Signalkaskade der PKG erfolgt über eine Hemmung der Inositol 1,4,5-triphosphat-Synthese (Rapaport 1986, Hirata et al 1990, Schlossmann et al 2000), eine Aktivierung der Calcium- ATPase des endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulums

(Lincoln 1989) und einer Regulierung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (Huang et al 2004)

Eine vermutete direkte Aktivierung calciumabhängigen Kaliumkanäle durch NO (Bolotina et al 1994) konnte in weiteren Untersuchungen nicht bestätigt werden (Haburcak et al 1997), eine indirekte Beeinflussung der calciumabhängigen Kaliumkanäle wiederum über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und damit einer Erhöhung des cGMP wurde an verschiedenen Modellen nachgewiesen (Matsuyama et al 1999, Vanneste et al 2004).

Auch über eine Freisetzung weiterer enterischer Neurotransmitter aus der selben oder aus einer benachbarten Nervenendigung könnten NO-Effekte neben der direkten relaxierenden Wirkung auf die glatte Muskulatur vermittelt werden. Hinweise auf eine NO-bedingte Freisetzung von VIP wurde unter anderem an der zirkulären Muskulatur des Hamsters (Matsuyama et al 2002), und an Synaptosomenpräparationen des Dünndarms der Ratte gezeigt; hier schien die Freisetzung des VIP beispielsweise ebenfalls über eine Beteiligung der Proteinkinase G und der Phosphodiesterase V gesteuert zu sein (Kurjak et al 2001).

Die durch cGMP vermittelte NO-induzierte Relaxierung der glatten Muskulatur scheint in ihrem Mechanismus nicht an allen enterischen Bereichen identisch, der Effekt einer verminderten intrazellulären Calciumkonzentration oder einer verminderten Calciumsensitivität verbunden mit einer Abnahme der Kontraktilität wird allgemein akzeptiert (Denninger und Marletta 1999, Lincoln und Komalavilas 2000).

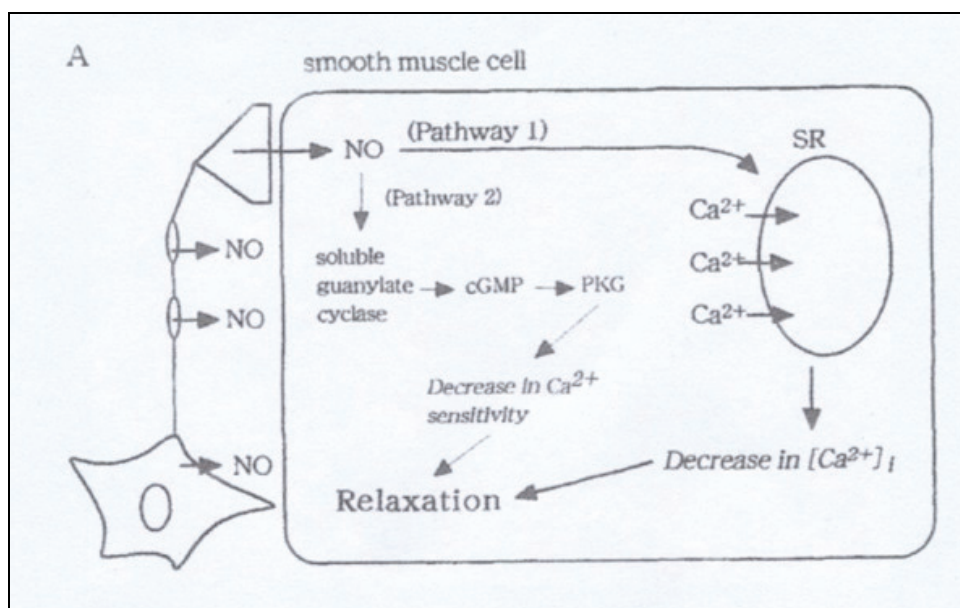


Abb. 10: Schematische Darstellung der NO-Signalkaskade zur Relaxation der intestinalen Muskulatur (aus Hata 2000)

4.2.2.4 Rolle des NO in der inhibitorischen NANC- Transmission des ENS

Die ersten immunhistochemischen Hinweise auf die Präsenz der neuralen NO-Synthase und damit auf eine Rolle als Transmitter innerhalb des ENS zeigten sich an myenterischen Neuronen und Nervenfasern der Ratte (Bredt et al 1990). Die NOS - teilweise in Kollokalisierung mit VIP - wurde im Verlauf innerhalb des gesamten Gastrointestinaltrakts verschiedener Spezies nachgewiesen, beispielsweise unter anderem im Ösophagus der Ratte (Kuramoto et al 1999), im Magen des Menschen (Tonini et al 2000, Pimont et al 2003), in Dünndarm und Sphincter Oddi des Opossum (Simula et al 2001), im Dünn- und Dickdarm der Maus (Sang und Young 1998), Pylorus und ileokolischen Sphinktern des Hundes (Ward et al 1994) oder auch in zahlreichen Subpopulationen myenterischer Nervenfasern des Meerschweinchen-dünndarms wie den deszendierenden inhibitorischen Motorneurone und den zu weiteren myenterischen Ganglien und zum submukösen Plexus ziehenden deszendierenden Interneuronen (Costa et al 1992, 1996, Furness et al 1994b).

Durch den fehlenden Membranrezeptor des NO wurde seine Rolle in der Neurotransmission zunächst indirekt über eine Blockierung des Syntheseapparates untersucht. Eine Hemmung der NOS zeigte eine Reduzierung der nach elektrischer Stimulierung ausgelösten NANC- Relaxation an gastrointestinalen Muskelzellen (Sanders und Ward 1992, Desai et al 1991), wie zum Beispiel des unteren Ösophagussphinkters (De Man et al 1991), Pylorus (Allescher et al 1992), Duodenums (Toda et al 1990), Jejunums (Stark et al 1991), terminalen Ileums (Boeckxstaens et al 1990, 1991), des ileokolischen Sphinkters und Kolons (Ward et al 1992a, Huizinga et al 1992) des Hundes. Ähnliche Daten wurden am Rattenmodell am Magen (Lefebvre et al 1992, Li und Rand 1990, Boeckxstaens et al 1992) oder Jejunum (Irie et al 1991) und zahlreichen weiteren gastrointestinalen Bereichen und Spezies erhoben. Die inhibitorische NANC- Transmission der menschlichen Zirkulärmuskulatur des Dünndarms zeigte sich ebenfalls nach Blockierung der NOS über L-NNA bis zu 65% reduziert (Maggi et al 1991).

Auch Eingriffe in die konsekutiven Schritte der NO- Signalkaskade, beispielsweise über Blockierung des intrazellulären NO- Ziels der löslichen Guanylatcyclase durch Methylenblau oder selektivere Inhibitoren führten sowohl zu einer Reduzierung der durch elektrische Stimulierung ausgelösten als auch der nach Zugabe exogenen NOs erzeugten Relaxation (Franck et al 1997, Lefebvre 1998, Shahin et al 2000).

Verschiedene Daten weisen neben der prägnanten inhibitorischen Rolle des NO auch auf eine modulierende Beeinflussung der exzitatorischen Komponente der enterischen Transmission, beispielsweise in Form eines tonisch inhibitorischen Effekts: Studien am

Modell der Katze, der Ratte, des Meerschweins oder des Menschen führten unter Hemmung der NOS zu einer Zunahme der intestinalen Compliance oder einer Zunahme des intraluminalen Drucks und der kontraktilen Aktivität (Maggi et al 1991, Calignano et al 1992, Gustafsson und Delbro 1993, Waterman und Costa 1994, Waterman et al 1994), bzw. zu einer Potenzierung der ascendierenden Exzitation (Allescher et al 1992).

Weitere Untersuchungsmodelle zeigten eine NO- bedingte Freisetzungshemmung sowohl cholinerg als auch nicht- cholinerg Transmitter (Hryhorenko et al 1994, Holzer- Petsche et al 1996, Tonini et al 2000), es werden aber auch stimulierende Effekte des NO auf die Freisetzung exzitatorischer Transmitter wie Acetylcholin und Substanz P beschrieben (Gustafsson et al 1990, Wiklund et al 1993). Zu deuten sind diese scheinbar widersprüchlichen Daten der NOS- Funktion vermutlich als Hinweise auf die Plastizität des enterischen Nervensystems und seine Fähigkeit der Modulation und bedarfsangepassten Steuerung der Transmission zur Regulation der Motilität.

Die entscheidende Rolle des NO als inhibitorischer Transmitter der NANC- vermittelten Relaxation wird durch zahlreiche Daten verschiedener Untersuchungsmodelle und Spezies gestützt; offen bleibt jedoch die Frage nach den genauen Regulationsmechanismen der NO- Freisetzung. Die differenzierten Signalwege und Funktionen des NO scheinen in der Konsequenz auch eine differenziert zu modulierende Steuerung zu erfordern.

Eine Möglichkeit hierfür ergibt sich aus der Calciumabhängigkeit der NOS in der NANC- Transmission (Boeckxstaens et al 1993a). Der Calciumeinstrom über spannungsabhängige Calciumkanäle kann durch die verschiedenen Subtypen und ihre jeweiligen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften differenziert reguliert werden (siehe Kap.4.3.), und stellt daher einen interessanten Aspekt in der Frage nach der Regulation der NOS- Aktivität dar.

4.2.3 Klinische Relevanz der NANC- Neurotransmission bei gastrointestinalen Krankheitsbildern

Aufgrund der Komplexität des enterischen Nervensystems können pathophysiologische Veränderungen des ENS durch zahlreiche verschiedene Ursachen entstehen.

Zum einen sind Störungen der embryonalen Entwicklung des ENS wie beispielsweise Mutationen der Tyrosinkinase- Rezeptoren, wie z.B. des „Ret“- (Edery et al 1994) oder

des „Kit“- Rezeptors (Burns et al 1996) mit Motilitätsstörungen, bzw. dem Auftreten eines Megacolon vergesellschaftet. Auch die funktionelle Ausschaltung von Endothelin-Rezeptoren, z.B. des Endothelin 3- und Endothelin B-Rezeptoren beeinträchtigt die Entwicklung des ENS und führt zur Ausbildung eines aganglionären Megacolons (Baynash et al 1994, Puffenberger 1994).

Eine durch Frühgeburt „physiologisch“ bedingte unzureichende Ausreifung des enterischen Nervensystems scheint an der Entstehung der bei extrem Frühgeborenen nicht selten auftretenden **nekrotisierenden Enterokolitis** (NEC) beteiligt. Immunhistochemisch zeigen die betroffenen Darmsegmente eine mangelhafte Ausbildung der inhibitorischen NANC- Innervation, was wiederum erklärend für die Motilitätsstörungen mit konsekutiver bakterieller Überwucherung und Durchwanderung der Darmwand zu sein scheint (Sigge et al 1998).

Angeborene Erkrankungen wie die infantile hypertrophe Pylorusstenose und der Morbus Hirschsprung zeichnen sich durch ein Fehlen inhibitorischer Neurone und dadurch resultierende stenotische Veränderungen aus. Bei der **infantilen hypertrophen Pylorusstenose**, die sich in schwallartigem Erbrechen in den ersten Lebenswochen der betroffenen Säuglinge äußert, zeigt sich im Bereich des Pylorus ein Mangel an NOS- haltigen Motorneuronen und klinisch eine Obstruktion des Magenausgangs mit einer Verdickung der Tunica muscularis. Bei dem Krankheitsbild des **Morbus Hirschsprung** stenosieren unterschiedlich lange Abschnitte des Kolons, meist in den distalen Abschnitten und führen zu ausgeprägter Dilatation vor den betroffenen Regionen (Goyal und Hirino 1996).

Ein im Laufe des Lebens auftretender Verlust myenterischer Neurone oder ein selektiver Verlust VIP/ NO- haltiger inhibitorischer Neurone des unteren Ösophagusphinkter, bzw. des mittleren und unteren Ösophagusdrittels kennzeichnet die **Achalasie**. Klinisch fällt eine tonische Kontraktion des unteren Ösophagusphinkters, bzw. eine gestörte Peristaltik des betroffenen Ösophagusbereichs auf. Häufig ist die Ursache für den Neuronenverlust unklar. Paraneoplastische Syndrome, Parkinsonsyndrome und die Chagaskrankheit sind mögliche Auslöser für neurale degenerative Prozesse (Goyal und Hirino 1996)

Funktionsausfälle oder Funktionsbeeinträchtigung der inhibitorischen NANC-Transmission, bzw. der Regulierung kontrahierender und relaxierender Signale führen auch zu weiteren Störungen der gastrointestinalen Motilität, die sich in einer Reihe klinisch häufig auftretender Symptome bemerkbar machen. So beschreibt die „**funktionelle Dyspepsie**“ ein Syndrom, welches mit Oberbauchbeschwerden, Völlegefühl und Übelkeit einhergeht. Als Erklärungen für die genannten Symptome

werden eine gestörte, weil verzögerte Magenentleerung (Talley et al 2001), eine verminderte Magenanpassung (Berstad et al 1997) oder auch eine Hypersensibilität auf eine Dehnung des Magens (Tack et al 2001) genannt. Im Falle der eingeschränkten Anpassungsfähigkeit des Magens an Volumina könnte ein therapeutischer Ansatz in der Stimulierung inhibitorischer NANC- Neurone bestehen (Tack et al 1998, Quarero et al 1998).

Auch der **Gastroösophageale Reflux (GÖR)** geht mit Störungen der Regulation inhibitorischer Transmission einher. Die physiologische Motilität des Ösophagus wird über exzitatorische cholinerge Komponenten und inhibitorische NANC- Komponenten gesteuert, wobei NO und VIP in der inhibitorischen Transmission eine entscheidende Rolle spielen. Außerdem wird die Relaxation des unteren Ösophagussphinkter über eine Dehnung des proximalen Magens stimuliert (Boulant et al 1997). Beim GÖR führen vermehrte transiente Relaxationen des unteren Ösophagussphinkters (Talley NJ et al 1999) zu der Symptomatik des Reflux. Untersuchungen an betroffenen Patienten zeigten erhöhte Serumwerte für Abbauprodukte des NO und für VIP, eine Rolle der beiden Transmitter in der Pathogenese des GÖR wurde daher postuliert (Kassim et al 2003). Angriffspunkte therapeutischer Interventionen ergäben sich aus diesen Punkten in der Modulierung der inhibitorischen Transmitter sowohl im Bereich des unteren Ösophagussphinkter, als auch im Bereich des Magenfundus.

Eine weitere bekannte funktionelle Verdauungsstörung wird durch den Begriff des „**irritablen Darmsyndroms**“ beschrieben, wobei abdominelle Beschwerden mit Veränderungen der Darmtätigkeit im Sinne von Obstipation, Diarrhoe oder einem Wechsel der beiden einhergehen. Die Ursache ist vermutlich multifaktoriell und beinhaltet eine viszerale Hypersensitivität, funktionelle Besonderheiten des ZNS, Veränderungen der intestinalen Motilität und auch psychosoziale Faktoren (Schwartz und Stollmann 2000). Bezogen auf die Motilität wurden in einigen Studien Veränderungen innerhalb des Dick- und in einigen Fällen auch im Bereich des Dünndarms beobachtet (Kellow et al 1999). Betroffene Patienten zeigten beispielsweise Veränderungen des Kontraktionsmusters und der Phasendauer im Ablauf der interdigestiven MMCs, und postprandial vermehrt phasische Kontraktionen des Kolons. Therapeutisch interessant zu diesem Aspekt ist wiederum die Rolle des NO und des VIP als Modulatoren, bzw. Suppressoren exzitatorischer also kontrahierender Transmission.

In Anbetracht der Bedeutung veränderter inhibitorischer Transmission im Rahmen einer Vielzahl von Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts und der sich daraus

ergebenden therapeutischen Ansätze, erscheint das Verständnis der Regulation der einzelnen inhibitorischen Transmitter und deren wechselseitige Beeinflussung von eminenter Bedeutung. Eine entscheidende Rolle in der Freisetzung unterschiedlicher Transmitter, und insbesondere der für die inhibitorische NANC- Transmission verantwortlichen VIP und NO spielen die spannungsabhängigen Calciumkanäle und werden auf Grund dessen in der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet.

4.3. Spannungsabhängige Calciumkanäle

Über Aktionspotentiale und Neurotransmitter wird Information innerhalb eines neuronalen Netzwerks vermittelt. Dabei wird die Vielfältigkeit dieser Information unter anderem über Anzahl und Eigenschaften verschiedener Ionenkanäle moduliert. Unter diesen spielen die spannungsabhängigen Calciumkanäle durch ihre weite Verbreitung und ihre Funktionen sowohl innerhalb des zentralen als auch des enterischen Nervensystems eine bedeutende Rolle. Unter Ruhebedingungen besteht ein 10.000-facher Konzentrationsunterschied zwischen extra- und intrazellulärer Calciumkonzentration. Wird die Plasmamembran jedoch depolarisiert, kommt es zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle (Heinonen et al 1985) und extrazelluläre Calciumströme werden innerhalb einer Sekunde entlang eines Gradienten rasch in das Zytoplasma der Zelle geschleust (Drapeau und Blaustein 1983).

Weitere Möglichkeiten der Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels ergeben sich aus der Aktivierung Liganden- Rezeptor- gesteuerter Calciumkanäle, wie beispielsweise dem glutaminergen NMDA- Rezeptor oder über eine Calciumfreisetzung und -aufnahme aus bzw. in intrazelluläre Kompartimente wie dem sarkoplasmatischen Retikulum. Diese spielen neben den Zellmembran gebundenen spannungsabhängigen Calciumkanälen eine weitere Rolle in der Steuerung der neuronalen Erregbarkeit und der Transmissionsvorgänge, auf die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher eingegangen wird.

Die intrazellulären Calciumsignale agieren als second messenger indem sie zahlreiche biochemische und elektrische Vorgänge der Zelle initiieren oder regulieren. Ihre Funktion erstreckt sich dabei über die Steuerung verschiedener Enzyme, die Kontrolle der calciumabhängigen Gentranskription oder auch die Aktivierung weiterer

calciumabhängiger Ionenkanäle zur Regulierung der neuronalen Erregbarkeit. Sie sind essentiell für die Kontraktion sowohl der gestreiften als auch der glatten Muskulatur und - dies ist besonders im Kontext der vorliegenden Arbeit von Interesse - tragen wesentlich zur Freisetzung bestimmter Neurotransmitter bei (Katz und Mild 1969, Augustine et al 1987).

4.3.1. Charakterisierung der Subtypen der spannungsabhängigen Calciumkanäle

Bei der Vielfalt der calciuminduzierten Effekte und der komplexen zeitlich und regional erforderlichen Regulierung des Calciumeintritts, scheint die Notwendigkeit verschiedener spannungsabhängiger Calciumkanäle offensichtlich, und es sind aufgrund ihrer pharmakologischen, elektrophysiologischen und molekularbiologischen Eigenschaften mehrere Subtypen, bisher L-, N-, P-, Q-, R- und T- Typ Calciumkanäle, klassifiziert. (Siehe Tabelle 7 Seite 45 und Tabelle 8 Seite 52)

4.3.1.1 Pharmakologische Charakterisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle

Die pharmakologische Differenzierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle und damit auch Untersuchungen zu deren individuellen Beeinflussung bestimmter Funktionen erfolgt über ihre jeweilige Blockierung.

Liganden des L-Typ- Calciumkanals spielen sowohl klinisch als auch experimentell eine interessante Rolle, hierzu gehören prinzipiell drei Substanzklassen, die Phenylalkylamine (PAA), die Benzothiazepine (BTZ) und Dihydropyridinderivate (DHP). Phenylalkylamine (PAA), wie Verapamil, Gallopamil oder Devapamil und Benzothiazepine (BTZ) wie Diltiazem blockieren Calciumströme über den L- Typkanal und führen dort auch zu einer allosterischen Veränderung des Kanals, die wiederum eine veränderte Affinität für die Dihydropyridine bewirkt (Glossmann und Striessnig 1990). Sowohl die Substanzen der PAA- Familie als auch die Benzothiazepine hemmen den L-Typ-Calciumkanal nicht selektiv, und sind daher für Untersuchungen zur Differenzierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle nicht optimal. Kennzeichnend für alle L- Typ- Calciumkanäle ist ihre Sensitivität für Dihydropyridine, zu denen sowohl blockierende Substanzen wie beispielsweise Nifedipin, Nisoldipin oder auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Isradipin gehören, als auch

Substanzen wie Bay K 8644, das eine aktivierende Wirkung auf den L-Typ-Calciumkanal besitzt. Es bindet spezifisch an die $\alpha 1C$ und $\alpha 1D$ - Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals.

In den 80'er Jahren fand man an neuronalen Strukturen Calciumkanäle, welche nicht über Dihydropyridine hemmbar waren, und deren Leitfähigkeit nicht denen der L- oder T-Typ- Calciumkanäle zuzuordnen war (Nowycky et al 1985, Fox et al 1987). Sie wurden entsprechend („neuronal“) zunächst allgemein N-Typ-Kanäle genannt, und im weiteren Verlauf anhand ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen aus den Giften von Meeresschnecken und Spinnen gewonnenen Substanzen unterteilt. Dabei blieb die Bezeichnung N- Typ-Calciumkanäle denjenigen Kanälen, die eine hohe Sensitivität gegenüber ω - Conotoxin GVIA zeigten. Diese Substanz gehört zu der Gruppe der Conotoxine, welche in der Natur von in warmen Gewässern des westlichen Pazifik in einer Tiefe bis zu 30 m lebenden Meeresschnecken zur Beutejagd verwendet werden. Conotoxine sind eine Gruppe relativ kleiner Proteine, die mit hoher Affinität und Spezifität das Nervensystem angreifen, und je nach Untergruppe über eine Blockierung von Natrium-, und oder Calciumkanälen wirken (Olivera et al 1991). Dabei wird das Gift über harpunähnliche Stacheln injiziert, und führt zu einer schlagartigen Lähmung des Opfers. Besonders die Gattung der Fische jagenden Meeresschnecken verfügt über hochtoxische Gifte, unter Ihnen befinden sich auch einige für den Menschen gefährliche Spezies, zu welchen besonders die Schnecke *Conus geographicus* gehört. Deren Toxin blockiert spezifisch den presynaptischen N-Typ- Calciumkanal.



Abb. 11: Abbildung der Meeresschnecke *Conus geographicus*

Über den Einsatz des ω - Conotoxins GVIA konnten N- Typ- Kanäle in zahlreichen neuronalen Strukturen nachgewiesen und charakterisiert werden (Plummer et al 1989, Carbone et al 1990, Regan et al 1991).

Durch Isolierung weiterer calciumkanalspezifischer Toxine aus anderen Gattungen der Meeresschnecken konnten auch weitere Calciumkanäle genauer untersucht werden. Aus dem Gift der *Conus magus* wurden vier ω - Conopeptide gewonnen: ω - Conotoxin MVIIA, MVIIB, MVIIC und MVIID (Monje et al 1993). ω - Conotoxin MVIIC blockiert den Q- und in bestimmten Konzentrationen auch den N-Typ-Calciumkanal.

Die Strategie des Beutefangs mit Hilfe des Einsatzes hochwirksamer Toxine ist auch bei Spinnentieren weit verbreitet. Die in Nordamerika vorkommende Trichternetzspinne (*Agelenosis aperta*) produziert ein aus drei verschiedenen Neurotoxinen bestehendes Gift, eines dieser Neurotoxine - ω - Agatoxin- IVA - blockiert selektiv den P-Typ-Calciumkanal (Adams 1990). Diese Hemmung ist durch weitere Depolarisationen reversibel, was wiederum auf eine Abhängigkeit der Toxinbindung von deren Konformität des Kanals deutet (Mintz et al 1992). Diejenigen Kanäle, die auf die oben beschriebenen spezifischen Toxine bzw. Substanzen nicht ansprechen, wurden dementsprechend R- („resistant“)- Typ- Calciumkanäle genannt. Ein weiterer Calciumkanaltyp ohne entsprechenden organischen Blocker wurde auf Grund seiner elektrophysiologischen Charakteristika T- Typ-Calciumkanal genannt (siehe auch 4.3.1.2.). R- und T- Typ Calciumkanäle werden über Ni^{2+} blockiert, wobei die R-Typ-Kanäle sensitiver gegenüber einer Blockierung mit Ni^{2+} reagieren und dadurch identifiziert werden.

Obwohl die verschiedenen Toxine und Substanzen essentiell für die Differenzierung der verschiedenen Calciumkanäle sind, ist eine Interpretation der an Hand ihrer Verwendung gewonnenen Daten nicht immer ganz einfach, da ihre Selektivität in einigen Fällen wie beispielsweise dem oben bereits erwähnten ω - Conotoxin MVIIC von der eingesetzten Konzentration der Substanz abhängig ist. Der Effekt und die Selektivität des verwendeten Blockers ist also einerseits von seiner Konzentration, andererseits von der Zeitspanne der Bindung und von der aktuellen Konformität des jeweiligen Calciumkanals abhängig.

Tabelle 7 nennt den jeweiligen Calciumkanalsubtypen zugeordnete wichtige Kanalblocker in den geläufigen Konzentrationen.

Ca ²⁺ -Kanal- Subtyp	Ca ²⁺ -Kanalblocker	
L-Typ- Ca ²⁺ - Kanal	Isradipin (7-10-30-300nM) ¹ (DHP)	Cadmium (100-200µM) ⁸
N-Typ- Ca ²⁺ - Kanal	ω- CTx- GVIA (1-5µM) ²	
P-Typ- Ca ²⁺ - Kanal	ω- Agatx- IVA (1- 30-80 nM) ³	
Q-Typ- Ca ²⁺ - Kanal	ω-CTx- MVIIC (1 µM) ⁴	
R-Typ- Ca ²⁺ - Kanal	Ni ²⁺ (1-50µmol) ⁵	
T-Typ- Ca ²⁺ - Kanal	Ni ²⁺ (12-200 µmol) ⁶ , Mibefradil (≥0,1µmol) ⁷	

Tabelle 7: Blocker der einzelnen Calciumkanalsubtypen in den jeweiligen üblichen Konzentrationen (Konzentrationsunterschiede beruhen auf Subtypen der jeweiligen Kanaltypen oder unterschiedlichen Versuchsansätzen)

¹Catterall et al 2005, ²Ellinor et al 1993, Fossier et al 1994, Wheeler et al 1994, Haage et al 1998, ³Alexander et al XX, Turner et al 1992, 1993., Wheeler et al 1994, Haage et al 1998, ⁴Mintz et al 1992, ⁵Bian et al 2004, ⁶: Lee JH et al 1999, ⁷:Strege et al 2005, ⁸Williams et al 1999, Haage et al 1998

4.3.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle

Primär können elektrophysiologisch zwei Arten spannungsabhängiger Calciumkanäle unterschieden werden, zum einen sind dies Calciumkanäle, welche bereits unter relativ niedriger Spannung (LVA- Calciumkanäle) aktiviert werden, und zum anderen jene Kanäle, die sich erst ab einer höheren Spannung (HVA- Calciumkanäle) öffnen (Hagiwara et al 1975, Llinás und Yarom 1981).

Zu den ersteren gehört nur der **T-Typ- Calciumkanal**, er kommt in verschiedenen Geweben wie neuronalen Strukturen, der glatten, der kardialen, und der Skelettmuskulatur, Niere, Leber und vielen endokrinen Organen vor, und wird verglichen mit den anderen Kanalsubtypen bereits bei sehr niedrigen Schwellenwerten (> -70mV) aktiviert. Kennzeichnend für den T-Typ- Calciumkanal ist weiterhin seine kleine Leitfähigkeitsamplitude und eine rasche Inaktivierung. Diese Eigenschaften leiten seinen Namen aus „tiny“ und „transient“ entsprechend als T-Typ- Kanal ab. Eine

Rolle scheint der T-Typ-Calciumkanal unter anderem in der Schrittmacherfunktion des sinoatrialen Knoten am Herzen (Hagiwara et al 1988), im Rahmen der Hormonsekretion der Nebenniere (Cohen et al 1988), bei der Bildung von Aktionspotentialen und in Weiterleitung, bzw Verstärkung von Signalen entlang von Dendriten (Perez Reyes 2003) zu spielen.

Zu den erst ab einer höheren Schwellenspannung (>-20 mV) geöffneten Calciumkanälen zählen die L-, N-, P-, Q und R-Typ- Calciumkanäle.

Die **L-Typ- Calciumkanäle** sind eine in sich heterogene Gruppe, so wurden sie weit verbreitet in verschiedenen Organen als unterschiedliche Subtypen gefunden (siehe auch 4.2.1.2). Dabei ähneln sich die L-Typ-Kanäle auf neuronalen, kardialen und sekretorischen Zellen in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften, während sich die L-Typ-Kanäle auf Zellen der Skelettmuskulatur beispielsweise durch eine deutlich langsamere Aktivierung unterscheiden. Häufig finden sich Kolokalisationen verschiedener L-Typ-Calciumkanäle auf einem Zelltyp, auf neuronalen Zellen beispielsweise an Granulosazellen des Rattenhirns (Forti und Pietrobon 1993) oder auch an kultivierten Myozyten der Aorta von Ratten (Neveu et al 1993).

Insgesamt ist die Leitfähigkeit der L-Typ- Calciumkanäle besser und andauernder als die der T-Typkanäle, so findet kaum, bzw. erst spät eine zeit- oder spannungsabhängige Inaktivierung statt. Auf Grund dieser Eigenschaften einer großen Leitfähigkeitsamplitude („Large“), und einer langsamen Kinetik des geöffneten Kanals („Long-lasting“), ergab sich die Bezeichnung L-Typ-Calciumkanal.

N-Typ- Calciumkanäle gehören zu den auf neuralen Strukturen am besten untersuchten Calciumkanälen. Ihre Leitfähigkeit liegt unter der der L-Typ Calciumkanäle, und sie werden bei einer Spannung von -30 mV inaktiviert, während L-Typ Calciumkanäle in diesem Bereich noch geöffnet sind. Ein weiteres Merkmal ist der über zelluläre Faktoren steuerbare Zeitverlauf der Inaktivierung. So kann an einem Calciumkanal vom N-Typ je nach Bedarf von „schneller“ zu „langsamer“ Inaktivierung gewechselt werden (Plummer und Hess 1991).

An Purkinje-Zellen wurden 1989 die entsprechend dem Ort ihrer Erstbeschreibung benannten **P- Typ- Calciumkanäle** durch Llinás et al charakterisiert (Llinás et al 1989). Sie zeigen nach Aktivierung bei ca -40 mV analog zu den L-Typ- Calciumkanälen eine sehr langdauernde Öffnung, wobei verschiedene Leitfähigkeiten des P-Typ-Kanals zumindest an Purkinje Neuronen nachgewiesen wurden (Usovicz et al 1992),

Ebenfalls zur Gruppe der unter hoher Spannung aktivierbaren Calciumkanäle gehören die Kanäle des **R-Typs**, welche ähnlich den N-, und P-Typ-Kanälen eine bei relativ hoher Spannung bereits wieder einsetzende Inaktivierung zeigen, zusätzlich zeigen sie

– eine weitere Ähnlichkeit zu den T-Typ-Kanälen- eine rasche zeitabhängige Inaktivierung (Zhang et al 1993).

4.3.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle

In den 1980'er Jahren wurden auf Grund molekularbiologischer Untersuchungen weitere Klassifizierungen der spannungsabhängigen Calciumkanäle entwickelt. Über Klonierungsstudien zeigte sich, dass die Calciumkanäle aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind, welche verschiedene Funktionen übernehmen und in den unterschiedlichen Organen und Geweben wiederum jeweils in verschiedenen Subtypen der jeweiligen Untereinheit auftreten.

Prinzipiell besteht der Aufbau der spannungsabhängigen Calciumkanäle in den meisten Organen aus einer aus drei Untereinheiten – der α_1 -, der α_2 - δ und der β – Untereinheit- geformten Öffnung. Am Skelettmuskel ist findet sich auch eine γ -Untereinheit.

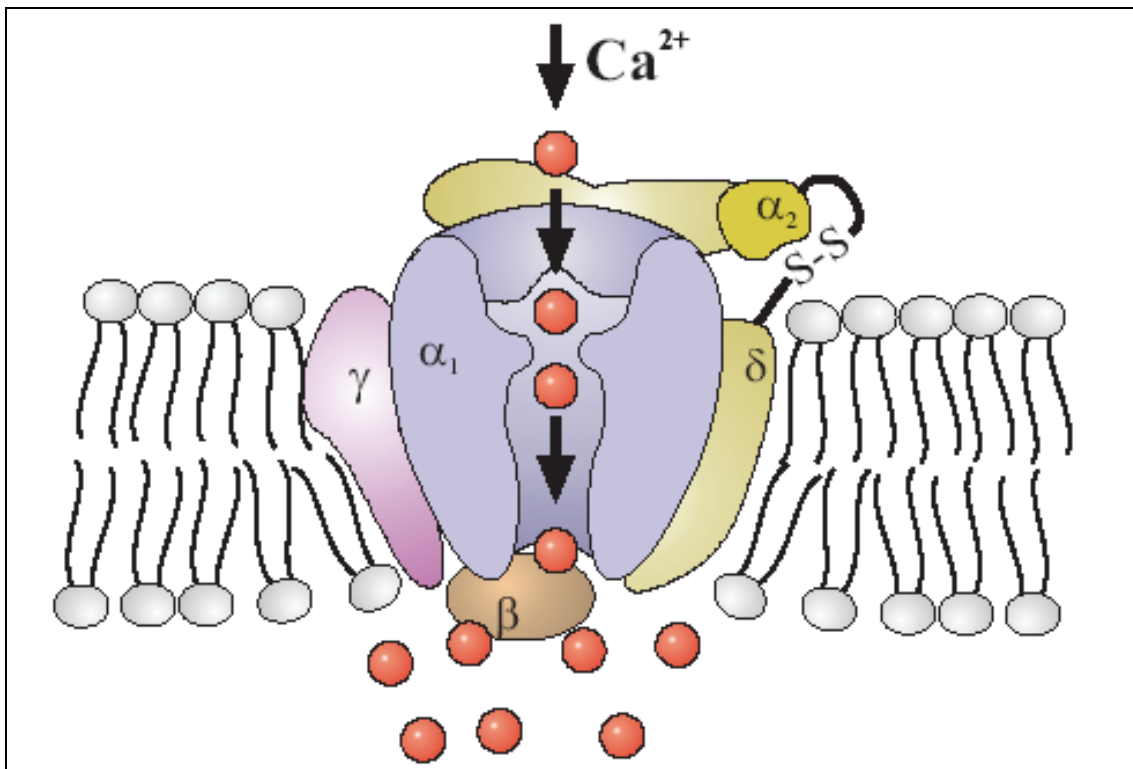


Abb. 12: Aufbau der Untereinheiten Calciumkanal (aus Lacinova 2005b)

Dabei werden durch die **$\alpha 1$ - Untereinheit** die wesentlichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften, welche auch zu der oben beschriebenen Einteilung in die Calciumkanalklassen führten, bestimmt (Catterall 1998).

Die $\alpha 1$ - Untereinheit der spannungsabhängigen Calciumkanäle sind große Proteine und gehören wie die spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle zur Familie der spannungsabhängigen Ionenkanäle. Die Struktur der $\alpha 1$ - Untereinheit bilden vier homologe Domänen (I-IV), die jeweils aus sechs transmembranen helikalen Segmenten aufgebaut sind.

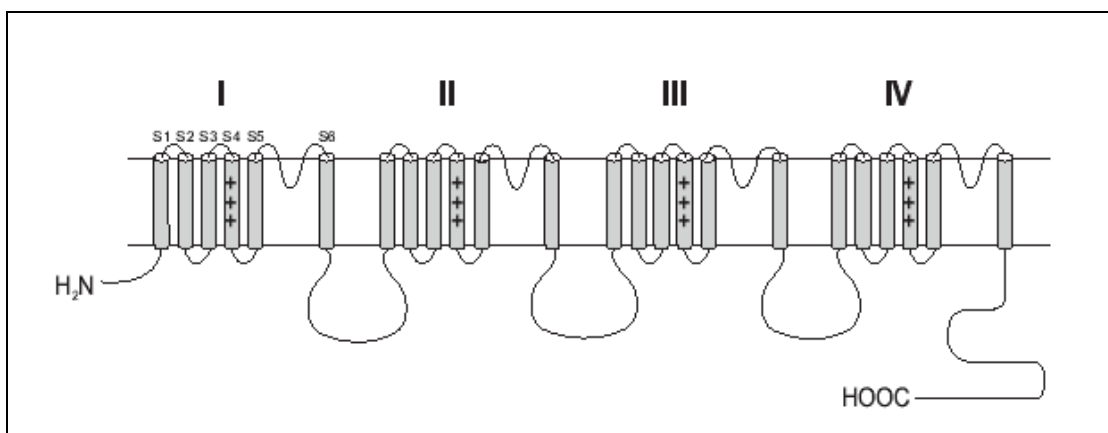


Abb. 13: Schematische Darstellung der $\alpha 1$ - Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle (aus Lacinova 2005b)

Das jeweilige Segment 4 der einzelnen Domänen enthält positiv geladene Arginine und Lysine, ist damit insgesamt positiv, und dient als eine Art Spannungsmesser der Calciumkanalöffnung. Veränderungen des Segment 4 während der Aktivierung des Kanals wurden für den spannungsabhängigen Kaliumkanal beschrieben (Glauner et al 1999), ausgehend von der strukturellen Übereinstimmung der spannungsabhängigen Kanäle kann von einer ähnlichen Funktion des Segment 4 der spannungsabhängigen Calciumkanäle ausgegangen werden (Lacinova 2005b). Weiterhin befindet sich zwischen Segment 5 und 6 jeder Domäne eine Pore, in deren Region sich vermutlich eine Art Filter befindet, der für die hohe Selektivität des Kanals für Calciumionen verantwortlich ist. (siehe Abbildung 13). Schließlich enthält die $\alpha 1$ - Untereinheit noch zahlreiche Bindungsstellen für verschiedene Liganden, G-Proteine, und natürlich auch für die weiteren den spannungsabhängigen Calciumkanal bildenden und modulierenden Untereinheiten: die $\alpha 2$ - δ -, die β -Untereinheit und die ggfs. vorhandene

γ - Untereinheit, welche im neuronalen Kontext keine Rolle spielt, und aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit nicht näher erläutert wird.

Molekulargenetische Untersuchungen zeigten mindestens 10 Gene welche für die $\alpha 1$ - Untereinheit der spannungsabhängigen Calciumkanäle kodieren. Sie bilden entsprechend jeweils Untereinheiten $\alpha 1A$ - $\alpha 1I$ und $\alpha 1S$ (Snutch et al 1990, Soong et al 1993, Lacinova et al 2005)

Die **$\alpha 2$ - δ - Untereinheit** ist ein glykosyliertes Protein, das posttranslational geteilt aus einer über Disulfidbrücken verbundenen extrazellulären $\alpha 2$ - und einer membranösen δ - Untereinheit (De Jongh et al 1990, Gurnett et al 1996) besteht. Die $\alpha 2$ - Untereinheit ist dabei auf Grund ihrer Struktur für eine Stimulierung des Kanals zuständig (Gurnett et al 1996), während der δ - Teil für eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungsschwelle, die Inaktivierung im Ruhezustand und die Modulierung der Inaktivierungskinetik verantwortlich ist (Felix et al 1997). Vier verschiedene Subtypen der $\alpha 2$ - δ - Untereinheiten sind bekannt (Lacinova 2005).

Die kanalmodulierende Rolle der $\alpha 2$ - δ - Untereinheit ist im Vergleich zur β -Untereinheit nicht eindeutig geklärt, wobei verschiedene Autoren unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zwar uneinheitliche, jedoch nicht widersprüchliche Ergebnisse finden. So wird beispielsweise in einigen Studien eine Zunahme der Stromamplitude durch eine funktionelle Coexpression der $\alpha 2$ - $\delta 1$ - Untereinheit mit verschiedenen Kombinationen von $\alpha 1$ - und β -Untereinheiten gefunden (Singer et al 1991, de Waard und Campbell 1995, Gurnett et al 1996, Felix et al 1997), andere Versuchsreihen konnten diesen Effekt nicht beobachten (Welling et al 1993a, Qin et al 1999). Weitere physiologische Eigenschaften wie die Zeitabhängigkeit der Kanalaktivierung oder Verschiebungen der Hyperpolarisierung in der Inaktivierungskurve weisen ähnlich unterschiedliche Untersuchungsergebnisse in der Literatur auf, wobei aber wie bereits zuvor erwähnt keine Diskrepanz, sondern vielmehr eine Beschreibung unter verschiedenen Bedingungen vorhandener oder nicht vorhandener Effekte berichtet wird.

Untersuchungen deuten auf eine die Interaktion zwischen Calciumkanal und Calciumkanalblocker modulierende Funktion der $\alpha 2$ - δ - Untereinheit. Mould et al fanden eine von der $\alpha 2$ - $\delta 1$ - Untereinheit abhängige Abnahme der Blockierung des N-Typ-Calciumkanals durch verschiedene ω - Conotoxine (Mould et al 2004). Klinisch interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Möglichkeit einer Hochregulierung der Expression der $\alpha 2$ - δ - Untereinheiten unter bestimmten Schmerzzuständen (Luo et al 2002).

Die **β -Untereinheit** liegt intrazellulär (siehe auch Abb. 12) und kommt gemeinsam mit der $\alpha 1$ - Untereinheit in allen HVA-Calciumkanälen vor, während sie in den LVA-

Calciumkanälen vom T-Typ bisher nicht nachgewiesen werden konnten (Lacinova 2000). Sie bindet an die Schleife zwischen den Domänen I und II der $\alpha 1$ - Untereinheit (Pragnell et al 1994).

Es sind bisher vier Isoformen der β -Untereinheit (β_{1-4}) bekannt (Hofmann et al 1999), so sind beispielsweise für den neuronalen L-Typ-Calciumkanal am ZNS vier verschiedene regional unterschiedlich gewichtet vorkommende β - Untereinheiten nachgewiesen worden, deren Heterogenität bereits auf eine mögliche Feinmodulierung der Funktion weist (Pichler et al 1997). Zusätzlich kommen zu jeder Isoform wiederum zahlreiche Spleißvarianten vor. Dabei scheint der Kern der β -Untereinheiten identisch zu sein, ihre Amino- und Carboxyterminalen und Teile der zentralen Region unterscheiden sich jedoch erheblich (Lacinova 2005), wodurch es zu einer Potenzierung der funktionellen und strukturellen Vielfalt der Calciumkanäle kommt. Die komplexen modulierenden Effekte der verschiedenen β -Untereinheiten beinhalten unter anderem eine Steigerung des maximalen Calciumflusses durch den Kanal (Singer et al 1991) über verschiedene Mechanismen wie der Aktivierung einer größeren Porenanzahl oder der vereinfachten Öffnung der Poren (Neely et al 1993, Kamp et al 1996). Weitere Funktionen der β -Untereinheit erstrecken sich über die Regulierung von Gentranskription (Hibino et al 2003) und analog zur $\alpha 2\text{-}\delta$ - Untereinheit Modulation der Affinität für bestimmte Calciumkanalblocker (Lacinova et al 1995, Welling et al 1995, Sokolov et al 2001), so dass zusammengefasst β -Untereinheiten einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die physiologischen Eigenschaften im Sinne einer Regulierung des Kanals und damit des Calciumstroms, als auch auf die pharmakologischen Eigenschaften im Sinne einer Beeinflussung der Interaktion mit relevanten Inhibitoren ausüben.

Die verschiedenen $\alpha 1$ - Untereinheiten konnten an Hand ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften den jeweiligen Calciumkanalsubtypen zugeordnet werden, so wurden allein für den **L-Typ Calciumkanal** mehrere $\alpha 1$ -Untereinheiten beschrieben. Am Skelettmuskel konnte zuerst eine spezifische $\alpha 1$ -Untereinheit gefunden, kloniert und als $\alpha 1S$ bezeichnet werden (Curtis und Catterall 1984, Tanabe et al 1987). Kurz darauf wurde auch die $\alpha 1C\text{-}_a$ Untereinheit an Myokard (Mikami et al 1989) und die $\alpha 1C\text{-}_b$ -Untereinheit an glatten Muskelzellen (Biel et al 1990) dargestellt. Weiterhin kodieren sowohl $\alpha 1D$ (Seino et al 1992, Williams et al 1992a), als auch $\alpha 1F$ (Bech- Hansen et al 1998, Strom et al 1998) für einen L- Typ-Calciumkanal.

Die Zuordnung der einzelnen α_1 - Subtypen zu den jeweiligen spannungsabhängigen Calciumkanalsubtypen ergab außerdem eine Identifizierung des **N-Typ Calciumkanals** durch die $\alpha_1\beta$ - Untereinheit (Williams et al 1992b, Dubel et al 1992),

An Oozyten wurden bei Exprimierung der α_1A Untereinheit Calciumströme festgestellt, die elektrophysiologisch offensichtlich den **P-Typ Calciumkanal** passierten (Mori et al 1991), ebenfalls eine Beteiligung der α_1A – Untereinheit an der Bildung des **Q-Typ Calciumkanals** zeigten Studien an Zelllinien von Säugetieren (Sather et al 1993), so dass die α_1A Untereinheit offensichtlich für diese beiden Calciumkanäle kodiert, die sich jedoch pharmakologisch, beispielsweise in ihrer Sensitivität gegenüber Blockern unterschiedlich verhaltenen.

Für die unter niedriger Spannung aktivierbaren **Calciumkanäle vom T-Typ** wurden bisher drei α_1 - Untereinheiten beschrieben: die α_1G -, die α_1H - und die α_1I - Untereinheit (Perez-Reyes et al 1998, Cribbs et al 1998, Lee JH et al 1999). Die verschiedenen Untereinheiten kommen in unterschiedlicher Gewichtung innerhalb des Hypothalamus vor (Craig et al 1999, Talley EM et al 1999), wo eine Regulierung der Expression der α_1G - Untereinheit durch Östrogen beschrieben wurde (Qiu et al 2006). Eine Kolo-kalisation der Subtypen Cav 3.1 und Cav 3.3 wurde an Hypophysenzellen nachgewiesen (Mudado et al 2004).

Soong et al konnten am ZNS der Ratte ein weiteres für eine α_1 - Untereinheit kodierendes Gen klonieren und schlugen zunächst eine Zuordnung zu einem Calciumkanal vom T-Typ vor (Soong et al 1993), im Verlauf wurde dann jedoch der **R-Typ- Calciumkanal** den α_1E - Untereinheiten zugeordnet (Smith SM et al 1999)

Durch die zunehmende Anzahl der klonierten α_1 - Untereinheiten ergab sich die Notwendigkeit einer Erweiterung der Nomenklatur der spannungsabhängigen Calciumkanäle. Die einzelnen Subtypen werden entsprechend nach einem „Ca_v x.y.“- Schema benannt. Das „Ca_v“ steht entsprechend für „spannungsabhängiger Calciumkanal“, für das „x“ werden Zahlen von 1-3, je nach Kanalfamilie (1= L-Typ, 2= Neuronal (P/Q- N- oder R-Typ), 3= T-Typ), für das „y“ stehen die einzelnen Kanäle der Kanalfamilien (Ertel et al 2000) (siehe Tab. 8).

Nomenklatur nach Tsien et al 1988		Nomenklatur nach Snutch et al 1990 Birnbauer et al 1994	Strukturelle Nomenklatur nach Ertel et al 2000
HVA	L-Typ	$\alpha 1$ S $\alpha 1$ C $\alpha 1$ D $\alpha 1$ F	$Ca_v1.1$ $Ca_v1.2$ $Ca_v1.3$ $Ca_v1.4$
	Neuronal P/Q-Typ N-Typ R-Typ	$\alpha 1$ A $\alpha 1$ B $\alpha 1$ E	$Ca_v2.1$ $Ca_v2.2$ $Ca_v2.3$
LVA	T-Typ	$\alpha 1$ G $\alpha 1$ H $\alpha 1$ I	$Ca_v3.1$ $Ca_v3.2$ $Ca_v3.3$

Tab. 8. Einteilung der spannungsabhängigen Calciumkanäle (aus Lacinova 2005)

4.3.2. Beeinflussung spannungsabhängiger Calciumkanäle durch intrazelluläre Moleküle

Eigenschaften der spannungsabhängigen Calciumkanäle werden - wie zuvor beschrieben- primär durch die Zusammensetzung ihrer Untereinheiten bestimmt, und sind sekundär einerseits durch Transmitter über Rezeptoraktivierung beeinflussbar (siehe auch Kapitel 4.3.4.) und können andererseits außerdem über intrazelluläre Vorgänge, bzw. Moleküle reguliert werden.

So ist auch die Inaktivierung im Gegensatz zur Aktivierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle zumindest bei den HVA- Calciumkanälen nicht allein von dem Spannungsniveau der Membran abhängig, sondern kann zusätzlich unter anderem über einen negativen Feedbackmechanismus einströmender Calciumionen gesteuert werden (Brehm und Eckert 1978, Cox und Dunlap 1994, Lee A et al 1999). Dabei scheint die Bindung an Calmodulin ein wesentlicher Schritt zur Inaktivierung des Kanals zu sein (Peterson et al 1999, Qin et al 1999, Zühlke et al 1999). Zahlreiche Untersuchungen beschreiben die sehr komplexe Rolle des calciumbindenden Proteins Calmodulin in der Regulierung spannungsabhängiger Calciumkanäle wie beispielsweise dem L-Typ (Halling et al 2005, Pitt et al 2001), oder dem P-/Q-Typ (Lee et al 1999, 2000; DeMaria et al 2001). Die Komplexität ergibt sich einerseits durch verschiedene Bindungsstellen wie der N-Terminalregion, der I-II-Domänen oder der C-

Terminalregion einzelner Calciumkanäle für das Calmodulin (Kobayashi et al 2007), und andererseits besonders durch die Fähigkeit des Calmodulin am C- Terminal der α 1-Untereinheit- Calcium an zwei verschiedenen Enden binden zu können, und damit gegensätzliche Effekte wie eine Aktivierung oder eben auch eine Inaktivierung des spannungsabhängigen Calciumkanals zu erzielen (DeMaria et al 2001, Van Petegem et al 2005).

Weitere intrazelluläre Moleküle tragen als Modulatoren spannungsabhängiger Calciumkanäle ebenfalls zur Plastizität der calciumabhängigen Transmitterfreisetzung bei (Kobayashi et al 2007). Im Falle des SNARE- Proteinkomplexes (siehe Kap.4.3.3, Abb. 15 und 16) führt dies zu einer Effizienzsteigerung der Aktivierung bestimmter Calciumkanäle in der Vesikelexozytose.

4.3.3. Mechanismus der Transmitterfreisetzung durch spannungsabhängige Calciumkanäle

Eine calciumabhängige Freisetzung bestimmter „Quantitäten“ von Transmittern wurde bereits 1969 von Katz et al beschrieben (Katz und Mild 1969). Zahlreiche folgende Untersuchungen beschrieben die intrazelluläre Speicherung der Transmitter in synaptischen Vesikeln und lieferten weitere Daten zum Ablauf der Exozytose der jeweiligen Vesikel.

So zeigten beispielsweise verschiedene Arbeiten eine für die Exozytose der Transmittervesikel notwendige hohe lokale Calciumkonzentration ($> 50\mu\text{M}$) (Heidelberger et al 1994, Lando und Zucker 1994), wie sie beispielsweise durch den raschen Einstrom extrazellulärer Calciumionen in das Zellinnere und eine langsamere zytoplasmatische Diffusion an der intrazytoplasmatischen Öffnung der spannungsabhängigen Calciumkanäle vorkommt (Roberts et al 1990, Prakriya et al 1996), so dass eine enge räumliche Verbindung zwischen den Calciumkanälen und den zur Transmitterfreisetzung bereiten Vesikeln als Voraussetzung für eine Exozytose gilt. Eine direkte Verknüpfung spannungsabhängiger Calciumkanäle mit dem die Vesikelexozytose regulierendem Komplex aus verschiedenen Proteinen wurde für die N- und P-/Q-Typkanäle nachgewiesen (Bennett et al 1992, Sheng et al 1994, 1998).

Dieser „Proteinkomplex“ wird auf Grund seiner Interaktion mit SNAP und NSF-Proteinen auch SNARE (SNAP- Rezeptor)- Komplex genannt und besteht aus den nach ihrer Lokalisation an der Vesikelmembran „v- SNARES“ genannten Synaptobrevinen und den an der Plasmamembran („target“) verankerten „t- SNARES“ zu denen das Syntaxin1 und SNAP25 gehören. Den benötigten Calciumsensor für die Triggerung der Exozytose bildet das ebenfalls an der Vesikelmembran lokalisierte

Synaptotagmin1, welches über seine sogenannte C2A-Domäne die einströmenden Calciumionen bindet (siehe Abb. 14).

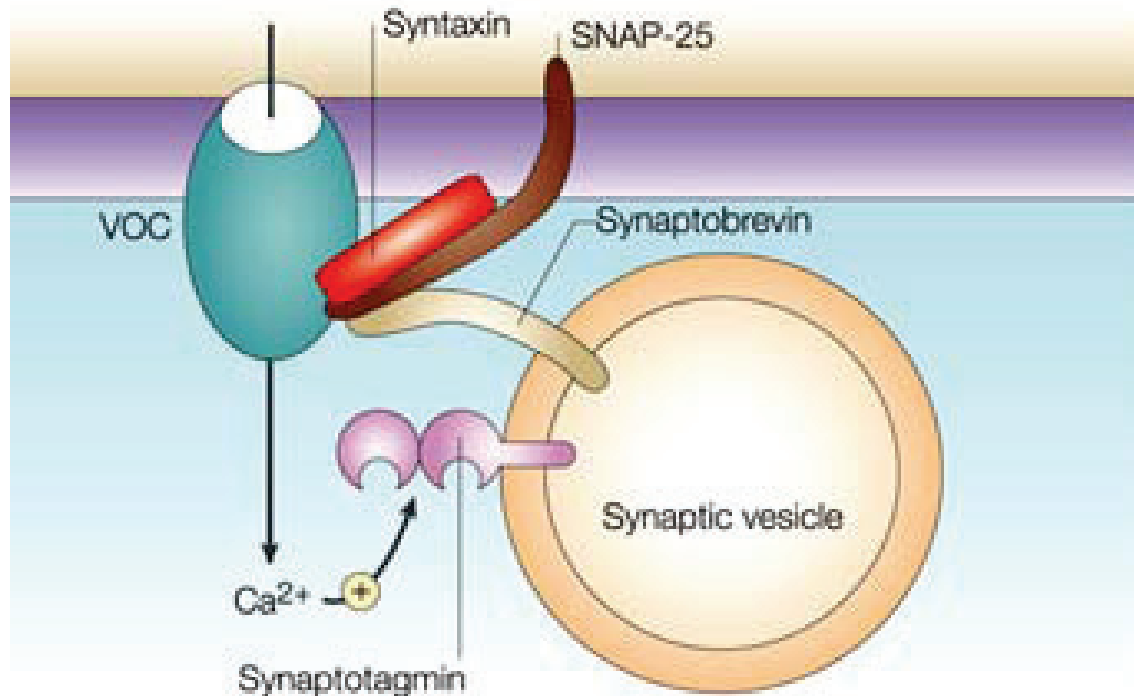


Abb. 14: Schematische Darstellung des SNARE- Komplexes bei der calciumabhängigen Vesikelexozytose (aus Berridge et al 2003)
(VOC= Spannungsabhängiger Calciumkanal)

Calciumabhängig kommt es von der C2A- Domäne ausgehend zu Interaktionen des Synaptotagmin mit Phospholipiden und dem t- SNARE- Protein Syntaxin (Li et al 1995, Ullrich et al 1994). Zusätzlich besitzt das Synaptotagmin eine C2B-Domäne, deren direkte Interaktion mit Komponenten des N- Typkanals auf eine Zielsteuerung der synaptischen Vesikel in die Nähe von Calciumeinstromkanälen deutet (Sheng et al 1997) (Abb. 15).

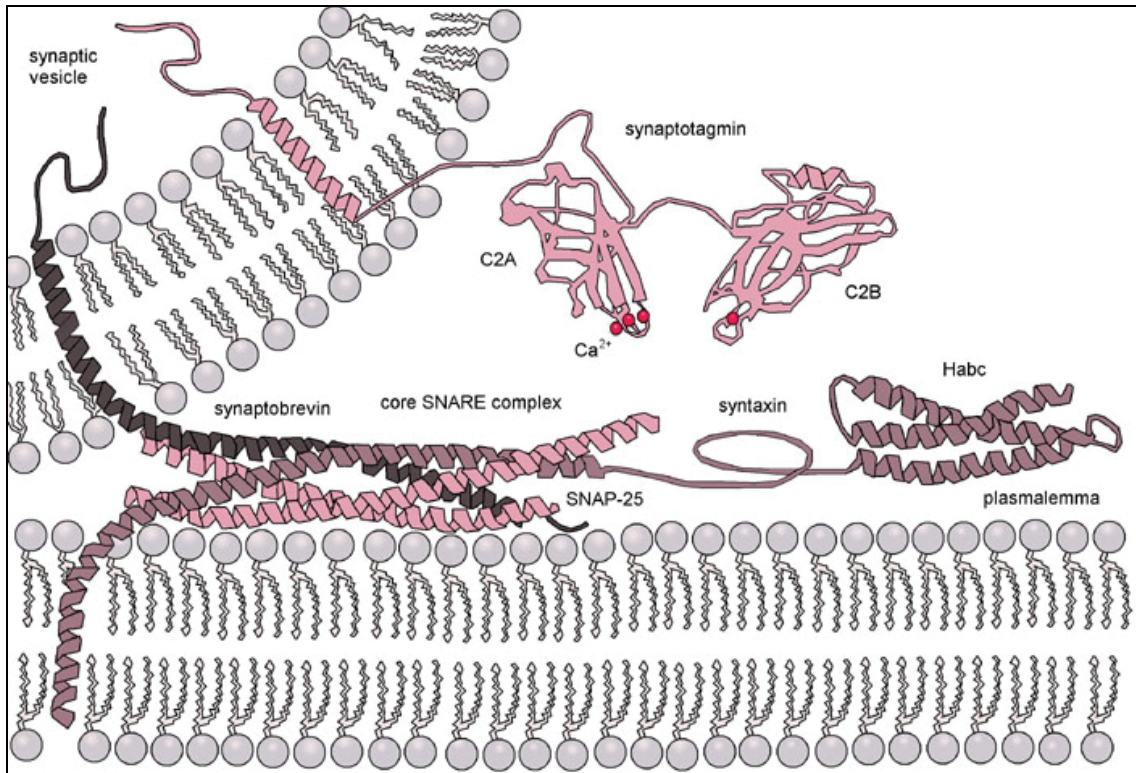


Abb. 15: Schematische Darstellung des Aufbaus des SNARE-Komplexes (aus Georgiev DD und Glazebrook JF 2007)

Eine Verknüpfung der spannungsabhängigen Calciumkanäle mit dem „klassischen“ Exozytoseproteinkomplex scheint daher auf den ersten Blick eine Voraussetzung für die calciumabhängige Freisetzung von Neurotransmittern aus Speichervesikeln zu sein.

An wirbellosen Tieren ist jedoch an dem einzigen vorhandenen N-Typ- Calciumkanal diese Verknüpfungsstelle nicht nachweisbar (Spafford et al 2003b), wobei auch die Transmitterfreisetzung der wirbellosen Tiere von einer Aktivierung des N-Typ- Calciumkanals abhängig ist.

An Wirbeltieren fand sich ebenfalls - neben den zuvor beschriebenen Verknüpfungen spannungsabhängiger Calciumkanäle mit dem Exozytoseapparat - im ZNS eine Spleißvariante des N-Typ- Calciumkanals der eben diese Verknüpfungsstelle fehlt (Kaneko et al 2002). Die Verknüpfung der spannungsabhängigen Calciumkanäle mit den Proteinen des SNARE-Komplexes scheint daher nicht allgemein essentiell für

eine Transmitterfreisetzung sondern vielmehr eine evolutionäre Weiterentwicklung der Wirbeltiere (Spafford und Zamponi 2003a).

Diese Erkenntnisse deuteten entsprechend auf zusätzliche - abgesehen von über den SNARE- Proteinkomplex vermittelten - Mechanismen der calciumgesteuerten Transmitter-freisetzung.

Diese weitere Möglichkeit der Vermittlung des Triggereffekts durch den aktivierten spannungsabhängigen Calciumkanal wurde an einer Spleißregion des C-Terminus des N-Typ-Calciumkanäle gefunden und erfolgt über eine Aktivierung bestimmter Adaptorproteine (Mint1 und CASK) (Maximov und Bezprozvanny 2002, Spafford et al 2003), über welche wiederum eine Auslösung des Exozytosevorgangs vermittelt wird.

Die Verknüpfung der spannungsabhängigen Calciumkanäle mit den Proteinen des SNARE- Komplexes dient neben der Exozytose über eine Art Rückkopplung auch der Feinregulierung der Transmitterausschüttung und der Regulierung des intrazellulären Calciumhaushaltes zur Vermeidung „unnötiger“ Calciumströme in die Presynapse.

So hemmt die Bindung des spannungsabhängigen Calciumkanals an nur ein Protein, beispielsweise Syntaxin 1 (Bezprozvanny et al 1995), oder auch Syntaxin 1B oder SNAP-25 (Jarvis et al 2000, 2001) die Öffnungswahrscheinlichkeit und damit die Aktivität des Kanals, während die gleichzeitige Bindung von Syntaxin1 und SNAP-25 die Kanalfunktion gewährleistet (Jarvis et al 2002). Calciumkanäle die nur an ein Protein des SNARE- Komplexes gebunden sind, tragen nicht zur Transmitterfreisetzung bei und sind daher im Kontext der Synapsenfunktion zu diesem Zeitpunkt nicht „brauchbar“, würden das präsynaptische Nerventerminal also nur unnötig mit Calcium überladen. Eine vereinfachte Kanalöffnung erscheint jedoch sinnvoll bei vorhandenen zur Exozytose bereiten Transmittervesikeln und wird entsprechend über die Bindung mehrerer Proteine des SNARE- Komplexes ermöglicht (Zamponi 2003).

Es scheint also die Vielfältigkeit der biophysikalischen Eigenschaften spannungsabhängiger Calciumkanäle, ihre Verteilung auf der presynaptischen Membran und ihre räumliche Nähe, bzw. ihre Verbindung zu den entscheidenden Komponenten des Exozytoseapparates zur Plastizität der Neurotransmitterfreisetzung an Synapsen beizutragen.

Die Kenntnis der Rolle der verschiedenen spannungsabhängigen Calciumkanäle in der Transmitterfreisetzung ist also auch ein wesentlicher Punkt im Verständnis der intrazellulären Kommunikation unter physiologischen sowie unter pathophysiologischen Bedingungen. Bezogen auf das enterische Nervensystem scheinen die Erkenntnisse

über die Funktion und die Interaktion mit anderen Zellkomponenten und –funktionen in diesem Zusammenhang fast noch rudimentär, obwohl zahlreiche Hinweise und Daten für eine bedeutende Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle in der Modulation der komplexen enterischen Transmission sprechen.

4.3.4. Spannungsabhängige Calciumkanäle innerhalb des enterischen Nervensystems

Die Entwicklung spezieller Antikörper gegen die verschiedenen Untereinheiten der einzelnen Calciumkanäle ermöglichte eine immunhistochemische Visualisierung, und damit auch eine Lokalisierung verschiedener Subtypen. L-, N-, P-, und Q-Typ Calciumkanäle wurden hierdurch im enterischen Nervensystem von Ratte und Meerschwein nachgewiesen (Kirchgessner und Liu 1999).

Eine Aufgabe der spannungsabhängigen Calciumkanäle innerhalb des enterischen Nervensystems besteht in die Regulierung der Erregbarkeit myenterischer Neurone. Beispielsweise scheinen N-Typ-Calciumkanäle verantwortlich für die Nachhyperpolarisationsphase (AHP) myenterischer S-Typ Neurone und sind auch an der Steuerung ihrer Erregbarkeit beteiligt (Shuttleworth und Smith 1999). Auch an AH- Typ Neuronen des myenterischen Plexus des Meerschweinchens zeigten sich Calciumströme über N- und P-/Q-Typ- Calciumkanäle (Starodub und Wood 1999, Zholos et al 1999) und auch die AHP- Phase der AH- Neurone scheint von einem Einstrom extrazellulären Calciums über N-Typ-Calciumkanäle und konsekutiver Öffnung calciumaktivierbarer Kaliumkanäle abhängig (Furness et al 1998, Vogalis et al 2001).

Weitere Aufgaben finden sich in der Steuerung neurogener und myogener Aktivitäten des Gastrointestinaltrakts, einerseits analog zu Daten des ZNS in einer regulatorischen Funktionsrolle bei der Transmitterfreisetzung innerhalb des ENS, zum anderen in der elektromechanischen Verknüpfung der glatten intestinalen Muskulatur.

Hinweise auf einen physiologischen Effekt der einzelnen spannungsabhängigen Calciumkanäle zeigten unter anderem Untersuchungen am Ileum des Hundes, die eine Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L-Typ für die Kontraktilität des Muskels, und eine Rolle für die spannungsabhängigen Calciumkanäle vom N-Typ für die Freisetzung inhibitorischer Transmitter postulierte (Daniel et al 1994, Cayabab et al 1996). Ähnliche Daten einer L-Typ-Calciumkanal- abhängigen elektromechanischen Kopplung und einer N- Typ-Calciumkanal- vermittelten inhibitorischen Transmission

wurden auch am Ileum des Schweins gefunden (Borderies et al 1997). Eine entscheidende Rolle des L-Typ Calciumkanals bei der elektromechanischen Koppelung an intestinalen glatten Muskelzellen fanden auch Wegener et al in ihren Untersuchungen der Darmmotilität der Maus (Wegener et al 2006). Untersuchungen der Zirkulärmuskulatur des Kolons der Ratte zeigten ebenfalls keine Veränderung der inhibitorischen Potentiale unter Blockierung der L-/P-/ oder Q- Typ-Calciumkanäle, so dass auch hier der N-Typ-Kanal eine dominante Rolle bei der Steuerung der inhibitorischen Transmission zu spielen scheint. Die Tatsache dass eine Blockierung des N- Typ-Calciumkanal- keine vollständige Hemmung der inhibitorischen IJPs erwirkte, lässt in dieser Studie die Möglichkeit weiterer Calciumeintrittswege, bzw. auch eine Beteiligung weiterer spannungsabhängiger Calciumkanäle an der Transmitterfreisetzung offen (Borderies et al 1996).

Zusammenfassend deuten die Daten verschiedener Studien auf eine Beteiligung des L-Typ-Calciumkanals an der Kontraktilität der glatten intestinalen Muskulatur und einer dominanten Rolle der N-Typ-Calciumkanäle an der Regulation der inhibitorischen Transmission innerhalb des Gastrointestinaltrakts.

In der Literatur finden sich außerdem zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung spannungsabhängiger Calciumkanäle an der Ausschüttung verschiedener weiterer Transmitter, sowie auf eine Modulation der Aktivität der einzelnen spannungsabhängigen Calciumkanäle durch verschiedene Transmitter des enterischen Nervensystems. So wird auch die exzitatorische Komponente der enterischen Transmission über spannungsabhängige Calciumkanäle beeinflusst. Eine Abhängigkeit der Acetylcholinfreisetzung von einem Einstrom extrazellulären Calciums über spannungsabhängige Calciumkanäle wurde beispielsweise am Dünndarm des Meerschweins nachgewiesen: N-Typ-Calciumkanäle zeigten sich an einer nach Depolarisation durch Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase hervorgerufenen Freisetzung von Acetylcholin beteiligt, während L-, T- oder P/Q-Typ Kanalblocker in dieser Studie zu keinem signifikanten Effekt führten (Gomez et al 1996). Ebenso scheint am Dünndarm der Ratte die Freisetzung des Acetylcholin überwiegend durch N-Typ- Calciumkanäle reguliert zu werden (Wessler et al 1990). Eine Beteiligung der N- und auch der L-Typ-Calciumkanäle an der endogenen Acetylcholinfreisetzung wurde am Kolon des Meerschweins nachgewiesen (Marino et al 1993). Umgekehrt führte Acetylcholin an kultivierten myenterischen Neuronen des Meerschweins zu einer ausgeprägten Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration über eine Aktivierung der L-Typ-Calciumkanäle (Simeone et al 1996). Ebenfalls an kultivierten myenterischen Neuronen des Meerschweins bewirkte Acetylcholin sowohl über nikotinerge als auch

über muskarinerge Rezeptoren eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, wobei nur die Stimulierung der muskarinen Rezeptoren unter anderem zusätzlich zum L-Typ-/ auch den N-Typ-Calciumkanal aktiviert (Vanden Berghe et al 2000b).

Substanz P und verwandte Tachykinine lösten in kultivierten myenterischen Neuronen des Meerschweinchen eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels nicht nur über eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, sondern auch über L- und N- Typ- Calciumkanäle aus (Sarosi et al 1998).

Auch die Freisetzung des Transmitters Glutamat erfolgt calciumabhängig nach Stimulation (Sinsky und Donnerer 1998), wobei im LMMP- Versuch eine Abhängigkeit der Glutamatfreisetzung aus enterischen Nerven von N-, P/Q-, und mit einer geringeren Beteiligung auch von L-Typ-Calciumkanälen festgestellt wurde (Reis et al 2000). Einen hemmenden Einfluss auf Calciumkanäle vom N-Typ übt Glutamat über Aktivierung des Glu II – Rezeptors via G-Protein aus (Chen und Kirchgessner 2002)

Ebenfalls eine Calciumabhängigkeit konnte für die Freisetzung von GABA an myenterischen Synaptosomen des Meerschweinchenileums gezeigt werden (Yau und Verdun, 1983): Untersuchungen an LM-MP- Präparationen ergaben Hinweise auf eine dominante Rolle der N- und P-, sowie in geringerem Maße auch der L- und Q-Calciumkanalsubtypen (Reis et al 2002).

Eine Modulation der spannungsabhängigen Calciumkanäle des enterischen Nervensystems scheint neben den bereits genannten Transmittern auch durch Adenosine und die Opiode gegeben. Baidan et al zeigten an Patch-clamp – Untersuchungen myenterischer Nerven des Meerschweinchen eine Modulation der spannungsabhängigen Calciumkanäle durch G-Proteine und Adenosinrezeptoren (Baidan et al 1995). Ebenfalls G-Protein vermittelt führt eine Aktivierung des k-Opiatrezeptors des Meerschweinchenileums zu einer Hemmung des N-Typ - Calciumkanals (Kojima et al 1994)

Die Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle innerhalb des Gastrointestinaltrakts zeigt bereits an Hand der genannten Beispiele eine Ausdehnung auf weite Bereiche hinsichtlich der Regulation enterischer Erregungsausbreitung und Transmitterfreisetzung, so dass die Komplexität der Einflüsse auf und durch die spannungsabhängigen Calciumkanäle bereits eine Vielfalt an pathologischen Veränderungen durch Funktionsausfälle oder Funktionsbeeinträchtigung der spannungsabhängigen Calciumkanäle erahnen lassen.

Die Auswirkungen veränderter spannungsabhängiger Calciumkanäle unter verschiedenen Bedingungen sind Ziel zahlreicher Forschungsansätze.

4.3.5. Allgemeine Pathologie der spannungsabhängigen Calciumkanäle

Veränderungen der Calciumkanaluntereinheiten durch Mutationen in den entsprechenden Genen können zu verschiedenen vererbbaaren neurologischen Störungen führen. Untersuchungen an Mäusen mit verschiedenen Mutationen sowohl für die α 1- als auch für α -2- δ und β - Untereinheiten zeigten neurologisch auffällige Bewegungsmuster (Pietrobon 2002).

Veränderungen der α -1 A-Untereinheit der P/Q-Calciumkanäle gelten als Ursache einer Gruppe seltener autosomal dominanter neurologischer Erkrankungen wie der familiären hemiplegischen Migräne, der episodischen Ataxie Typ 2 und der spinocerebellären Ataxie Typ 6 (Kordasiewicz und Gomez 2007). Genetische Veränderungen des T- Typ-Calciumkanals äußern sich klinisch in Form von Absence-Epilepsien und Kardiomyopathie (Sen und Smith 1994, Tsakiridou et al 1995, Talley EM et al 2000).

Zu den bekannten durch Calciumkanalveränderungen des ZNS hervorgerufenen Erkrankungen gehört beispielsweise auch die X- chromosomal rezessive Nachtblindheit (Strom et al 1998) die auf einer Veränderung einer α -1-Untereinheit eines L-Typ-Calciumkanals beruht.

Neben den durch genetische Veränderungen der Calciumkanäle hervorgerufenen Erkrankungen können auch autoimmune Prozesse gegen Calciumkanäle bestimmten Krankheitsbildern zu Grunde liegen: so führt ein autoimmuner Vorgang an Calciumkanälen vom P-/Q-Typ an motorischen Nervenendigungen zu einer peripheren cholinergen Dysfunktion: dem Lambert- Eaton- Myasthenie Syndrom (Flink et al 2003).

Pathophysiologische Veränderungen der Calciumkanäle können auch reaktiv unter bestimmten Umständen auftreten, so sind verschieden induzierte Schmerzzustände mit einer Hochregulierung der α -2- δ -Untereinheit der spannungsabhängigen Calciumkanäle vergesellschaftet. Dies zeigten unter anderem Untersuchungen an Rattenmodellen mit posttraumatischen oder diabetesinduzierten Schmerzzuständen in dorsalen Wurzelganglien oder dem Rückenmark (Luo et al 2002). Klinisch interessant sind in diesem Zusammenhang Studien an Ratten, die bei einer durch Chemotherapie ausgelösten Neuropathie eine Abnahme bzw Normalisierung der hochregulierten α -2- δ -Untereinheit der Calciumkanäle nach Therapie mit Gabapentin zeigten (Xiao et al 2007).

Keine konkreten Daten gibt es bisher zu pathologischen Veränderungen der Calciumkanäle bei krankhaften Veränderungen des Gastrointestinaltrakts. Eine Voraussetzung hierfür ist sicherlich die Kenntnis der genauen Funktion der spannungsabhängigen Calciumkanäle des enterischen Nervensystems unter physiologischen Bedingungen.

5. Spezielle Diskussion

Die Neurotransmission des enterischen Nervensystems, die der Regulation der gastrointestinalen Motilität, des Blutflusses und der Sekretion dient, ist von einem Einstrom extrazellulären Calciums über spannungsabhängige Calciumkanäle abhängig. Obwohl die bedeutende Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle in der ganglionären Transmission bekannt ist, und es bereits zahlreiche Untersuchungen zu deren Aufbau, Vorkommen und Koloalisationen untereinander, und mit anderen Rezeptoren und Neurotransmittern auf enterischen Neuronen gibt, ist die Rolle der einzelnen Subtypen für die Freisetzung verschiedener Transmitter noch nicht vollständig geklärt.

Innerhalb dieses umfassenden Forschungsgebiets sind Stickstoffmonoxid (NO) und das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP) als wichtige Transmitter der nicht- adrenergen, nicht- cholinergen (NANC) inhibitorischen Transmission in der vorliegenden Arbeit von Interesse. Die Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle bei der Regulation der VIP- Freisetzung und der NO- Synthese, sowie die potenzielle Einflussnahme anderer Transmitter aus „benachbarten“ Neuronen war daher Gegenstand der Untersuchungen. Die Bedingungen der VIP- Freisetzung und der NO- Synthese und die wechselseitige Beeinflussung von NO und VIP lässt sich durch die Komplexität des enterischen Nervensystems jedoch schwer beschreiben, da in den Untersuchungen der Einfluss lokaler oder systemischer Mechanismen in vivo oder am intakten Organ in vitro nicht ausgeschlossen werden kann.

5.1. Synaptosomenmodell

Um die subzellulären Mechanismen, die an einer Freisetzung von Vasoaktivem Intestinalen Peptid und an der Synthese von Stickstoffmonoxid beteiligt sind genauer zu untersuchen, wurde daher das Modell der isolierten hochgereinigten Nervenendigungen aus dem myenterischen und submukösen Plexus, den sogenannten Synaptosomen angewandt (White 1977, Jonakait 1979, Kurjak 1994).

Als Synaptosomen werden die bei der zuvor beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Partikel bezeichnet, die sich aus abgetrennten Nervenendigungen mit Synapsenbläschen, Mitochondrien und weiteren zytosolischen Bestandteilen zusammensetzen (Whittaker 1964). Durch Ausbildung von Plasmamembranen entstehen abgeschlossene Synaptosome, die in der Lage sind unter bestimmten Voraussetzungen Stoffwechselvorgänge wie die Transmitterausschüttung

und Zellatmung über einen gewissen Zeitraum aufrecht zu erhalten (Campbell 1976, De Belleruche 1972). Neuronen des enterischen Nervensystems sind für die Präparation von Synaptosomen ähnlich wie die Neuronen des ZNS gut geeignet, da sie keine perineurale Kollagenhülle besitzen, so dass der Extrazellulärraum meist direkt an die neuronale Membran angrenzt (Gabella 1984). Die erhaltenen Synaptosomen setzen sich aus verschiedenen Arten von Nervenendigungen zusammen, welche wiederum durch den Inhalt ihrer Vesikel, also den jeweiligen Transmittern klassifiziert werden. Sie bilden also die Summe vieler Nervenendigungen unterschiedlicher Neurone mehrerer Tiere, hier Ratten. Diese Heterogenität der verschiedenen Subpopulationen der Synaptosomen mit jeweils verschiedenen Transmitter und Rezeptoren bedingt jedoch auch die Limitierungen des Modells im Rahmen von Funktionsstudien.

Der methodische Vorteil des Modells liegt in der Untersuchung der intra- und subzellulären Mechanismen der Transmitterfreisetzung ohne störende Einflüsse aus dem komplexen enterischen Netzwerk wie sie in In-vivo oder In-vitro-Studien am perfundierten Organ auftreten können. Auch im Vergleich zur Patch-Clamp Technik an Einzelsynapsen bewähren sich die Synaptosomen als valides Modell zur Untersuchung der Neurotransmitterfreisetzung.

Studien am isolierten intakten Nervenende bieten also den Vorteil eines einfachen Systems zur Untersuchung des Ablaufs von Depolarisation bis zur Transmitterausschüttung (Scott und Nicholls 1980). Durch diese Datengenerierung auf kleinster Ebene mit der Möglichkeit der „Einzeleffektanalyse“ hat sich das Synaptosomenmodell als optimales Versuchsmodell für die genannten Fragestellungen angeboten.

5.2. Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle bei der Freisetzung von VIP und der NO- Synthese an enterischen Synaptosomen

Spannungsabhängige Calciumkanäle spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der synaptischen Transmission. Ihre Unterteilung aufgrund verschiedener Kinetiken und Spannungsabhängigkeiten in sechs Subtypen deutet bereits auf verschiedene Aufgaben und Funktionen der einzelnen Subtypen, und so ist die Verteilung dieser Kanäle auf den unterschiedlichen Neuronen und ihr Einfluss auf die verschiedenen Transmitter besonders interessant. Am enterischen Nervensystem wurden Untersuchungen zur Identifizierung der einzelnen Calciumkanalssubtypen primär im Rahmen der cholinergen Transmission an verschiedenen Spezies und verschiedenen Kompartimenten des Gastrointestinaltrakts durchgeführt (Maggi et al 1988, 1994a, Wessler et al 1990). Ein

Einfluss der spannungsabhängigen Calciumkanäle auf die nicht- cholinerge, nicht- adrenerge Transmission wurde ebenfalls bereits in einigen Studien gezeigt (Allescher et al 1996, Daniel et al 1994, DeLuca et al 1990), eine genaue Untersuchung der einzelnen Calciumkanalsubtypen bezogen auf die einzelnen Transmitter der nicht- cholinergen, nicht- adrenergen Signalübertragung innerhalb des enterischen Nervensystems stand jedoch noch aus. Hinweise auf eine differenzierte Steuerung der Freisetzung von VIP und NO ergaben sich zum einen aus immunhistochemischen Untersuchungen: Doppelfärbungen am Gastrointestinaltrakt des Hundes zeigten zwar eine Kolo-kalisation von VIP und NO in gleichen Nervenendigungen, die beiden Transmitter traten jedoch in unterschiedlichen Zellkompartimenten auf (Berezin et al 1994). Auch die grundsätzlich verschiedenen Synthese- und Speicherungsmodalitäten und durch unterschiedliche Stimuli wie beispielsweise unterschiedliche Frequenzen ausgelöste Freisetzung und die damit im Falle einer Kotransmission auftretende serielle Freisetzung (Li und Rand 1990) der beiden Transmitter könnten auf eine Involvierung unterschiedlicher spannungsabhängiger Calciumkanäle deuten.

Aus diesem Grund wurde die Rolle der einzelnen spannungsabhängigen Calciumkanäle bei der Freisetzung der inhibitorischen Transmitter VIP und NO in der vorliegenden Arbeit untersucht.

5.2.1. Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom N- Typ

Unter den verschiedenen spannungsabhängigen Calciumkanälen scheint der N- Typ- Calciumkanal einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Signalübertragung innerhalb des Gastrointestinaltraktes auszuüben. So zeigte sich in immunhistochemischen Untersuchungen die identifizierende $\alpha 1B$ Untereinheit weit verbreitet sowohl im submukösen als auch im myenterischen Plexus, hauptsächlich in Verbindung mit cholinergen Elementen (Kirchgessner und Liu 1999). Ein Zusammenhang mit der Acetylcholinfreisetzung wurde in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen (Gomez 1996, Vanden Berghe 2000c). Die exzitatorische Komponente der enterischen Neurotransmission scheint überwiegend durch N- Typ Calciumkanäle geregelt zu sein (Maggi et al 1994a, Wessler et al 1990), während deren Einfluss auf die inhibitorische Komponente in der Literatur nicht eindeutig geklärt ist, und von Spezies und Lokalisation innerhalb des Gastrointestinaltraktes abhängig zu sein scheint.

Zahlreiche funktionelle Daten sprechen für eine Beteiligung der N-Typ-Kanäle an der inhibitorischen NANC- Transmission.

So wurde eine Abhängigkeit der inhibitorischen NANC- Transmission vom Calciumeinstrom über N- Typkanäle sowohl am Ileum des Schweins (Borderies et al 1997), als auch am Ileum des Hundes (Daniel et al 1994) gefunden. Die Studien am isolierten perfundierten Hundedarm zeigten zum einen eine Reduktion der nach K^+ - Stimulation erhaltenen VIP- Freisetzung durch Entzug von Calcium oder Blockierung der N- Typ Calciumkanäle durch ω - CTx- GVIA, zum anderen auch eine Abhängigkeit der NO- Synthese von einem Einstrom extrazellulären Calciums über die N- Typ Calciumkanäle (Daniel et al 1994). In den funktionellen Versuchen der Arbeitsgruppe von Daniel konnte jedoch durch eine Blockierung der N- Typ Calciumkanäle keine vollständige Aufhebung der inhibitorischen Erregung erwirkt werden, so dass auch eine Beteiligung weiterer Calciumkanäle nicht ausgeschlossen wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden die spannungsabhängigen Calciumkanäle am Dünndarm der Ratte untersucht. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der K^+ - stimulierten VIP- Freisetzung unter anderem von einem Einstrom extrazellulären Calciums über den N-Typ-Kanal, es werden also vorhergehende funktionelle Daten der VIP-Freisetzung auch an dem Modell der Synaptosomen bestätigt und erweitert, indem auch ein Einfluss des P-Typ-Calciumkanals sowohl an der K^+ - stimulierten wie bereits an der tonischen VIP- Freisetzung nachgewiesen werden konnte.

Frühere Daten funktioneller Studien zur NO- abhängigen Transmission, welche von einer N- Typ- Calciumkanalbeteiligung bei der NO- Synthese (Daniel et al 1994) ausgingen wurden bestätigt, indem in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduzierung der NOS- Aktivität nach Blockierung des N- Typkanals durch ω - CTx GVIA gezeigt wurde. Eine allgemeingültige Aussage für die Rolle des N-Typ-Calciumkanals bei der VIP- Freisetzung und die NOS- Aktivität am gesamten enterischen Nervensystem kann hierdurch, wie bereits erwähnt, nicht getroffen werden. Vorhergehende Daten beschreiben an funktionellen Modellen eine unterschiedliche Gewichtung der einzelnen Kanäle für bestimmte Transmitterfreisetzungen innerhalb verschiedener Abschnitte des Gastrointestinaltrakts. Es zeigt sich beispielsweise am proximalen Duodenum der Ratte die nicht- adrenerge, nicht- cholinerge Relaxation völlig unabhängig von einer Hemmung der N- Typ Kanäle durch ω -CTx GVIA (Maggi et al 1988). Untersuchungen am Kolon der Ratte deuteten wiederum auf eine tragende Rolle der N- Typ-Kanäle bei der Ausschüttung der NANC- Transmitter im Rahmen der elektrisch stimulierten inhibitorischen Transmission (Borderies et al 1996). Die Antagonisierung des N-Typ-Kanals führte jedoch nicht zu einer vollständigen Hemmung des inhibitorischen Potentials, eine Tatsache, welche die Autoren trotz fehlender Reaktion der inhibitorischen Potentiale auf eine direkte Blockierung der L-, P- und Q-Typ-Kanäle zu dem Schluss kommen lässt, dass ein beitragender Einfluss weiterer

spannungsabhängiger Calciumkanäle nicht auszuschließen ist (Borderies et al 1996). Auch am Meerschweinchen konnte eine durch Feldstimulation erzeugte Inhibition im Bereich des Kolons nur teilweise durch eine Blockade der N-Typ-Kanäle beeinflusst werden (de Luca et al 1990), während im Bereich des Caecums durch den N-Typ-Kanal-Blocker ω -CTx GVIA eine vollständige Aufhebung der schnellen inhibitorischen Potentiale beobachtet wurde (Bridgewater et al 1995). Die eingeschränkte Hemmung der inhibitorischen Potentiale durch Blockade der N-Typ-Kanäle, wie sie unter anderem auch am Kolon der Ratte und des Meerschweins beobachtet wurden, deuteten bereits auf eine Beteiligung weiterer Kanäle, wie es auch am Synaptosomenmodell in dieser Arbeit durch eine Reduzierung der VIP-Freisetzung nach Blockade des P-Typ Calciumkanals und einer Reduzierung der NOS-Aktivität auch nach Blockierung des P- und L-Typkanals bestätigt werden konnte. Die Diskrepanz zwischen funktionell fehlenden Effekten nach Blockade verschiedener Calciumkanäle und dem Effekt am Modell der Synaptosomen lässt sich wiederum durch die Ausschaltung interferierender Einflüsse aus dem enterischen Netzwerk wie sie an perfundierten Darmsegmenten vorkommen können, erklären.

Fragen zum genauen Ablauf – ob direkter oder indirekter Effekt- der Steuerung der VIP-Freisetzung durch die N-Typkanäle wirft zum einen die Kenntnis über die Zusammensetzung der Synaptosomenfraktionen mit jeweils zahlreichen Transmittern und Rezeptoren auf. Durch die präparativ bedingte Mischung verschiedener Synapsen lässt sich somit eine indirekte Beeinflussung der VIP-Freisetzung über eine Hemmung oder Aktivierung weiterer Transmitter aus benachbarten Neuronen durch eine Modulation der spannungsabhängigen Calciumkanäle nicht ausschließen. Dieser Aspekt wird später im Text behandelt (siehe 5.2.6.).

Voraussetzung für einen direkten Effekt der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom N-Typ auf die Freisetzung von VIP stellt zum anderen eine Kolo-kalisation des Kanals an VIP-enthaltenden Nervenendigungen dar. Immunhistochemische Untersuchungen im Bereich des Ileums von Meerschwein und Ratte zeigten innerhalb des submukösen und des myenterischen Plexus eine ausgeprägte Immunreaktivität der für den N-Typ-Calciumkanal kodierenden α 1B Untereinheit (Kirchgessner und Liu 1999). Am Modell des Meerschweins wurde in dieser Studie innerhalb des submukösen Plexus ein Vorkommen der N-Typ-Kanäle auf VIP-immunreaktiven Nerven dargestellt, während der für den N-Typ-Calciumkanal verwendete Antikörper ein gemeinsames Auftreten von VIP und N-Typ-Kanälen bei der Ratte jedoch nicht nachweisen konnte (Kirchgessner und Liu 1999).

Die unterschiedliche Kolo-kalisierung des N-Typ-Calciumkanals in Meerschwein und Ratte könnte Ausdruck unterschiedlicher Regulierung der Transmitterfreisetzung unter

den verschiedenen Spezies sein, die gefundenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit am Modell der Ratte weisen jedoch in Diskrepanz zu dem immunhistochemisch fehlendem Nachweis einer Kolo-kalisation auf eine direkte Interaktion des N- Typ-Calciumkanals mit der VIP-Freisetzung. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre beispielsweise wie von den Autoren bereits angedeutet, dass es weitere N-Typ-Kanäle innerhalb des enterischen Nervensystems gibt, welche über den verwendeten Antikörper nicht nachgewiesen werden konnten. Diese Erwägung wird durch Daten aus dem ZNS gestützt, die ein Vorkommen zweier ω -CTx GVIA blockierbarer N-Typ- Calciumkanäle beschreiben (Westenbroek et al 1998).

Die Möglichkeit sowohl regional innerhalb einer Spezies als auch unter verschiedenen Spezies differierender N-Typ- Calciumkanäle wäre dementsprechend nicht auszuschließen, und in Zusammenschau vorhergehender Daten aus dem ENS, dem ZNS und der Daten der vorliegenden Arbeit scheint eine entscheidende direkte Rolle des N- Typ-Calciumkanals an der Regulation der VIP-Freisetzung wahrscheinlich. Weitere immunhistochemische, pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen des enterischen Nervensystems mit dem Ziel der Beschreibung weiterer N-Typ-Calciumkanäle, deren Lokalisation und deren differenzierte Aufgaben wären daher sicher von Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher zunächst weitere Versuchsreihen angesetzt, um die Rolle weiterer Calciumkanäle in diesem Zusammenhang durch subzelluläre Versuche am Synaptosomenmodell zu klären.

5.2.2. Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom P- und vom Q- Typ

In vielen Zelltypen sind die einzelnen Calciumkanäle vom P-/ und Q-Typ schwer zu unterscheiden, und werden aus diesem Grund in der Literatur meist als einheitlicher P-/ Q-Typ beschrieben.

Eine Rolle der P-/ Q-Typ-Kanäle bei der Transmitterfreisetzung deutet sich bereits auf Grund der immunhistochemisch nachgewiesenen presynaptischen Lokalisierung an Nervenendigungen innerhalb des ZNS an (Westenbroek et al 1995).

Auch im enterischen Nervensystem am Dünndarm von Ratte und Meerschwein konnte die sowohl für den P- als auch für den Q- Typ kodierende α 1A Untereinheit immunhistochemisch sowohl im submukösen als auch im myenterischen Plexus nachgewiesen werden (Kirchgessner und Liu 1999). Eine Bedeutung der P- und Q- Typ-Kanäle bei der inhibitorischen nicht- adrenergen, nicht - cholinergen Transmission wurde bereits in einigen funktionellen Studien beschrieben. Analog zum Calciumkanal vom N-

Typ zeichnet sich auch hier eine von Spezies und Bereich innerhalb des Verdauungstraktes abhängige Funktion ab. So zeigte sich in der vorliegenden Arbeit die NOS des Ileums der Ratte unter anderem entscheidend durch Calciumkanäle vom P-Typ reguliert. Eine Blockierung des P-Typ-Calciumkanals erwirkte eine Reduzierung der NOS-Aktivität um 79%, ähnlich den unter calciumfreien Bedingungen erzielten Ergebnissen. Eine Blockierung des Q-Typ Calciumkanals über ω Ctx-MVIIC führte in den Versuchen zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivität der NOS. Im Gegensatz hierzu stehen die von Todorov et al erhobenen Daten, welche am Magenfundus des Meerschweins keinen Effekt einer Blockade der P-/Q-Typ-Kanäle auf ein NO induziertes Inhibitionspotential zeigen konnten (Todorov et al 2003).

Die einfachste Erklärung für diese Diskrepanz der NO-Regulierung ist die oben bereits erwähnte in verschiedenen Spezies und verschiedenen Organen unterschiedlich regulierte Transmission, möglich wäre theoretisch jedoch auch eine unterschiedliche Affinität der verwendeten Blocker der jeweiligen spannungsabhängigen Calciumkanäle, so wurden in den Versuchen von Todorov et al. ein Blocker für beide Typen – ω -Agatoxin TK- verwendet, während in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit der Literatur die beiden Calciumkanäle über verschiedene spezifische Blocker untersucht wurden.

Keine Daten gab es bisher im Hinblick auf den direkten Zusammenhang zwischen einem Calciumeinfluss durch die genannten Calciumkanalsubtypen und der VIP-Freisetzung am ENS. In der vorliegenden Arbeit führte eine Blockierung der P-Typ-Kanäle durch ω -AgaTx IVA am Synaptosomenmodell zu einer Reduzierung sowohl der tonischen als auch der durch K^+ -Depolarisation stimulierten VIP-Freisetzung. Eine Hemmung des Q-Typ-Kanals durch ω -Ctx MVIIC zeigte wiederum keinen Effekt, weder an der basalen, noch an der K^+ -induzierten Freisetzung des VIP. Die Regulation der K^+ -induzierten VIP-Freisetzung an enterischen Neuronen des Dünndarms der Ratte scheint dementsprechend analog zu den Daten des zentralen Nervensystems über die gleichen Calciumkanäle, nämlich den P- und den N-Subtyp gesteuert zu sein (Martire et al 2001). Eine mögliche Rolle der Q-Typ-Kanäle bei der NANC-Transmission postulierten Untersuchungen am Meerschweindünndarm (Tran und Boot 1997). Im Gegensatz dazu zeigte eine Blockade der P-, Q- oder L-Typ-Kanäle am Ileum des Schweins keinen Einfluss auf die inhibitorischen Potentiale (Borderies et al 1997). Auch am Kolon der Ratte konnte keine Abhängigkeit der inhibitorischen Potentiale von einem Calciumfluss durch Q-Typ-Kanäle nachgewiesen werden (Borderies et al 1996). Insofern scheint eine dominante Rolle des Q-Typ-Kanals in der inhibitorischen Transmission nach den hier gefundenen Daten und in Zusammenschau der Literatur unwahrscheinlich, eine

Beteiligung, evt. nach Modulation durch weitere Transmitter kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Rolle des P-Typ-Kanals als bedeutender Modulator der Exozytose verschiedener Transmitter wurde bereits am ZNS beschrieben, Hinweise auf eine Beteiligung an der Transmitterfreisetzung innerhalb des enterischen Nervensystems ergaben sich ebenfalls bereits aus immunhistochemischen und einzelnen funktionellen Studien, eine genauere Beleuchtung seiner Rolle im Sinne einer dominanten Beteiligung an der Freisetzung der inhibitorischen NANC- Transmitter NO und VIP gelang in der vorliegenden Arbeit.

5.2.3. Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L- Typ

Zahlreiche Studien der myenterischen Neurone anhand LMMP- Präparationen benutzten Blocker des L- Typ- Calciumkanals zur Unterdrückung von Muskelkontraktionen in der Annahme, ausschließlich L- Typ Kanäle der Muskulatur zu beeinflussen. Die Präsenz der L- Typ-Calciumkanäle auch auf neuronalen Strukturen deutete sich jedoch bereits in verschiedenen Studien auch an myenterischen Neuronen der Ratte an (Franklin und Willard 1992, Hirning et al 1990, Hanani et al 2000).

Bestätigt wurden diese Studien durch den immunhistochemischen Nachweis der Untereinheiten $\alpha 1D$ und $\alpha 1C$ an neuronalen Strukturen innerhalb des Ileums von Meerschwein und Ratte. Dabei zeigten die beiden jeweils für den L-Typ kodierenden Untereinheiten unterschiedliche Gewichtungen und Muster in den beiden Spezies (Kirchgessner und Liu 1999). An der Ratte zeigten sich überwiegend $\alpha 1C$ - positive Neurone, welche in Muskelgewebe, submukösem und myenterischen Plexus häufig dicht an cholinergen Neuronen liegen, und auch auf intrinsisch primär afferenten Neuronen auftreten. Am Dünndarm des Meerschweinchens dominiert die $\alpha 1D$ - Untereinheit und kommt sowohl innerhalb des myenterischen als auch des submukösen Plexus häufig auf VIP- immunoreaktiven Neuronen vor. Die unterschiedliche Lokalisierung der Calciumkanalsubtypen lässt sich möglicherweise durch unterschiedliche Aufgaben und Funktionen innerhalb des enterischen Nervensystems erklären, so zeigten sich in den analog zu den vorhergehenden Untersuchungen der N- und P-Typkanäle durchgeführten Versuchsreihen mit dem Blocker Isradipin und einem Aktivator der L-Typ-Kanäle Bay K an den Synaptosomen kein Effekt an der VIP-Freisetzung. In Betracht der immunhistochemischen Befunde von Kirchgessner und Liu könnten die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse auf eine unterschiedliche Aufgabe der beiden Untereinheiten deuten, so ist ein Einfluss des über die $\alpha 1D$ - Untereinheit identifizierten L-Typ-Kanals auf die VIP-Freisetzung beim Meerschwein

nicht ausgeschlossen. Nicht untersucht wurde, ob die bei der Ratte in geringem Maße vorkommende $\alpha 1D$ –Untereinheit auch hier mit VIP kolokalisiert ist. Dies ist auch durch die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse nicht auszuschließen. Da kein signifikanter Effekt auf die VIP-Freisetzung durch den L-Typ-Kanal gezeigt werden konnte, scheint eine bedeutende Rolle des L-Typ Calciumkanals bei der Freisetzung von VIP innerhalb des Dünndarms der Ratte jedoch unwahrscheinlich.

Bezogen auf die Synthese von NO konnte der Blocker des L- Typ Calciumkanals jedoch eine Reduzierung der NOS- Aktivität um 70% erwirken, so dass eine bedeutende Rolle des L-Typ-Calciumkanals bei der Synthese von NO am Dünndarm der Ratte gesichert scheint.

Am Magenfundus des Meerschweins zeigen Daten aus LMMP- Studien ebenfalls eine Hemmung der NO-Freisetzung nach Blockierung des neuronalen L-Typ- Calciumkanals (Todorov et al 2003), und auch innerhalb des ZNS wurde eine Rolle der L-Typ- Calciumkanäle bei der Synthese von NO nachgewiesen, so wurde in Neuronenkulturen des cerebralen Cortex der Maus eine Abhängigkeit der K^+ - stimulierten NOS- Aktivität von einem Calciumeinstrom über L- und P/Q- Typkanäle nachgewiesen (Oka et al 2003).

Eine klassische Rolle des L- Typ-Kanals bei der Transmitterfreisetzung, beispielsweise im Rahmen der Vesikelexozytose schien in Zusammenschau der Daten aus ZNS und ENS eher unwahrscheinlich. Bezogen auf das ZNS sprechen die Daten der immunhistochemischen Untersuchungen, die ein ausgedehntes Vorkommen der $\alpha 1C$ und $\alpha 1D$ - Untereinheit in Zellkörpern und proximalen Dendriten beschreiben für eine Funktion in der Regulation biochemischer Prozesse wie der Proteinphosphorylierung und der Genexpression (Westenbroek et al 1990, Westenbroek et al 1995, Hell et al 1993), so dass insgesamt zahlreiche Untersuchungen zur Transmitterfreisetzung in verschiedenen Systemen keinen Hinweis auf eine bedeutende Rolle der L-Typ- Calciumkanäle bei der Freisetzung vesikelgespeicherter Neurotransmitter ergaben. Keine Daten scheint es bisher zu dem genauen Mechanismus der NOS- Aktivierung durch die spannungsabhängigen Calciumkanäle - verglichen beispielsweise mit den Daten zur Vesikelexozytose über den SNARE- Komplex - zu geben, besonders interessant in diesem Zusammenhang wäre sicherlich auch die Erforschung der durch die L-Typ- Calciumkanäle bedingten Signalkaskade zur Transmitterfreisetzung, insbesondere deren Verknüpfung mit der NO- Synthase.

Zusammenfassend zeigten die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse erstmals am Synaptosomenmodell eine Abhängigkeit der neuronalen NOS- Aktivität von einer Aktivierung des L-Typ-Calciumkanals und bestätigten damit auch funktionelle

Studien am Magenfundus des Meerschweins und Untersuchungen an cerebralen Neuronenkulturen der Maus.

Die Blockierung der in die Freisetzung von VIP und in die Aktivierung der NOS sicher involvierten Calciumkanäle vom N-, P-, und L-Typ konnten weder einzeln, noch in Kombination eine vollständige Aufhebung des Calciumflusses erwirken, so dass eine Beteiligung weiterer Kanäle zunächst nicht ausgeschlossen schien.

5.2.4. Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom T- Typ

In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich nach Anwendung von Nickel (Ni^{2+}) zur Blockierung unter anderem der T- Typ-Calciumkanäle weder ein Effekt an der NOS-Aktivität, noch an der VIP-Freisetzung.

In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen, welche zur Blockierung von T- Typ-Calciumkanälen Nickel in der auch hier eingesetzten Konzentration verwenden, wobei unterschiedliche Nickelsensitivitäten der T-Typ-Calciumkanäle verschiedener Zelltypen existieren: T-Typ-Calciumkanälen der Zellen des sinoatrialen Knotens (Hagiwara et al 1988) und der sensorischen Neuronen (Todorovic und Lingle 1998) werden bereits unter niedrigeren Nickelkonzentrationen ($<50\mu\text{M}$) blockiert, während T-Typ-Calciumkanäle auf neuronalen Strukturen höhere Nickeldosen ($>200\mu\text{M}$) benötigen (Huguenard 1996. Todorovic und Lingle 1998). Dies scheint auf die Subtypen des spannungsabhängigen T- Typ- Calciumkanals hinzudeuten, die nachgewiesenen $\alpha 1\text{H}$ -, $\alpha 1\text{G}$ - und $\alpha 1\text{I}$ - Isoformen zeigen unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber einer Nickelblockade (Lee JH et al 1999). und sind beispielsweise am ZNS heterogen, teilweise auch kolokalisiert verteilt (Talley EM et al 1999), wobei bisher kein immunhistochemischer Nachweis der T-Typ- Calciumkanal kodierenden $\alpha 1$ - Untereinheiten, und damit auch kein Hinweis auf einen evt. vorhandenen dominanten Untertyp, innerhalb des ENS publiziert wurde.

Problematisch bei der Verwendung höherer Nickelkonzentrationen ist jedoch die abnehmende Spezifität, so dass entsprechend multiple Calciumkanalsubtypen blockiert würden (Bian et al 2004).

Mögliche Erklärungen für den in den Untersuchungen fehlenden Effekt an der NOS-Aktivität und der VIP-Freisetzung wären also zum einen eine suboptimale Konzentration des verwendeten Blockers. Dies lässt sich an Hand der Literatur nicht sicher ausschließen; um dies zu überprüfen könnten weitere Versuchsreihen mit verschiedenen Konzentrationen des hier verwendeten Nickels und ggfs auch eines weiteren Blockers

der T-Typ-Calciumkanäle, des Mibefredil durchgeführt werden. Denkbar wäre beispielsweise eine spezifische Blockierung weiterer Calciumkanäle um verbleibende Calciumströme unter verschiedenen Nickelkonzentrationen zu untersuchen. Das hier verwendete Synaptosomenmodell ist für diesen Ansatz jedoch nicht geeignet.

Damit ist auch schon die zweite ursächliche Möglichkeit des fehlenden Effekts in den durchgeführten Studien angedeutet: Nickel könnte unabhängig von der Konzentration vielleicht ein zu unspezifischer Blocker sein, doch selbst unter dieser Annahme hätte unter der Voraussetzung, dass sowohl N-, L-, als auch P-Typ-Calciumkanäle an der NANC-Transmission über NO und VIP beteiligt sind ein Effekt auftreten müssen. Mibefredil galt als selektiver Blocker der T-Typ-Calciumkanäle (Mishra und Hermsejer 1994), die Selektivität wurde jedoch in weiteren Studien eingeschränkt, und als deutlich von der Spannung abhängig beschrieben (Bezprozvanny und Tsien 1995, McDonough und Bean 1998), so dass in Bezug auf den optimalen Blocker und dessen optimale Konzentration zur Untersuchung der T-Typ-Calciumkanäle im Rahmen der enterischen Nervensystems sicherlich eine immunhistochemische Darstellung der vorhandenen Subtypen und ihrer Lokalisation und die Entwicklung subtypspezifischer Blocker interessant wäre.

Gerade in Bezug auf eine Präsenz oder gar die Lokalisation der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom T-Typ innerhalb des enterischen Nervensystems gibt es so gut wie keine Daten.

Ihre durch elektrophysiologische Charakteristika bedingte Funktion in der Bildung und Weiterleitung von Aktionspotentialen, bzw. Verstärkung von Signalen entlang von Dendriten an neuronalen Zellen und der Schrittmacherfunktion beispielsweise an kardialen Zellen scheint auch innerhalb des Gastrointestinaltrakts eine Rolle zu spielen. Kürzlich veröffentlichte Daten deuten auf eine Beteiligung der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom T-Typ an der Funktion der Schrittmacherzellen des Gastrointestinaltrakts, der ICCs (Lee et al 2007).

Zusammengefasst ergibt sich somit aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und der Literatur kein Hinweis auf eine direkte Rolle des T-Typ-Calciumkanals an der Freisetzung der inhibitorischen NANC-Transmitter NO und VIP.

5.2.5. Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom R-Typ

Weder bei der K^+ -induzierten VIP-Freisetzung, noch an Untersuchungen der NOS-Aktivität zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein Effekt nach Blockierung des R-Typ-Calciumkanals durch Nickel (Ni^{2+}).

Der erst nach unseren Versuchsreihen entdeckte spezifischen Blocker des R-Typ Calciumkanals SNX-482 zeigte an Untersuchungen der Calciumströme myenterischer Neurone des Meerschweins parallele Ergebnisse zu dem auch in den vorliegenden Versuchen verwendeten NiCl_2 (Bian et al 2004).

Eine zumindest unmittelbare Rolle des R-Typ-Kanals bei der Freisetzung der untersuchten Transmitter scheint somit ausgeschlossen.

Funktionelle Untersuchungen deuten auf einen relativ großen Anteil (50%) der R-Typ-Kanäle an den Calciumströmen der myenterischen Neurone des Meerschweinchenileums (Bian et al 2004). Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen eine Aktivierung der R-Typ-Kanäle unter Depolarisationen wie sie während somatodendritischen oder synaptischen Aktionspotentialen erreicht werden. Eine Rolle bei der Regulierung der neuralen Erregbarkeit wurde deshalb postuliert (Bian et al 2004), auch eine Funktion bei der Neurotransmitterfreisetzung konnte nicht ausgeschlossen werden. Ein immunhistochemischer Nachweis der $\alpha 1\text{E}$ -Untereinheit wurde bisher am enterischen Nervensystem nicht durchgeführt. Am ZNS zeigten sich $\alpha 1\text{E}$ Untereinheiten immunhistochemisch weit verbreitet besonders in Mittellinienstrukturen wie Kauda-Putamen, Thalamus und Hypothalamus, Amygdala, Cerebellum und verschiedenen Nuclei des vorderen Mittelhirns, wo sie überwiegend in Zellsoma und teilweise auch in Dendriten auftreten (Yokoyama et al 1995).

Wenige Daten gibt es bisher, die eine Rolle des R-Typkanals bei der Freisetzung von Transmittern belegen. Hinweise auf eine Beteiligung, wenn auch geringerer Effizienz als die des N- und P-Typkanals, bei der synaptischen Weiterleitung eines Aktionspotentials über eine Freisetzung von Transmittern, ggfs. über Mobilisierung der Vesikel ergaben Patch-Clamp Studien cerebraler Synapsen von Ratten (Wu et al 1998).

Anhand der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse ist eine direkte Beteiligung des R-Typ-Kanals an der nicht adrenergen, nicht cholinergen Transmission über die Freisetzung von NO und VIP unwahrscheinlich. Seine Lokalisation, sein Beitrag zur intrazellulären Calciumkonzentration und seine Funktion in den calciumabhängigen Vorgängen innerhalb des enterischen Nervensystems ist jedoch durch die Daten der Literatur längst nicht ausreichend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.2.6. Charakterisierung des Einflusses K^+ -Depolarisations-induzierter indirekter Mechanismen

Aufgrund der Zusammensetzung der Neurotransmitter enterischer Motoneurone schien eine Beeinflussung oder Interaktion durch weitere Transmitter möglich. Wenn also

Neurotransmitter calciumabhängig ausgeschüttet zu einer Stimulation der VIP-Freisetzung oder der NO-Synthese führen, könnte eine verminderte Calciumzufuhr auch indirekt über eine Reduzierung der Neurotransmitterausschüttung eine Reduzierung der VIP- und/ oder NO- Freisetzung zur Folge haben. Aus diesem Grund wurde der Effekt einiger relevanter Transmitter (siehe auch Kap 4.2) in Bezug auf die Freisetzung von VIP und/ oder NO am Modell der Synaptosomen untersucht.

Acetylcholin spielt in der Regulation der enterischen Motilität eine entscheidende Rolle, und gilt als der wichtigste exzitatorische Transmitter (Furness und Costa 1987). Eine Beeinflussung der inhibitorischen Transmission über einen modulierenden Effekt der Freisetzung inhibitorischer Transmitter wurde beispielsweise an LMMP- Präparationen gezeigt, die auf eine Hemmung der NOS via Aktivierung muskarinergere Rezeptoren über Acetylcholin, und eine Stimulierung der NOS- Aktivität über nikotinerge Rezeptoren deuteten (Hebeiss und Kilbinger 1999, Shuttleworth et al 1995).

Eine Abhängigkeit der Acetylcholinfreisetzung von einem Einstrom extrazellulären Calciums über spannungsabhängige Calciumkanäle wurde durch verschiedene Daten nachgewiesen. Eine tragende Rolle der L-Typ- und eine eingeschränkte Beteiligung der N-Typ- Calciumkanäle bei der muskarinerg gesteuerten Freisetzung von Acetylcholin konnte beispielsweise an der Harnblase von Ratten gezeigt werden (Somogyi et al 1997). Innerhalb des enterischen Nervensystems fanden Marino et al eine Abhängigkeit der Acetylcholinfreisetzung vom N- und L-Typ -Calciumkanal (Marino et al 1993) am Kolon des Meerschweinchens und auch am Ileum des Meerschweins deuteten Untersuchungen des myenterischen Plexus eine Involvierung der N-Typ Calciumkanäle in die Freisetzung von Acetylcholin an, während hier die L-Typ- Calciumkanäle keine Rolle spielte (Gomez et al 1996). Eine durch Hemmung der einzelnen Calciumkanäle, - speziell des N- und L- Typ- Calciumkanals - könnte also zu einer Hemmung der Acetylcholinfreisetzung und im hypothetischen Falle einer Acetylcholin induzierten VIP- oder NO- Freisetzung damit zu einer reduzierten Freisetzung der beiden Transmitter führen.

Im Falle der Freisetzung von NO zeigte in den durchgeführten Versuchen der Agonist cholinergere Rezeptoren Carbachol keinen signifikanten Effekt. Auch eine Antagonisierung des cholinergeren muskarinergeren Rezeptors über Atropin beeinflusste die NO- Freisetzung nicht, so dass auch ein Einfluss tonisch freigesetzten Acetylcholins auf die NOS- Aktivität unwahrscheinlich ist.

Die gefundenen Ergebnisse bestätigen Daten aus LMMP- Präparationen des Meerschweinchenmagens, die weder einen Einfluss cholinergere Agonisten noch muskarinergere oder nikotinerge Antagonisten auf die inhibitorische NANC- Relaxation beobachteten (Todorov et al 2003). Der Widerspruch zu den Daten einer Stimulation der

NOS über nikotinerge Rezeptoren (Hebeiss und Kilbinger 1999, Shuttleworth et al 1995) oder einer möglichen Hemmung der NOS über muskarinerge Rezeptoren (Hebeiss und Kilbinger 1999, Berrino et al 1995) könnte durch die verschiedenen Untersuchungsmodelle bedingt sein. Die hier gefundenen Daten wären entsprechend ein Hinweis auf eine Beteiligung weiterer Neuromodulatoren innerhalb des enterischen Nervensystems in der Verknüpfung des cholinergen Signals mit der nitrergen inhibitorischen Antwort.

Kimura et al beschrieben eine über muskarinerge Rezeptoren vermittelte Acetylcholin induzierte VIP- Freisetzung am Ileum des Hundes (Kimura et al 1994), auch diese Daten konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da weder Carbachol, noch der Antagonist Atropin einen Effekt auf die basale VIP-Freisetzung zeigten. Insofern scheint auch kein direkter Einfluss tonisch freigesetzten Acetylcholins auf die Freisetzung von VIP vorhanden.

Damit scheint ein über Acetylcholin vermittelter indirekter Effekt der spannungsabhängigen Calciumkanäle auf die Freisetzung von VIP und NO ausgeschlossen.

Auch für Substanz P, einem weiteren bedeutenden exzitatorischen Transmitter des enterischen Nervensystems ist eine Modulation der deszendierenden inhibitorischen Transmission des Gastrointestinaltrakts beschrieben, so zum Beispiel im Ileum des Meerschweins (Johnson et al 1998).

Über welchen Weg, bzw. über welche Transmitter diese Beeinflussung erfolgt, war bisher kaum untersucht. In den durchgeführten Versuchsreihen zeigte Substanz P weder eine signifikante Steigerung noch eine Hemmung der VIP-Freisetzung. Somit scheint eine direkte Beeinflussung der VIP- Freisetzung, aber auch eine direkte Aktivierung der für die VIP-Freisetzung notwendigen Calciumkanäle durch Substanz P unwahrscheinlich. Interessant ist in diesem Zusammenhang ist jedoch die Stimulierung der VIP-Freisetzung durch den Tachykininrezeptor- Antagonisten Spantide. Diese Ergebnisse weisen auf einen hemmende Wirkung tonisch freigesetzter Tachykinine auf die VIP-Ausschüttung. Möglicherweise findet diese jedoch über andere Agonisten als Substanz P oder indirekt über Modulation weiterer Mechanismen bzw. Einschaltung weiterer Transmitter statt.

Bezogen auf die NOS- Aktivität konnte kein signifikanter Effekt, weder durch eine Stimulation tachykininerger Rezeptoren, noch über eine Hemmung durch den Antagonisten Spantide erreicht werden, so dass ein indirekter Einfluss der Calciumkanäle auf die NOS über eine Modulation der Substanz P- Freisetzung ausgeschlossen werden kann. Eine Freisetzung von NO wie sie via tachykininerger NK₃-Rezeptoren auf deszendierenden Reflexbahnen (Maggi et al 1994b), oder auch aus inhibitorischen Motorneuronen über NK₁ -Rezeptoren (Lecci et al 1999) beschrieben wird, können am Synaptosomenmodell nicht bestätigt werden.

Untersuchungen an verschiedenen Spezies wie Ratte, Meerschwein, Hund oder auch am Mensch weisen auf eine modulierende Rolle der Opiode im Rahmen der nicht adrenergen nicht cholinergen Transmission, so zeigten Storr et al am Magenfundus der Ratte eine Hemmung der NANC- Relaxation über eine Aktivierung des μ -Rezeptors durch Endomorphine (Storr et al 2002). Auch am Magen des Meerschweins führte Loperamid, ein unselektiver μ - Rezeptoragonist, zu einer Hemmung der 5-HT induzierten NANC- Relaxation (Meulemans et al 1993), und Agonisten der μ - und κ -Rezeptoren reduzierten die Amplitude der durch transmurale Nervenstimulation am Zirkulärmuskel des Hundedarms hervorgerufenen NANC- inhibitorischen Potentiale (Bauer und Szurszewski 1991).

Auch immunhistochemische Studien welche Kollokationen der Opiodrezeptoren und der NANC- Transmitter VIP und NO untersuchten, legen mögliche gegenseitige Beeinflussungen nahe, so fanden sich am Meerschweinchendarm eine Immunreaktivität für μ - Rezeptoren in 68% der VIP enthaltenden und in 60% der NOS enthaltenden myenterischen Neuronen (Ho et al 2003). Im myenterischen Plexus des Schweins zeigte sich der λ -Rezeptor ebenfalls auf NOS und VIP enthaltenden Neuronen (Poonyachoti et al 2002).

Hinweise auf eine opioidinduzierte Hemmung der NO- Freisetzung aus inhibitorischen Neuronen wurden unter anderem an in vitro Versuchsreihen der zirkulären Muskulatur des Meerschweinchenileums (Lenard et al 1999), und an isolierten Muskelstreifen des Pylorus des Hundes (Bayguinov und Sanders 1993) postuliert. Keine Daten gab es bisher zu den involvierten Transmittern am subzellulären Modell.

Bezogen auf eine Freisetzung von NO konnte am Synaptosomenmodell kein Effekt der Opiodrezeptoren nachgewiesen werden. So scheint ein direkter Einfluss der Opiode auf die NO- Freisetzung am Dünndarm der Ratte unter den vorliegenden Bedingungen nicht vorhanden. Nicht nachgegangen werden konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Frage, ob dieser Effekt eine Beeinflussung völlig ausschließt, oder ob evt. im Kontext einer pathologischen Veränderung eine Verschaltung des Opioidsystems mit dem NO- System erfolgt.

Die gefundenen Ergebnisse zeigen einerseits eine Abhängigkeit der VIP-Freisetzung von einem Einstrom extrazellulären Calciums über spannungsabhängige Calciumkanäle vom N- und P-Typ, andererseits konnte eine Hemmung der VIP-Freisetzung über eine Aktivierung des κ - Opiodrezeptors gezeigt werden. Die hemmende Wirkung des κ - Rezeptors wäre beispielsweise über eine indirekte Hemmung des N-Typ- Calciumkanals erklärbar. Hinweise für eine opioidvermittelte Hemmung spannungsabhängiger Calciumkanäle sowohl vom N- als auch vom P- und Q- Typ durch μ – ebenso wie κ - Rezeptorenagonisten finden sich am ZNS (Moises et al 1994, Wiley et al 1997), und

auch am enterischen Nervensystem wurde am Ileum des Meerschweinchens durch Aktivierung des κ -Opiatrezeptors via inhibitorischen G-Proteins eine Hemmung des spannungsabhängigen N- Typ- Calciumkanals gezeigt (Kojima et al 1994). Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der κ - Rezeptor vermittelten Hemmung der VIP-Freisetzung wären daher sicher interessant, waren aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht relevant.

Nicht bestätigt werden konnten mit den am Modell der Synaptosomen gefundenen Ergebnissen daher die Daten am Magenfundus der Ratte, die auf eine entscheidende Rolle der μ - Rezeptoren an der Hemmung der NANC- induzierten Relaxation deuteten. Eine mögliche Erklärung für diese scheinbare Diskrepanz wäre jedoch durch die bereits zuvor erwähnte unterschiedliche Verteilung und besonders die unterschiedliche Lokalisation der Opioidrezeptoren mit anderen Rezeptoren und Transmittern, die bereits auf unterschiedliche Funktionen in den verschiedenen Abschnitten des gastrointestinalen Systems weisen.

Die zu prüfende Hypothese einer calciumabhängigen Freisetzung eines Transmitters, in diesem Fall der Opiode – und einer dadurch bedingten Stimulation der VIP- Freisetzung oder der NO- Synthese hätte entsprechend eine Zunahme der VIP- Freisetzung bzw. NOS- Aktivität durch Aktivierung des κ - Opioidrezeptors erwarten lassen. Der gegenteilige Effekt an der VIP- Freisetzung, der fehlende Effekt an der NOS- Aktivität und der fehlende Effekt des Antagonisten Naloxon deuten jedoch auf einen direkten Einfluss der spannungsabhängigen Calciumkanäle auf die NOS und VIP-Freisetzung.

5.2.7. Beeinflussung der NOS- Aktivität durch einen Rezeptor- aktivierten Calciueinstrom

Am Gehirn zeigten Untersuchungen einen die neuronale NOS regulierenden Calciueinstrom über den glutaminergen NMDA- Rezeptor (Garthwaite et al 1988). Auch im Gastrointestinaltrakt wurden innerhalb des myenterischen Nervengeflechts neben weiteren Rezeptoren des Glutamat sowohl NMDA- Rezeptoren nachgewiesen (Liu et al 1997), als auch eine Zunahme des Calciumspiegels in enterischen Neuronen durch Glutamat gezeigt (Kimball und Mulholland, 1995). Im LMMP- Versuch wurde eine Freisetzung des Glutamats aus enterischen Nerven in Abhängigkeit der N-, P/Q-, und mit einer geringeren Beteiligung auch des L- Typ-Calciumkanäle festgestellt (Reis 2000). Eine Bedeutung als exzitatorischer Transmitter der - kolokalisiert mit Acetylcholin in enterischen Neuronen- über den NMDA -Rezeptor langsame EPSPs auslöst, wird postuliert (Liu et al 1997). Um diesen Weg des Calciueinstroms an enterischen

Synaptosomen bezogen auf seinen Einfluss auf die NOS zu prüfen, wurden sowohl Glutamat als auch der NMDA- Antagonist in die Versuchsreihen einbezogen.

Da keine der Substanzen zu einem signifikanten Effekt der NOS- Aktivität führten, muss angenommen werden, dass der NMDA- Rezeptorkanal im enterischen Nervensystem keine oder nur eine untergeordnete Rolle im Regulationsmechanismus der NOS darstellt. Damit scheinen die für die neuronale NOS benötigten Calciumressourcen in den unterschiedlichen Organen auf unterschiedliche Wege bereitgestellt zu werden.

5.2.8. Beeinflussung der durch exogen zugeführtes NO ausgelösten VIP-Freisetzung durch subtypspezifische Calciumkanalblocker

NO und VIP gelten unabhängig voneinander als wichtige Neurotransmitter der nicht-adrenergen nicht-cholinergen Transmission an inhibitorischen Motorneuronen des Gastrointestinaltrakts. Eine Kolokalisierung dieser beiden Transmitter wurde in deszendierenden inhibitorischen Neuronen des myenterischen Plexus und in Nervenendigungen verschiedener Spezies nachgewiesen (Furness et al 1995a, Wang 1998) Beide Substanzen wirken synergistisch über unterschiedliche Signaltransduktionswege - NO über einen cGMP, VIP über einen cAMP- abhängigen Mechanismus- relaxierend auf die glatte Muskulatur (Murthy und Makhlof 1995, Keef et al 1994) und sind in die Steuerung vasomotorischer und sekretorischer Prozesse involviert (Lundberg 1996, Mourad 1999). Eine Interaktion zwischen VIP und NO erscheint daher naheliegend und wurde in einer Reihe von funktionellen Studien im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen (Grider et al.1993, Matsuyama 2002). Eine Stimulierung der VIP-Freisetzung durch endogenes und durch exogenes NO wurde bereits in vorhergehenden Studien gezeigt (Daniel et al 1994, Grider und Jin 1993, Allescher et al 1996). Während jedoch sowohl die tonische, als auch die K^+ - induzierte VIP Freisetzung in den vorliegenden Daten unter calciumfreien Bedingungen oder durch Calciumkanalblocker signifikant reduziert wurden, zeigte sich durch Calciumkanalblockade kein Effekt auf die VIP-Freisetzung nach NO- Stimulation. Nachdem die vorhergehenden Versuche auf eine Beteiligung der N- und P-Typ-Calciumkanäle an der Freisetzung der K^+ - induzierte VIP hindeuteten, und für die Exozytose der Transmittervesikel prinzipiell Calcium benötigt wird, stellt sich nun die Frage nach möglichen Erklärungen für die gefundenen Ergebnisse. An cerebralen Synaptosomen des Hippocampus wurde eine NO gesteuerte calciumunabhängige Exozytose eigentlich calciumabhängiger Vesikel beschrieben (Meffert et al 1994, Sporns und Jenkins 1997). Weitere Untersuchungen zeigten einen wieder calciumunabhängigen

direkten NO- Einfluss auf die zur Kontrolle der Vesikelexozytose notwendige Proteinkette (Meffert et al 1996). Ein Weg der Signaltransduktion durch NO scheint über die Erhöhung des intrazellulären cyclischen GMP mit folgender Aktivierung der Phosphodiesterase V (PD) und der Proteinkinase G (PKG) zu funktionieren, wobei die Reaktionsmöglichkeiten der PKG wiederum vielfältig sind, und über Substratphosphorylierung, Cytoskelettbeeinflussung, Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels und damit auch möglicher Neurotransmitterfreisetzung durch Vesikelexozytose reichen (Wang und Robinson 1997). Eine Involvierung des cGMP/ PD V und cGMP/ PKG Signalweges konnte auch bezogen auf die NO-induzierte VIP-Freisetzung gezeigt werden (Kurjak et al 2001). Dies deutet auf eine Beteiligung der Phosphodiesterase und Proteinkinase G bei der durch NO stimulierten Freisetzung von VIP aus den Vesikeln der enterischen Nervenendigungen. Zusammen mit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Daten einer Unabhängigkeit von den spannungsabhängigen Calciumkanälen, scheinen die PD und PKG entweder über intrazelluläre Calciumspeicher oder auch über calciumunabhängige Signalwege z.B. über Phosphorylierungsvorgänge für die VIP-Freisetzung nach NO-Stimulation verantwortlich zu sein. Einen Einfluss sarkoplasmatischer intrazellulärer Calciumspeicher für die inhibitorische Wirkung des NO wurde postuliert (Franck et al 1998)

Anhand der durchgeführten Untersuchungen zeigt sich zusammengefasst ein dominanter und offenbar direkter Einfluss der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom P- und vom N-Typ auf die Freisetzung von VIP an enterischen Neuronen der Ratte, und der spannungsabhängigen Calciumkanäle vom P-, L- und vom N-Typ auf die Aktivität der NO- Synthase.

Die durch Blockade der jeweiligen Calciumkanäle erreichte Hemmung der Freisetzung zeigt einen eminenten Anteil des Calciumstroms der jeweiligen Kanäle an der Freisetzung der beiden Transmitter, offen bleibt jedoch warum durch die einzelne oder auch die additive Anwendung der Blocker keine vollständige Inhibition der VIP-Freisetzung oder der NOS- Aktivität erzielt wurde.

Mehrere Erklärungen für diese Beobachtungen scheinen möglich. Zum einen stellt sich die Frage nach von spannungsabhängigen Calciumkanälen unabhängigen Freisetzungsmechanismen, wie sie in der vorliegenden Arbeit beispielsweise für die NO- vermittelte VIP-Freisetzung beschrieben wurden. Auch eine Calciumbereitstellung durch intrazelluläre Calciumlieferanten wäre möglich, ein Hinweis für diesen Mechanismus könnte z.B. die verbleibende Restaktivität der NOS bzw. VIP-Freisetzung der unter durch EGTA erwirkten calciumfreien Bedingungen durchgeführten Versuche sein.

Als dritte grundsätzliche Erklärung für den Anteil an Restaktivität der NOS bzw. VIP-Freisetzung nach Blockade der Calciumkanäle könnte eine Calciumzufuhr über Ligandengesteuerte Ionenkanäle in Betracht gezogen werden. Für den Glutamat-aktivierten Calciumkanal wurde dies bezüglich der nNOS ausgeschlossen. Die abschließende Klärung der Rolle ligandengesteuerter Calciumkanäle ist Aufgabe weiterer Forschungen.

Und schließlich deutet die bereits nachgewiesene Diversität der Subtypen spannungsabhängiger Calciumkanäle und die Hinweise auf zahlreiche weitere Isoformen mit unterschiedlichen elektrophysiologischen oder pharmakologischen Charakteristika auf eine mögliche Präsenz weiterer spannungsabhängiger Calciumkanäle innerhalb des enterischen Nervensystems, deren immunhistochemische Nachweise durch fehlende Antikörper, und deren Bestimmung funktioneller Eigenschaften durch fehlende spezifische Blocker noch ausstehen.

Die physiologische Bedeutung des Einflusses verschiedener Subtypen spannungsabhängiger Calciumkanäle bei der Freisetzung von VIP und NO kann aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Aufgrund der Komplexität des enterischen Nervensystems und der durch zahlreiche Faktoren beeinflussbaren Verschaltungen innerhalb dieses Systems wären mögliche Erklärungen zum einen eine Lokalisierung der Calciumkanäle auf verschiedenen Neuronen, in der Literatur ist jedoch auch die gemeinsame Präsenz unterschiedlicher Subtypen spannungsabhängiger Calciumkanäle, und selbst Isotypen eines Subtyps beschrieben, so dass diese Möglichkeit als unwahrscheinlich oder nur teilweise zutreffend gewertet wird.

Eine weitere Erklärung für den Nutzen unterschiedlicher spannungsabhängiger Calciumkanalsubtypen zur Freisetzung eines Transmitters liegt - bei angenommener Kollokalisierung der verschiedenen Subtypen - in der durch ihre jeweiligen Charakteristika bestimmten Regulierbarkeit durch extrazelluläre Substanzen oder durch intrazelluläre Komponenten. Dies würde entsprechend zu der Plastizität der enterischen Transmission beitragen.

Die wachsende Kenntnis über die Vielfalt der Möglichkeiten innerhalb des Nervensystems in diese Prozesse einzugreifen, sie zu modulieren, zu hemmen oder zu verstärken zeigt jedoch, dass Untersuchungen an nur einem Modell - wie hier an den Synaptosomen - nicht ausreichen, um die Komplexität dieser Steuerungsmechanismen vollständig zu ergründen. Genannt sei in diesem Fall beispielsweise der Einsatz des Calmodulin als benötigten Kofaktor der NOS- Aktivität. Seine multifunktionale Rolle innerhalb der Zelle schließt wie bereits unter Kapitel 4.2.3 erwähnt auch einen Einfluss auf die spannungsabhängigen Calciumkanäle nicht aus. Da jedoch auch die Art dieses

Einfluss von weiteren Faktoren wie z.B. der Bindungsstelle des Calmodulin an den jeweiligen Calciumkanal oder auch der Bindungsstelle des Calcium an das Calmodulin abhängt (siehe Kap 4.3.2), ist eine Vorhersage auf den durch die Calmodulinzugabe möglicherweise veränderten Effekt des Calciumstroms durch spannungsabhängige Calciumkanäle anhand der heutigen Datenlage und der gefundenen Ergebnisse nicht definitiv möglich.

Ein durch Calmodulinzugabe im NOS- Assay erwirkter CaM/ Ca²⁺-Komplex an den spannungsabhängigen Calciumkanälen könnte einerseits eine Hemmung eines oder verschiedener Kanäle mit konsekutiv geringerer Calciumzufuhr und damit geringerer NOS- Aktivität bedingen. Eine vollständige Hemmung der Calciumzufuhr ist in Betracht der gewonnenen Ergebnisse jedoch auszuschließen. Der umgekehrte Fall einer Stimulierung des Calciumstroms durch eine Bindung eines CaM/ Ca²⁺-Komplex und damit möglicherweise einer Zunahme oder zeitlichen Verschiebung der NOS- Aktivitätskurve kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, ein Einfluss auf die untersuchte Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle bei der NO-Freisetzung scheint aber unwahrscheinlich.

Zusammenfassend zeigten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse einen entscheidenden Einblick in die Regulation der Freisetzung der inhibitorischen NANC-Transmitter VIP und NO über die spannungsabhängigen Calciumkanäle. Dabei zeigte sich das Modell der Synaptosomen als besonders geeignet um den direkten Einfluss der Calciumkanäle zu untersuchen. Weitere Untersuchungen an verschiedenen Modellen zum Mechanismus der Calciumkanalabhängigen Freisetzung der beiden Transmitter und besonders zu den extra- und intrazellulären Mechanismen der Regulierung dieser Calciumkanäle scheinen daher für die Zukunft äußerst interessant.

Die Kenntnis der Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle bei der Freisetzung der inhibitorischen Transmitter VIP und NO stellt sicherlich nur einen kleinen Baustein im Verständnis der komplexen Regulierung der gastrointestinalen Motilität dar. Doch auch in Anbetracht der Beeinträchtigung der inhibitorischen NANC- Transmission in pathologischen Veränderungen des Verdauungstrakts, und der bekannten Veränderungen der Calciumkanäle unter pathologischen Bedingungen wie posttraumatischen oder anderen neuropathologischen Zuständen in Rückenmark und dorsalen Wurzelganglien (Luo et al 2002, Xiao et al 2007), scheint das Wissen um die Rolle der Calciumkanäle in der Physiologie der enterischen Transmission wichtig für weitere Untersuchungen, und damit evt. auch Entwicklungen von Therapieansätzen bei krankhaften Veränderungen des Gastrointestinaltrakts.

6. Zusammenfassung

Die Transmitter Stickstoffmonoxid (NO) und Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) sind für die inhibitorische nicht- adrenerge, nicht cholinerge (NANC)- Transmission im enterischen Nervensystem von zentraler Bedeutung. Die NANC- Transmission ist entscheidend beteiligt an der koordinierten Steuerung komplexer Motilitäts- und Sekretionsvorgänge des Gastrointestinaltrakts.

Eine wesentliche Rolle bei der Freisetzung von Neurotransmittern spielt der Einstrom extrazellulären Calciums über spannungsabhängige Calciumkanäle. Diese werden entsprechend ihren jeweiligen pharmakologischen und elektrophysiologischen Merkmalen im wesentlichen in 6 Subtypen unterteilt, und nach „alter“ Klassifikation als L-, N-, P-, Q-, R- und T- Typ Calciumkanäle bezeichnet. Eine Erweiterung der Nomenklatur greift molekularbiologische Unterschiede der jeweiligen Subtypen auf und benennt die einzelnen Kanäle nach einem „Ca_vx.y“- Schema.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diejenigen spannungsabhängigen Calciumkanäle zu identifizieren, welche in die VIP- Freisetzung und die NO- Synthese in enterischen Nervenendigungen der Ratte involviert sind.

Bezogen auf die Freisetzung des Vasoaktiven intestinalen Peptids wurde zum einen eine Abhängigkeit der durch K⁺- Depolarisation ausgelösten VIP- Freisetzung von der Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle vom P- und vom N- Typ nachgewiesen. Keinen Einfluss zeigten wiederum die spezifischen Calciumkanal- Blocker auf die durch exogenes NO herbeigeführte VIP- Freisetzung. Dies deutet auf einen anderen Mechanismus der NO- induzierten VIP- Sekretion, beispielsweise über eine Aktivierung intrazellulärer Calciumspeicher.

Die Steuerung der NO- Synthese erwies sich in den durchgeführten Untersuchungen abhängig sowohl von einer Aktivierung des P- und N- Typ-, als auch des L- Typ- Calciumkanals. Ein zusätzlicher Einfluss Liganden- aktivierter Calciumkanäle an der Steuerung der NOS- Aktivität wie sie für den NMDA- Kanal am ZNS beschrieben ist, wurde für das enterische Nervensystem des Dünndarms der Ratte am Synaptosomenmodell nicht gefunden.

Ein indirekter Einfluss der spannungsabhängigen Calciumkanäle über eine K⁺- Depolarisations- bedingte, und Calciumkanalabhängige Freisetzung weiterer Transmitter des enterischen Nervensystems, wie Acetylcholin, Substanz P oder die Opiode auf die Freisetzung von VIP oder NO konnte ausgeschlossen werden.

Somit wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle der spannungsabhängigen Calciumkanäle bei der inhibitorischen Transmission des Gastrointestinaltrakts auf

zellulärer Ebene umfassend charakterisiert, und Ergebnisse aus früheren funktionellen Studien bestätigt.

Eine Steuerung der Freisetzung der beiden Transmitter VIP und NO scheint daher differentiell direkt über eine Modulation der P- und N- Typ-Calciumkanäle und zusätzlich des L-Typ-Calciumkanals für die NO- Freisetzung möglich. Dies stellt einen interessanten Aspekt vor dem Hintergrund multipler Strategien zur Modulation defizienter inhibitorischer, insbesondere NO- abhängiger Neurotransmission beispielsweise im Rahmen einer diabetischen Neuropathie dar. Unter den bisherigen Ansätzen einer Beeinflussung der enterischen inhibitorischen Transmission seien beispielsweise die Transplantation nitrerger Neurone nach Kultivierung von Stammzellen, der Einsatz von NO- Donoren, oder von PDE- Hemmern wie Sildenafil mit deren jeweiligen Limitationen genannt.

Aus den hier gewonnenen Daten ergeben sich nun weitere potenzielle therapeutische Optionen. Ein Ansatz bestünde beispielsweise in der direkten Beeinflussung der Aktivität der jeweiligen spezifischen Calciumkanäle, welche für die Freisetzung der jeweiligen Transmitter verantwortlich sind. Denkbar ist hier abgesehen von der Blockierung über spezifische Substanzen auch eine Modulation der Eigenschaften des Kanals – wie z.B. der Leitfähigkeit oder der Öffnungswahrscheinlichkeit - über Anwendung oder Aktivierung extra- oder intrazellulärer Faktoren. Interventionsmöglichkeiten ergeben sich theoretisch auch im Rahmen der Signaltransduktionskaskade nach Aktivierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle bis zur Transmitterfreisetzung.

Weitere Studien zum genauen Mechanismus der Calciumkanalgesteuerten Freisetzung der Transmitter und der Zusammensetzung und Bedeutung der Untereinheiten der jeweiligen spannungsabhängigen Calciumkanäle sind entsprechend für das Verständnis der synaptischen Plastizität des enterischen Nervensystems und damit der Steuerung der Motilität von herausragender Bedeutung. Bezogen auf die inhibitorische Transmission wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Identifizierung derjenigen spannungsabhängigen Calciumkanäle, die an der Freisetzung der beiden Transmitter VIP und NO beteiligt sind, die Grundlage für zukünftige Forschungen geschaffen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten stellen daher einen wichtigen Ausgangspunkt zur Erforschung der calciumabhängigen Signaltransduktion innerhalb des Gastrointestinaltrakts dar.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R.:** Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 6, (2001) 535-541.
2. **Adams HP Jr:** Calcium antagonists in the management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Angiology* 41 (1990) 1010-1016.
3. **Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.J.* 357, (2001) 593-615.
4. **Alexander SPH, Mathie A, Peters JA:** Guide to receptors and Channels (GRAC), 2nd edition. *Br J. Pharmacol.*, 1500 (Suppl.1), (2007) S1-S168
5. **Allescher H.-D., Tougas G., Vergara P., Lu S., Daniel E.E.:** Nitric oxide as a putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the canine pylorus in vivo. *Am.J.Physiol.* 262 (1992) G695-G702.
6. **Allescher H.D., Kurjak M., Huber A., Trudrung P., und Schusdziarra V.:** Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: evidence for a stimulatory effect of NO. *Am.J.Physiol.* 271 (1996) G568-574.
7. **Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ.:** Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu rev Neurosci.* 10 (1987) 633-693.
8. **Baidan LV., Zholos AV., Wood JD.** Modulation of calcium currents by G-proteins and adenosine receptors in myenteric neurons cultured from adult guinea-pig small intestine. *Br.J.Pharmacol.* 116 (1995) 1882-1886.
9. **Baldwin MV, Thomas JE.:** The intestinal intrinsic mucosal reflex: a possible mechanism of propulsive motility. In *Functions of the Stomach and Intestine*, ed. M Friedman, Baltimore: University Park Press (1975) 75-91.
10. **Bauer AJ, Szurszewski JH:** Effect of opioid peptides on circular muscle of canine duodenum. *J physiol.* 434 (1991) 409-422.
11. **Bayguinov O, Sanders KM:** Regulation of neural responses in the canine pyloric sphincter by opioids. *Br J Pharmacol* 108 (1993) 1024-1030
12. **Bayliss WM, Starling EH.:** The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* 24 (1899) 99-143.
13. **Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M.:** Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79 (1994) 1277-1285.
14. **Bech-Hansen NT, Naylor MJ, maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fgioshman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM:** Loss-of-function

- mutations in a calcium-channel α_1 -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* 19 (1998) 264-267.
15. **Bennett MK, Calakos N, Scheller RH.**: A synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257 (1992) 255-259.
 16. **Berezin, I., SH. Snyder, DS. Bredt, und Daniel E.E.** Ultrastructural localization of nitric oxide synthase in canine small intestine and colon. *Am.J.Physiol.* 266 (1994): C981-94.
 17. **Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL.** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):517-29.
 18. **Berrino LC, Hey F, Racké K.**: Stimulation induced ^3H -L-Citrulline accumulation in isolated longitudinal muscle myenteric plexus preparations of rat small intestine: a measure to characterize nitrergic neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 352 (1995) 506-511.
 19. **Berstad A, Hauksen T, Gilja OH, Hveem K, Undeland KA, Wilhelmsen I, Haug TT.** Gastric accommodation in functional dyspepsia. *Scand J Gastroenterol.* Mar;32(3): (1997) 193-7.
 20. **Bezprozvanny I, Scheller RH, Tsien RW:** Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 378 (1995) 623-625.
 21. **Bezprozvanny I, Tsien RW:** Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca^{2+} channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca^{2+} channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol Pharmacol* 48 (1995) 540-549.
 22. **Bian XC, Zhou XP, Galligan JJ.** R- Type calcium channels in myenteric neurons of guinea pig small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: (2004) (5) 134-142.
 23. **Biancani P, Walsh JH, Behar J.;** Vasoactive intestinal polipeptide. A neurotransmitter for lower esophageal sphincter relaxation. *J Clin Invest* 73 (1984) 963-967.
 24. **Biel M, Ruth P, Bosse E, Huillin R, Stuhmer W, Flockerzi V, Hofmann F:** Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FERS Lett.* 269 (1990) 409-412.
 25. **Bitar KN., Makhlouf GM.** Relaxation of isolated gastric smooth muscle cells by vasoactive intestinal peptide. *Science* 216 (1982) 531-533.
 26. **Boeckstaens GE, Pelckmans PA, Bult H, De Man JG, Herman aG, Van Maercke YM.:** Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric

- oxide in the canine ileocolonic junction. *Eur. J. Pharmacol* 190 (1990) 239-246.
27. **Boeckstaens G.E., Pelckmans P.A., Ruytjens I.F., Bult H., De Man J.G., Herman A.G., und Van Maercke Y.M.:** Bioassay of nitric oxide released upon stimulation of non-adrenergic non cholinergic nerves in the canine iliocolonic junction. *Br.J.Pharmacol* 103 (1991) 1085-1091.
28. **Boeckstaens GE., Pelckmans PA., De Man JG., Bult H., Herman AG., Van Maercke YM.** Evidence for ad differential release of nitric oxide and vasoactive intestinal polipeptide by nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *Arch.Int. Pharmacodyn Ther.* 318 (1992) 107-115.
29. **Boeckstaens, G.E., J.G. De Man, P.A. Pelckmans, K.M. Cromheeke, A.G. Herman, und Y.M. Van Maercke.** Ca^{2+} dependency of the release of nitric oxide from non-adrenergic, non-cholinergic nerves. *Br.J.Pharmacol* 110 (1993a) 1329-1334.
30. **Bolotina VM, Najibi S, Placino JJ, Pagano PJ, Cohen RA.:** Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368 (1994) 850-853.
31. **Borderies JR., Jimenez M., Angel F.** Non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory junction potential in rat colonic circular muscle is partly sensitive to ω -conotoxin GVIA and resistant to L-, P- or Q-type calcium channel blockers. *Neurosci Lett* 210 (1996) 91-94.
32. **Borderies, J.R., E. Gonalons, F. Angel, P. Vergara, und M. Jimenez.** Effect of different calcium channel blockers on inhibitory junction potentials and slow waves in porcine ileum. *Life Sci.* 60 (1997) 883-892.
33. **Bornstein JC, Costa M, Furness JB, Lang RJ.:** Electrophysiological analysis of projections of enteric inhibitory motor neurons in the guinea-pig small intestine. *J. Physiol.* 370 (1986) 61-74.
34. **Boulant J, Mathieu S, D'Amato M, Abergel A, Dapoigny M, Bommelaer G.:** cholecystokinin in transient lower esophageal sphincter relaxation due to gastric distension in humans. *Gut* (1997) 575-581.
35. **Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal.Biochem.* 72: (1976) 248-254
36. **Bredt D.S., Snyder S.H.:** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87, (1990) 682-685.
37. **Bredt DS, Huang PM, Snyder SH.:** Localization of nitric oxide synthase indicting a neural role for nitric oxide. *Nature* 347 (1990) 768-770.

38. **Bredt DS, Snyder SH.:** Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. 8 (1992) 3-11.
39. **Brehm P, Eckert R.:** Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in paramecium. *Science* 202 (1978) 1203-1206.
40. **Bridgewater M, Cunnane TC, Brading AF:** Characteristic features of inhibitory junction potentials evoked by single stiuli in the guinea-pig isolated taenia caeci. *J Physiol*. 485 (1995) 145-155.
41. **Brookes SJ, Steele PA, Costa M. :** Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience*. 1991;42(3):863-78.
42. **Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM, Ward SM:** Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory eurotransmission in the stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93 (1996) 12008-12013.
43. **Burnstock G. und Holman ME:** Smooth muscle: autonomic nerve transmission. *Annu Rev Physiol.*;25 (1963) 61-90.
44. **Burnstock G.:** Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol*. Feb;4(1) (2004):47-52.
45. **Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Fröhlich LG, Sickmann A Meyer HE, Lohmann SM, Schmidt HH.:** Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol chem*. 275 (2000) 5179-5187.
46. **Bywater RA, Taylor GS.:** Non-cholinergic excitatory and inhibitory junction potentials in the circular smooth muscle of the guinea-pig ileum. *J. Physiol*. 374 (1986) 153-164.
47. **Cajal, S.R.:** Sur les ganglions et les plexus nerveux de l'intestin. *C R Soc Biol Paris* 45 (1893) 213-223.
48. **Calignano A., Whittle BJR., Di Rosa M., Moncada S.** Involvement of endogenous nitric oxide in the regulation of rat intestinal motility in vivo. *Euro. Journ. of Pharmacology* 229 (1992) 273-276.
49. **Campbell C.W.B.:** The Na^+ , K^+ , Cl^- , contents and derived membrane potentials of presynaptic nerve endings in vitro. *Brain res*. 101 (1976) 594-599.
50. **Carbone E, Sher E, Clementi F.:** Ca^{2+} Currents in human neuroblastoma IMR 32 cells: kinetics, permeabilità and pharmacology. *Pflugers Arch*. 416 (1990) 170-179.
51. **Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J.** International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*. Dec;57(4): (2005) 411-25

52. **Cayabyab, F.S., de Bruin H., Jiménez M., und Daniel E.E.:** Ca²⁺ role in myogenic and neurogenic activities of canine ileum circular muscle. *Am.J.Physiol* 271 (1996) G1053-G1066,.
53. **Chen WP, Kirchgessner AL:** Activation of group II mGlu receptors inhibits voltage-gated Ca²⁺ currents in myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283 (2002) G1282-1289.
54. **Ciccocioppo R, Onori L., Messori E., Candura SM, Coccini T., Tonini M.:** Role of nitric oxide-dependent and -independent mechanisms in peristalsis and accommodation in the rabbit distal colon. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Sep;270(3):929-37.
55. **Cohen CJ, McCarthy RT, Barrett PQ, Rasmussen H:** Ca channels in adrenal glomerulosa cells K⁺ and angiotensin II increase T-type Ca channel current. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) 2412-2416.
56. **Costa M., Furness J.B., Buffa R., Said S.I.:** Distribution of enteric nerve cell bodies and axons showing immunoreactivity for vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig intestine. *Neuroscience* 5, 587-596, 1980
57. **Costa M., Furness JB.** The origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 8 (1983) 665-676.
58. **Costa M, Furness JB., Pullin CO., Bornstein J.** Chemical Coding of enteric neurons. *Progress in Brain Research* 68 (1986a) 217-239.
59. **Costa M. Furness JB, Humphreys DM.:** Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology* 332 (1986b) 153-164.
60. **Costa M., Furness J.B., Llewellyn-Smith I.J.:** Histochemistry of the Enteric Nervous System. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, edited by L.R.Johnson, Raven press, New York, 2 , 1-40, 1987
61. **Costa M, Furness JB, Pompolo S, Brookes SJ, bornsein JC, Bredt DS, Snyder SH.:** Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. *Neurosci Lett.* 148 (1992) 121-125.
62. **Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ.** Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience.* Dec;75(3): 1996 949-67.
63. **Cox DH, Dunlap K:** Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. *J Gen Physiol* 104 (1994) 311-336.

64. **Craig PJ, Beattie RE, Folly EA, Banerjee MD, Reeves MB, Priestley JV, Carney SL, Sher E, Perez-Reyes E, Volsen SG:** Distribution of the voltage-dependent calcium channel α_1G subunit mRNA and protein throughout the mature rat brain. *Eur J Neurosci.* 11 (1999) 2949-2964.
65. **Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E:** Cloning and characterization of α_{1H} from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family *Circ Res.* 83 (1998) 103-109.
66. **Crist JR, He XD, Goyal RK.:** Chloride mediated inhibitory junction potentials in circular muscles of guinea pig ileum. *American J Physiol.* 261 (1991 b) G742-751.
67. **Crist JR, He XD, Goyal RK.:** both ATP and the peptide VIP are inhibitory neurotransmitters in guinea-pig ileum circular muscle. *J. Physiol.* 447 (1992) 119-131.
68. **Curtis BM, Catterall WA:** Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transvers tubules. *Biochemistry* 23 (1984) 2113-2118.
69. **Daniel, E.E., C. Haugh, Z. Woskowska, S. Cipris, J. Jury, und J.E.T. Fox-Threlkeld.:** Role of nitric oxide-related inhibition in intestinal function: relation to vasoactive intestinal polypeptide. *Am.J.Physiol.* 266 (1994) G31-G39.
70. **De Belleruche J.S., Bradford H.F.:** Metabolism of beds of mammalian cortical synaptosomes: response to depolarizing influences. *J. Neurochem.,* 19 (1972) 585-602.
71. **De Jongh KS, Warner C, Catterall WA :** Subunits of purified calcium channels α_2 and δ are encoded by the same gene. *J Biol Chem* 265 (1990) 14738-14741.
72. **De Luca A, Li CG, Rand MJ, Reid JJ, Thaina P, Wong-Dusting HK.** Effects of omega-conotoxin GVIA on autonomic neuroeffector transmission in various tissues. *Br J Pharmacol.* 101 (1990) 437-447.
73. **De Man JG, Pelckmans PA, Boeckstaens GE, Bult H, Oosterbosch L, Herman AG, Van Maercke YM.** The role of nitric oxide in inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the canine lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol.* May;103(1) (1991) 1092-6.
74. **DeMaria CD, Soong TW, Alseikhan BA, Alvania RS, Yue DT.:** Calmodulin bifurcates the local Ca^{2+} signal that modulates P/Q-type Ca^{2+} channels. *Nature* 411 (2001) 484-489.

75. **Denninger JW, Marletta MA.:** Guanylate cyclase and the 'NO/cGMP signaling pathway. *Biochem Biophys Acta*: 1411 (1999) 334-350.
76. **Desai KM, Sessa WC, Vane JR.:** Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* 351 (1991) 477-479.
77. **Desai K.M., Warner T.D., Bishop A.E., Polak J.M.und Vane J.R.:** Nitric oxide, and not vasoactive intestinal peptide, as the main neurotransmitter of vagally induced relaxation of the guinea-pig stomach. *Br. J. Pharmacol.*,113, (1994) 1197-1202.
78. **De Waard M, Campbell KP:** Subunit regulation of the neuronal α_{1A} Ca²⁺ channel expressed in xenopus oocytes. *J Physiol* 485 (1995) 619-634.
79. **Dickinson T, Fleetwood-Walker SM.:** VIP and PACAP: very important in pain *Trends Pharmacol Sci.* 20 (1999) 324-329.
80. **Drapeau P, Blaustein MP.:** Initial release of [3H]dopamine from rat striatal synaptosomes: correlation with calcium entry. *J Neurosci.* 3 (1983) 703-713.
81. **Dubel SJ, Starr TV, Hell J, Ahlijanian MK, Enyeart JJ, Catterall WA, Snutch TP:** Molecular cloning of the α -1 subunit of an ω -conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 5058-5062.
82. **Ederly P, Pelet A, Mulligan LM, Abel L, Attie T, Dow E, Bonneau D, David A, Flintoff W, Jan D, et al.** Long segment and short segment familial Hirschsprung's disease: variable clinical expression at the RET locus. *J Med Genet.* Aug;31(8): (1994) 602-6.
83. **Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH.:** Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 3396-3401.
84. **Ellinor PT, Zhang JF, Randall AD, Zhou M, Schwarz TL, Tsien RW, Horne WA:** Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature.* 363 (1993) 455-458.
85. **Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA:** Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25 (2000) 533-535.
86. **Fahrenkrug J, Haglund U, Jodal M, Lundgren O, Olbe L, de Muckdell OB.:** Nervous release of vasoactive intestinal polypeptide in the gastrointestinal tract of cats: possible physiological implications. *J Physiol.* 284 (1978) 291-305.

87. **Felix R, Gurnett CA, DeWaard M, Campbell KP:** Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ subunit. *J Neurosci* 17 (1997) 6884-6891.
88. **Flink MT, Atchison WD.:** Ca²⁺ channels as targets of neurological disease: Lambert-Eaton Syndrome and other Ca²⁺ channelopathies. *J Bioenerg Biomembr.* 35(6) (2003) 697-718.
89. **Forti L, Pietrobon D:** Functional diversity of L-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *Neuron.* 10 (1993) 437-450.
90. **Fossier P, Baux G, Tauc L.** N- and P-type Ca²⁺ channels are involved in acetylcholine release at a neuroneuronal synapse: only the N-type channel is the target of neuromodulators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 24;91(11): (1994) 4771-5.
91. **Fox DA, Herman JR, Bass P.** Differentiation between myenteric plexus and longitudinal muscle of the rat jejunum as the site of action of putative enteric neurotransmitters. *Eur.J. Pharmacol.* 131 (1986) 39-47.
92. **Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW:** Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol* 394 (1987) 149-172.
93. **Fox- Threlkeld JA, McDonald TJ, Woskowska Z., Lesaki K, Daniel EE.:** Pituitary adenylate cyclase-activating peptide as a neurotransmitter in the canine ileal circular muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Jul;290(1):66-75
94. **Franck H., Sweeney KM., Sanders KM., Shuttleworth CW.** Effects of a novel guanylate cyclase inhibitor on nitric oxide-dependent inhibitory neurotransmission in canine proximal colon. *Br.J.Pharmacol* 122 (1997) 1223-1229.
95. **Franck H, Storr M, Puschmann A, Schusdziarra V, Allescher HD:** Involvement of intracellular Ca²⁺ stores in inhibitory effects of NO donor SIN-1 and cGMP. *Am J Physiol.* 275 (1998) G159-168.
96. **Franklin JL, Fickbohm DJ, Willard AL:** Long-term regulation of neuronal calcium currents by prolonged changes of membrane potential. *J Neurosci.* 12 (1992) 1726-1735.
97. **Furness J.B., Costa M, Gibbins I.L., Llewellyn-Smith I.J., Oliver J.R.:** Neurochemically similar myenteric and submucosus neurons directly traced to the mucosa of the small intestine. *Cell tissue Res.*241, (1984) 155-163.
98. **Furness J.B, Costa M.:** *The Enteric Nervous System:* Churchill Livingstone, Edinburgh. 1987

99. **Furness JB, Li ZS, Young HM, Forstermann U.:** Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description *Cell tissue Res.* 277 (1994b) 139-149.
100. **Furness JB, Young HM, Pompolo S, Bornstein JC, Kunze WA, McConalogue K.:** Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. *Gastroenterology.* Feb;108(2) (1995a) 554-63.
101. **Furness JB, Johnson PJ, Pompolo S, Bornstein JC.:** Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* 7 (1995b) 89-96.
102. **Furness JB, Kunze WAA, Bertrand PP, Clerc n, Bornstein JC.:** Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol* 54 (1998) 1-18.
103. **Gabella G.** Innervation of the intestinal muscular coat. *J.Neurocytol.* 1 (1972) 341-362.
104. **Gabella G, Trigg P:** Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *J Neurocytol.* Feb;13(1): (1984) 49-71
105. **Garthwaite, J., S.L. Charles, und R. Chess-Williams.:** Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests its role as intracellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-388, 1988.
106. **Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B.:** Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.* Aug;48(2): 1995 184-8.
107. **Georgiev DD, Glazebrook JF.:** Subneuronal processing of information by solitary waves and stochastic processes, *Nano and Molecular Electronics Handbook*, Lyshevski, SE (ed.), CRC Press, 2007
108. **Gershon MD:** The Enteric Nervous System. *Ann ev. Neurosci.*4, 227-272, 1981 (1)
109. **Gershon MD.** The enteric nervous system: a second brain. *Hosp Pract (Off Ed).* Jul 15;34(7):31-2, 35-8, 41-2 passim. 1999
110. **Glauner KS, Mannuzzu LM, Gandhi CS, Isacoff EY:** Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the shaker potassium channel. *Nature* 402 (1999) 813-817.
111. **Glossmann H, Striessnig J:** Molecular properties of calcium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 114 (1990) 1-105
112. **Goedert M., Hunter JC, Ninkovic M.:** Evidence for neurotensin as a non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter in guinea pig ileum. *Nature.* 1984 Sep 6-11;311(5981):59-62.

113. **Gomez RS, Gomez MV, Prado MA.:** Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by ouabain opens calcium channels coupled to acetylcholine release in guinea pig myenteric plexus. *J Neurochem.* Apr;66(4) (1996) 1440-1447.
114. **Goyal RK, Rattan S, Said SI.:** VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic non-adrenergic inhibitory neurons. *Nature* 288 (1980) 378-380.
115. **Goyal RK, Hirano I.:** Mechanisms of disease: the enteric nervous system. *N.Engl. J.med* 334 (1996) 1106-1115.
116. **Grider J.R. und Makhlof G.M.:** The modulatory function of galanin: potentiation of VIP-induced relaxation in isolated smooth cells. *Gastroenterology*,94, (1988a)A157.
117. **Grider JR, Makhlof GM.;** Vasoactive intestinal peptide. Transmitter of inhibitory motor neurons of the gut. *Ann N Y Acad Sci.* 527 (1988b) 369-377.
118. **Grider JR., Rivier JR.** Vasoactive intestinal peptide (VIP) as a transmitter of inhibitory motor neurons of the gut: evidence from the use of selective VIP antagonists and VIP antiserum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 253 (1990) 738-742
119. **Grider, J.R. und J.G. Jin.:** Vasoactive intestinal peptide release and L-citrulline production from isolated ganglia of the myenteric plexus: evidence for regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neurosci.* 54 (1993) 521-526.
120. **Gurnett CA, DeWaard M, Campbell KP:** Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16 (1996) 431-440.
121. **Gustafsson LE., Wiklund CU., Wiklund NP., Persson MG., Moncada S.** Modulation of autonomic neuroeffector transmission by nitric oxide in guinea-pig ileum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173 (1990) 106-110.
122. **Gustafsson BI., Delbro D.** Tonic inhibition of small intestinal motility by nitric oxide. *Journal of the Autonomic Nervous System* 44 (1993) 179-187.
123. **Haburcak M, Wei L, Viana F, Prenen J, Droogmans G, Nilius B.:** Calcium-activated potassium channels in cultured human endothelial cells are not directly modulated by nitric oxide. *Cell Calcium* 21 (1997) 291-300.
124. **Haage D, Karlsson U, Johansson S.** Heterogeneous presynaptic Ca²⁺ channel types triggering GABA release onto medial preoptic neurons from rat. *J Physiol.* Feb 15;507 (Pt 1): (1998) 77-91.

125. **Hagiwara S, Ozawa S, Sand O:** Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65 (1975) 617-644.
126. **Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M:** Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol.* 395 (1988) 233-253.
127. **Halling DB., Aracena-Parks P., Hamilton SL.,** Regulation of voltage-gated Ca²⁺ Channels by calmodulin. *Sci STKE.* (2005)
128. **Hanani M, Francke M, Hartig W, Grosche J, Reichenbach A, Pannicke T.** Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Apr;278(4):G644-51 2000
129. **Hata F, Takeuchi T, Nishio H, Fujita A:** Mediators and intracellular mechanisms of NANC relaxation of smooth muscle in the gastrointestinal tract. *J.Smooth Muscle Res.* 36 (2000) 181-204.
130. **He XD, Goyal RK.:** Nitric Oxide involvement in the peptide VIP-associated inhibitory junction potential in the guinea-pig ileum. *J.Physiol.* 461 (1993) 485-499.
131. **Hebeiss K, Kilbinger H.**Cholinergic and GABAergic regulation of nitric oxide synthesis in the guinea pig ileum. *Am J Physiol.* 276(4 Pt 1) (1999) G862-6.
132. **Heidelberger R, Heinemann C, Neher Ed, Matthews G.:** Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature.* 371 (1994) 513-515.
133. **Heinonen E, Akerman KE, Kail K, Scott IG.:** Dependence of cytoplasmic calcium transients on the membrane potential in isolated nerve endings of the guinea pig. *Biochim Biophys Acta.* 815 (1985) 203-8.
134. **Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA.** Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol.* Nov;123(4): (1993) 949-62
135. **Hellström PM, Ljung T.:** Nitroergic inhibition of migrating myoelectric complex in the rt is mediated by vasoactive intestinal peptide. *Neurogastroenterol Motil.* 8 (1996) 299-306.
136. **Henning RJ, Sawmiller DR.:** Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc Res.* 49 (2001) 27-37 Review.
137. **Hens J, Gajda M, Scheuermann DW, Adriaensen D, Timmermans JP.:** The longitudinal smooth muscle layer of the pig small intestine is innervated

- by both myenteric and submucous neurons. *Histochem Cell Biol.* Jun;117(6):481-92. Epub 2002 Apr 27. 2002
138. **Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Rousset M, Charnet P, Hudspeth AJ, Lesage F:** Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel β_4 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) 307-312.
139. **Hirata M, Kohse KP, Chang CH, Ikebe T, Murad F.** Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* Jan 25;265(3): (1990) 1268-73.
140. **Hirning LD, Fox AP, Miller RJ:** Inhibition of calcium currents in cultured myenteric neurons by neuropeptide Y: evidence for direct receptor/Channel coupling. *Brain Res.* 532 (1990) 120-130.
141. **Ho A, Lievore A, Patierno S, Kohlmeier SE, Tonini M, Sternini C.** Neurochemically distinct classes of myenteric neurons express the mu-opioid receptor in the guinea pig ileum. *J Comp Neurol.* 458(4) (2003)404-11.
142. **Hofmann F, Lacinová L, Klugbauer N:** Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139 (1999) 33-87.
143. **Holzer-Petsche U., Moser RL.** Participation of nitric oxide in the relaxation of the rat gastric corpus. *Naunyn-Schiedebergs Archives of Pharmacol.* 354 (1996) 348-354.
144. **Hryhorenko LM, Woskowska Z., Fox- Threlkeld JA.:** Nitric oxide (NO) inhibits release of acetylcholine from nerves of isolated circular muscle of the canine ileum: relationship to motility and release of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Nov;271(2):918-26.
145. **Huang QQ, Fisher SA, Brozovich FV.:** Unzipping the role of myosin light chain phosphatase in smooth muscle cell relaxation. *J Biol Chem* 279 (2004) 597-603
146. **Huber, A., D. Saur, M. Kurjak, V. Schusdziarra, und H.D. Allescher.** Characterization and splice variants of neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. *Am.J.Physiol.* 275: 1998.G1146-1156,
147. **Huguenard JR:** Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol.* 58 (1996) 329-348 Review.
148. **Huizinga JD., Tomlinson J. Pintin-Quezada J.** Involvement of nitric oxide in nerve-mediated inhibition and action of vasoactive intestinal peptide in colonic

- smooth muscle. *Journal of Pharmacol. And Experim. Therapeutics* 260 (1992) 803-808.
149. **Irie K.**, Muraki T., Furukawa K., Nomoto T. L-N^G-Nitro-arginine inhibits nicotine-induced relaxation of isolated rat duodenum. *European Journal of Pharmacology* 202 (1991) 285-288.
150. **Jarvis SE, magga JM, Beedle AM, Braun JE, Zamponi GW:** G protein modulation of N-type calcium channels is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and Gbetagamma. *J Biol Chem.* 275 (2000) 6388-6394.
151. **Jarvis SE, Zamponi GW:** Distinct molecular determinants govern syntaxin 1A-mediated inactivation and G-protein inhibition of N-type calcium channels. *J Neurosci* 21 (2001) 2939-2948.
152. **Jarvis SE, Barr W, Feng ZP, Hamid J, Zamponi GW:** Molecular determinants of syntaxin 1 modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem* 277 (2002) 44399-44407.
153. **Jessen KR, Saffrey MJ.**, Van Noorden S., bloom SR., Polak JM., Burnstock G. Immunohistochemical studies of the enteric nervous system in tissue culture and in situ: localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance-P and enkephalin immunoreactive nerves in the guinea-pig gut. *Neuroscience* 5 (1980) 1717- 1735.
154. **Johnson PJ, Bornstein JC, Burcher E.:** Roles of neuronal NK1 and NK3 receptors in synaptic transmission during motility reflexes in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol.* Aug;124(7): (1998) 1375-84.
155. **Jonakait GM, Gintzler AR, Gershon MD.** Isolation of axonal varicosities (autonomic synaptosomes) from the enteric nervous system. *J Neurochem.* May;32(5) (1979) 1387-400.
156. **Kamp TJ, Perez-Garcia MT, marban E:** Enhancement of ionic current and charge movement by coexpression of calcium channel β_{1A} subunit with α_{1C} subunit in a human embryonic kidney cell line. *J Physiol* 492 (1996) 89-96.
157. **Kaneko S, Cooper CB, Nishioka N, Yamasaki H, Suzuki A, Jarvis SE, Akaike A, Satoh M, Zamponi GW:** Identification and characterization of novel human Ca (v)2.2 (alpha 1B) calcium channel variants lacking the synaptic protein interaction site. *J Neurosci* 22 (2002) 82-92.
158. **Kassim SK, El Touny M, El Guinaidy M, El Moghni MA, El Mohsen AA.** Serum nitrates and vasoactive intestinal peptide in patients with gastroesophageal reflux disease. *Clin Biochem.* Nov;35(8) (2002) 641-6
159. **Katsoulis S, Schmidt WE, Clemens A, Schworer H, Creutzfeldt W.:** Vasoactive intestinal polypeptide induces neurogenic contraction of guinea

- pig ileum. Involvement of acetylcholine and substance P. Regul Pept. 38 (1992) 155-164.
160. **Katz B, Mild R.:** Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. J Physiol. 203 (1969) 689-706.
161. **Keef KD, Shuttleworth CW, Xue C, Bayguinov O, Publicover NG, Sanders KM.** Relationship between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in enteric inhibitory neurotransmission. Neuropharmacology. 33(11) (1994)1303-14.
162. **Kellow JE, Delvaux M, Azpiroz F, Camilleri M, Quigley EMM, Thompson DG.** Principles of applied neurogastroenterology: physiology/motility-sensation. Gut, 45 (Suppl.2): (1999) 17-24.
163. **Kimball BC, Mulholland MW.:** Neuroligands evoke calcium signaling in cultured myenteric neurons. Surgery. Aug;118(2): (1995) 162-9;
164. **Kimura H, Ito S, Ohta T, Asano T, Nakazato Y.** Vasoactive intestinal peptide released by acetylcholine in the dog ileum. J Auton Nerv Syst. Jul;48(2) (1994) 167-74
165. **Kirchgessner, A.L. und M. Liu.** Differential localization of Ca²⁺ channel alpha_{1B} subunits in the enteric nervous system: presence of alpha_{1B} channel-like immunoreactivity in intrinsic primary afferent neurons. The Journal of Comparative Neurology 409 (1999) 85-104.
166. **Kishi M.,** Takeuchi T., Katayama H., Yamazaki Y., Nishio H., Hata F., Takewaki T. Involvement of cyclic AMP-PKA pathway in VIP-induced, chrybdotoxin-sensitive relaxaton of longitudinal muscle of the distal colon of Wistar-ST rats. Br.J. Pharmacol. 129 (2000) 140-146.
167. **Knowles RG., Palacios M.; Palmer RMJ., Moncada S.** Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86 (1989) 5159-5162.
168. **Knowles RG, Moncada S.:** Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J. 298 (1994) 249-258 Review.
169. **Kobayashi T., et al.** Regulation of Ca_v 1.2 Current : Interaction with intracellular molecules. J.Pharmacol. Sciences 103 (2007) 347-353
170. **Kojima Y., Takahashi T., Fujina M., Owyang C.** Inhibition of cholinergic transmission by opiates in ileal myenteric plexus is mediated by κ receptor. Involvement of regulatory inhibitory G protein and calcium N-channels. Journal of Pharmacol. And Exp. Therapeutics 268 (1994) 965-970.

171. **Kordasiewicz HB, Gomez CM:** Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 6. *Neurotherapeutics*. 4 (2007) 285-294.
172. **Kunze WA, Furness JB.:** The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol.*;61:117-42. 1999
173. **Kuramoto H, Kawano H, Sakamoto H, Furness JB.** Motor innervation by enteric nerve fibers containing both nitric oxide synthase and galanin immunoreactivities in the striated muscle of the rat esophagus. *Cell Tissue Res*. Feb;295(2):241-5. 1999 (4, GAL)
174. **Kurjak, M., H.D. Allescher, V. Schusdziarra, und M. Classen.** Release of bombesin-like immunoreactivity from synaptosomes isolated from the rat ileum. *Eur.J.Pharmacol.*257 (1994) 169-179
175. **Kurjak, M., R. Fritsch, D. Saur, V. Schusdziarra, und H.D. Allescher.** Functional coupling between nitric oxide synthesis and VIP release within enteric nerve terminals of the rat: Involvement of proteinkinase G and phosphodiesterase 5. *J.Physiol.(Lond.)*534.3 (2001) 827-836,.
176. **Kusunoki M., Tsai LH., Taniyama K., Tanka C.** Vasoactive intestinal polipeptide provokes acetylcholine release from the myenteric plexus. *American Journ. Of Physiol.* 251(1986) G51-G55.
177. **Lacinová L, Klugbauer N, Hofmann F:** Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys* 19 (2000) 121-136.
178. **Lacinova L.** Voltage-dependent calcium channels. *Gen. Physiol Biophys*. 244 (2005b) 1:1-78.
179. **Lala PK, Chakraborty C.;** Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol.* 2(3) (2001) 149-156. Review
180. **Landò L, Zucker RS, Ca²⁺ cooperativity in neurosecretion measured using photolabile Ca²⁺ chelators.** *J Neurophysiol.* 72 (1994) 826-830.
181. **Langley J.N.:** The Autonomic Nervous System. Part1., W.Heffer, London, 1921
182. **Lecci A, De Giorgio R, Bartho L, Sternini C, Tramontana M, Corinaldesi R, Giuliani S, Maggi CA.** Tachykinin NK(1)receptor-mediated inhibitory responses in the guinea-pig small intestine. *Neuropeptides*. Feb;33(1): (1999) 91-7.
183. **Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E:** Nickel block of three cloned T- type calcium channels: low concentrations selectively block alpha 1H. *Biophys J.* 77 (1999) 3034-3042.

184. **Lee A, Wong ST, Gallagher D, Li B, Storm DR, Scheuer T, Catterall WA.** Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* 339 (1999) 155-159.
185. **Lee A, Scheuer T, Catterall WA.** Ca²⁺/Calmodulin-dependent facilitation and inactivation of P/Q-type Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 20 (2000) 6830-6838.
186. **Lee HT, Hennig GW, Fleming NW, Keef KD, Spencer NJ, Ward SM, Sanders KM, Smith TK:** The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of cajal in human small intestine. *Gastroenterology*. 132 (2007) 1852-1865.
187. **Lefebvre RA, De Vriese A, Smits GJ.:** Influence of vasoactive intestinal polypeptide and NG-nitro-L-arginin methyl ester on cholinergic neurotransmission in the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol*. 221 (1992a) 235-242.
188. **Lefebvre RA., Baert E., Barbier AJ.** Influence of N^(G)-nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea pig gastric fundus. *Br.J.Pharmacol*. 106 (1992b) 173-179.
189. **Lefebvre R.A., Smits G.J., Timmermanns J.P.:** Study of NO and VIP as non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br.J.Pharmacol.*, 116,2017-2026, 1995 (5,VIP/NO-Colokalisation)
190. **Lefebvre RA.:** Influence of a selective guanylate cyclase inhibitor, and of the contraction level, on nitrenergic relaxations in the gastric fundus. *Br J Pharmacol*. Aug;124(7): (1998) 1439-48.
191. **Lenard L Jr, Halmai V, Bartho L:** Morphine contracts the guinea pig ileal circular muscle by interfering with a nitric oxide mediated tonic inhibition. *Digestion*. 60 (1999) 562-566.
192. **Li CG, Rand MJ:** Nitric oxide and vasoactive intestinal polipeptide mediate non- adrenergic, non- cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Europ-J.Pharmacol*. 73 (1990) 1-9.
193. **Li C, Davletov BA, Sudhof TC:** Distinct Ca²⁺ and Sr²⁺ binding properties of synaptotagmins. Definition of candidate Ca²⁺ sensors for the fast and slow components of neurotransmitter release. *J Biol Chem*. 1995 Oct 20;270(42):24898-902.
194. **Lim SP, Muir TC.:** Neuroeffector transmission in the guinea-pig internal anal sphincter: an electrical and mechanical study. *European Journal of Pharmacology* 128 (1986) 17-24.
195. **Lincoln TM.:**Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther*. 41 (1989) 479-502

196. **Lincoln TM, Komalavilas P.** Cyclic GMP-mediated signaling mechanisms in smooth muscle. In: Ed, Nitric Oxide, New York, Academic Press; 401-25. 2000
197. **Liu MT, Rothstein JD, Gershon MD, Kirchgessner AL.** Glutamatergic enteric neurons. *Neurosci.* Jun 15;17(12): (1997) 4764-84.
198. **Llewellyn-Smith IJ., Furness JB., Costa M.** Light and electron microscopic immunocytochemistry of the same nerves from whole mount preparations. *Journ. Of Histochemistry and Cytochemistry* 33 (1985) 857-866.
199. **Llinás R, Yarom Y:** Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. *J Physiol.* 315 (1981) 233-253.
200. **Llinas RR, Sugimori M, Cherksey B:** Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann N Y Acad Sci.* 560 (1989) 103-111 Review.
201. **Lundberg JM:** Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev.* 48 (1996) 113-178. Review.
202. **Luo ZD, Calcutt NA, Higuera ES, Valder CR, Song YH, Svensson CI, Myers RR:** Injury type-specific calcium channel alpha 2 delta-1 subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. *J Pharmacol Exp Ther.* 303 (2002) 1199-1205.
203. **Maczka M, Thor P, Lorens K, Konturek SJ.:** Nitric oxide inhibits the myoelectric activity of the small intestine in dogs. *J physiolarmacol.* 44 (1993) 31-42.
204. **Maggi Ca, Patacchini R, Santicioli P, Lippe IT, Giuliani S, Geppetti P, Del Bianco E, Selleri S, Meli A:** The effect of omega conotoxin GVIA, a peptide modulator of the N-type voltage sensitive calcium channels, on motor responses produced by activation of efferent and sensory nerves in mammation smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 338 (1988) 107-113.
205. **Maggi CA.,** Barbanti G., turini D., Giuliani S. Effect of N^G -monomethyl-L-Arginine (L-NMMA) and N^G -nitro-L-arginine (L-NOARG) on non-adrenergic, non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the human ileum. *Britisch Journal of Pharmacology* 103 (1991) 1970-1972.
206. **Maggi CA, Giuliani S.:** Multiple inhibitory mechanisms mediate non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the guinea-pig colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1993 Jun;347(6):630-4.

207. **Maggi CA, Holzer P, Giuliani S.** Effect of omega-conotoxin on cholinergic and tachykininergic excitatory neurotransmission to the circular muscle of the guinea-pig colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Nov;350(5): (1994a) 529-36.
208. **Maggi CA, Zagorodnyuk V, Giuliani S:** Tachykinin NK3 receptor mediates NANC hyperpolarization and relaxation via nitric oxide release in the circular muscle of the guinea-pig colon. *Regul Pept* 53(3) (1994b) 259-74.
209. **Maggi CA, Giuliani S.:** Characterization of the apamin- and L-nitroarginine-resistant NANC inhibitory transmission to the circular muscle of guinea-pig colon. *J Auton Pharmacol.* 1996 Jun;16(3):131-45.
210. **Manzini S., Maggi CA., Meli A.** Further evidence for involvement of adenosine-5'triphosphate in non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the isolated rat duodenum. *Eur.J. Pharmacol.* 113 (1985) 399-408.
211. **Marino F, Creta F, De Ponti F, Gironi C, Lecchini S, Frigo GM:** Opioid pathways exert a tonic restraint in the guinea-pig isolated colon: changes after chronic sympathetic denervation. *Jour. Of Pharmacy and Pharmacology* 45 (1993) 668-670.
212. **Martinson J, Muran A.:** Excitatory and inhibitory effects of vagus stimulation on gastric motility in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica* 57 (1963) 309-316.
213. **Martire M, Curro D, Altobelli D, Preziosi P, Fuxe K:** Voltage-operated Ca(2+) channels involved in K(+)-evoked release of vasoactive intestinal polypeptide from the rat hypothalamus. *Neurochem Int.* 38(4) (2001)359-65.
214. **Matsuda H, Iyanagi T:** Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochem Biophys Acta* 1473 (1999) 345-355.
215. **Matsuyama H., Thapaliya S., Takewaki T.** Cyclic GMP-associated apamin-sensitive nitrenergic slow inhibitory junction potential in the hamster ileum. *Br. J. Pharmacol.* 128 (1999) 830-836.
216. **Matsuyama H, Unno T, El-Mahmoudy AM, Komori S, Kobayashi H, Thapaliya S, Takewaki T.** Peptidergic and nitrenergic inhibitory neurotransmissions in the hamster jejunum: regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neuroscience.*;110(4):779-88. 2002
217. **Maximov A, Bezprozvanny I:** Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *J Neurosci* 22 (2002) 6939-6952.
218. **McDonough SI, Bean BP.** Mibefradil inhibition of T-type calcium channels in cerebellar purkinje neurons. *Mol Pharmacol.* Dec;54(6): (1998) 1080-7

219. **Meffert, M.K., B.A. Premack, und H. Schulman.** Nitric oxide stimulates Ca^{2+} -independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12 (1994)1235-1244.
220. **Meulemans AL, Helsen LF, Schuurkes JA:** The role of nitric oxide (NO) in 5-HT-induced relaxations of the guinea-pig stomach. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 348 (1993) 424-430.
221. **Meulemans AL, Eelen JG, Schuurkes JA.:** NO mediates gastric relaxation after brief vagal stimulation in anesthetized dogs. 269 (1995) G255-261.
222. **Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S:** Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340 (1989) 230-233.
223. **Mintz IM, Adams ME, Bean BP:** P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron.* 9 (1992) 85-95.
224. **Mishra SK, Hermsmeyer K :** Selective inhibition of T-type Ca^{2+} channels by Ro 40-5967. *Circ Res.* 75 (1994) 144-148.
225. **Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL:** μ - and κ -opioid receptors selectively reduce the same transient components of high-threshold calcium current in rat dorsal root ganglion sensory neurons. *J Neurosci.* 14 (1994) 5903-5916.
226. **Moncada S, Palmer RM, Higgs EA.:** Nitric oxide: hysiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43 (1991) 109-142.
227. **Monje VD, Haack JA, Naisbitt SR, Miljanich G, Ramachandran J, Nasdasdi L, Olivera BM, Hillyard DR, Gray WR:** A new conus peptide ligand for Ca channel subtypes. *Neurpharmacology* 32 (1993) 1141-1149.
228. **Mori Y, Friedrich T, Kim MS, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T, et.al:** Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350 (1991) 398-402.
229. **Mould J, Yasuda T, Schroeder CI, Beedle AM, Doering CJ, Zuanponi GW, Adams DJ, Lewis RJ :** The $\alpha_{2\delta}$ auxiliary subunit reduces affinity of ω -conotoxins for recombinant N-type ($\text{Ca}_v2.2$) calcium channels. *J Biol Chem* 279 (2004) 34705-34714.
230. **Moumni C, Magour R, Bali JP.:** Gastrointestinal hormone receptors on isolated smooth muscle cells from gastric antrum of the rabbit. *Biochem Pharmacol* 38 (1989) 2895-2901
231. **Mourad FH, turvill JL, Farthing MJ:** Role of nitric oxide in intestinal water and electrolyte transport. *Gut* 44 (1999) 143-147

232. **Mudado MA, Rodrigues AL, Prado VF, Beirão PS, Cruz JS:** CaV 3.1 and CaV 3.3 account for T-type Ca²⁺ current in GH3 cells. *Braz J Med Biol Res.* 37 (2004) 929-935.
233. **Murr MM., Balsiger BM., Farrugia G., Sarr MG.,** Role of nitric oxide, vasoactive intestinal polypeptide, and ATP in inhibitory neurotransmission in human jejunum. *J. Surg. Res.* 84 (1999) 8-12.
234. **Murthy KS., Zhang KM., Jin, JG., Grider JR., Makhlof GM.** VIP-mediated G protein-coupled CA²⁺ influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. *Am. J. Physiol.* 265 (1993) G660-G671.
235. **Murthy KS, Makhlof GM.** Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 268(1 Pt 1) (1995) C171-80.
236. **Neely A, Wei X, Olcese R, Birnbaumer L, Stefani E:** Potentiation by the β subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science* 262 (1993) 575-578.
237. **Neveu D, Nargeot J, Richard S:** Two high-voltage-activated, dihydropyridine- sensitive Ca²⁺ channel currents with distinct electrophysiological and pharmacological properties in cultured rat aortic myocytes. *Pflugers Arch.* 424 (1993) 45-53.
238. **Niel JP, Bywater RAR, Taylor GS.:** Apamin-resistant post-stimulus hyperpolarization in the circular muscle of guinea pig ileum. *J. Autonomic Nerv. System* 9 (1983) 565-569.
239. **Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW.:** Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316 (1985) 440-443.
240. **Nurko S, Rattan S.:** role of vasoactive intestinal polypeptide in the internal anal sphincter relaxation of the opossum. *J Clin Invest.* 81 (1988) 1146-1153.
241. **Ny L, Pfeifer A, Aszodi A, Ahmad M, Alm P, Hedlund P, et al.** Impaired relaxation of the stomach smooth Muscle in mice lacking cyclin GMP-dependent protein kinase I. *Br J Pharmacol;* 129: 395-401. 2000
242. **Oka M, Itoh Y, Wada M, Yamamoto A, Fujita T:** Gabapentin blocks L-type and P/Q-type Ca²⁺ channels involved in depolarization-stimulated nitric oxide synthase activity in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex. *Pharm Res.* 20 (2003) 897-899.
243. **Olivera Bm, Imperial JS, Cruz LJ, Bindokas VP, Venema VJ, Adams ME.:** Calcium channel-targeted polypeptide toxins. *Ann N Y Acad Sci.* 635 (1991) 114-122

244. **Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH:** Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391 (1998) 896-900.
245. **Perez-Reyes E:** Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev.* 83 (2003) 117-161.
246. **Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT:** Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22 (1999) 549-558.
247. **Pichler M, Cassidy TN, Reimer D, Haase H, Kraus R, Ostler D, Striessnig J:** Beta subunit heterogeneity in neuronal L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 272 (1997) 13877-13882.
248. **Pietrobon D.** Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 25-1 (2002) 31-50.
249. **Pimont S, Bruley Des Varannes S, Le Neel JC, Aubert P, Galmiche JP, Neunlist M.:** Neurochemical coding of myenteric neurons in the human gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil.* 15 (2003) 655-662.
250. **Pitt GS,** Zuhlke RD, Hudmon A, Schulman H, Reuter H, Tsien RW. Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 276 (2001) 30794-30802
251. **Plummer MR, Logothetis DE,** Hess P.: Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron.* 2 (1989) 1453-1463.
252. **Plummer MR, Hess P:** Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels. *Nature* 351 (1991) 657-659.
253. **Poonyachoti S, Kulkarni-Narla A, Brown DR.** Chemical coding of neurons expressing delta- and kappa-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum. *Cell Tissue Res.* 307(1) (2002) 23-33.
254. **Pragnell M, DeWaard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP:** Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α_1 -subunit. *Nature* 368 (1994) 67-70
255. **Prakriya M, Solaro CR, Lingle CJ.** [Ca²⁺]_i elevations detected by BK channels during Ca²⁺ influx and muscarine-mediated release of CA²⁺ from intracellular stores in rat chromaffin cells. *J Neurosci.* 16 (1996) 4344-4359.
256. **Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, Chakravart A.:** A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79 (1994) 1257-1266

257. **Qin N, Olcese R, Bransby M, Lin T, Birnbaumer L.** Ca²⁺-induced inhibition of the cardiac Ca²⁺ channel depends on calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96 (1999) 2435-2438.
258. **Qiu J, Bosch MA, Jamali K, Xue C, Kelly MJ, Ronnekleiv OK:** Estrogen upregulates T-type calcium channels in the hypothalamus and pituitary. *J Neurosci.* 26 (2006) 11072-11082.
259. **Quartero AO, De Wit NJ, Lodder AC, Numans ME, Smout AJ, Hoes AW:** Disturbed solid-phase gastric emptying in functional dyspepsia: a meta-analysis. *Dig Dis Sci*, 43: (1998) 2028-33.
260. **Rae MG, Muir TC.:** Neuronal mediators of inhibitory junction potentials and relaxation in the guinea-pig internal anal sphincter. *J. Physiology* 493 (1996) 517-527.
261. **Rapoport RM.** Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circ Res.* Mar;58(3), (1986) 407-10.
262. **Regan LJ, Sah DW, Bean BP.:** Ca²⁺ channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron.* 6 (1991) 269-280.
263. **Reis, H.J., A.R. Massensini, M.A.M. Prado, R.S. Gomez, M.V. Gomez, Romano-Silva, and M.A.** Calcium channels coupled to depolarization-evoked glutamate release in the myenteric plexus of guinea-pig ileum. *Neurosci.* 101 (2000) 237-242,
264. **Reis HJ, Biscaro FV, Gomez MV, Romano-Silva MA.** Depolarization-evoked GABA release from myenteric plexus is partially coupled to L-, N-, and P/Q-type calcium channels. *Cell Mol Neurobiol.* Dec;22(5-6) (2002) 805-11.
265. **Rekik M., Delvaux M., Tack I., Frexinos J., Bueno L.** VIP-induced relaxation of guinea pig intestinal smooth muscle cells: sequential involvement of cyclic AMP and nitric oxide. *Br.J.Pharmacol.* 118 (1996) 477-484.
266. **Ribeiro-da Silva A., Hokfelt T.,** Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. *Neuropeptides* Oct;34(5): 256-71, 2000 (4, Subst P)
267. **Roberts WM, Jacobs RA, Hudspeth AJ.:** Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J Neurosci.* 10 (1990) 3664-3684.
268. **Russo A., Fraser R., Adachi K., et al.** Evidence that nitric oxide mechanisms regulate small intestinal motility in humans. *GUT*;44:72-76.1999

269. **Said S.I., Mutt V.:** Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature*. Feb 28;225(235):863-4. (1970) (4, VIP)
270. **Said SI, Rosenberg RN.:** Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. *Science* 192 (1976) 907-908.
271. **Said SI, Dickman K, Dey RD, Bandyopadhyay A, De Stefanis P, Raza S, Pakbaz H, Berish HI.:** Glutamate toxicity in the lung and neuronal cells: prevention or attenuation by VIP and PACAP. *Ann N Y Acad Sci* 865 (1998) 226-237.
272. **Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G, Siracusa MA.:** Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des.* 8 (2002) 177-200.
273. **Sanders KM., Ward SM.** Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *American Journal of Physiology* 262 (1992) G379-G392)
274. **Sang Q, Young HM.:** Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res.* Apr;284(1) (1996) 39-53.
275. **Sarna S, Stoddard C, Belbeck L, McWade D.** Intrinsic nervous control of migrating myoelectric complexes. *Am J Physiol.* Jul;241(1):G16-23. 1981
276. **Sarosi GA Jr, Kimball BC, Barnhart DC, Zhang W, Mulholland MW.:** Tachykinin neuropeptide-evoked intracellular calcium transients in cultured guinea pig myenteric neurons. *Peptides.*;19(1) (1998)75-84
277. **Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y Adams ME, Tsien RW:** Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (B1) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron.* 11 (1993) 291-303.
278. **Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P.** Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature.* Mar 9;404(6774): (2000) 197-201.
279. **Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U.:** The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178 (1993) 153-175 Review.
280. **Schultzberg M., Hokfelt T., Nilsson G., Terenius L., Rehfeld JF., Brown M.:** Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immuno-histochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins,

- somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine β -hydroxylase. *Neuroscience* 5 (1980) 689-744.
281. **Schwartz D, Stollman N** : University of Miami Division of Clinical Pharmacology therapeutic rounds: irritable bowel syndrome- pathophysiology, diagnosis and treatment. *Am J Ther*; 7, (2000) 265-72,
282. **Scott ID, Nicholls DG**: Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. *Biochem J* 186 (1980) 21-33.
283. **Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, Bell GI**: Cloning of the α_1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic β cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 584-588.
284. **Sen L, Smith TW**: T-type Ca^{2+} channels are abnormal in genetically determined cardiomyopathic hamster hearts. *Circ Res.* 75 (1994) 149-155.
285. **Serio R., Mule F., Adamo EB., Postorine A**. Evidence against purines being neurotransmitters of non-adrenergic, non-cholinergic nerves in rat duodenum. *Eur. J. Pharmacol.* 182 (1990) 487-495.
286. **Shahin W, Murray JA, Clark E, Conklin JL.**: Role of cGMP as a mediator of nerve-induced motor functions of the opossum esophagus. *Am J physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279 (2000) G567-574.
287. **Sheng ZH, Rettig J, Takahashi M, Catterall WA**: Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron.* 13 (6) (1994) 1303-1313.
288. **Sheng ZH, Yokoyama CT, Catterall WA**: Interaction of the synprint site of N-type Ca^{2+} channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 94 (1997) 5405-5410.
289. **Sheng ZH., Westenbroek RE., Catterall WA**. Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *J Bioenerg. Biomembr.* 30-4 (1998) 335-45.
290. **Shuttleworth CW, Xue C, Ward SM, De Vente J, Sanders KM.**; Immunohistochemical localization of 3', 5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience* 56 (1993) 513-522.
291. **Shuttleworth CWR, Weinert JS, Sanders KM, Bxtton ILO.** : Detection of nitric oxide release from canine enteric neurons. *J. Auton. Nerv. Syst.* 56 (1995) 61-68.

292. **Shuttleworth CW, Smith TK:** Action potential-dependent calcium transients in myenteric S neurons of the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 92 (1999) 751-762.
293. **Sigge W., Wedel T., Kunhnel W., Krammer HJ.** Morphologic alterations of the enteric nervous system and deficiency of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory innervation in neonatal necrotizing enterocolitis. *Wur. J. Pediatr. Surg.* 8 (1998) 87-94.
294. **Simeone DM, Kimball BC, Mulholland MW:** Acetylcholine-induced calcium signaling associated with muscarinic receptor activation in cultured myenteric neurons. *J Am Coll Surg.* 182 (1996) 473-481.
295. **Simula ME., Brookes SJ., Meedeniya AC., Toouli J., Saccone GT.** Distribution of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the sphincter of Oddi and duodenum of the possum. *Cell Tissue Res.* 304 (2001) 31-41.
296. **Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N:** The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253 (1991) 1553-1557.
297. **Sinsky M, Donnerer J.** Evidence for a neurotransmitter role of glutamate in guinea pig myenteric plexus neurons. *Neurosci Lett.* Dec 18;258(2) (1998) 109-12.
298. **Smith SM, Piedras-Rentera ES, Namkung Y, Shin HS, Tsien RW:** Neuronal voltage-activated calcium channels: on the roles of the alpha 1E and beta 3 subunits. *Ann N Y Acad Sci* 868 (1999) 175-198.
299. **Smith TK., Kang SH., Vanden Berghe P.** Calcium channels in enteric neurons. *Curr Opin Pharmacol.* 3-6 (2003) 588-593.
300. **Sokolov S, Timin E, Hering S:** On the role of Ca²⁺ -and Voltage-dependent inactivation in Cav1.2 sensitivity for the phenylalkylamine (-) gallopamil. *Circ Rs* 89 (2001) 700-708.
301. **Somogyi GT, Zernova GV, Tanowitz M, de Groat WC.** Role of L- and N-type Ca²⁺ channels in muscarinic receptor-mediated facilitation of ACh and noradrenaline release in the rat urinary bladder. *J Physiol.* 1997 Mar 15;499 (Pt 3):645-54.
302. **Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP:** Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260 (1993) 1133-1136.

303. **Spafford JD., Zamponi G.** Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13 (2003) 308-314.
304. **Spafford JD, Munno DW, Van Nierop P, Feng ZP, Jarvis SE, Gallin WJ, Smit AB, Zamponi GW, Syed NI:** Calcium channel structural determinants of synaptic transmission between identified invertebrate neurons: *J Biol Chem* 278 (2003) 4258-4267.
305. **Sporns, O. und S. Jenkinson.** Potassium ion- and nitric oxide-induced exocytosis from populations of hippocampal synapses during synaptic maturation. *Neurosci.* 80 (1997) 1057-107.
306. **Stark ME, Bauer AJ, Szurszewski JH.** Effect of nitric oxide on circular muscle of canine small intestine. *Journal of physiology* 444 (1991) 743-761.
307. **Starodub, A.M. und J.D. Wood.** Selectivity of omega-CgTx-MVIIIC toxin from conus magus on calcium currents in enteric neurons. *Life Sci.* 64: (1999) PL305-PL310,
308. **Sternini C, Su D, Gamp PD, Bunnett NW.;** Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract. *J. Comp. Neurol.* 358 (1995) 531-540.
309. **Storr M., Gaffal E., Schusdziarra V., Allescher HD.** Endomorphins 1 and 2 reduce relaxant non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmission in rat gastric fundus. *Life Sci* 71 (2002) 383.389.
310. **Strege PR, Bernard CE, Ou Y, Gibbons SJ, Farrugia G.** Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Aug;289(2) (2005) G249-53.
311. **Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BH, Wutz K, Gutwillinger N, Ruther K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A, Meindl A:** An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 19 (1998) 260-263.
312. **Szurszewski J.:** A migrating electric complex of the canine small intestine. *Am J Physiol* 217 (1969) 1757-1763.
313. **Tack J, Piessevaux H, Coulie B, Canapeel P, Janssens J.** Role of impaired gastric accommodation to a meal in functional dyspepsia. *Gastroenterol,* 115: (1998)1346-52.
314. **Tack J, Caenepeel P, Fischler B, Piessevaux H, Janssens J.** Symptoms associated with hypersensitivity to gastric distension in functional dyspepsia. *Gastroenterol,* 121: (2001) 526-35

315. **Takhashi T, Owyang C.:** Vagal control of nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide release in the regulation of gastric relaxation in rat. *J Physiol.* 484 (1995) 481-492.
316. **Talley NJ, Stanghellini V, Heading RC, Koch KL, Malagelada JR, Tytgat GNJ.** Functional gastroduodenal disorders. *Gut*, 45 (Suppl.2): (1999) 37-42
317. **Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA:** Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci.* 19 (1999) 1895-1911.
318. **Talley EM, Solórzano G, Depaulis A, Perez-Reyes E, Bayliss DA:** Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 75 (2000) 159-165.
319. **Talley NJ, Verlinden M, Jones M,** Can symptoms discriminate among those with delayed or normal gastric emptying in dysmotility-like dyspepsia? *Am J Gastroenterol*, 96: (2001)1422-8
320. **Talmage E. K., Mawe G.M:** NADPH-diaphorase and VIP are co-localized in neurons of gallbladder ganglia. *J. Auton.Nerv.Syst.*43:83-89, 1993
321. **Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S:** Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328 (1987) 313-318.
322. **Thornbury KD, Ward SM, Dalziel HH, Carl A, Westfall DP, Sanders KM:** Nitric oxide and nitrocyteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. *American Journal of Physiology* 261 (1991) G553-G557.
323. **Toda N, Baba H, Okamura T:** Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. *Japans Journal of Pharmacology* 53 (1990) 281-284
324. **Todorov S., Pozzoli C., Zamfirova R., Poli E.** Prejunctional modulation of non-adrenergic non-cholinergic (NANC) inhibitory responses in the isolated guinea-pig gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil* 15 (2003) 299-306.
325. **Todorovic SM, Lingle CJ:** Pharmacological properties of T-type Ca²⁺ current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol* 79 (1998) 240-252.
326. **Tonini M, De Giorgio R, De Ponti F, et al.** Role of nitric-oxide and vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons in human gastric fundus strip relaxations. *Br J Pharmacol*;129: (2000) 12-20

327. **Torphy TJ**, Fine CF., Burman M., Barnett MS., Ormsbee HS. Lower esophageal sphincter relaxation is associated with increased cyclic nucleotide content. *Am.J. Physiol.* 251 (1986) G 786-G793.
328. **Tran S, Boot JR**. Differential Effects of voltage-dependent Ca²⁺ channels on low and high frequency mediated neurotransmission in guinea-pig ileum and rat vas deferens. *Eur J Pharmacol* 335 (1997) 31-36.
329. **Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, Avanzini G, Pape HC**. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J Neurosci.* Apr;15(4): (1995) 3110-7
330. **Turner TJ, Adams ME, Dunlap K**. Calcium channels coupled to glutamate release identified by omega-Aga-IVA. *Science.* Oct 9;258 (5080) (1992) 310-3.
331. **Turner TJ, Adams ME, Dunlap K**. Multiple Ca²⁺ channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 15;90(20) (1993) 9518-22.
332. **Ullrich B, Li C, Zhang JZ, McMahon H, Anderson RG, Geppert M, Südhof TC**: Functional properties of multiple synaptotagmins in brain. *Neuron.* 13 (6) (1994) 1281-1291.
333. **Usovich MM, Sugimori M, Cherksey B, Llinás R**: P-Type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 9 (1992) 1185-1199.
334. **Van Petegem F, Chatelain FC, Minor DL Jr**. Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca²⁺/calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol* 12 (2005) 1108-1115
335. **Vanden Berghe P, Tack J, Andrioli A, Missiaen L, Janssens J**: Receptor-induced Ca(2+) signaling in cultured myenteric neurons *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278(6) (2000b):G905-14.
336. **Vanden Berghe P, Tack J, Coulie B, Andrioli A, Bellon E, Janssens J**. Synaptic transmission induces transient Ca²⁺ concentration changes in cultured myenteric neurones. *Neurogastroenterol Motil.* Apr;12(2) (2000c) 117-24
337. **Vanneste G, Robberecht P, Lefebvre RA**.: Inhibitory pathways in the circular muscle of rat jejunum. *Br. J. Pharmacol.* 143 (2004) 107-118,
338. **Vantrappen G, Janssens J, Hellemans J et al**.: The interdigestive motot complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J Clin Invest,* 59 (1977):1158-66.

339. **Vogalis F, Furness JB, Kunze WA.**: Afterhyperpolarization current in myenteric neurons of the guinea pig duodenum. *J. Neurophysiol* 85 (2001) 1941-1951.
340. **Wang, X. und P.J. Robinson.** Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J. Neurochem.* 68 (1997) 443-456.
341. **Wang YF, Mao YK, Fox-Threlkeld JE, McDonald TJ, Daniel EE.** Colocalization of inhibitory mediators, NO, VIP and galanin, in canine enteric nerves. *Peptides.* 19(1) (1998) 99-112.
342. **Ward SM, McKeen ES, Sanders KM.**: Role of nitric oxide in non- adrenergic, non- cholinergic inhibitory junction potentials in canine ileocolonic sphincter. *Br. J. Pharmacology* 105 (1992a) 776-782.
343. **Ward SM, Sanders KM.** Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Sep;281(3): (2001) G602-11
344. **Ward SM, Xue C, Sanders KM.**: Localization of nitric oxide synthase in canine ileocolonic and pyloric sphincters. *Cell tissue Res.* 275 (1994) 513-527.
345. **Waterman Sa., Costa M.** The role of enteric inhibitory motoneurons in peristalsis in the isolated guinea-pig tenia coli. *British Journal of Pharmacology* 477 (1994) 459-468.
346. **Waterman SA., Costa M. Tonini M.** Accommodation mediated by enteric inhibitory reflexes in the isolated guinea-pig small intestine. *Journal of Physiology* 474 (1994) 539-546.
347. **Wattchow DA, Porter AJ, Brookes SJ, Costa M.**: The polarity of neurochemically defined myenteric neurons in the human colon. *Gastroenterology.* Aug;113(2): (1997) 497-506.
348. **Wegener JW, Schulla V, Koller A, Klugbauer N, Feil R, Hofmann F:** Control of intestinal motility by the Ca(v)1.2 L-type calcium channel in mice. *FASEB J* 20 (2006) 1260-1262.
349. **Weisbrodt NW, Copeland EM, Moore EP, Kearley RW, Johnson LR.**: Effect of vagotomy on electrical activity of the small intestine of the dog. *Am. J. Physiol.* 228 (1975) 650-654.
350. **Welling A, Bosse E, Cavalie A, Bottlender R, Ludwig A, Nastainczyk W, Flockerzi V, Hofmann F:** Stable co-expression of calcium channel α_1 , β and α_2 / δ subunits in a somatic cell line. *J Physiol* 471 (1993) 749-765

351. **Welling A, Lacinova L, Donatin K, Ludwig A, Bosse E, Flockerzi V, Hofmann F:** Expression of the L-type calcium channel with two different β subunits and its modulation by Ro 40-5967. *Pflügers Arch.* 429 (1995) 400-411.
352. **Wessler I, Dooley DJ, Werhand J, Schlemmer F..** Differential effects of calcium channel antagonists (ω -conotoxin GVIA, nifedipine, verapamil) on the electrically-evoked release of (3H)acetylcholine from the myenteric plexus, phrenic nerve and neocortex of rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 341 (1990) 288-294.
353. **Westenbroek RE, Ahljianian MK, Catterall WA:** Clustering of L-type Ca^{2+} channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature.* 347 (6290) (1990) 281-284.
354. **Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TV, Snutch TP, Catterall WA:** Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci.* 15 (1995) 6403-6418.
355. **Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA.** Localization of Ca^{2+} channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals *J Neurosci.* Aug 15;18(16): (1998) 6319-30
356. **Wheeler DB, Randall A, Tsien RW.** Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 1994 Apr 1;264(5155):107-11.
357. **Whittaker V.P., Michaelson I.A., Kirkland R.J.A.:** The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles("synaptosomes"). *Biochem.J.*90 (1964) 293-303
358. **White TD.** Direct detection of depolarisation-induced release of ATP from a synaptosomal preparation. *Nature.* 1977 May 5;267(5606):67-8.
359. **Wiklund CU., Olgart C., Wiklund NP., Gustafson LE.** ndModulation of cholinergic and substance P-like neurotransmission by nitric oxide in the guinea-pig ileum. *Br. Journ. of Pharmacology* 110 (1993) 833-839
360. **Wiley JW, O'Dorisio TM, Owyang C.:** Vasoactive intestinal polypeptide mediates cholecystinin-induced relaxation of the sphincter of Oddi. *J Clin Invest.* 81 (1988) 1920-1924.
361. **Wiley JW, Moises HC, Gross RA, Mac Donald RL:** Dynorphin A-mediated reduction in multiple calcium currents involves a $G(o)$ alpha-subtype G protein in rat primary afferent neurons. *J Neurophysiol.* 77 (1997) 1338-1348

362. **Williams ME, Washburn MS, Hans M, Urrutia A, Brust PF, Prodanovich P, Harpold MM, Stauderman KA.** Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem.* Feb;72(2): (1999) 791-9.
363. **Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM:** Structure and functional expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$ and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8 (1992a) 71-84.
364. **Williams ME, Brust PF, Feldman DH, Patthi S, Simerson S, Maroufi A, McCue AF, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM:** Structure and functional expression of an ω -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 257 (1992b) 389-395.
365. **Wu LG, Borst JG, Sakman B.** R-type Ca^{2+} currents evoke transmitter release at a rat central synapse. *Proc Natl acad Sci USA* 95 (1998)4720-4725.
366. **Xiao W., Boroujerdi A., Bennet GJ., Luo ZD.** Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy : Analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2Delta Type-1 Calcium channel subunit. *Neuroscience* 144 (2007) 714-720.
367. **Xue L, Farrugia G, Sarr MG, Szurszewski JH.** ATP is a mediator of the fast inhibitory junction potential in human jejunal circular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1999 Jun;276(6 Pt 1):G1373-9.
368. **Yagasaki O, Nabata H, Yanagiya I:** Effects of desensitization to adenosine 5'-triphosphate and vasoactive intestinal polypeptide on non-adrenergic inhibitory responses of longitudinal and circular muscles in the rat ileum. *J Pharm Pharmacol*, Dec; 35,(12) (1983) 818-820
369. **Yau WM, Verdun PR.** Release of gamma-aminobutyric acid from guinea pig myenteric plexus synaptosomes. *Brain Res.* Nov 14;278(1-2) (1983) 271-3.
370. **Yau WM., Youther ML., Verdun PR..** A presynaptic site of action of substance P and vasoactive intestinal polypeptide on myenteric neurons. *Brain Research* 330 (1985), 382-385.
371. **Yau WM, Dorsett JA., Parr EL.** Characterization of acetylcholine release from enzyme-dissociated myenteric ganglia. *American Journal of Physiology* 256 (1989) G233-G239.
372. **Yokoyama CT, Westenbroek RE, Hell JW, Soong TW, Snutch TP, Catterall WA.** Biochemical Properties and Subcellular Distribution of the Neuronal Class E Calcium Channel $\alpha 1$ Subunit. *J Neurosci*, 15 (10) (1995) 6419-32.

373. **Young HM, McConalogue K, Furness JB, de Vente J.:** Nitric oxide targets in the guinea-pig intestine identified by induction of cyclic GMP immunoreactivity. *Neuroscience* 55 (1993) 583-596.
374. **Yuan SY, Furness JB, Bornstein JC, Smith TK.:** Mucosal distortion by compression elicits polarized reflexes and enhances responses of the circular muscle to distension in the small intestine. *J. Auton. Nerv. Syst.* 35 (1991) 219-226.
375. **Zamponi GW.** Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J. Pharmacol Sci* 92 (2003) 79-83.
376. **Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Home WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW:** Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32 (1993) 1075-1088.
377. **Zholos AV, Baidan LV, Starodub AM, Wood JD. :** Potassium channels of myenteric neurons in guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 89 (1999) 603-618.
378. **Zühlke RD, Pitt GS, Deissroth K, Tsien RW, Reuter H:** Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399 (1999) 150-162.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung der Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Manfred Kurjak für die freundliche Überlassung des Themas, das damit entgegengebrachte Vertrauen, und die Unterweisung in die experimentelle Arbeit. Dank gilt ihm auch für die außerordentlich gute freundschaftliche Betreuung, zahlreiche persönliche, über Fax, Telefon oder Internet geführte Diskussionen, und vor allem für seine herzliche Motivation während der gesamten Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Hans – Dieter Allescher für konstruktive Besprechungen und wissenschaftliche Diskussionen insbesondere während der Erarbeitung des experimentellen Teils.

Zudem danke ich Frau C. Herda und Frau H. Paeghe für ihre Unterstützung während der Arbeit im Labor.

Herrn Emeritus Prof. Dr. Drs. h.c. Meinhard Classen danke ich sehr für die Möglichkeit der Nutzung der technischen Einrichtungen.

Zuletzt danke ich besonders meinen Eltern, die mich während meiner Ausbildung und in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit zu jedem Zeitpunkt sehr unterstützt haben, und ein ganz herzlicher Dank gilt meinem Mann für seine liebenswerte Geduld und für seine Ungeduld, die diese Arbeit doch noch zum Abschluss gebracht haben.

9. Lebenslauf

Name: Monika Schwarz, geb. Aigner

Geburtsdatum/-ort: 09. Oktober 1973, Erlangen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet mit Stephan Georg Schwarz
Sohn Xaver Luis Schwarz, geb. 14. August 2006

Eltern: Ingeborg Aigner, geb. Kratkai
Prof. Dr. med. Karl R. Aigner

Schulbildung: 8/1979- 8/1992

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife (Chiemgau- Gymnasium,
Traunstein)
Abiturnote: 2,3 (Leistungskurse Französisch/ Kunst)

Studium: 1993-1994 Kunstgeschichte und Archäologie an der LMU
München
1994-1995 Humanmedizin an der Augusta Universität
Göttingen
1995-1997 Humanmedizin an der LMU München
1997 Physikum
1997-2001 Humanmedizin an der Technischen Universität
München
1998 1. Staatsexamen
2000 2. Staatsexamen
2001 3. Staatsexamen (Note 1, Gesamtnote der
ärztlichen Prüfung 1,83)

Berufliche Tätigkeit: 03/2002-08/2003 Ärztin im Praktikum in der Gynäkologie
des Klinikums rechts der Isar
09/2003- 09/2004 Assistenzärztin in Teilzeit in der
Chirurgischen Abteilung der Medias Klinik Ransbach
Seit 10/2004: Assistenzärztin in der Kinderklinik der
Universität Ulm