
Aus dem Bereich Theoretische Medizin
der Medizinischen Fakultät
Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Kombinierte Effekte verschiedener neurotropher Faktoren
auf dissoziierten Darmplexus allein und in Kombination.
Eine in-vitro Studie.**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2006

Vorgelegt 2006
von: Matthias Lintz
geboren am: 25. August 1968 in Zweibrücken

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	3
SUMMARY	5

I EINLEITUNG

1. Das enterische Nervensystem	6
1.1 Das enterische NS in seiner Funktion als autarker Teil des autonomen NS ..	8
1.2 Der Aufbau des enterischen Nervensystems	10

II MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere	19
2. Präparation der Versuchstiere	19
3. Auslösen des Plexus Myentericus aus der Muscularis	19
4. Dissoziation des Plexus in einzelne Neurone und Gliazellen	22
5. Ansetzen der Zellkulturen	22
6. Fixierung, Permeabilisierung und Immunmarkierung der Nervenzellen	24
7. Entwässerung und Einbettung der Nervenzellpräparate	26
8. Bestimmung des Neuritenwachstums	26

III ERGEBNISSE

1. Technische Probleme bei der Präparation	28
2. Messung der Nervenzellen	29
3. Aussehen der Nervenzellkulturen	29
4. Generelle Aspekte des neuronalen Wachstums	31
5. Vergleich der Neuritenlängen	37
6. Verhältnis der Neuritentragenden Neurone zu den Nicht-neuritentragenden Neuronen	44
7. Verzweigungsrate	45
8. Sonderstellung einzelner Kulturen	50

IV DISKUSSION

1. Methodische Probleme	51
2. Allgemeine Aspekte der Nervenzellentwicklung.....	52
3. Auswirkung der einzelnen Neutrophine auf das Neuritenwachstum	56
3.1 Glial cell-line derived neurotrophic factor	56
3.2 Brain derived neurotrophic factor	57
3.3 Basic fibroblast growth factor.....	60
3.4 Besondere Situation zum Zeitpunkt p10	62
3.5 Synergistische Effekte	63
4. Funktionsstörungen des Darmes unter Berücksichtigung der Entwicklung des enterischen Nervensystems	63

V ANHANG

1. Literaturverzeichnis	67
2. Abkürzungsverzeichnis	79
3. Herstellung der Poly-L-Lysin beschichteten Coverslips	80
4. Danksagung	81
5. Lebenslauf	82

ZUSAMMENFASSUNG

Das enterische Nervensystem (ENS) stellt eines der größten und unabhängigen neuronalen Netzwerke außerhalb des zentralen Nervensystems dar und ist für eine ungestörte Funktion des Magen-Darm-Traktes (MDT) maßgeblich verantwortlich. Es agiert zum größten Teil selbständig ohne zentrale Einflüsse.

Im Rahmen seiner Entwicklung spielen eine Reihe von neurotrophen Faktoren eine entscheidende Rolle. Neuralleistenzellen wandern in den embryonalen Darm ein und migrieren entlang der Darmachse. Die Versorgung mit Wachstumsfaktoren zum richtigen Zeitpunkt und am richtigen Ort ist für die korrekte Entwicklung absolut notwendig. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) scheint hier eine zentrale Rolle zu spielen.

Für die vorliegende Arbeit wurden Untersuchungen an dissoziiertem Darmplexus vorgenommen. Hierzu wurden Neurone aus dem Darm von Wistar-Ratten im postnatalen Alter p1, p5, p10 und p15 isoliert untersucht. Durch Methoden der mechanischen Agitation und enzymatischen Verdauung gelang die Dissoziation.

Die dissoziierten Neurone wurden mit verschiedenen Neurotrophinen über 24 Stunden inkubiert. Dabei kamen zur Anwendung: GDNF, BDNF, bFGF, sowie die Kombinationen aus GDNF/BDNF und GDNF/bFGF.

Nach Fixierung der Präparate wurden die Neuritenlängen der unterschiedlichen Altersklassen unter verschiedenen Kulturbedingungen nach entsprechender Fixierung und Färbung vermessen. Dabei wurde der neuritogene Effekt durch die computergestützte Längenvermessung über ein speziell angefertigtes Programm bestimmt. Die Ergebnisse wurden einer statistischen Auswertung unterzogen.

Es zeigte sich insbesondere bei den Kulturen der neugeborenen Tiere ein signifikant längeres Wachstum der Neuriten unter der Behandlung mit den Neurotrophinen. Auch konnten deutliche synergistische Effekte bei den Kombinationen der Neurotrophine beobachtet werden. Insgesamt konnte ein durchschnittlich ca. 15 – 40% besseres Wachstum der Neurite beobachtet werden. Die Auswirkungen der Neurotrophine waren mit zunehmendem Alter der Versuchstiere weniger ausgeprägt.

Die synergistischen Effekte beim Wachstum der Neurite unter dem Einfluss der Kombinationskulturen sind größtenteils signifikant und wahrscheinlich durch die verschiedenen Signalübertragungsmechanismen erklärbar. Allerdings zeigt die Kombination aus GDNF mit bFGF nur partiell synergistische Effekte. Die Mutmassung einer Umdifferenzierung der Neurone während der ersten postpartalen Tage mit einem unterschiedlichen Ansprechen der Neurotrophine liegt nahe.

Ein „Cocktail“ aus den unterschiedlichen neurotrophen Faktoren ist am ehesten mit den Gegebenheiten des natürlichen „microenvironments“ zu vergleichen, wo die entsprechenden Faktoren nur in geringen Mengen vorkommen.

SUMMARY

The enteric nervous system is the largest and independent neuronal network in the peripheral nervous system and is responsible for the undisturbed function of the gastrointestinal tract. It is working mainly autonomously, but although under the influence of vagal afferences from the CNS.

During its development several neurotrophic factors act as important players. Neural crest cells colonize the presumptive gut and migrate along the gut axis. The supply of trophic factors at the right time of development is either for that timely and spatial development and differentiation absolutely crucial.

Here the glial cell-line derived neurotrophic factor plays a central role.

In the present study dissociated myenteric plexus was investigated in vitro. Myenteric plexus from postnatal gut of Wistar rats at different postnatal timepoints was isolated using enzymatic digestion and cultivated as isolated neurones and glial cells.

The cultures were treated for 24 h with different neurotrophic factors: GDNF, BDNF, and bFGF were used alone or in combination. After fixation and staining with neuronal marker neurite length were measured using an interactive image analysis program. Results were statistically evaluated.

It could be demonstrated that the neurite outgrowth in the younger animals was significantly increased. Usually, the combination of factors yielded synergistic effects. Depending on the factors used the increase in neurite outgrowth reached from 15 to 40 percent, decreasing in general with age. The demonstrated effects were mostly significant and obviously dependent on different signal cascades. The combination of bFGF and GDNF displays only partially synergistic effects, depending on the stage of postnatal development. This might be caused by a changing of the susceptibility of the individual neurotrophic receptors.

A "cocktail" made out of a several neurotrophic compounds at different concentrations might be able to simulate the natural microenvironment, where the individual factors can be found in very low concentrations.

I EINLEITUNG

1. Das enterische Nervensystem

Das enterische Nervensystem stellt einen der größten Teile des peripheren Nervensystems dar. Es erstreckt sich vom Ösophagus bis zum Rektum und schließt dabei die Innervation der Bauchspeicheldrüse, sowie der Leber und der Gallenblase mit ein. Im Rahmen von morphometrischen Untersuchungen konnte man feststellen, daß die Anzahl der Neurone im enterischen Nervensystem in etwa so hoch ist, wie im Rückenmark (*GERSHON et al.*, 1993). Als ein Teil des autonomen Nervensystems wird das ENS durch zentrale Einflüsse, vertreten durch den N. vagus und präganglionäre Fasern aus dem sakralen Anteil des Rückenmarks, moduliert. Im Gegensatz zu anderen Abschnitten des peripheren Nervensystems besteht allerdings auch eine relative Unabhängigkeit von zentralen Einflüssen, da im ENS die Möglichkeit zu eigener Reflexaktivität besteht.

Diese Beobachtung wird durch experimentelle Untersuchungen bestätigt, bei denen die extrinsische nervale Versorgung des Darmes unterbunden wird und man eine Reflexaktivität auslösen kann (*FURNESS et al.*, 1995). Darüber hinaus können auch andere Organe über sensorische Neurone und Interneurone beeinflusst werden. Insgesamt zeigt sich beim ENS eine deutlich nähere Verwandtschaft zum ZNS als zum restlichen peripheren Nervensystem. So konnte K. JESSEN 1983 zeigen, daß die enterische Glia, welche lange Zeit unter die Schwannschen Zellen des PNS subsummiert wurde, eine positive Immunreaktion für das gliale fibrilläre Protein (GFAP) aufweist. Dieses Protein ist ein wesentlicher Marker für die Astrozyten des ZNS (*JESSEN et al.*, 1983). Die Ähnlichkeit des enterischen und des zentralen Nervensystems zeigt sich auch darin, daß sämtliche im ZNS entdeckten Neurotransmitter auch im ENS vertreten sind (*COSTA et al.*, 1996; *FURNESS* 2000, *BROOKES*, 2001). Auch die Morphologie (z.B. des Neuropil) zeigt eine große Übereinstimmung zwischen ZNS und ENS.

Beim enterischen Nervensystem handelt es sich um mehrere komplexe neuronale Netzwerke, welche miteinander kommunizieren und aus ganglionären sowie aganglionären Anteilen bestehen (siehe Abb. 1).

Wir finden hier deutliche Unterschiede bei verschiedenen Spezies. Während in humanem Gewebe mehrere submuköse Plexus existieren, kann man zum Beispiel bei Ratten lediglich einen submukösen Plexus differenzieren.

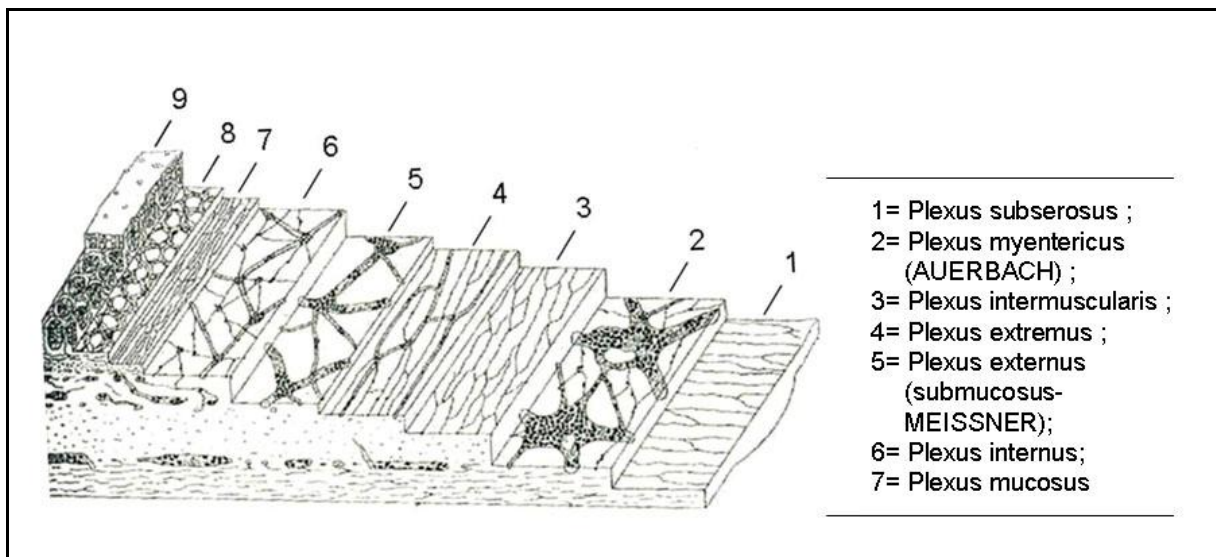


Abbildung 1: Schema zum Aufbau der Darmwand (nach *Gershon et al.*, 1993)

1.1 Das enterische Nervensystem in seiner Funktion als autarker Teil des autonomen Nervensystems

Das enterische Nervensystem enthält eine Vielzahl von Neuronen. Die Anzahl beläuft sich nach Schätzungen auf 10 – 100 Millionen Nervenzellen (*FURNESS et al.*, 1980). Dies erklärt die Eigenständigkeit und die Unabhängigkeit vom ZNS, welches aber über die Verbindungen des Sympathikus und Parasympathikus eine gewisse Modulation in der Aktivität des ENS bewerkstelligt.

Innerhalb des ENS wird der Funktionszustand des Gastrointestinaltraktes über verschiedene sensorische Neurone vermittelt. Über Motoneurone wird auf die verschiedenen Funktionszustände reagiert, wobei Interneurone die Koordination der Motoneurone im Sinne von stimulierender oder hemmender Reflexaktivität beeinflussen. Diese Verschaltungen können als eine Art neuronaler Kreislauf bezeichnet werden. Die Übertragungsmechanismen werden dabei über viele verschiedene Neurotransmitter vermittelt. Die einzelnen Neurone beeinhaltet mehrere Transmitterstoffe, so daß je nach Erregungsleitung (aktivierend oder hemmend) ein unterschiedliches Signal weiter geleitet werden kann. Man kann die verschiedenen Neurone auch anhand ihrer Transmitterstoffe identifizieren. Dieses „chemical coding“ wird zur Klassifizierung der verschiedenen Neurone eingesetzt. (*BROOKES*, 2001).

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Neuronenklassen und ihre Neurotransmitter.

Zu den gesteuerten Qualitäten zählen unter anderem die Regulierung des Blutflusses der Mucosa, die Sekretion der Epithelzellen, sowie der Wasser- und Ionentransport (*FURNESS et al.*, 1987; *VANNER et al.*, 1996).

Plexus	Chemische Zusammensetzung	Morphologie	Funktion
SMP	ChAT/+Calb/ +SP/+NMU	II	Primär aff. Neurone
MP	ChAT/+Calb/ +SP/+NMU	II	Primär aff. Neurone
MP	ChAT/+Calb/ +SP/+NMU	Dend.II	Primär aff. Neurone
MP	ChAT/+Calret/+SP	s/I	Ex. Motoneurone
MP	VIP/+NOS/+NPY/+GABA	s/I	Inh. Motoneurone
MP	ChAT/+SP/+ENK/+GABA/AP	I	Ex. Motoneurone
MP	VIP/NOS/ENK/+GABA/AP	I	Kurze inh. Motoneurone
MP	VIP/NOS/NFP/+ GRP/AP	I	Lange inh.Motoneurone
MP	ChAT/Calret/ENK/NFP/SP	I	Aufst. Interneurone
MP	ChAT/5-HT/NFP	I	Abst. Interneurone
MP	ChAT/SOM	fil.	Abst. Interneurone
MP	ChAT/VIP/+NPY/+GRP	I	Abst. Interneurone
MP	VIP/NOS/NFP/+NPY/+GRP/A	I	Abst. Interneurone
MP	VIP/ChAT/GRP/ ChAT/NPY/NMU/CCK/CGRP/SO	S/I	Viscerofugale Neurone
SMP	GAL/DYN ChAT/NPY/NMU/CCK/CGRP/SO	fil.	Sekretomotor
MP	GAL/DYN	fil.	Sekretomotor
SMP	ChAT/Calret	fil.	Vasodilatator
SMP	VIP/GAL/DYN/+NMU	fil.	Sekretomotor
MP	VIP/GAL/DYN/+NMU	fil.	Sekretomotor
SMP	VIP/GAL/DYN/+NMU	fil.	Interplexusneurone

SMP =	Plexus submucosus	DYN =	Dynorphin
MP =	Plexus myentericus	ENK =	Enkephalin
I =	Dogiel Typ I	GABA =	Gamma-Aminobuttersäure
II =	Dogiel Typ II	GAL =	Galanin
dend.II =	Dendritische Dogiel Typ II-Neurone	NFP =	Neurofilament Proteintriplet
fil =	Filamentös	NMU =	Neuromedin U
5-HT =	5 Hydroxytryptamin	NOS =	Nitritoxidsynthase
GRP =	Gastrin-releasing Peptid	NPY =	Neuropeptid Y
AP =	Endogene alkal.Phosphatase	SOM =	Somatostatin
Calb =	Calbindin	SP =	Substanz P
Calret =	Calretinin		(verwandte Tachykinine)
CCK =	Cholecystokinin	ChAT =	Cholinacetyltransferase
CGRP =	Calcitonin gene-related Peptid	VIP =	Vasoaktives intestinales Polypeptid

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Neuronenklassen und ihre Neurotransmitter
(nach Simon J.H. Brookes, 2001).

1.2 Der Aufbau des enterischen Nervensystems

Neben den schon beschriebenen ganglionären Plexus (myenterisch und submukös) existieren eine Reihe weiterer Plexus, deren Charakteristik im Fehlen der Ganglien besteht. Trotz der eigentlichen topographischen Trennung durch die verschiedenen Schichten der Darmwand bestehen untereinander doch ausgeprägte Vernetzungen, vermittelt durch vertikal aufsteigende Nervenfasern. Die aganglionären Plexus wurden nach ihren Entdeckern (*DRASCH*, 1880 und *CAJAL/MÜLLER*, 1892) benannt. Desweiteren existiert noch ein aganglionärer Plexus in der Lamina muscularis mucosae.

Die Komplexität diese Systems läßt den Schluß zu, daß bereits geringfügige Störungen in der Entwicklung zu schwerwiegenden Krankheiten führen können.

Eine gut bekannte und auch erforschte Krankheit stellt dabei der nach ihrem Erstbeschreiber benannte Morbus Hirschsprung (*HIRSCHSPRUNG*, 1888) dar. Die fehlerhafte Entwicklung des enterischen Nervensystems führt zu schwerwiegenden Funktionsstörungen bedingt durch eine angeborene Aganglionose des Auerbach'schen Plexus mit Entwicklung einer fast vollständigen Obstruktion des Darmlumens im Dickdarm und einem daraus resultierenden, prästenotischem toxischen Megakolon.

Durch die extreme Aufweitung der Darmwand proximal der Aganglionose entsteht eine lokale Durchblutungsstörung mit der Folge einer gestörten Mukosabarriere. Dies führt gerade bei Säuglingen zu septischen Verläufen. Eine schnelle Intervention ist indiziert.

Auch die Neuronale intestinale Dysplasie, bei der es sich um eine Entwicklungsanomalie des Plexus submucosus mit daraus resultierenden erheblichen Funktionsstörungen handelt, fällt in diesen Formenkreis. Dabei können im Gegensatz zur Aganglionose durchaus einzelne Nervenzellen gefunden werden. Histologisch lassen sich hier Riesenganglien mit mehr als 7 Nervenzellen nachweisen. Eine Ätiologie, welche sowohl die komplette Aganglionose, als auch das Fehlen einzelner Nervenzellen oder eine Reduktion bzw. Hypertrophie der Nervenfasern bei den unterschiedlichen Krankheitsbildern erklären würde, ist nach wie vor lückenhaft (*PURI*, 2003).

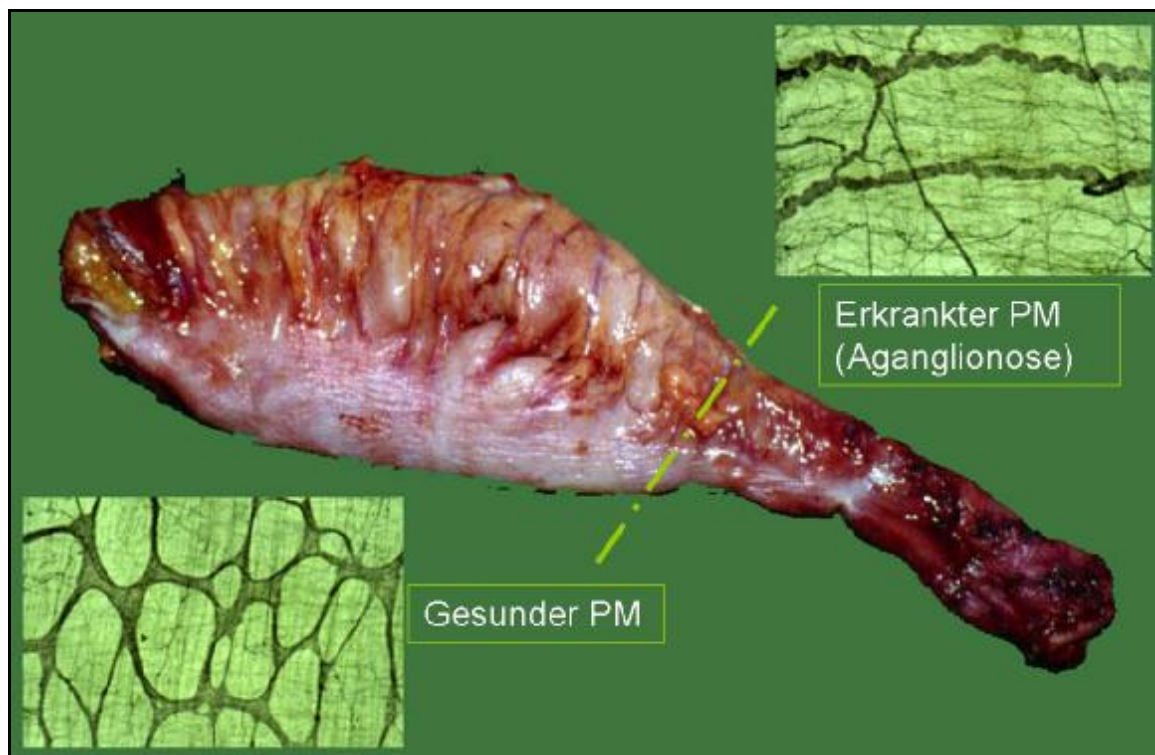
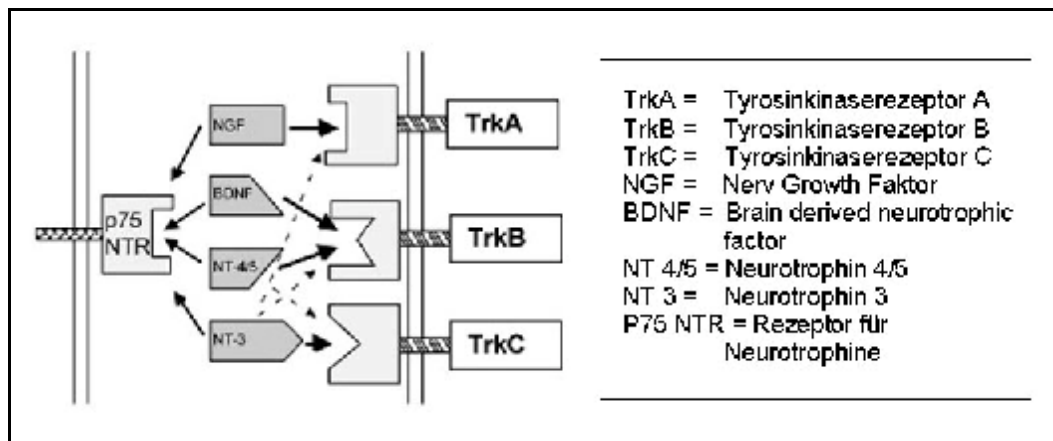


Abbildung 2: Makroskopisches und mikroskopisches Bild eines Darmsegmentes bei Morbus Hirschsprung. PM = Plexus Myentericus

Während ein kompletter Verlust von notwendigen Faktoren während der Entwicklung zum Absterben der aus der Neuralleiste stammenden enterischen Vorläuferzellen führt, könnte ein Defizit erklären, warum es zu schwerwiegenden Funktionsstörungen bei dem sich entwickelnden neuronalen Netzwerk kommt. So könnten Subpopulationen betroffen sein, bzw. funktionelle Störungen ausgelöst werden, welche histologisch nur schwer nachzuweisen sind.

In der Entwicklung des enterischen Nervensystems spielt der Einfluß verschiedenster Faktoren eine große Rolle. Hierunter zählen vor allem die sogenannten Neurotrophine, eine Substanzklasse von Proteinen, unter deren Einfluß es zunächst zu einer physiologischen Entwicklung verschiedener neurologischer Strukturen kommt, die aber auch zu einer weiteren Reifung des Nervensystems in der postnatalen Phase führen. Als erster Vertreter wurde bereits 1952 der Nerve Growth Factor (NGF) beschrieben (*LEVI-MONTALCINI, 1987*), unter dessen Einfluß bereits ein neuritogener Effekt auf enterische Nervenzellen nachgewiesen wurde (*MULHOLLAND et al., 1991*).

Neben NGF etablierten sich BDNF und NT-3 als wichtige Neurotrophine. Die Wirkung dieser Faktoren wird über die Tyrosinkinaserzeptoren Trk A, Trk B und Trk C vermittelt, wobei NGF an TrkA, BDNF an Trk B und NT-3 an Trk C hoch affin bindet. Kreuzreaktionen werden partiell aber auch beobachtet (siehe Graphik 1).



Graphik 1: Signalübertragungsmechanismen

Dem mitogenen Faktor FGF konnten neben seiner Fibroblasten-proliferierenden Wirkung auch neuritogene und neuroprotektive Effekte zugeschrieben werden.

Für das ENS zeigte sich insbesondere ein Faktor als besonders relevant: GDNF, ein Mitglied der TGF- β -Familie (JING *et al.*, 1996). Bei Knock-out-Mäusen, denen das GDNF-Gen fehlte, war anschließend eine komplette Aganglionose des Darmes, sowie eine Nierenagenesie (SÁNCHEZ *et al.*, 1996; MOORE *et al.*, 1996; PICHEL *et al.*, 1996) festzustellen. GDNF kann somit als ENS-essentieller Faktor betrachtet werden.

Bei der Entwicklung des enterischen Nervensystem war lange Zeit nicht klar, welche Abschnitte des Neuralnetzes des ENS sich aus welchem Teil der Neuralleiste ausbilden und unter welchem Einfluß es zu einer Einsprossung der Nervenfasern kommt.

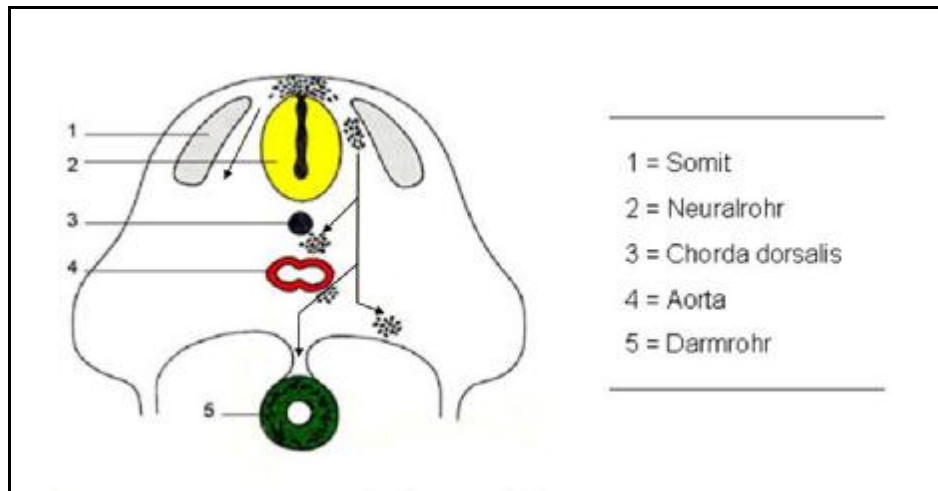


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Neuralleiste

Durch zwei voneinander unabhängige Versuche (*LE DOUARIN* und *TEILLET*, 1973; *YNTEMA* 1954) konnte nachgewiesen werden, daß sich aus der unteren Region des Neuralrohres die nervale Versorgung des Dickdarmes, aus der oberen Region des Neuralrohres des gesamten oberen Gastrointestinaltraktes entwickelt. Diese Beobachtung stützte sich auf Versuche, bei denen Zellen aus der Neuralleiste von Hühnerembryos in Entenembryos implantiert wurden. Diese Zellen konnten zum Zeitpunkt der Untersuchung im Darm identifiziert werden. Dabei kam es zu einer Besiedelung des Dünndarmes aus dem oberen Anteil der Neuralleiste (Somiten 1 – 7), während die Besiedelung des Dickdarmes aus der Region caudal von Somit 28 erfolgte.

Während der Migration der Vorläuferzellen aus der Neuralleiste wurde deren Fähigkeit zur Expressierung von Katecholaminen festgestellt. Auffällig war, daß diese Zellen diese Fähigkeit im weiteren Verlauf wieder verloren, weswegen sie als „vorübergehend katecholaminerg“ (Transiently catecholaminergic = TC-Cells) bezeichnet wurden (*BAETGE et al.* 1989, *BAETGE et al.* 1990, *COCHARD et al.* 1978, *JONAKIT et al.* 1979, *TEITELMANN et al.* 1981).

Diese Zellen, deren Zuordnung zunächst sehr schwierig war, wurden als die Vorläuferzellen der enterischen Neurone interpretiert.

Dies begründete sich gerade aus der Beobachtung des Zeitpunktes des Auftretens (Tag E 11 bei Ratten), der Zellverteilung, ihrer Fähigkeit zur Proliferation und letztlich ihrer Wandlungsmöglichkeit in nicht-katecholaminerge Zellen (*BAETGE et al.* 1990).

Andere Faktoren müssen die Differenzierung der Vorläuferzellen beeinflussen.

Dem Einfluß der Neurotrophine zu einem bestimmten Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung wird eine grundlegende Funktion bei der Migration der sogenannten Vorläuferzellen („crest-derived-cells“) beigemessen.

Die regelrechte Entwicklung des enterischen Nervensystems scheint also einer Vielzahl von Faktoren, die zum richtigen Zeitpunkt ihren Einfluss nehmen, zu unterliegen. Dies wird durch eine Versuchsreihe, bei der genetisch mutierte Tiere („knock-out mice“) zum Einsatz kamen, bestätigt.

Durch Blockade des Tyrosinkinase-Rezeptors, bzw. des GDNF-Rezeptors wurde die Differenzierung der Vorläuferzellen aus der Neuralleiste komplett verhindert. Durch eine Mutation am Mash-1-Gen, welches von enterischen Vorläuferzellen während der Entwicklung exprimiert wird, wird ein Fehlen sympathischer Neurone im oberen Ösophagus und in der Kardia beobachtet. (siehe Abb. 4).

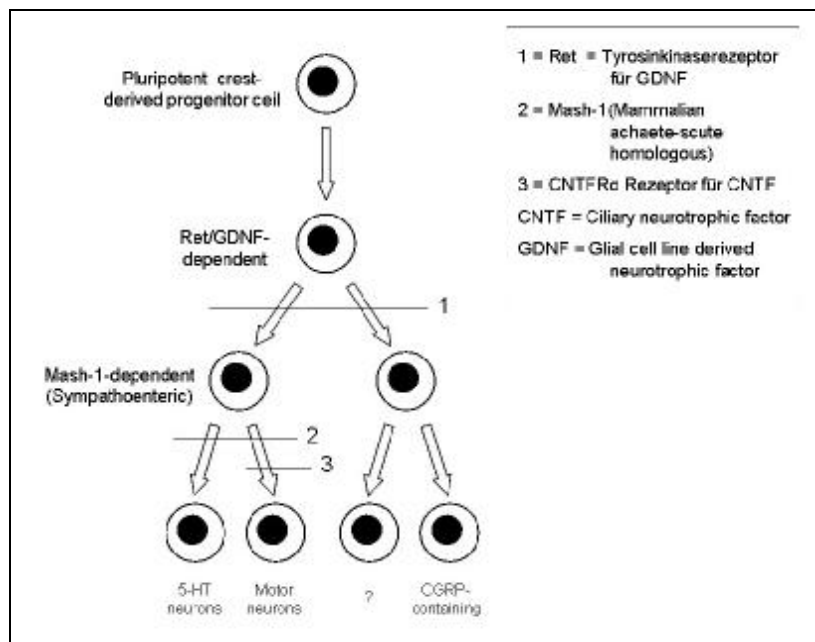


Abbildung 4: Rezeptorabhängige Differenzierung verschiedener Neurone des ENS aus pluripotenten Vorläuferzellen

Weitere Faktoren – z.B. CNTF - beeinflussen offensichtlich die Entwicklung distinkter Gruppen enterischer Nervenzellen oder Glia.

Die Migration der Vorläuferzellen aus der Neuralleiste der Ratte erfolgt schon relativ früh bei Nagetieren, etwa zu der Embryonalentwicklungszeit E 5. Dabei wandern Neuralleistenzellen aus dem vagalen und sakralen Bereich in den sich entwickelnden Darm.

Eine Differenzierung der Vorläuferzellen erfolgt erst bei Besiedelung der Darmwand, im Verlauf der Embryonalzeit E9 – E10 (Mäuse) bzw. E10 – E11 (Ratten) (*BAETGE et al.* 1989, 1990) Die Zellen aus dem vagalen Bereich führen dabei zur Kolonialisierung des distalen Magenanteiles, des Dünndarmes, sowie von Teilen des Caecums und Colons. Aus dem sakralen Bereich entwickelt sich die Innervation von Anteilen des Ileum, Caecums und Colons, sowie die davon distal gelegenen Anteile. Gerade hier spielt GDNF und/oder sein funktioneller Rezeptor (Ret) eine entscheidende Rolle. Bei genetisch mutierten Tieren, bei welchem das Gen entweder für GDNF oder seinen Rezeptor nicht exprimiert wurde, wird ein kompletter Verlust des gesamten enterischen Nervensystems und auch der Glia beobachtet. (*TRUPP et al.*, 1996; *SCHUCHARDT et al.*, 1994)

Vorläuferzellen differenzieren sich vor Ort unter dem Einfluß der in der Mikroumgebung vorhandenen Faktoren. Schon während ihrer Migration erfolgt eine gewisse Zellteilung. Weitere Beobachtungen zeigen, daß mit abnehmender Anzahl der Vorläuferzellen auch die Geschwindigkeit der Migration abnimmt. Erstaunlich bei dieser Arbeit ist die Tatsache, daß dem interzellulären Kontakt bei der Migration eine entscheidende Rolle zufällt. Nach der ersten Besiedelung der Darmwand bildet sich ein Geflecht aus, an dem sich die nachfolgenden Vorläuferzellen orientieren und ihrer Migration fortsetzen (*YOUNG et al.*, 2004).

Grundsätzlich entstehen zwei Zelltypen. Zum einen die enterische Glia, die eine Art Ernährungsfunktion der enterischen Nervenzellen übernimmt und wenig Ähnlichkeit mit den Schwann'schen Zellen des peripheren Nervensystems hat, sondern eher den Astrocyten des zentralen Nervensystems entspricht (*GABELLA* 1971, 1981, *JESSEN*, 1983). Zum anderen die Entwicklung der Nervenzellen.

Unter diesen sind eine Vielzahl von Subklassifikationen aufgrund ihrer Morphologie, ihrer Projektionen und ihres Neurotransmittergehaltes zu unterscheiden. Wie im zentralen Nervensystem finden sich Schaltkreise mit sensorischen, Moto- und Interneuronen. Eine bereits 1899 von Dogiel beschriebene Klassifikation enterischer Nervenzellen zeigt 3 unterschiedliche Neuronentypen (siehe Abb. 5).

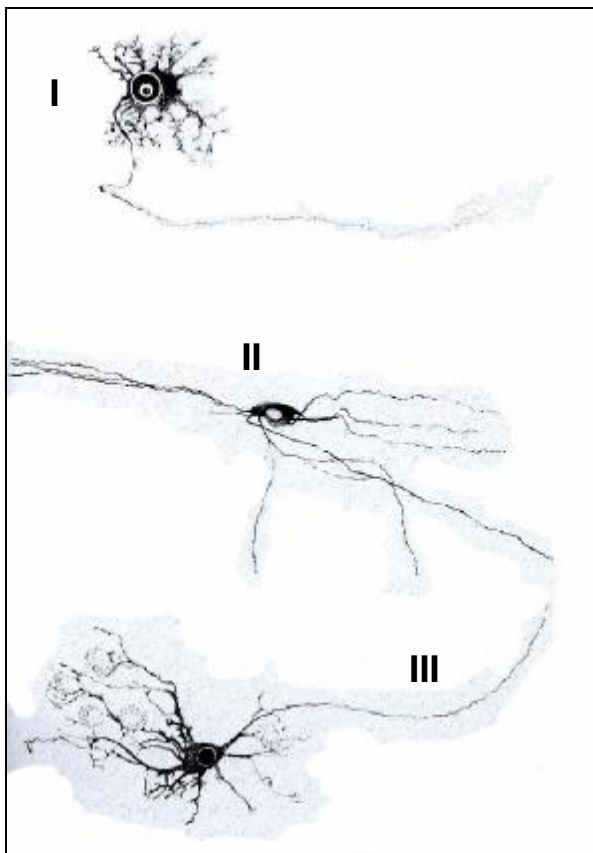


Abbildung 5: **Unterschiedliche Nervenzelltypen aus dem Plexus myentericus des Darmes** (nach *DOGIEL*, 1899)

Diese Typisierung ist zwischenzeitlich bis auf 7 unterschiedliche Gruppen erweitert worden (*STACH*, 1989). Neben der histologischen Klassifizierung versuchte man die Neurone auch hinsichtlich ihrer Transmitterausstattung einzuordnen. Das Vorhandensein einer bestimmten Neurotransmitter- bzw. Neuropeptidkonstellation ist typisch für unterschiedliche neuronale Subgruppen. Brookes benutzte dabei die Neurotransmitterausstattung zur entsprechenden Klassifizierung (*BROOKES*, 2001). Siehe auch Tabelle 1.

Die Reifung des ENS endet noch nicht mit der Geburt. Es konnte eine Veränderung in der Morphologie des Plexus myentericus in den ersten beiden postnatalen Wochen beobachtet werden. Mit zunehmender Länge des Darmes entwickelt sich der Plexus von einer anfänglich dichten Zusammenlagerung der einzelnen Ganglien zu einem relativ aufgelockerten Netzwerk, bei dem die Abstände zwischen den Nervenzellen deutlich länger werden (*SCHÄFER et al.*, 1999). Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß das Neuritenwachstum nach der Geburt zunehmen muß.

Der Einfluß verschiedener Neurotrophine auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems, insbesondere von Motoneuronen, aber auch sensible und sensorische Neurone, konnte bereits verifiziert werden (*JONES et al.*, 1994; *ERNFORS et al.*, 1994). Hierbei spielt vor allem GDNF eine entscheidende Rolle. Auch der positive Einfluß von GDNF und bFGF auf die Anzahl und das Neuritenwachstum der enterischen Neurone wurde bereits beschrieben (*SCHÄFER et al.*, 1995 und 1999). BDNF ist bekannt als ein Promotor sowohl für das Überleben als auch für die Verzweigungsrate der einzelnen Neurone. Dies wurde insbesondere bei Neuronen des Akustikusganglions der Ratte in der postnatalen Phase nachgewiesen (*HARTNICK et al.*, 1996).

In vorangegangenen Studien konnten auch positive neurotrophe Effekte von Proteinextrakten der Darmwand auf die Entwicklung der Nervenzellen beobachtet werden, wobei der Effekt auf die Neuritogenese mit zunehmendem Alter der Versuchstiere abnahm. Bei älteren Tieren zeigten lediglich Kulturen, die mit Proteinextrakten aus der Darmwand stimuliert wurden, ein signifikant gesteigertes Wachstum, während GDNF allein lediglich eine geringe nicht signifikante Verbesserung im Neuritenwachstum zeigte (*SCHÄFER et al.* 1999). Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, daß Proteinextrakte einen Spiegel der natürlichen Umgebung darstellen, d.h. in Proteinextrakten sind annähernd alle zur Entwicklung notwendigen Substanzen vorhanden und beinhalten auch eine Reihe von Neurotrophinen.

Es kann also gefolgert werden, daß das enterische Nervensystem durch die Mikroumgebung mit einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, d.h. eine Vielzahl aus neurotrophen und anderen Faktoren muß zur richtigen Entwicklung des ENS beitragen.

Da ein Großteil der Neurone im ENS als wesentlichen Transmitter ATP (*HOYLE et al.*, 1989) benutzt, welches schnell zu Adenosin verstoffwechselt wird, scheint diesem als Kofaktor auch eine synergistische Rolle zuzufallen. Dies wird durch den synergistischen Effekt von bFGF mit 2-Chloradenosin (2-CA) in Bezug auf die Ernährungsfunktion (Mikroumgebung) bestätigt, da die Versuchsbedingungen beim Einsatz von 2-CA allein zu einem verlängerten Neuritenwachstum, aber nicht zu einem signifikantem Anstieg der Zahl der Neurone führte, während bFGF auf beides einen Einfluß hatte (*SCHÄFER et al.*, 1995)

Ziel dieser Studie ist es zu untersuchen, inwieweit neurotrophe Faktoren allein und in Kombination, in definierten Konzentrationen, zu einem positiven Effekt auf das Neuritenwachstum und die Neuronenzahl in der frühen postnatalen Phase führen. Es ist durch diese Studie nachgewiesen, daß ein synergistischer Effekt zwischen den bereits bekannten neurotrophen Faktoren besteht und diese auf isolierte Zellkulturen der Darmwand einen positiven Einfluß haben.

II MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Die für die Untersuchungen herangezogenen Versuchstiere waren neugeborene Wistar-Ratten im postnatalen (p) Alter p1, p5, p10 und p15, die mir mit freundlicher Unterstützung des physiologischen Institutes der Universitäten des Saarlandes, Homburg/Saar, zur Verfügung gestellt wurden. Die Tiere wurden vom physiologischen Institut zur Untersuchung am zentralen Nervensystem herangezogen und hierzu dekapitiert. Der verbliebene Corpus wurde unverzüglich von mir zur weiteren Verarbeitung übernommen.

2. Präparation der Versuchstiere

Nach Überführung der Tiere wurde ohne Verzögerung das Abdomen eröffnet und der gesamte Dünndarm vom Duodenum bis zur Valvula ileo-coecalis am Mesenterialansatz mit der Schere entfernt (siehe Abb. 6). Der entnommene Dünndarm wurde zunächst in der Gesamtlänge vom Duodenum bis zum Coecum ausgemessen, dann der Übersichtlichkeit halber in drei Teile zerlegt und sofort in eiskaltes minimal essential Medium (MEM-Hepes, Gibco Life Technologies) unter Zusatz von Antibiotika (Gentamicin, 200 µg/ml und Metronidazol, 50 µg/ml) zur Infektprophylaxe eingebracht.

3. Auslösen des Plexus Myentericus aus der Muscularis

Die weiteren Schritte zur Isolierung des Plexus myentericus beruhen auf dem Prinzip der Kombination einer mechanischen Agitation und einer enzymatischen Verdauung. Dazu wurde zunächst unter einer Stereolupe die Lamina muscularis und die Mucosa mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten (Dumont Nr. 5) getrennt. Dies gelang ohne gröbere Zerstörung der Muskelschicht, auch wenn sich dieser Schritt bei den älteren Tieren teilweise sehr schwierig gestaltete (siehe Abb. 7)



Abbildung 6: Absetzen des Dünndarmes an der Valvula ileocaecalis
Vergrößerung 10-fach
Pfeil: terminales Ileum

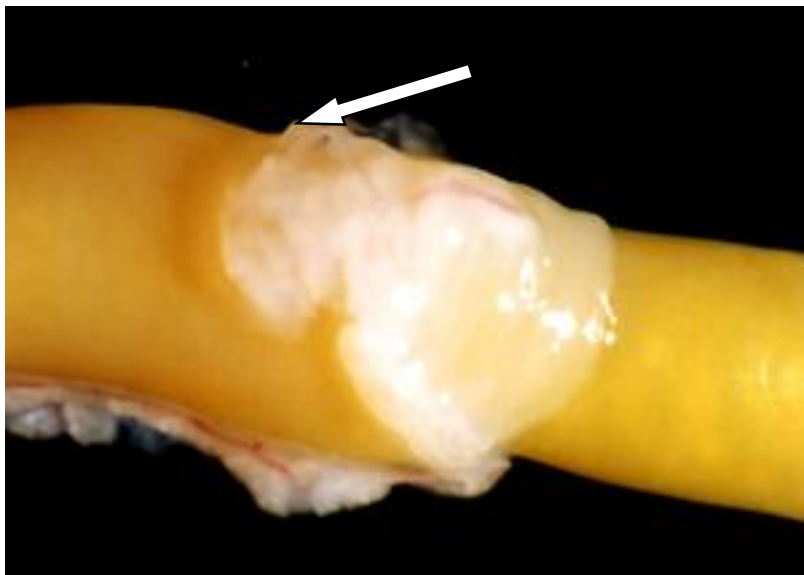


Abbildung 7: Stripping der Lamina muscularis von der Mucosa
Vergrößerung 10-fach
Pfeil: Lamina muscularis

Um den Plexus Myentericus aus der Muskulatur zu isolieren wurde dieser bei 37°C für zwei Stunden in einer Kollagenase-Lösung (Hanks balanced salt solution; HBSS, Gibco Life Technologies) (Collagenase type 2, 253 U/mg, Worthington Biochemical Corporation, 1 mg/ml) inkubiert.

Die mechanische Agitation bestand im sogenannten Vortexen, eine Maßnahme bei der man durch Rütteln für ca. 30 Sekunden eine Trennung von Anteilen der Muscularis vom Plexus myentericus erreichen konnte. Die Anteile des Plexus myentericus, die sich bereits von der Mucosa getrennt hatten und teils als Gitternetz teils als einzelne Nervenfasern imponierten, wurden mit einer Pipette aufgesaugt und in eiskalte MEM-Hepes überführt (Abb. 8).

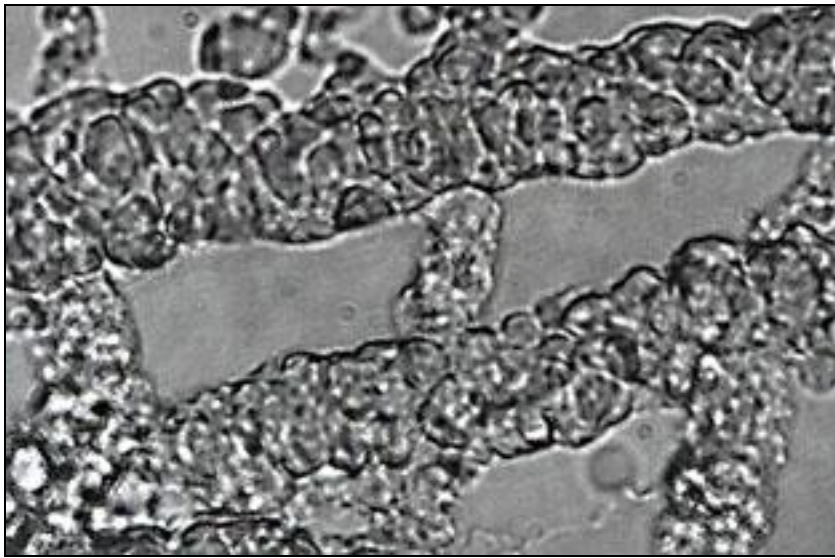


Abbildung 8: Differenzieller Interferenzkontrast (DIC)
Das Gitternetzwerk des Plexus myentericus mit den Neuronen ist gut erkennbar.
Vergrößerung 50-fach

Dieser Vorgang wurde je nach Altersstufe der Versuchstiere zwei- bis viermal wiederholt. Danach hatten sich die meisten Plexusstücke separiert und konnten gesammelt werden. Verbleibende intakte Muskelgewebsteile wurden einer erneuten Kollagenasebehandlung unterzogen um eine möglichst große Ausbeute an Plexusanteilen zu erhalten. Eine allzu lange Inkubationszeit mit der Kollagenase mußte dabei im Hinblick auf vollständige Verdauung vermieden werden.

4. Dissoziation des Plexus in einzelne Neurone und Gliazellen

Nach Isolation der Plexusanteile wurden diese zur Dissoziation in eine Trypsinlösung (Trypsin EDTA, Gibco BRL, 0,05%) transferiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die Lösung bei 1000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Trypsinlösung abpipettiert und das verbleibende Pellet in einem Kulturmedium (Dulbeco's modified eagle medium, DMEM; Gibco BRL) mit 10% fetalem Kälberserum resuspendiert. Die Plexusstücke wurden langsam und schonend durch eine dünne Kanüle aspiriert. Unter optischer Kontrolle wurde diese Trituration so oft durchgeführt, bis keine isolierten Plexusstücke mehr zu sehen waren und eine homogene Zellsuspension entstand. Je nach Alter der Tiere konnte eine Gesamtanzahl der zu kultivierenden Neurone von ca. 500.000 bis zu 1.000.000 Zellen pro Ansatz erzielt werden, wobei nicht alle Zellen dem Kulturansatz zur Verfügung standen. Durch die enzymatische Verdauung brach ein Großteil der neuronalen Netze auseinander und entzog sich somit letztlich der Kultur.

5. Ansetzen der Zellkulturen

Die Anzahl der Zellen wurde in einer Zählkammer (Bürker-Zählkammer) unter dem Mikroskop bestimmt. Die durchschnittliche Vitalität war im Vorfeld mit Trypan Blau bestimmt worden und betrug über 95 %. Die Zellsuspension wurde anschließend soweit verdünnt, daß 100 µl Medium etwa 10.000 Zellen enthielten. Zur Kultivierung wurden 100 µl Medium mit je 10.000 Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckplättchen von 13 mm Durchmesser aufgebracht und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (zur Herstellung der Deckplättchen siehe Anhang).

Als Kultivierungskammer dienten 24-Loch Platten (NUNC).

Nach der Aussaat der Nervenzellen kam es schon nach kurzer Zeit zu einer Adhäsion der Zellen an den Deckplättchen. Um eine vollständige Adhäsion zu gewährleisten, wurde die Zeit auf 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C festgesetzt. Danach konnte ein Überschichten der Zellen mit Nährmedium problemlos vorgenommen werden.

Für die weitere Kultivierung wurde ein serumfreies, chemisch definiertes Medium aus: OPTIMEM (Gibco BRL); N2 Supplement (bestehend aus essentiellen Inhaltsstoffen wie z.B. Aminosäuren, Transferrin, Insulin); 3% BSA und Penicillin/Streptomycin (je 50µg/ml) verwendet. Es wurden 500 µl des Definierten Mediums allein bzw. in Kombination mit verschiedenen Neurotrophinen zugesetzt.

Folgende Neurotrophine wurden eingesetzt:

- BDNF Brain derived neurotrophic factor 10 ng/ml
- bFGF basic fibroblast growth factor 10 ng/ml
- GDNF Glial cell – line derived neurotrophic factor 10 ng/ml
- Kombination aus GDNF und BDNF je 10 ng/ml
- Kombination aus GDNF und bFGF je 10 ng/ml

Prinzipiell sollten die Kulturen daher nicht konfluent, bzw. ohne dass sich die einzelnen Neuritenbäume verbinden, wachsen. Dadurch war gewährleistet, dass lediglich der Effekt der Neurotrophine und nicht parakrine Einflüsse der einzelnen Nerven- oder Gliazellen vermessen wurde. Das heißt konkret, dass lediglich einzelne Nervenzellen in die Untersuchung eingeflossen sind, und alle Neurone die mit anderen Nerven-oder Gliazellen nur annähernd Kontakt hatten nicht berücksichtigt wurden. Oft zeigte sich bei diesen Neuron-Glia-Interaktionen ein gesteigertes Neuritenwachstum.

Hierbei zeigten die Kulturen der jüngeren Präparationen (P1, P5) bereits nach 24 Stunden ein signifikantes Neuritenwachstum (siehe Abb. 9), während sich dies bei den älteren Kulturen (P10, P15) erst nach 48 Stunden in einem auswertbaren Umfang darstellte. Aus diesem Grund wurden die jüngeren Kulturen generell nach 24 und die älteren nach 48 Stunden in vitro fixiert.

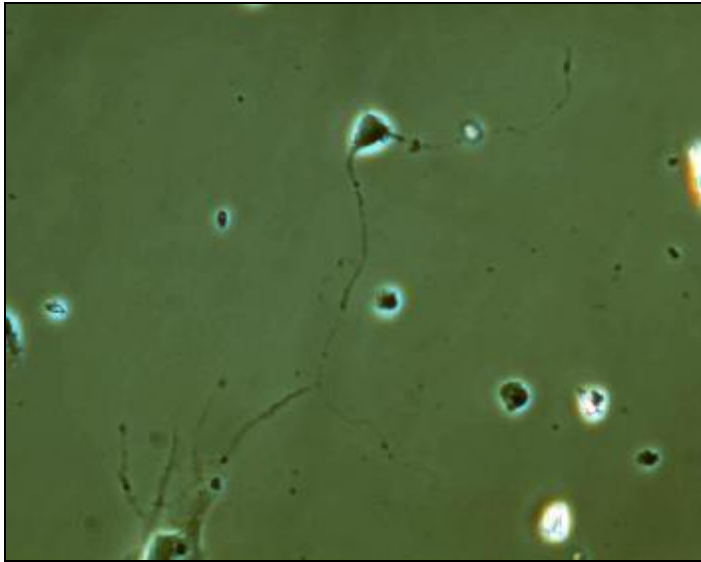


Abbildung 9: Darstellung einer Nervenzelle im Phasenkontrast nach 2 Tagen in vitro
Vergrößerung 400-fach

6. Fixierung, Permeabilisierung und Immunmarkierung der Nervenzellen

Nach Abschluß der Kultivierung wurden die Zellen in einer 4% -igen Formaldehydlösung für 10 Minuten fixiert, anschließend ausgiebig mit Pufferlösung gespült.

Zur Identifikation der Neurone wurden diese mit einem Antikörper gegen PGP 9.5 (Protein-gene product 9,5; Ultracclone, immunonuclear corporation), einem etablierten neuronalen Marker für das enterische Nervensystem (KRAMMER et al., 1993), dargestellt. Zur besseren Exposition des cytosolischen Proteins (PGP 9.5) wurden die fixierten Kulturen zunächst für 10 min in einer -20°C kalten absoluten Methanollösung inkubiert. Diese Behandlung führt zur Permeabilisierung der Zellmembranen und damit zu einer besseren Penetration der Antkörper. Im Anschluß wurde sorgfältig mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS ph 7,4 bei 20°C) gespült. Zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Kulturen für 5 Minuten mit einer 3%-igen Wasserstoffperoxidlösung vorbehandelt. Zur Blockierung der unspezifischen Antikörper-Bindung wurde BSA (Bovines Serumalbumin) verwendet. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden. Danach wurde das BSA entfernt und die Proben ohne einen weiteren Waschschrift mit dem Primärantikörper (Protein – gene Product, PGP 9.5) (THOMPSON et al., 1983) für

weitere 2 Stunden inkubiert. Um ein ausreichend großes Visualisierungssignal zu erhalten wurde als Sekundärantikörper ein an Dextran gebundenes IgG-Molekül (DAKO, EnVision) verwendet und für weitere 0,5 Stunden inkubiert. An das Dextran sind mehrere Peroxidaseenzyme gebunden, welche zu einer deutlich gesteigerten Umsetzung des zur Visualisierung benutzten 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) führte. Dies bedeutete eine deutlich bessere Erkennbarkeit auch feinsten neuronaler Strukturen, bei gleichzeitig im Verhältnis zur vorher verwendeten Immuntechnik reduzierter Inkubationszeit. (siehe Abb. 10).

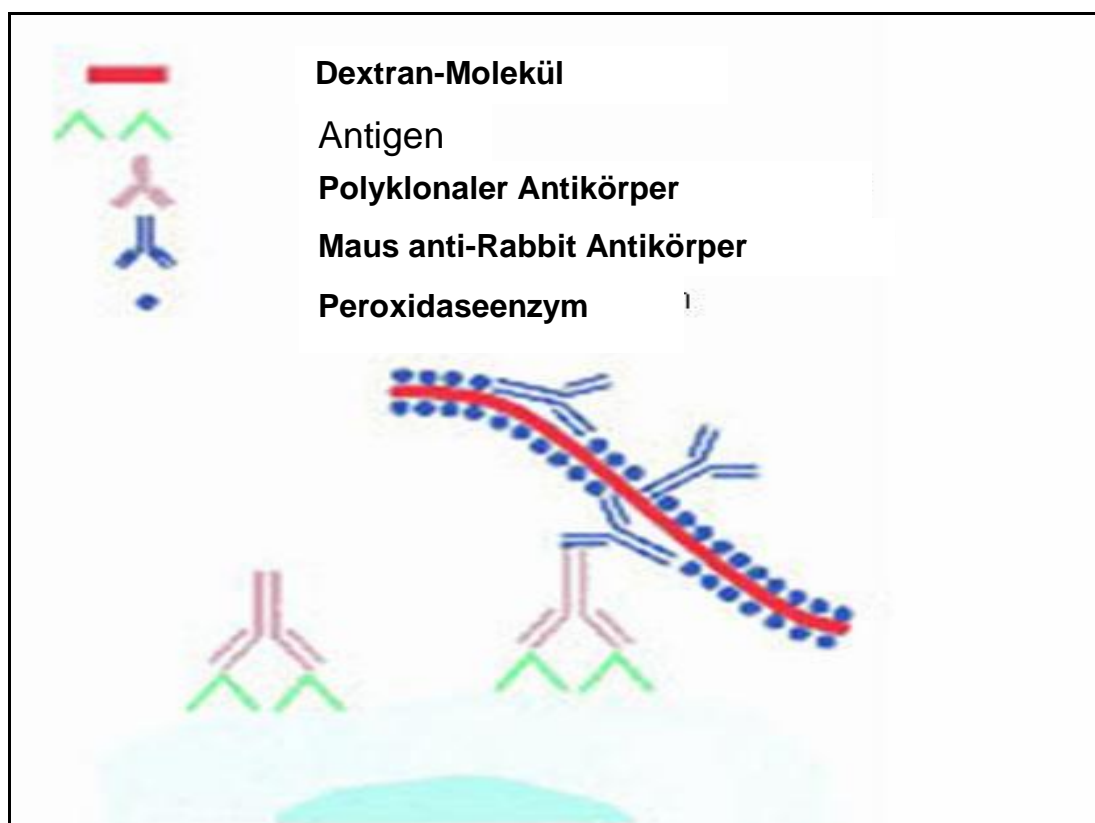


Abbildung 10: Schema der Immunreaktion mit dem an Dextran gekoppelten IgG-Antikörper

7. Entwässerung und Einbettung der Nervenzellpräparate

In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate entwässert.

Die Schritte sahen folgendermaßen aus:

- 10 Minuten 70% Isopropylalkohol
- 10 Minuten 80% Isopropylalkohol
- 10 Minuten 90% Isopropylalkohol
- 10 Minuten 95% Isopropylalkohol
- 10 Minuten 100% Isopropylalkohol
- 10 Minuten Aceton absolut

Nach Abtrocknen der Coverslips über 30 Minuten wurden diese mit einem Harz (DePeX) auf einem Objektträger fixiert.

8. Bestimmung des Neuritenwachstums

Zur Auswertung wurden mindestens drei unabhängige Experimente herangezogen. Pro Experiment und Bedingung wurden mindestens 120 isolierte Neurone vermessen. Diese Zahl hat sich aus Vorversuchen ergeben, wo gezeigt werden konnte, dass bei kontinuierlichen Ermittlungen des Mittelwerts ab 80-90 Einzelmessungen keine großen Schwankungen des Endergebnisses mehr auftraten. Somit war mit 120 Einzelmessungen eine statistisch deutlich ausreichende Anzahl erreicht. Diese Anzahl wurde bei den jüngeren Kulturen in der Regel bei der Auswertung eines einzigen coverslips erzielt, während bei den älteren und insbesondere den P15 Kulturen deutlich weniger auswertbare Neurone pro coverslip vorhanden waren. In diesen Fällen mussten oft bis zu 4 einzelne coverslips ausgewertet werden.

Die Messung der Nervenzellausläufer wurde an einem Olympus Mikroskop durchgeführt. Das Neuritenwachstum wurde mittels eines interaktiven Bildverarbeitungsprogrammes (DIGGER, MedVis, Homburg Germany) gemessen.

Hierzu wurden die einzelnen Neurite mit der Maus abgefahren. Dabei wurden nur die isolierten Nervenzellen mit Ausläufern zur Messung herangezogen.

Die meisten der Neurone hatten Kontakt zur Glia und wiesen ein komplett unterschiedliches Wachstumsverhalten auf (siehe Abb. 11). Diese wurden deswegen nicht zur Vermessung herangezogen.

Das Programm berechnete sowohl Anzahl und Länge der einzelnen Neuritensegmente, als auch die Gesamtlänge der Neuriten jeder einzelnen Nervenzelle, soweit vorhanden. Zur Anzahl der Verzweigungspunkte wurde die Gesamtanzahl der gemessenen Neuriten herangezogen und diese um eins reduziert, da das Programm nicht zwischen Hauptausläufern und Verzweigungen unterscheiden konnte.

Die Gesamtmenge der Neurone und der Gliazellen wurde durch Auszählung von 40 Gesichtsfeldern berechnet. Die Neurone wurden dazu entweder als neuritentragend (NN) oder nicht neuritentragend (NNN) bezeichnet.

Die Neuronenzahl des Definierten Mediums wurde als 100% festgesetzt, die der mit Neurotrophinen behandelten Kulturen als das entsprechende Dezimalvielfache dazu gesetzt.

Zur Auswertung aller vorliegenden Daten wurde ein statistisches Hilfsprogramm eingesetzt, um signifikante Unterschiede zwischen den Neuritenlängen aller Kulturen festzustellen. Dazu wurde der Mann Whitney U-test herangezogen.

III ERGEBNISSE

1. Technische Probleme bei der Präparation

Die Präparation der Versuchstiere gestaltete sich in Abhängigkeit vom Alter sehr unterschiedlich. Bei den neugeborenen Tieren (p1) war die Trennung der Lamina muscularis von der Mucosa durch sehr kleine anatomische Verhältnisse erschwert. Diese Präparation war bei den älteren Tieren zwar leichter, aber es bestand eine ausgeprägte Vernetzung von Muskelfasern aus dem Magen mit der Muskelschicht des nervenführenden Plexus.

Außerdem war bei den älteren Tieren die Präparation durch die manchmal starke Verfettung der Mesenterialwurzel problematisch, da bei der Überführung der Darmabschnitte in die Nährlösung ein Aufschwemmen von Fettaggen eintrat. Dadurch war die Sicht auf den Darm für die weiteren präparatorischen Schritte deutlich eingeschränkt.

Ein ähnlich gelagertes Problem stellten die zum Teil sehr kräftig ausgebildeten Lymphgefäße dar. Auch hier wurde die Nährlösung insgesamt extrem trüb (s. auch Abb. 2 + 3).

Nach der Verdauung und mechanischen Agitation der abgestrippten Muskelschicht mussten die zum Teil separierten Plexus myentericus-Anteile gesammelt werden (Gitternetzanteile wie in Abb. 8 zu erkennen). Auch hier war durch eingeschränkte Sichtverhältnisse insbesondere bei den älteren Tieren und eine entsprechende Fettüberlagerung diese Sammlung sehr erschwert. Mehrmals mussten die Verdauungsschritte wiederholt werden, um eine weitere Separierung der Plexusanteile zu erzielen.

Allerdings konnte dieser Schritt nicht beliebig oft wiederholt werden, da die zugefügte Trypsinlösung zu einer letztlich kompletten Verdauung führte und somit die einzelnen Plexusanteile nicht mehr identifiziert werden konnten. Im Endeffekt führte dies zu einer Reduktion der Nervenzellen pro Kulturansatz.

Auch die Kontamination der ausgesäten Zellen spielte bei der Entwicklung eine entscheidende Rolle. So war bei frühzeitiger bakterieller Übersiedlung eine schwerwiegende Entwicklungsstörung der Nervenzellen und auch der Glia zu beobachten. Die Kulturen mussten deswegen verworfen werden und standen keinen Messungen zur Verfügung. Dies führte teilweise zu sehr zeitintensiven Fehlerquellenbehebungen.

2. Messung der Nervenzellen

Nach Abschluß der Präparationen mit Vorliegen der meßfertigen Coverslips wurde die Messung teils durch subjektive Empfindungen beeinflusst, d.h. allein durch die Begutachtung unter dem Mikroskop konnte eine annähernde Zuordnung zum Alter der Tiere, wie auch zu den Kulturbedingungen getroffen werden. Um diesem Problem aus dem Wege zu gehen, wurde vor der Messung eine entsprechende Verschlüsselung durch eine zweite Person vorgenommen, so dass die von mir durchgeführte Messung im Blindversuch ohne Kenntnis der Kulturbedingungen erfolgte.

3. Aussehen der Nervenzellkulturen

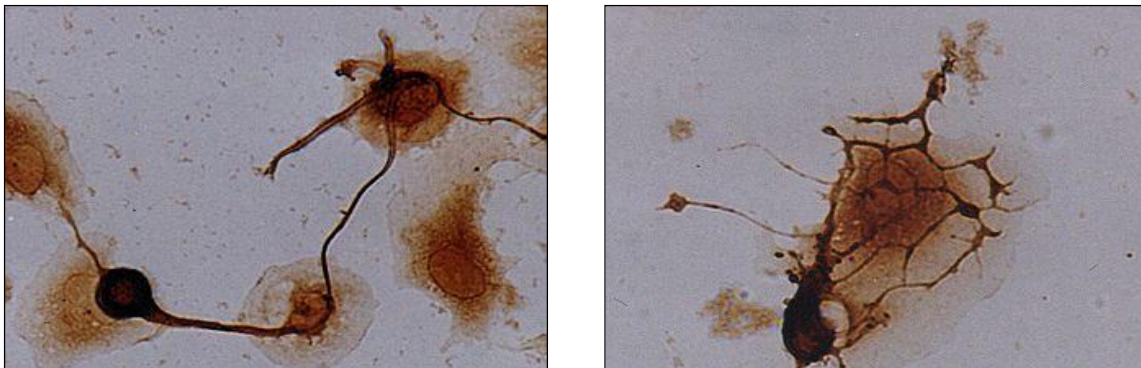
Nach dem Aussäen der definierten Anzahl von Nervenzellen konnte man nach ca. 30 Minuten ein Abflachen der Gliazellen beobachten. Bereits nach kurzer Zeit waren die ausgesäten Zellen den beschichteten Deckplättchen adhärent.

Die Nervenzellen erschienen dabei unter dem Phasenkontrastmikroskop plastisch. In Abhängigkeit vom Alter der Tiere war vor allem bei den Kulturen der neugeborenen Tiere bereits nach 2-4 Stunden ein Neuritenwachstum erkennbar. In den älteren Kulturen wurde dieses Neuritenwachstum erst nach ca. 10 Stunden beobachtet. Aus diesem Grund waren unterschiedliche Inkubationszeiten bei jungen und älteren Kulturen notwendig (P1 und P5 24 h, P10 und P15 48h).

Als Grundlage der Meßergebnisse wurde das Neuritenwachstum bzw. die Zahl der zu messenden Neurone der Kulturen mit Definiertem Medium (DM) zugrunde gelegt. Die Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, der Durchschnitt wurde als Bemessungsgrundlage heran gezogen.

Bei Kontakt der Nervenzellen zur Glia konnten verschiedene Wachstumsmuster beobachtet werden. Entweder die Glia wurde von den Neuriten einfach nur übergangen, oder es kam bei Gliakontakt zu einer ausgeprägten Verzweigungstendenz der Neuriten (siehe Abb. 11). In Einzelfällen konnte sogar ein komplettes Umlaufen der Neurite um die Gliazellen beobachtet werden.

Dies bedeutet, dass unterschiedliche Gliazellen existieren.



**Abbildung 11: unterschiedliches Verhalten der Nervenzellen nach Kontakt mit der Glia
Vergrößerung 800 fach**

Nicht bei allen Kulturen konnte die gleiche Anzahl neuritentragender Neurone erzielt werden, da ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zu unterschiedlicher Anzahl der Neuriten führte.

4. Generelle Aspekte des neuronalen Wachstums

Prinzipiell fallen bei der bloßen Durchsicht der einzelnen Präparate bereits Unterschiede hinsichtlich des Gesamtneuritenwachstums bzw. der Komplexität der Verzweigungsraten auf. Generell zeigen die Kulturen jüngeren Alters deutlich längere und in Abhängigkeit von den eingesetzten Faktoren komplexere Verzweigungsmuster. Insgesamt verplumpen die Neuritenbäume mit zunehmendem Alter der benutzten Tiere (Abb.12). So zeigen sich sowohl bei Kulturen von p 1 und p 5 relativ längere Neuriten, bzw. bei bestimmten Kombinationen (GDNF/bFGF, GDNF/BDNF) ein ausgeprägteres Branching und generell eine Zunahme der neuritentragenden Neurone (Abb.13-15). Auffällig ist, dass zum Zeitpunkt p10 ein deutlich schwächeres Neuritenwachstum zu sehen ist, wobei hier die Effekte von BDNF und bFGF im Gegensatz zu den anderen Altersstufen signifikant erhöht sind.



Abb.: Vorherrschender Nervenzelltypus in den p15-Kulturen
Vergrößerung 1000-fach, GDNF

Insgesamt fällt auch auf, dass die Population enterischer Nervenzellen sich auch in Kultur nicht homogen darstellt. Das ENS beherbergt eine ähnlich hohe Vielfalt an Neuronen wie das ZNS, was sich auch in einer Vielzahl unterschiedlicher Morphologien in der Kultur niederschlägt (Abb.15). Offensichtlich lassen sich jedoch nicht alle morphologisch distinkten Unterpopulationen über den ganzen Beobachtungszeitraum gleich durch die eingesetzten Neurotrophine beeinflussen. So finden sich bei den p15 Kulturen einerseits offensichtlich mehr Neurone die dem Dogiel Typ III entsprechen, andererseits treten trotz durchschnittlich kurzer Neuritenlängen einzelne Neurone auf, die mit relativ langen (ähnlich den jüngeren Kulturen) Neuriten imponieren.

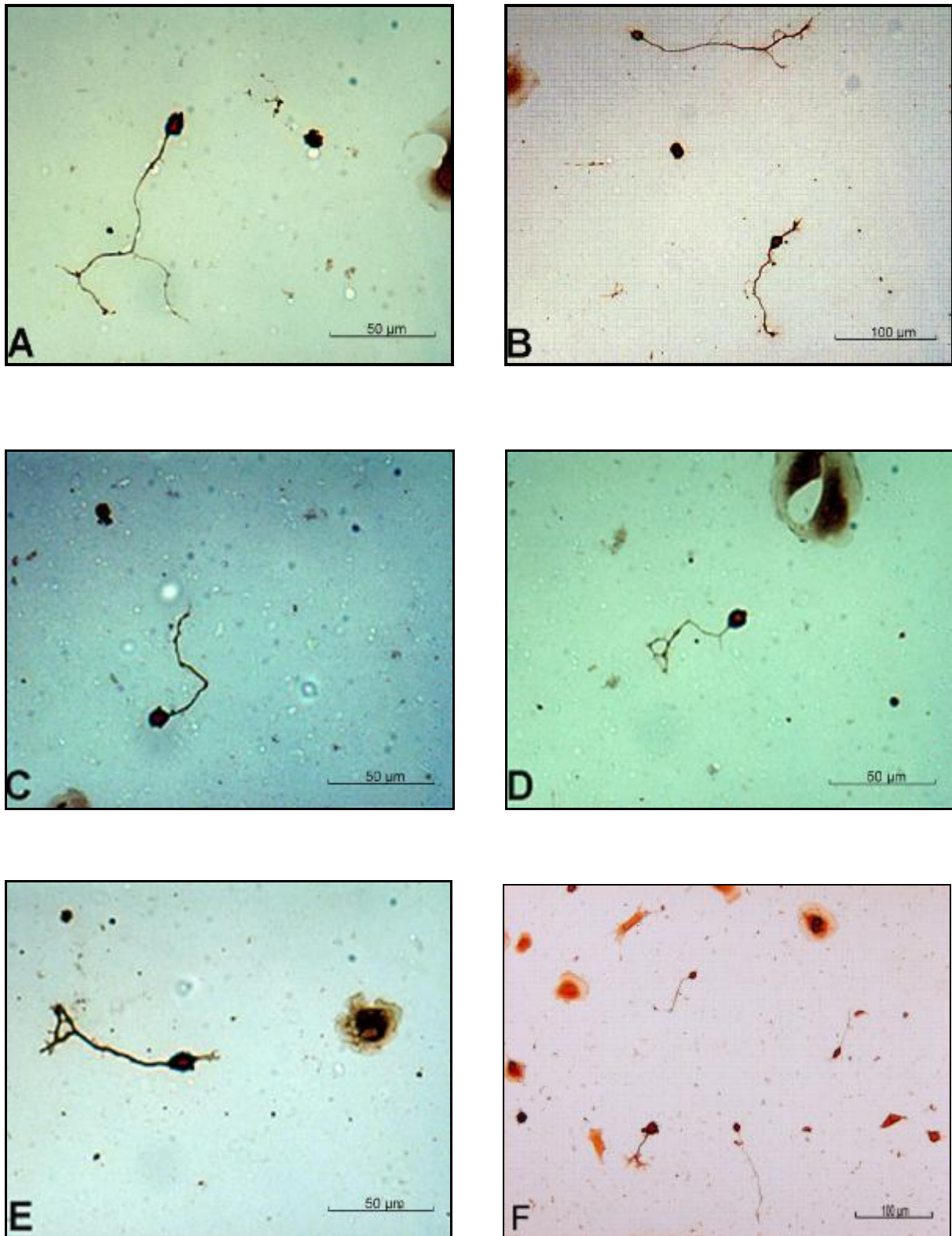


Abbildung 13: Verschiedene Kulturbedingungen der neugeborenen Tiere

- A = DM, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- B = GDNF, Vergrößerung 400-fach (Massstab 100µm)
- C = BDNF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- D = FGF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- E = GDNF-BDNF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- F = GDNF-FGF, Vergrößerung 400-fach (Massstab 100µm)

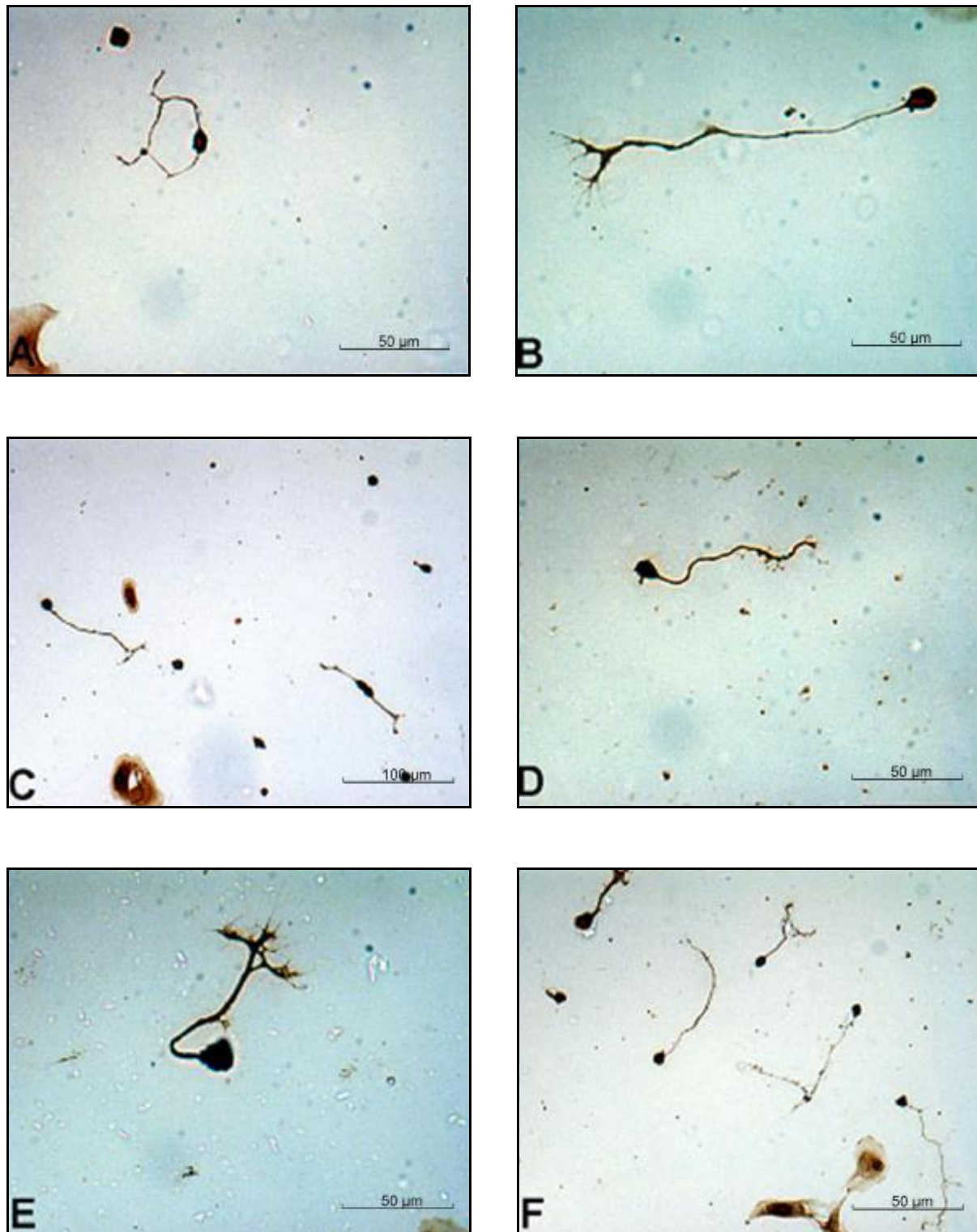


Abbildung 14: Verschiedene Kulturbedingungen bei 5 Tage alten Tieren

- A = DM, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- B = GDNF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- C = BDNF, Vergrößerung 400-fach (Massstab 100µm)
- D = FGF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50 µm)
- E = GDNF-BDNF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50 µm)
- F = GDNF-FGF, Vergrößerung 400-fach (Massstab 100µm)

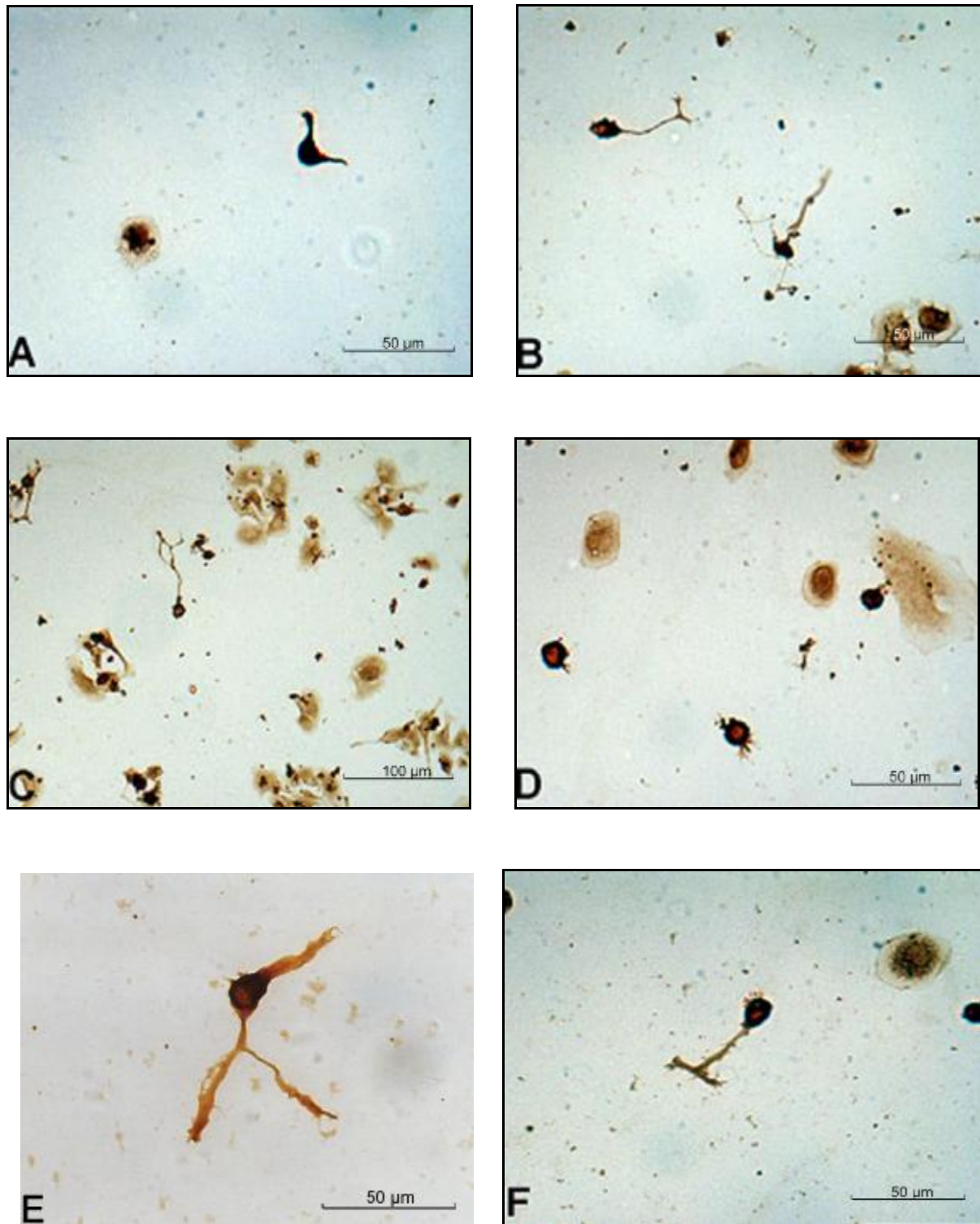


Abbildung 15: Veränderung des Neuritenwachstums bei p15-Kulturen

- A = DM, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- B = GDNF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- C = BDNF, Vergrößerung 400-fach (Massstab 100µm)
- D = FGF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- E = GDNF-BDNF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)
- F = GDNF-FGF, Vergrößerung 800-fach (Massstab 50µm)

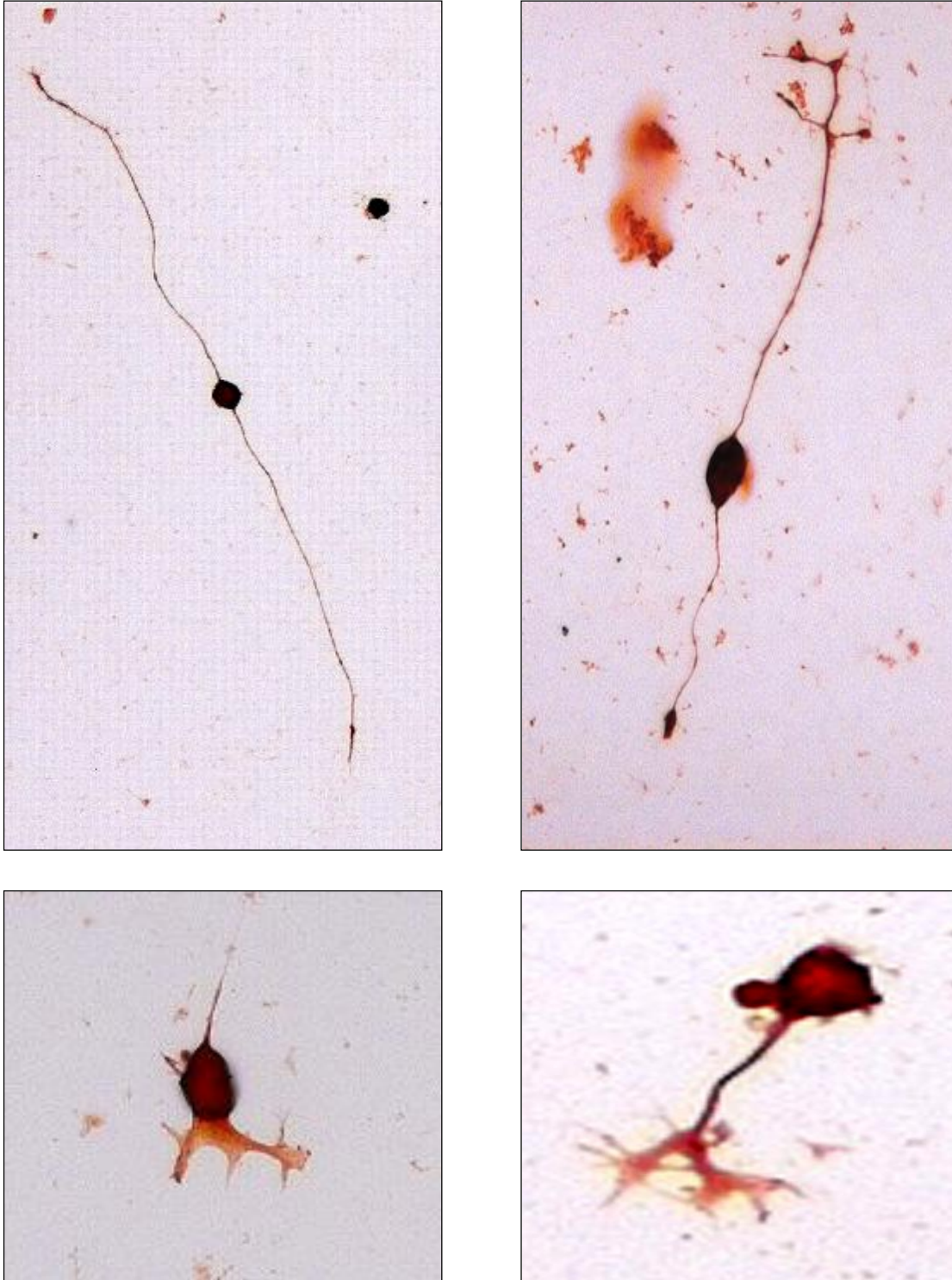
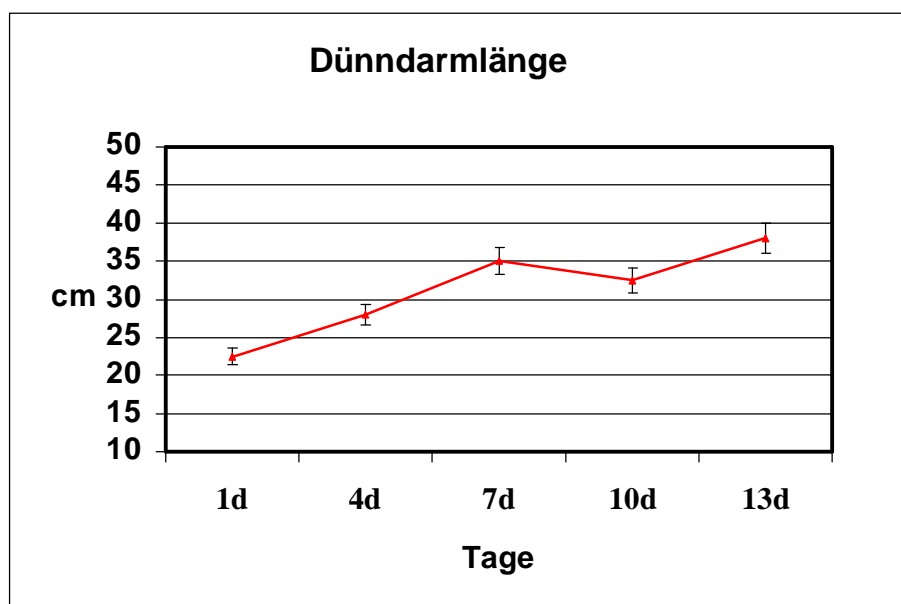


Abbildung 16: Verschiedene Nervenzelltypen
Deutlich erkennbar die unterschiedliche Neuritenausprägung der einzelnen Nervenzellen mit teilweise ausgeprägter Verzweigungstendenz.
Vergrößerung 1000-fach

Ein besonderes Augenmerk soll wegen deren Sonderstellung noch einmal auf die Kulturen der 10 Tage alten Tiere gerichtet werden. Insgesamt konnte in Bezug auf die deutlich reduzierte Neuritenlänge ähnliche Beobachtungen bei der Vermessung des Dünndarmes gemacht werden. Im Rahmen einer Voruntersuchung zeigte sich hier eine Besonderheit: Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Tagen, kam es bei P10 nicht zu einem weiteren kontinuierlichen Anstieg der Darmlängen. Dieser Befund korreliert mit den gemessenen Neuritenlängen in dieser Altersstufe. Aufgrund der relativ kleinen Fallzahlen zeigt diese Untersuchung jedoch lediglich eine Tendenz auf (Graphik 2).



Graphik 2: Entwicklung der Gesamtlänge des Dünndarmes mit zunehmendem Alter

5. Vergleich der Neuritenlängen

Als Kontrollgruppe wurden die Kulturen im serumfreien, chemisch definierten Medium ohne Wachstumsfaktoren herangezogen. Auch ohne einen Zusatz an neurotrophen Faktoren war hier ein Neuritenwachstum erkennbar. Dieses war abhängig von der Altersstufe der Kulturen unterschiedlich ausgeprägt. Die statistischen Auswertungen

beziehen sich jeweils auf die Kontrollgruppen mit definierem Medium innerhalb der Altersstufe.

Die längsten Ausläufer zeigten sich hier bei den neugeborenen Kulturen (P1). Das durchschnittliche Neuritenwachstum betrug $88,5 \mu\text{m}$ ($\pm 2,6 \mu\text{m}$).

Betrachtet man nun weiterhin die gleiche Altersstufe (P1) zeigt sich bei dem Zusatz von GDNF ein deutlich längeres Neuritenwachstum mit einem Durchschnittswert von $105,1 \mu\text{m}$ ($\pm 3,5 \mu\text{m}$). Dieses Ergebnis war im Vergleich zur Kontrolle deutlich signifikant.

Unter der Behandlung mit BDNF ($90,2 \mu\text{m}$, $\pm 2,6 \mu\text{m}$) oder bFGF ($97,2 \mu\text{m}$, $\pm 2,9 \mu\text{m}$) zeigten die Kulturen der neugeborenen Tiere keine Signifikanz und subjektiv betrachtet auch kein, bzw. nur ein gering verbessertes Neuritenwachstum im Vergleich zu den Kulturen mit Definiertem Medium. (siehe Graphik 3 und Abb. 12)

Die Kombinationen aus GDNF mit BDNF ($110,1 \mu\text{m}$, $\pm 3,7 \mu\text{m}$), sowie GDNF mit bFGF ($105,2 \mu\text{m}$, $\pm 3,8 \mu\text{m}$) zeigten hingegen wieder eine deutliche Längenzunahme der Nervenzellausläufer, die jedoch nur bei der Kombination aus GDNF und BDNF signifikant war.

Bei den Kulturen der älteren Tiere (p5) konnte insgesamt ein ähnliches Wachstumsmuster unter den Einzelneurotrophinen oder unter dem Einfluss aus den Kombinationen beobachtet werden. Während das durchschnittliche Neuritenwachstum mit definiertem Medium allein bei $61,1(2,8)$ lag, war es unter GDNF allein mit $98,2 \mu\text{m}$ ($\pm 5,3 \mu\text{m}$) deutlich und signifikant gesteigert. BDNF mit durchschnittlich $68,6 \mu\text{m}$ ($\pm 3,2 \mu\text{m}$) und bFGF mit durchschnittlich $60,8 \mu\text{m}$ ($\pm 2,4 \mu\text{m}$) zeigten kaum veränderte Neuritenlängen. Die Kombination aus GDNF und BDNF ($109,2 \mu\text{m}$, $\pm 5,4 \mu\text{m}$), als auch die Kombination aus GDNF und bFGF ($100 \mu\text{m}$, $\pm 4,2 \mu\text{m}$) waren eindeutig besser und im Falle von GDNF/BDNF auch signifikant (siehe auch Graphik 4, und Abb. 13).

Auffällig war das Längenwachstum der Neuriten bei den 10 Tage alten Kulturen unter der Behandlung mit GDNF, da man mit einem durchschnittlichen Wachstum von $39,3 \mu\text{m}$ ($\pm 3,3 \mu\text{m}$) versus $34,6 \mu\text{m}$ ($\pm 1,3 \mu\text{m}$) bei DM keinen wesentlichen Unterschied feststellen konnte. BDNF ($73 \mu\text{m}$, $\pm 8 \mu\text{m}$) und bFGF ($56,6 \mu\text{m}$, $\pm 6,5 \mu\text{m}$) allein waren signifikant besser in Bezug auf das Neuritenwachstum. Die Kombinationen der

beiden mit GDNF (49,6 μm , $\pm 2,7 \mu\text{m}$ unter GDNF/BDNF und 60,2 μm , $\pm 8 \mu\text{m}$ unter GDNF/bFGF) zeigte zwar auch ein signifikant besseres Neuritenwachstum, ein synergistischer Effekt wurde nicht gesehen (siehe Graphik 5). Im Gegenteil, bei der Kombination mit BDNF zeigte sich sogar eine deutliche Reduktion des Neuritenwachstums im Vergleich zu BDNF allein.

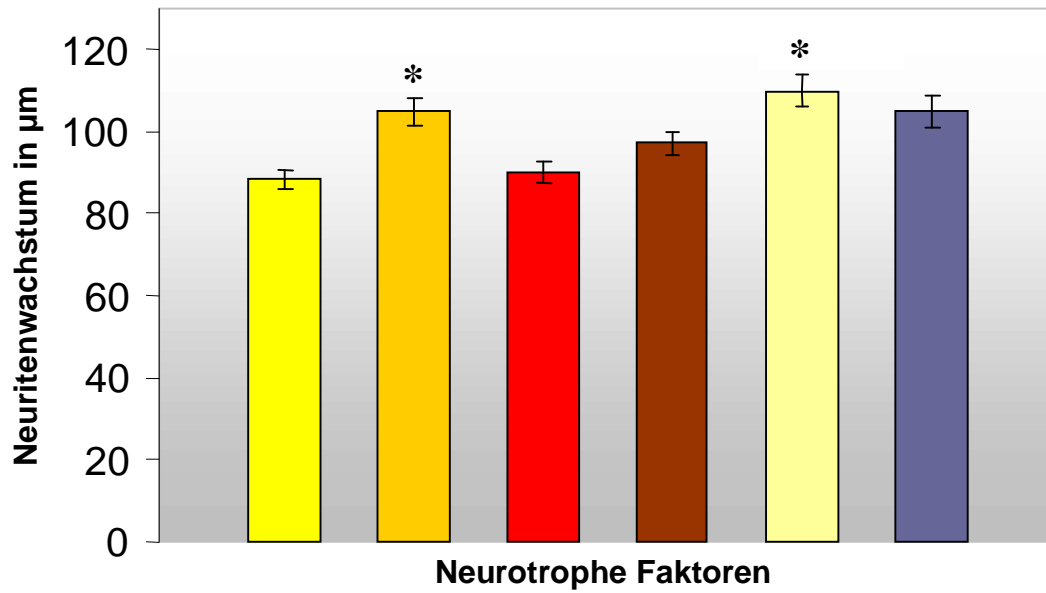
Auch die p 15-Kulturen wiesen etwa die gleiche Verteilungskurve auf:

Unter GDNF allein wurde ein durchschnittliches Wachstum von 58,9 μm ($\pm 2,8 \mu\text{m}$) versus 43,6 μm ($\pm 1,9 \mu\text{m}$) bei DM festgestellt. BDNF mit 46,4 μm ($\pm 2,4 \mu\text{m}$), als auch bFGF mit 39,3 μm ($\pm 1,7 \mu\text{m}$) zeigten nicht nur kein verlängertes Wachstum, sondern eine Reduktion der Neuritenlänge. Die Kombinationen (62,5 μm , $\pm 3,2 \mu\text{m}$ unter GDNF/BDNF und 59,2 μm , $\pm 2,8 \mu\text{m}$ unter GDNF/bFGF) wiesen wieder ein verbessertes Neuritenwachstum auf, allerdings wurde hier keine Signifikanz erzielt. (siehe Graphik 6 und Abb. 14).

Stellt man nun die einzelnen Alterstufen nebeneinander, erkennt man die Tendenz, dass mit zunehmendem Alter der Tiere der Einfluss der Neurotrophine nachlässt, aber immer noch ein positiver Effekt erzielt werden kann.

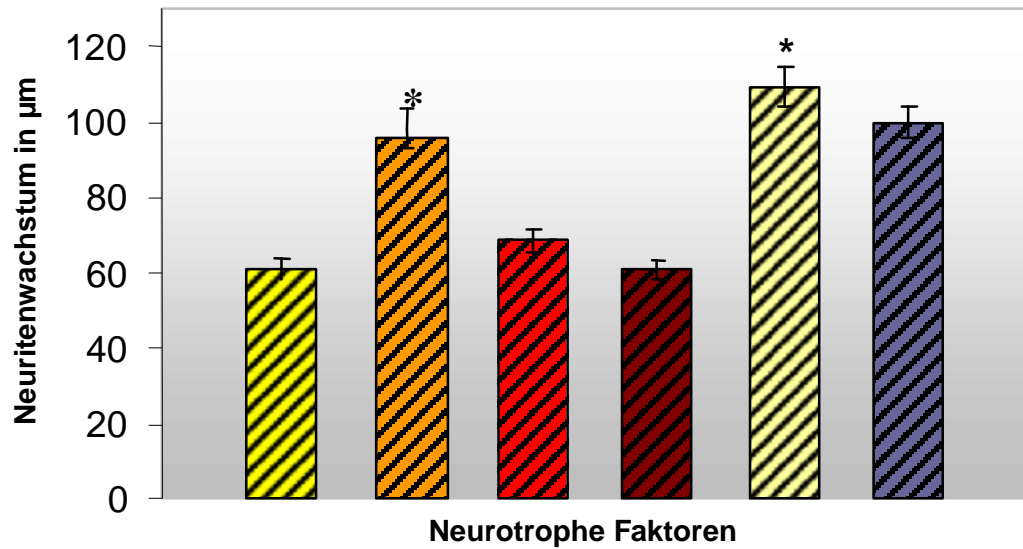
Eine Sonderstellung nehmen die Kulturen der 10 Tage alten Tiere ein. Während bei den anderen Altersstufen annähernd ein gleicher Einfluss der Neurotrophine entweder alleine oder in Kombination erzielt werden konnte, zeigt sich hier das Phänomen, dass plötzlich BDNF und bFGF einen anderen Stellenwert einzunehmen scheinen. Aber auch die Kombinationen der beiden mit GDNF sorgen für ein signifikant besseres Neuritenwachstum.







Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen[μm] in den p1- Kulturen



Graphik 3: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen[μm] in den p1-Kulturen
 DM=Definiertes Medium; B 10=BDNF 10ng/ml; F 10=bFGF 10ng/ml
 G 10=GDNF 10ng/ml; GB 10=GDNF/BDNF 10ng/ml
 GF 10=GDNF/bFGF 10ng/ml
 * = $p < 0,001$

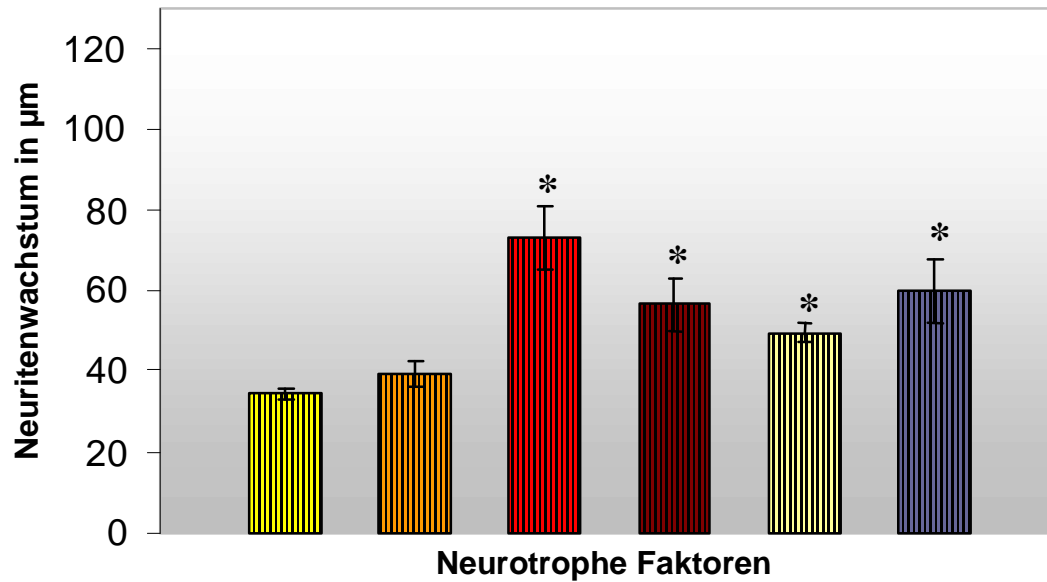
Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen[μm] in den p5- Kulturen



	DM 	G 10 	B 10 	F 10 	GB 10 	GF 10 
Wachstum in μm	61,1	98,2*	68,6	60,8	109,2*	100
SD in μm	2,8	5,3	3,2	2,4	5,4	4,2

Graphik 4: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen[μm] in den p5-Kulturen
* = $p < 0,001$

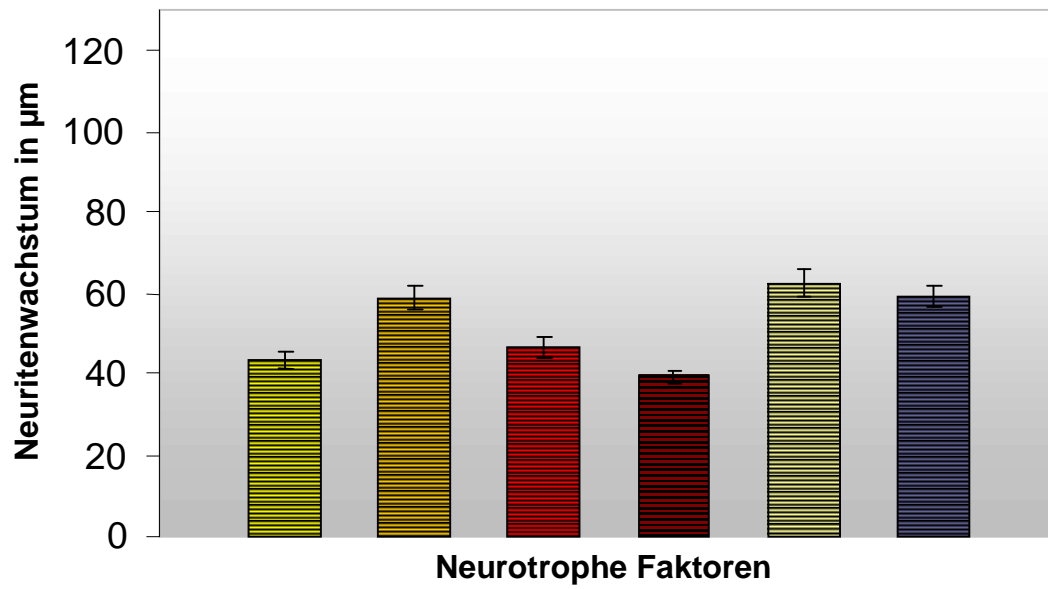
Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen[μm] in den p10- Kulturen



	DM	G 10	B 10	F 10	GB 10	GF 10
Wachstum in μm	34,6	39,3	73*	56,6*	49,6*	60,2*
SD in μm	1,3	3,3	8	6,5	2,7	8

Graphik 5: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen[μm] in den p10-Kulturen mit Standardabweichungen
 DM=Definiertes Medium; B 10=BDNF 10ng/ml; F 10=bFGF 10ng/ml
 G 10=GDNF 10ng/ml; GB 10=GDNF/BDNF 10ng/ml
 GF 10=GDNF/bFGF 10ng/ml
 * = $p < 0,001$

Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen[μm] in den p15- Kulturen



	DM	G 10	B 10	F 10	GB 10	GF 10
Wachstum in μm	43,6	58,9	46,4	39,3	62,5	59,2
SD in μm	1,9	2,8	2,4	1,7	3,2	2,8

Graphik 6: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen[μm] in den p15-Kulturen

6. Verhältnis der neuritentragenden Neurone zu den Nicht-neuritentragenden Neuronen

Bei dieser Messung wurden die Coverslips in vertikale und horizontale Gesichtsfelder eingeteilt. Es ergaben sich pro Coverslip eine Anzahl von 40 Gesichtsfeldern, was bei drei coverslips pro Versuchsansatz eine Gesamtzahl von 120 ausgewerteten Gesichtsfeldern bedeutet. Es wurden die Anzahl der neuritentragenden und der nicht-neuritentragenden Neurone gewertet. Die bei Definiertem Medium gemessene Anzahl wurde dabei auf 100% normiert und mit den behandelten Kulturen verglichen. Insgesamt vermindert sich die Anzahl der überlebenden Neurone (neuritentragend) mit dem Alter der Tiere. Insofern bedeuten die 100 % neuritentragender Neurone in den Kontrollgruppen jeweils unterschiedliche, bei den älteren Kulturen geringere, Neuronenzahlen.

Bei den p1-, den p5, sowie den p15-Kulturen zeigte sich bei allen mit Neurotrophen versetzten Nährmedien eine Erhöhung der Anzahl neuritentragender Neurone. Auffällig waren die Kombinationen von GDNF/BDNF und GDNF/bFGF, bei denen das Wachstum der Neurite der neugeborenen Tiere auf das 1,5-fache gesteigert werden konnte. Ein signifikanter Unterschied wurde dabei nicht festgestellt (siehe Tabelle 1), was durchaus an der Messmethode gelegen haben könnte, da die Tendenz zu einem signifikanten Unterschied eindeutig ausfiel (insbesondere bei den P1-Kulturen und mit kombinierten Neurotrophen).

Insgesamt lässt sich jedoch folgern, dass es in Abhängigkeit vom eingesetzten Faktor nicht nur zu einer Zunahme der durchschnittlichen Neuritenlänge kommt, sondern dass die Gesamtneuritenlänge einer Kultur allein dadurch deutlich gesteigert ist, da sich mehr Nervenzellen mit Neuriten finden lassen. Das heißt z.B. bei P1, dass sich die durchschnittlichen Neuritenlängen bei der Kombination von GDNF und BDNF um 25 % steigern lässt (von 88 auf 110µm), unter Berücksichtigung der Zunahme der neuritentragenden Neurone in Wirklichkeit aber eine Zunahme des Gesamtneuritenzuwachses von mehr als 200 % vorliegt ($110 \cdot 1,7 / 88 \cdot 1$)

Verhältnis zwischen:
Neuriten-tragenden zu Nicht-Neuritentragenden Neuronen

	P1	P5	P10	P15
DM	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
G10	138,00%	113,00%	107,00%	117,00%
F10	121,00%	104,00%	87,50%	114,00%
B10	129,00%	104,00%	103,00%	109,00%
GF10	166,00%	125,00%	110,00%	107,00%
GB10	170,00%	131,00%	116,00%	122,00%

Tabelle 2: Vergleich der mit Neurotrophinen behandelten Kulturen unter der Annahme, dass DM=100%. Es handelt sich um das Verhältnis zwischen Neuriten-tragenden zu Nicht-Neuritentragenden Neuronen.

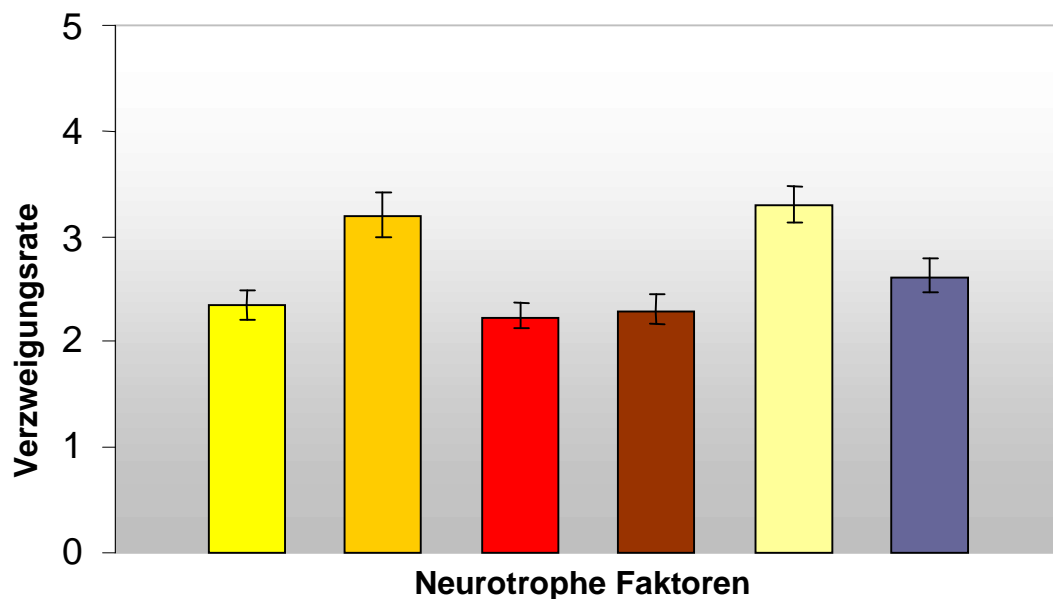
7. Verzweigungsrate

Bei der Verzweigungsrate wurden die einzelnen Ausläufer der Nervenzellen gemessen. Da das Programm nicht zwischen Haupt- und Nebenausläufern unterscheiden konnte, wurde die gemessene Anzahl der Verzweigungen um den Faktor eins reduziert.

Während bei DM zunächst ein Anstieg der Verzweigungsrate in den p5-Kulturen beobachtet werden kann, kommt es in den p10-Kulturen zu einer deutlichen Reduzierung, um dann in den p15-Kulturen erneut anzusteigen. Unter dem Einfluß der mit Neurotrophinen behandelten Nährmedien zeigt sich ein ähnliches Verhalten, wobei die Verzweigungen zunehmen. Eine Sonderstellung nehmen die p15- Kulturen ein, bei denen eine signifikante Zunahme der Verzweigungsrate erzielt wird. Dies spiegelt sich auch in dem vorherrschenden Zelltyp herangewachsenen Tiere wieder (siehe auch Abb. 16). In allen gemessenen Versuchen zeigt sich bezüglich der Verzweigungsrate eine deutliche Tendenz mit Zunahme der Verästelungen, eine Signifikanz konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Die auf den nächsten Seiten folgenden Graphiken geben einen Überblick über das Verzweigungsverhalten der Neurite der einzelnen Altersstufen unter entsprechender Behandlung mit den Neurotrophinen (Graphiken 7-10).

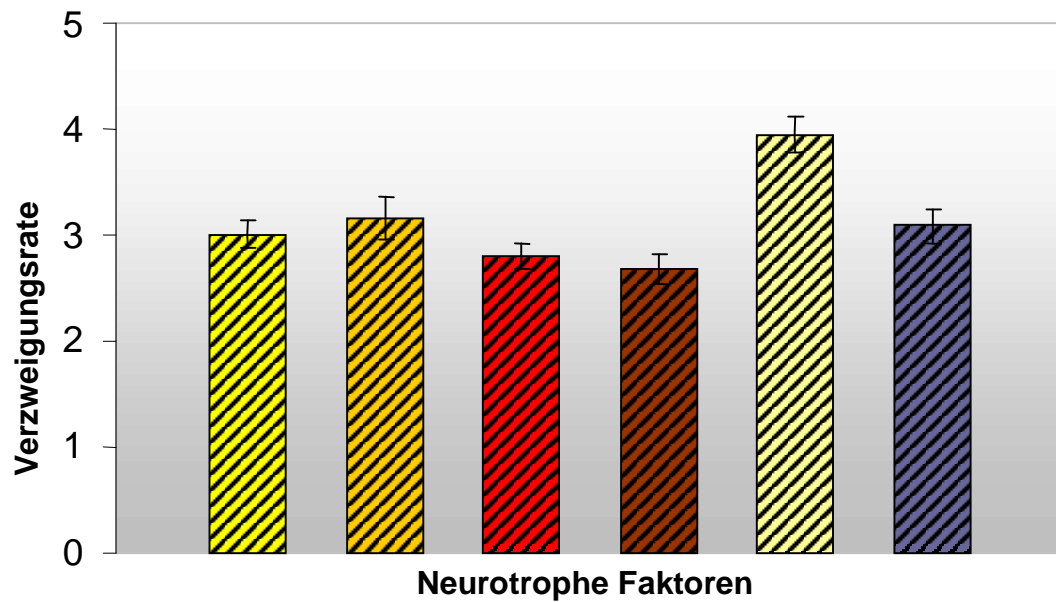
Vergleich der durchschnittlichen Verzweigungspunkte[absolut] der p1-Kulturen



	DM	G 10	B 10	F 10	GB 10	GF 10
Wachstum in μm	2,34	3,2	2,24	2,3	3,3	2,62
SD in μm	0,14	0,2	0,12	0,15	0,17	0,16

Graphik 7: Verzweigungspunkte[absolut] der p1-Kulturen. Gesamtanzahl dabei um 1 reduziert, da Hauptausläufer nicht in Messung einging.
 $P=0,05$
 DM=Definiertes Medium; F 10=bFGF 10ng/ml; B 10=BDNF 10ng/ml; G 10=GDNF 10ng/ml; GB 10=GDNF/BDNF 10ng/ml;
 GF 10=GDNF/bFGF 10ng/ml

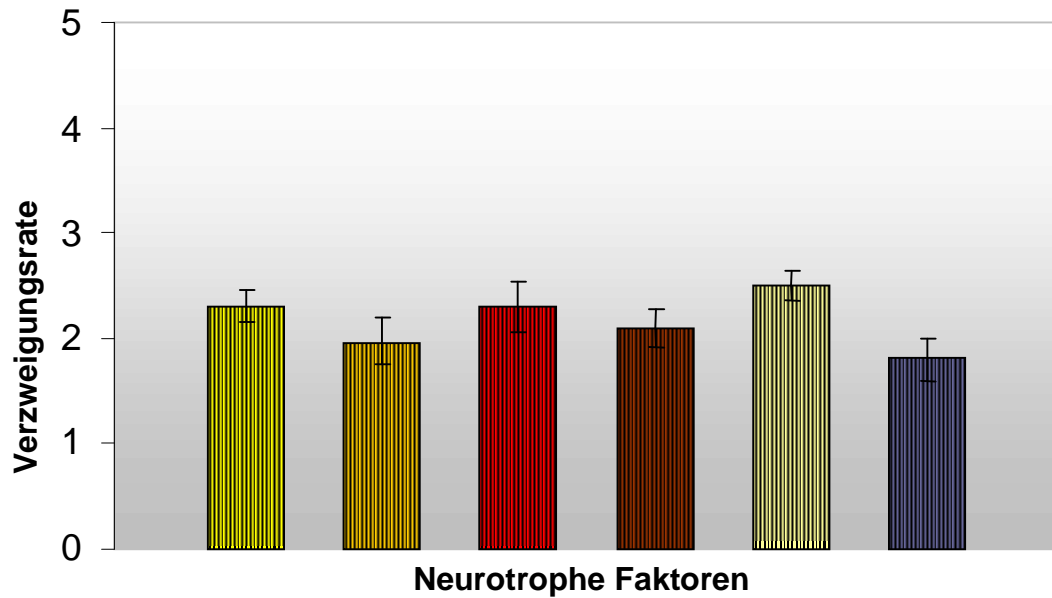
Vergleich der durchschnittlichen Verzweigungspunkte[absolut] der p5-Kulturen



	DM	G 10	B 10	F 10	GB 10	GF 10
Wachstum in μm	3	3,16	2,8	2,67	3,95	3,09
SD in μm	0,13	0,11	0,1	0,12	0,18	0,14

Graphik 8: Verzweigungspunkte[absolut] der p5-Kulturen

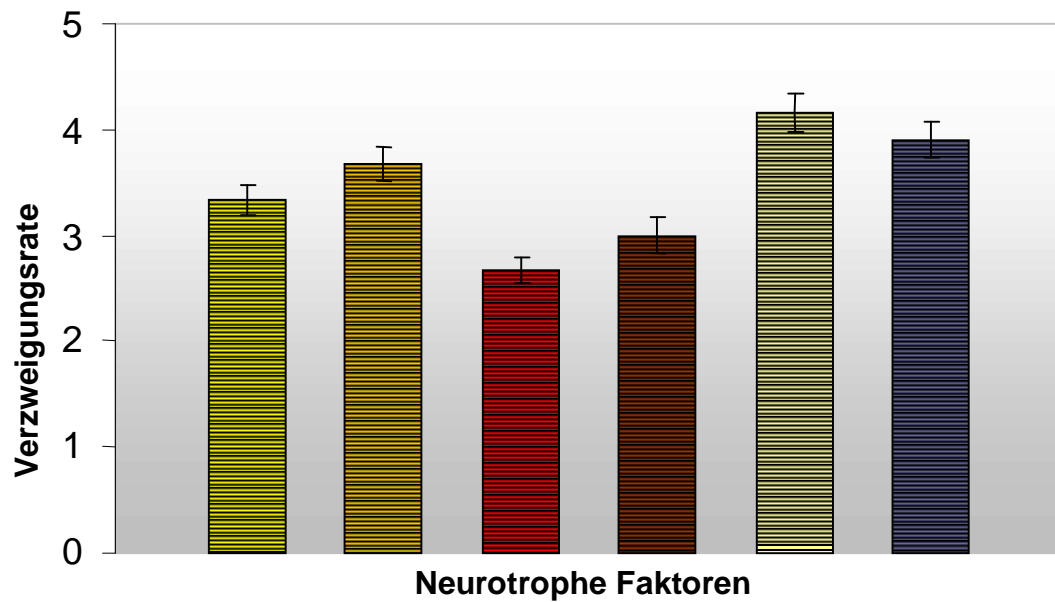
Vergleich der durchschnittlichen Verzweigungspunkte[absolut] der p10-Kulturen









	DM	G 10	B 10	F 10	GB 10	GF 10
Wachstum in μm	2,3	1,96	2,3	2,1	2,5	1,8
SD in μm	0,15	0,22	0,24	0,18	0,15	0,2

Graphik 9: Verzweigungspunkte[absolut] der p10-Kulturen. Gesamtanzahl dabei um 1 reduziert, da Hauptausläufer nicht in Messung einging.
 $P=0,05$
 DM=Definiertes Medium; F 10=bFGF 10ng/ml; B 10=BDNF 10ng/ml; G 10=GDNF 10ng/ml; GB 10=GDNF/BDNF 10ng/ml;
 GF 10=GDNF/bFGF 10ng/ml

Vergleich der durchschnittlichen Verzweigungspunkte[absolut] der p15-Kulturen



	DM 	G 10 	B 10 	F 10 	GB 10 	GF 10 
Wachstum in μm	3,34	3,68	2,67	3	4,16	3,9
SD in μm	0,13	0,15	0,12	0,17	0,18	0,17

Graphik 10: Verzweigungspunkte[absolut] der p15-Kulturen

8. Sonderstellung einzelner Kulturen

Abschließend soll noch kurz auf eine Beobachtung während der Experimente eingegangen werden. Dies betrifft die Differenzierung der Gliazellen nach unterschiedlich langer Inkubationszeit und mit Behandlung der Neurotrophine. Ein erheblicher Unterschied wurde dabei bei der Zugabe eines Cytokins in Kombination von GDNF beobachtet. Diese Versuche mit Ciliary neurotrophic factor (CNTF) mussten aus organisatorischen Gründen aufgegeben werden.

Bei dem Vergleich der Gliazellen fällt die teils fibroblastenähnliche Struktur bei entsprechender Differenzierung auf (siehe Abb. 17).

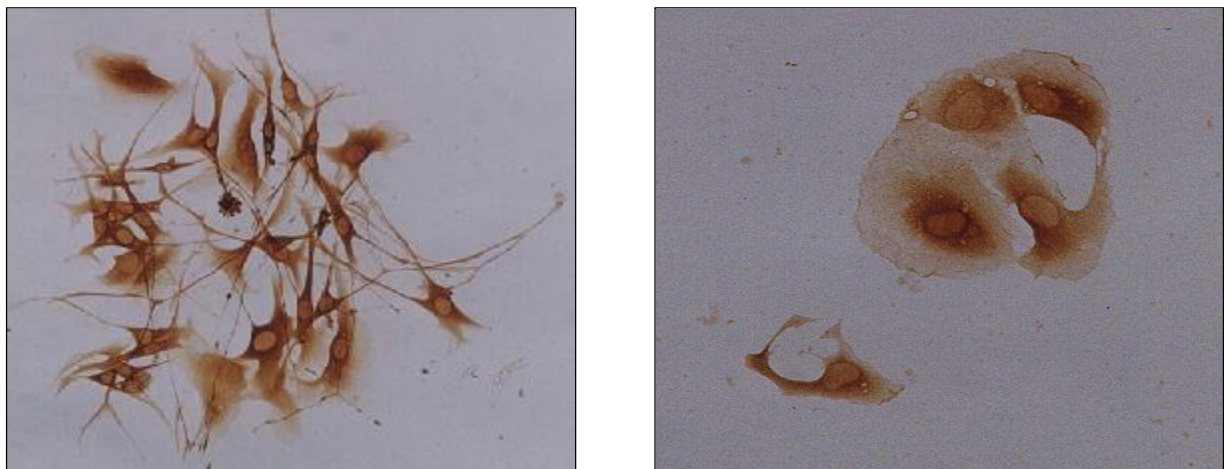


Abbildung 17: Unterschiedliches Gliawachstum unter gleichen Kulturbedingungen
Links: Fibrilläre Netzbildung und Ausdifferenzierung der Glia (Vergrößerung 500-fach)
unter Behandlung mit CNTF
Rechts: Annähernd unveränderte Darstellung der Glia (Vergrößerung 1000-fach),
Behandlung mit DM

Auch hinsichtlich der Unterschiede des Neuritenwachstums bei Gliakontakt ist somit auch von unterschiedlichen Gliapopulationen auszugehen.

IV DISKUSSION

1. Methodische Probleme

Die starke Verfettung mit zunehmendem Alter der Versuchstiere machte eine sehr sorgfältige Präparation der Mesenterialwurzel notwendig. Die Resektionsgrenzen wurden dabei sehr nahe am Übergang des Mesenteriums zum Darm festgelegt. Trotzdem gelang gerade bei den älteren Tieren eine fettfreie Präparation nicht. Die dadurch eingeschränkten Sichtverhältnisse wurden durch einen häufigen Wechsel der eisgekühlten Nährlösung verbessert. Durch diesen Schritt konnte auch die Trübung der Nährlösung durch die ausgeprägten Lymphbeimengung erheblich reduziert werden.

Der schwierigen Präparation des Plexus aufgrund der Vernetzung der Muskelschicht des Magens wurde durch eine retrograde Präparation vom terminalen Ileum her entgegengewirkt. Die Präparation wurde am duodenogastralen Übergang beendet. Nach Überführung der Muskelanteile in die Kollagenaselösung gelang die Dissoziation der Plexusanteile. Bei der Kollagenase wurde nach entsprechender Anleitung streng auf den verwendeten Typ geachtet, da eine Wirksamkeit nur bei Typ II-Kollagenase beobachtet wurde (*SCHÄFER et al.*, 1997).

Auch die Dissoziation der einzelnen Neurone nach Überführung der Gitternetzanteile in die Trypsinlösung war ausgesprochen konzentrationsabhängig. Eine höhere Konzentration als 0,05% führte innerhalb kurzer Zeit zu einer vollständigen Verdauung der Neurone.

Um einer Kontamination der Präparate vorzubeugen war in sämtlich verwendeten Medien eine Antibiotikabeimengung mit breitem Erregerspektrum beigefügt. Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen und Präparation unter dem Abzug im aseptischen Bereich wurde gelegentlich eine bakterielle Übersiedlung der Kulturen beobachtet. Einmalig wurden sogar sämtliche Kulturen verworfen, der Brutschrank mit einer nicht-aldehydhaltigen Lösung ausgewaschen und Abstriche entnommen. Diese waren nach der Behandlung ohne Nachweis eines bakteriellen Befalles oder einer Pilzinfektion.

2. Allgemeine Aspekte der Nervenzellentwicklung

In der Embryonalzeit kommt es zu einer Einsprossung von Vorläuferzellen aus dem Neuralrohr in den sich entwickelnden Darm. Diese Migration bedarf einer Reihe von Faktoren. Eine ausgewogene Mikroumgebung und das Vorhandensein verschiedenster neurotropher Substanzen zum richtigen Zeitpunkt ist für die entsprechende Entwicklung unbedingt erforderlich.

Während der postnatalen Phase erfolgt eine Differenzierung der Vorläuferzellen in Nervenzellen und Gliazellen. So wie in der embryonalen Phase ist zur weiteren Differenzierung der Vorläuferzellen eine ausgewogene Mikroumgebung und der Einfluß neurotropher Substanzen notwendig.

Um möglichst einen Einfluß von unbekanntem Faktoren zu verhindern, wurde in dieser Untersuchung bewußt ein serumfreies Medium gewählt, da serumhaltiges Medium als eine Art „Black Box“ betrachtet werden muß.

Es enthält eine undefinierbare Anzahl von Substanzen und Faktoren, wie z.B. Transforming growth-factor beta (TGF- β), wobei GDNF ein wichtiger Abkömmling der TGF- β -Familie darstellt. Trophische Effekte von TGF β auf Neurone *in vitro* und *in vivo* wurden beschrieben (*LIN et al.*, 1993; *STROMBERG et al.*, 1993; *TOMAC et al.* 1995). In ansteigenden Serumkonzentrationen wurde auch ein verbessertes Neuronenwachstum bei Neuronen des plexus myentericus beobachtet, was die Theorie der neurotrophen Faktoren im Serum bestätigt (*MULHOLLAND et al.*, 1991). Allerdings stimuliert serumhaltiges Medium auch die Gliaproliferation und kann daher bei der Auswertung isolierter Neurone zu starken Einschränkungen der Auswertbarkeit führen. Aus diesem Grund wird eine Reduktion der Gliaproliferation gerade bei isolierten enterischen Nervenzellen durch den Einsatz von serumfreiem Medium angestrebt (*SAFFREY et al.*, 1991).

Als Grundsubstanz wurde folglich ein chemisch definiertes Medium ohne zusätzliche unbekanntem Faktoren verwendet, um sämtliche Fremdeinflüsse zu unterbinden.

Frühere Studien zeigten hier eine Reduktion des Gliawachstums in serumfreiem Medium bei einer Kultivierungszeit von mehr als 7 Tagen (*SAFFREY et al.* 1994, *ECCLESTON et al.* 1987).

In der klassischen Zellkultur wird fetales Kälberserum als Additiv verwendet. In diesem Supplement sind alle Faktoren enthalten (Hormone, Spurenelemente, Wachstumsfaktoren), die den Zellen ein ungestörtes Wachstum ermöglichen. Diese Zusatzstoffe (Trijod- und Tetrajodtyronin, Progesteron, Transferrin, Putrescin, Selen = N₂-supplement) wurden bei diesem chemisch definierten Medium separat zugesetzt. Dies, sowie die starken Abweichungen unterschiedlicher Serumchargen, lassen keine eindeutigen Messungen von Neurotrophineffekten zu. Deshalb wurde in dem vorliegenden Versuchsansatz ein serumfreies Medium eingesetzt.

Die Effektivität gerade der Kombination dieser Zusatzstoffe wurde schon 1979 von Bottenstein und Sato auf Neuroblastomzellen beschrieben (BOTTENSTEIN UND SATO, 1979). Bestätigt wurde der Versuch an humanen Hepatocyten in einer Langzeit-kultivierungsstudie (NAKABAYASHI *et al.*, 1984).

In den hier beschriebenen Versuchen wurde die Kulturzeit gerade bei den älteren Tieren wurde in unseren Versuchen auf 48 Stunden beschränkt, da es bei längerer Kulturdauer zur Ausbildung eines dichten neuronalen Netzwerkes gekommen wäre (siehe Abb. 18), was eine Auswertung des Einzelzellfaserwachstums unmöglich gemacht hätte. Insbesondere auch dadurch, dass bei Vernetzungen der einzelnen Nervenzellen untereinander ein anderes Wachstumsmuster festzustellen ist. Teilweise sind exzessive Längenzunahmen und Ausbildung neuronaler Netzwerke der Neurite zu verzeichnen. Offensichtlich wird das Nervenfaserverwachstum durch den interneuronalen Austausch (parakrine Aktivität) an trophischen Substanzen gesteigert.

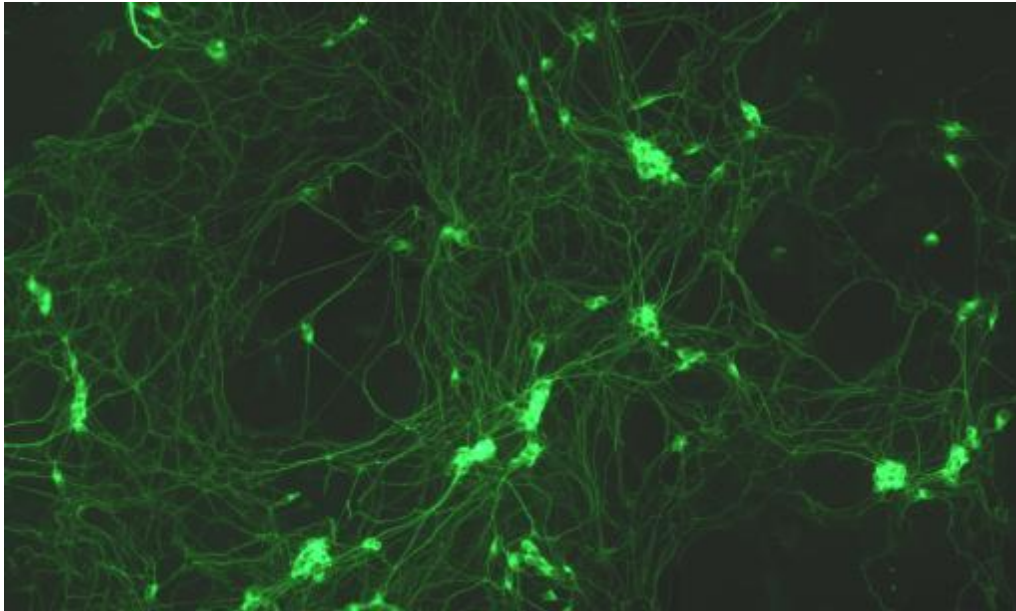


Abbildung 18: Darstellung eines sehr dichten Neuropils nach längerer Inkubationszeit. Deutlich erkennbar sind die ausgeprägten Vernetzungen
Vergrößerung 400-fach; Fluoreszenzmikroskopie, Färbung: Anti-Tubulin

Des Weiteren wird speziell die einzelne Nervenzelle ohne Kontakt zur Glia zu den Meßergebnissen herangezogen, da bei Kontakt der Nervenzelle zur Glia ein vollständig anderes Wachstumsmuster beobachtet werden kann, egal ob der Nervenzellkörper oder der Neurit eine Beziehung zur Glia aufnimmt (siehe Abb. 11). Dies läßt sich durch Untersuchungen insbesondere an Astrocyten („Glia“ des zentralen Nervensystems) nachweisen, von denen bekannt ist, daß sie mehrere Neurotrophine (wie z.B. NGF, BDNF und GDNF) exprimieren und für eine ausgewogene Mikroumgebung sorgen („Glia, the Brain’s Other Cells“). Diese Beobachtung läßt sich anhand der unterschiedlichen Neuritenausprägung bei Gliakontakt nachvollziehen, da teilweise ein exzessiv längeres Neuritenwachstum mit ausgeprägten Verzweigungen nachzuweisen war.

Auch in der untersuchten enterischen Population konnte ein direkter Einfluß von enterischer Glia auf Nervenzellen gesehen werden. So wachsen die Neurite größtenteils deutlich besser bei Kontakt zur Glia. Allerdings ließ sich auch ein anderes Phänomen beobachten: ein Überwachsen der Neurite ohne direkten Einfluß auf das Wachstum bzw. ein direktes Vermeiden von Gliakontakten. Aus diesen

Beobachtungen lässt sich schließen, daß unterschiedliche Glia-bzw. Nervenzelltypen vorliegen. Aus neueren Arbeiten lässt sich diese Theorie unterstützen (*VON BOYEN et al.*, 2004). Hierbei konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von einem Krankheitsbild (M. Crohn) enterische Glia transdifferenzieren kann, Es finden sich einerseits S100-positive, andererseits GFAP-positive Gliazellen.

Auch wenn in dieser Arbeit kein besonderes Augenmerk auf die Entwicklung der Glia gelegt wurde, fällt doch ein eklatanter Unterschied im Differenzierungsgrad der enterischen Glia unter Behandlung mit den Neurotrophinen auf. Besonders zu beachten ist hier die Kombination GDNF mit CNTF (einzelne Versuche wurden mit CNTF durchgeführt).

Die Variabilität der einzelnen Neurone kann in der vorliegenden Arbeit gut nachvollzogen werden. Die Unterschiede der einzelnen Neurone können auch auf ein unterschiedliches Ansprechen der Neurite unter dem Einfluss der einzelnen Neurotrophine hinweisen.

3. Auswirkung der einzelnen Neurotrophine auf das Neuritenwachstum

3.1 Glial cell-line derived neurotrophic factor

Glial cell-line derived neurotrophic factor ist ein wichtiger und notwendiger Faktor für die Entwicklung unterschiedlicher Neurone. Dies belegen Untersuchungen sowohl in vivo als auch in vitro.

So konnten Motoneuronatrophien des Spinalkanals nach Axotomie unter dem Einfluß von GDNF deutlich verringert werden (*HENDERSON et al.*, 1994). Aber auch in sensorischen und autonomen Neuronen (*BUJ-BELLO et al.* 1995; *EBENDAL et al.* 1995), als auch in Neuronen des zentralen Nervensystems (*GIEHL et al.* 1998) wurde eine verbesserte Überlebensrate unter GDNF erzielt. Desweiteren wurde das Neuritenwachstum in Motoneuronen unter dem Einfluß von GDNF beobachtet (*ZURN et al.* 1996) ein neuritogener Effekt bestätigte sich.

Welche schwerwiegende Folgen das Fehlen von GDNF zum Zeitpunkt der Entwicklung haben kann, zeigen die Versuche mit genmanipulierten Mäusen, bei welchen die Produktion von GDNF oder dessen Rezeptor „Ret“ unterdrückt wurde. Die Nierenanlage fehlte vollständig und es wurde ein kompletter Verlust der Neurone des enterischen Nervensystems (*SANCHEZ et al.* 1996, *PICHEL et al.*, 1996, *MOORE et al.*, 1996) festgestellt. Diese Veränderungen waren mit dem Leben der Tiere nicht vereinbar.

In der Übergangszeit der prä- und postpartalen Entwicklung nimmt die Expression von GDNF mit zunehmendem Alter der Tiere ab. Dies wurde insbesondere durch die Untersuchungen an der Expression der GDNF-mRNA verschiedener Gewebe (Nieren, Hoden, Lunge und Darm) festgestellt. Es kam hierbei zu einer Abnahme der Expression von der embryonalen Tragzeit Tag 18 (E 18) zum postnatalen Alter p 0 und erneut bis zum postnatalen Alter p10 in den Neuronen des enterischen Nervensystems (*CHOI-LUNDBERG und BOHN* 1995). Im Lungengewebe dagegen wurde eine Zunahme der GDNF-mRNA-Expression beobachtet.

Einige der in dieser Studie untersuchten Kriterien scheinen die beschriebenen Phänomene der abnehmenden Wirksamkeit von GDNF mit zunehmendem Alter der Tiere zu bestätigen - wie auch schon von *SCHÄFER et al.*, 1998, beobachtet – wobei sich nach den hier vorliegenden Untersuchungsergebnissen dieses Phänomen auf das Auftreten von Nervenzellausläufern zu beziehen scheint. Man kann also annehmen, daß GDNF bei der Entwicklung des enterischen Nervensystems eine Rolle in der Differenzierung und im Wachstum zufällt.

3.2 Brain derived neurotrophic factor

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) ist ein Abkömmling aus der Nerve growth factor (NGF)-Familie. Dazu gehören auch Neurotrophin 3 (NT-3) und Neurotrophin 4/5 (NT-4/5). Das Vorhandensein von NT-3 in den Vorläuferzellen des sich

entwickelnden Darmes wurde nachgewiesen, ebenso seine Auswirkung auf die Differenzierung der Vorläuferzellen in Neurone oder Glia (*CHALAZONITIS et al.*, 1994). In vitro-Untersuchungen an Neuronen des enterischen Nervensystems zeigten unter dem Einfluß von NT-3 eine signifikante Zunahme der Neuritenlängen (*SAFFREY et al.*, 2000). Allerdings liegt für NT-3 und BDNF ein unterschiedlicher Signaltransduktionsweg vor. Während NT-3 über den Tyrosinkinaserzeptor TrK C aktiviert wird, findet die Signalübertragung von BDNF über den Tyrosinkinaserzeptor TrK B statt.

Für BDNF konnte ein positiver Effekt in Bezug auf Überleben und Neuritenwachstum auf andere neuronale Populationen nachgewiesen werden (*HARTNICK et al.* 1996). Die Neuritogenität war dabei signifikant besser als in der Kontrolle.

Bei der Untersuchung von BDNF-knock out Mäusen (Unterdrückung des BDNF-Gens) zeigten sich schwerwiegende neurologische Entwicklungsstörungen im Sinne von Koordinationsstörungen der Bewegung, Gleichgewichtsstörungen und andere auffällige Verhaltensmuster.

Die wenigsten dieser Tiere erreichten das Erwachsenenalter, und die postmortalen Untersuchungen der Neurone zeigten einen signifikanten Verlust verschiedenster Ganglien des zentralen Nervensystems (*ERNFORS, LEE, JAENISCH*, 1994).

Die Versuche konnten durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt werden. Durch die Unterdrückung des Gens für BDNF wiesen die homozygoten Tiere schwerste neurologische Veränderungen im sensiblen und sensorischen Bereich auf, während die Entwicklung der Motoneurone ungehindert erfolgte (*JONES et al.*, 1994). Auswirkungen auf das ENS wurden keine beschrieben.

Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß BDNF bei der Entwicklung und Differenzierung einer Vielzahl von Nervenzellen des zentralen Nervensystems zum Zeitpunkt der Reifung eine entscheidende Rolle spielt, aber nicht sämtliche Neuronenklassen beeinflusst.

Betrachtet man nun unter diesen Voraussetzungen die hier vorliegenden Meßergebnisse, wird verdeutlicht, daß BDNF als einzelner Faktor bei der Reifung des ENS keine wesentliche Rolle zu spielen scheint, da weder in Bezug auf Anzahl, oder Neuritenwachstum bzw. Verzweigungsrate der einzelnen Neuriten eine signifikante Verbesserung beobachtet werden konnte.

Eine Ausnahmestellung bildeten hier wiederum die Kulturen der 10 Tage alten Tiere, bei denen, zumindest was das Neuritenwachstum betrifft, ein plötzlicher Anstieg der Neuritenlänge zu sehen war. Die Schlußfolgerung hieraus ist also, daß es im Laufe der ersten postpartalen Tage zu einer Veränderung der Differenzierungseigenschaften zum Zeitpunkt p10 mit anderen Einflußfaktoren kommen muß. Möglicherweise werden aber auch andere Neuronenklassen zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung beeinflusst.

Geht man von der Tatsache aus, daß BDNF lediglich auf sensible oder sensorische Neurone Auswirkungen hat, wäre die Menge und die Verteilung dieser Neurone im enterischen Nervensystem von Interesse.

Ganz anders sieht es aus, wenn BDNF in Kombination mit weiteren neurotrophen Faktoren - insbesondere GDNF - verabreicht wird. Unter dem Einfluß dieser beiden Faktoren kann ein signifikant besseres Neuritenwachstum im Vergleich zu DM, als auch eine verbesserte Verzweigungsrate beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung liegt hier in den verschiedenen Signalübertragungsmechanismen der beiden Moleküle, die zu additiven bzw. synergistischen Effekten führen. Während BDNF eine Signaltransduktion über Tyrosinkinaserzeptoren (Transmembranäre Proteine, TrK B) einleitet, wurde für GDNF ein komplexer Multikomponentenrezeptor isoliert, welcher sich im Übertragungsmechanismus deutlich davon unterscheidet (*TREANOR et al.*, 1996).

Aus den verschiedenen Übertragungsmechanismen erklärt sich auch, warum bei der Kombination der verschiedenen Neurotrophine ein additiver bzw. synergistischer Effekt erzielt wird, da unterschiedliche Tyrosinkinaserzeptoren als Signaltransmitter isoliert wurden. Der am besten untersuchte ist dabei der Tyrosinkinaserzeptor von NGF. Über eine Phosphorylierung des extrazellulären Rezeptorendes werden verschiedene Zellmechanismen ausgelöst, die u.a. auf z.B. Neuritenwachstum, Zellüberleben, Neurotransmittersynthese und -modulation einen Einfluß haben (*THOENEN et al.*, 1980; *LEVI-MONTALCINI*, 1987).

Zur gleichen Familie wie NGF gehören auch BDNF, NT-3 und NT-4 (*ECKENSTEIN*, 1994). Alle diese Neurotrophine interagieren mit unterschiedlichen

Tyrosinkinaserzeptoren (Trk A, Trk B, Trk C) (*CHAO, 1992; BARBACID, 1995*). Ausgehend davon, daß über den Auerbachschen Plexus sowohl der Muskeltonus der Darmwand, als auch ein geringer Teil der sekretorischen Funktion des Darmes (über Verbindungen zu afferenten, sensorischen Fasern des Plexus submucosus zum ZNS) gesteuert wird, liegen folglich auch verschiedene Neuronenklassen vor.

Unter der Annahme, daß jedes Neuron über alle Tyrosinkinaserzeptoren verfügt und die unterschiedlichen Neurotrophine über unterschiedliche Rezeptoren eine Signaltransduktion bewirken, erklärt einen synergistischen Effekt bei den Kombinationen der Neurotrophine, wie auch schon in anderen Arbeiten zugrunde gelegt (*NISHI, 1994; ZURN et al., 1996;*).

Im Gegensatz hierzu stehen in vivo-Versuche an Motoneuronen des peripheren Nervensystems, die unter dem Einfluß von BDNF vor einem Untergang bewahrt werden können (*SENDTNER et al., 1992; HOFER et al., 1988*). Bei experimenteller Unterdrückung des Gens für den Trk B-Rezeptor sind Schädigungen an

Motoneuronen nachzuweisen (*KLEIN et al., 1993*), was nahe legt, daß der Übertragungsmechanismus und/oder die Rezeptoren im ZNS vs. PNS unterschiedlich sein müssen.

Werden die hier zu Grunde liegenden Messergebnisse herangezogen, wird bei BDNF als Einzelfaktor nur ein lediglich normales Wachstum beobachtet. Auch die Verzweigungsrate wird nicht beeinflusst. Im Gegenteil, es wird unter den Kulturbedingungen mit DM sogar eine stärkere Verzweigung festgestellt als mit BDNF.

Aber als synergistischer Faktor im Zusammenspiel mit anderen Molekülen – insbesondere GDNF - kann eine stärkere Neuritogenität festgestellt werden. Möglicherweise wird durch eine Interaktion mit den anderen neurotrophen Faktoren eine Signalkaskade ausgelöst, so dass dann eine Signalverstärkung der beiden Moleküle erfolgt.

Der synergistische Effekt dieser beiden Moleküle könnte aber auch daran liegen, dass verschiedene Neuronenklassen durch die jeweiligen Einzelsubstanzen beeinflusst werden und keine gegenseitige Hemmung im Sinne einer Konkurrenz um Rezeptoren vorliegt.

3.3 Basic fibroblast growth factor

Auch für bFGF wurde sein neuritogener und positiver Effekt auf Überlebensraten unter Kulturbedingungen insbesondere auf Nervenzellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen (WALICKE, 1988). Wie schon in den Untersuchungen von SCHÄFER (1995) zeigte sich in dieser Studie eine ansteigende Tendenz der Neuritenlänge mit ihrem Maximum bei p10. Hier konnte sogar ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Beim Vergleich der neuritentragenden zu den nicht-neuritentragenden Neuronen zeigt sich allerdings zum Zeitpunkt p10 ein Einschnitt mit deutlich reduzierter Menge an neuritentragenden Neuronen. Dies lässt die Vermutung zu, dass zwar die Neuritogenität von p7 bis p10 erhalten bleibt (um dann wieder bis p14 anzusteigen), die Gesamtanzahl an neuritentragender Neurone aber unter dem Einfluß von bFGF abnimmt.

Die Verzweigungsrate konnte durch den Einsatz von bFGF nicht verbessert werden. Basic FGF (oder auch FGF-2) ist einer von insgesamt 9 Faktoren aus der Familie der Fibroblast growth factors. Mehrfach wurden seine trophischen Effekte auf viele unterschiedliche Neuronenpopulationen beschrieben, wobei Überlebensraten, Neuritenwachstum und die Synthese von Neurotransmittern im positiven Sinne beeinflusst wurden (UNSICKER *et al.*, 1993).

Basic FGF scheint nicht zu jedem Zeitpunkt der postnatalen Entwicklung des enterischen Nervensystems eine entscheidende Rolle zuzufallen. Dies zeigt sich an den Ergebnissen dieser Studie. Während in der frühen postnatalen Phase unter dem Einfluß von bFGF keine Veränderung in der Neuritenlänge oder bei der Verzweigungsrate zu sehen ist, ändert sich das Verhalten zum Zeitpunkt p10 mit deutlich elongierten Neuriten.

Es muss also erst nach einigen Tagen der Entwicklung eine Umdifferenzierung der einzelnen Neurone mit verändertem Ansprechen auf unterschiedliche Neurotrophine vorliegen, die sich im weiteren Verlauf sogar umkehrt und eher ein vermindertes Neuritenwachstum bewirkt.

Auch in der Kombination von GDNF mit bFGF wird die erheblich verminderte Wirksamkeit der Moleküle mit fortschreitendem Alter der Tiere beobachtet, wobei ein

partiell synergistischer Effekt zwischen den beiden Substanzen bestehen muss. Partiiell lediglich deswegen, da bei den Faktoren alleine – insbesondere GDNF – ein ähnlich positives Ergebnis erzielt wird. Mit dem Unterschied, dass gerade wieder in den p10 Kulturen ein signifikant längeres Neuritenwachstum vorliegt. Ein komplett synergistischer Effekt kann hier also ausgeschlossen werden.

Genauere Studien über die Verteilung der FGF's in der Darmwand liegen nicht vor. Lediglich in der Mucosa des Darmes ist die Anwesenheit dieser Differenzierungsfaktoren nachgewiesen (*SAFFREY et al.*, 1994). Über sensorische Nervenfasern zu den submukosal gelegenen Neuronen könnten dadurch positive Einflüsse vermittelt werden.

3.4 Besondere Situationen zum Zeitpunkt P10

Generell zeigt sich bei den Beobachtungen dass die Kulturen der 10 Tage alten Tiere schlechter als die der jüngeren, aber auch der älteren Tiere sind. Eine ähnliche, wenn auch noch nicht signifikante Beobachtung, wurde bei den Darmlängenmessungen gefunden. Bei P10 scheint das Längenwachstum noch einmal einzubrechen (siehe Graphik 4).

Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung muß eine grundlegende Veränderung geschehen, was zum einen durch die nahezu identische Anzahl an neuritentragenden Neuronen – ungeachtet ob Behandlung mit serumfreiem Medium oder mit Neurotrophen -, zum anderen durch stark verminderte Wirksamkeit von GDNF (im Vergleich zu p1 und p5) bei der Neuritenlänge verdeutlicht wird. Andererseits zeigen FGF und insbesondere BDNF deutlich gesteigerte Effekte.

Da es bei diesem Entwicklungsstand zu einer Umstellung der Tiere von der Muttermilch auf feste Nahrungsbestandteile kommt („Weaning“), muß sich also auch ENS and die Funktionumstellung des Darmes anpassen.

Schon frühzeitige Untersuchungen dahingehend zeigen, daß bei der Umstellung der Nahrung von Muttermilch auf feste Nahrungsbestandteile ein beschleunigtes Epithelwachstum verbunden mit einer Hyperplasie der Zotten und Krypten des Dünndarmes auftreten (*KOLDOVSKY et al.*, 1966; *THOMPSON et al.*, 1998; *CUMMINGS et al.*, 2002). Entscheidend wird hier wohl ein Fehlen der in der

Muttermilch vorhandenen neurotrophen Faktoren sein, die bei der Umstellung zu den entsprechenden Veränderungen in der Oberflächenstruktur des Darmes führen. In Vorversuchen konnte die Anwesenheit von GDNF in humaner Muttermilch bereits nachgewiesen werden (SCHÄFER, persönliche Kommunikation). Darüberhinaus findet sich auch eine ganze Reihe weiterer wesentlicher Faktoren in der Muttermilch, wie z.B. TGF- β , welches synergistisch mit GDNF hinsichtlich der Rekrutierung des relevanten ret-Rezeptors ist (PETERZIEL et al., 2002)

Möglicherweise liegt aber auch ein fehlendes Ansprechen der Neurotrophine zum Zeitpunkt p10 vor.

3.5. Synergistische Effekte

Die Einzelwirkungen der Faktoren lassen sich hinsichtlich der Gesamtneuritenlänge innerhalb eines experimentellen Ansatzes durch die Kombination einzelner Faktoren bei den Kulturen von P1-P10 deutlich (bis über 200%) verbessern. Dies konnte bereits für die Kombination von bFGF und Adenosin in enterischen neuronalen Kulturen gezeigt werden (SCHÄFER et al, 1995). Hinsichtlich der durchschnittlichen Neuritenlängen, bzw. der Verzweigungspunkte lassen sich zwar deutliche Tendenzen, jedoch keine signifikanten Unterschiede darstellen. Dies scheint mit auf die im Versuchsansatz gewählte Konzentration der Einzelsubstanz zurückzuführen zu sein. So wurden generell 10 ng/ml Einzelsubstanz gewählt, was insbesondere für die Erfassung synergistischer Effekte zu hoch zu sein scheint. Es ist davon auszugehen, dass bei Absenken der Konzentrationen in Bereiche bei denen die Einzelsubstanz keinen Effekt mehr hat (z.B. GDNF <100pg, SCHÄFER et al, 1999) synergistische Beeinflussungen deutlicher und signifikant hervortreten würden.

4. Funktionsstörungen des Darmes unter Berücksichtigung der Entwicklung des enterischen Nervensystems

Eine Beschwerdesymptomatik in Bezug auf den Darm oder das enterische Nervensystem nimmt im klinischen Alltag oftmals eine zentrale Rolle ein. Dabei sind gerade Kinder immer wieder im Blickpunkt des Interesses. Das Beschwerdebild reicht von gastroösophagealem Reflux, dyspeptischen Syndromen über unspezifische Abdominalschmerzen bis hin zu einem Colon irritabile. Da das enterische Nervensystem nach der Geburt noch reift, werden die funktionellen Störungen konservativ behandelt.

Unter der Reifung des Darmes und des ENS wird häufig eine deutliche Verbesserung der Beschwerdesymptomatik beobachtet. Schwerwiegenderen gastrointestinalen Erkrankungen, welche bereits nachgewiesenermaßen mit histopathologischen Veränderungen des enterischen Nervensystems einhergehen, gilt hier das besondere Augenmerk.

Bereits 1888 wurde von Hirschsprung die nach ihm benannte Krankheit beobachtet, wobei zunächst zwei Patienten mit schwerer Obstipation aufgrund eines Megakolons beschrieben wurden und die eigentliche Ursache – ein aganglionärer Darmabschnitt – nicht erkannt wurde (*HIRSCHSPRUNG*, 1888).

Erst sehr viel später stellte sich heraus, dass der dilatierte Darmabschnitt funktionell intakt und die Ursache der Erkrankung der aganglionärer Darmabschnitt war (*ZUELZER und WILSON*, 1948). Dieser führt zu schwerwiegenden Veränderungen in der Peristaltik des Darmes.

Es gilt nun die Ursache der fehlenden Ganglien zu eruieren. Handelt es sich dabei um eine Störung der Neuralleiste selbst, besteht eine gestörte Mikroumgebung, besteht ein Defizit bei der Migration der Vorläuferzellen bevor die Darmwand erreicht wird oder liegt eine fehlende Differenzierung der Vorläuferzellen nach Erreichen der Darmwand vor?

Letztlich kann es sich auch um eine Mischung aus allen diesen Anteilen handeln. Ein möglicher Einfluß von neurotrophen Substanzen, die zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort einwirken.

Bisher muß bei Diagnose eines Morbus Hirschsprung der betroffene Darmabschnitt einer chirurgischen Intervention mit Resektion des aganglionären Darmsegmentes unterzogen werden. Schwierig dabei ist die Festlegung der Resektionsgrenzen, zumal zwischen Kurz-Segment und Lang-Segment M. Hirschsprung unterschieden werden muß. Nur sehr einzelne Fälle betreffen den gesamten Dickdarm unter Einbeziehung des terminalen Ileums.

Entwicklungsgeschichtlich ist der Nachweis des Einflusses von GDNF bzw. dessen Rezeptors RET – welcher über eine Kaskade unter Anbindung eines Rezeptors GFR- α stimuliert wird – erbracht. Dieser Übertragungsmechanismus ist sowohl bei peripheren als auch zentralen Neuronen sehr wichtig. Es kann sowohl bei in vivo- als auch bei vitro-Versuchen zu einem positiven Einfluß auf die Überlebensrate, zu Differenzierung der Neurone und zu ausgeprägtem Neuritenwachstum führen (*LIN et al. 1993, HENDERSON et al. 1994., MATHESON et al. 1996, ROSENTHAL, 1999*)).

Die Wichtigkeit dieses Übertragungssystems wird an den Versuchen deutlich, bei denen das Gen von GDNF oder dessen Rezeptor unterdrückt wurde (*gdnf^{-/-}, ret^{-/-}*) mit daraus resultierendem Verlust aller enterischen Neurone unterhalb des Ösophagus (*SANCHEZ et al., MOORE et al., PICHEL et al. 1996*).

Am menschlichen Darm wurden bislang noch keine homozygoten Genveränderungen beschrieben.

Alle diese Veränderungen nehmen Bezug auf den sich entwickelnden Darm und die daraus resultierenden Funktionsstörungen. Eine Übertragbarkeit auf das hier vorliegende Modell ist schwer vorzunehmen, da lediglich die postnatalen Einflüsse der Neurotrophine auf das enterische Nervensystem untersucht wurden. Es läßt sich aber aus der Wirksamkeit gerade von GDNF bzw. der noch deutlicheren Ansprechrate auf die Kombination von GDNF mit BDNF konstatieren, dass diesen Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Reifung des ENS zufällt. Inwieweit die Kombination der einzelnen Faktoren oder ihr Übertragungsmechanismus bei der Migration der Vorläuferzellen und deren Differenzierung in der Darmwand einen Einfluss nehmen, bleibt weiter führenden Studien überlassen.

Letztlich besteht das Ziel in einer klinischen Anwendbarkeit der theoretischen Untersuchungen. Noch scheint es nicht möglich neurotrophe Substanzen zu applizieren, um eine entsprechende Antwort bei den Nervenzellen zu erzielen. Es ist allerdings schon möglich aus Kulturen von explantierten Nervenzellen des Darmes Stammzellen zu produzieren, die sich unter Einfluß von unterschiedlichen Geweben in entsprechende Zellen differenzieren. Somit könnte ein therapeutischer Ansatz darin bestehen, dass in aganglionäre Segmente des Darmes Stammzelltransplantationen vorgenommen werden können, die zu einer normalen Entwicklung des Darmes ohne chirurgische Intervention führen (*SCHÄFER*, 1999, 2003, enteric neurospheres). Entsprechende Forschungen hierüber sind bereits unternommen worden, bei denen nach Entnahme von pluripotenten Vorläuferzellen aus dem menschlichen Darm diese in aganglionäre Abschnitte eines erkrankten Darmabschnittes retransplantiert wurden (*RAUCH et al.*, 2005)

Erste Ansätze, Neurone aus dem ENS zur Regeneration zentraler Störungen zu nutzen, wurden bereits in den 90-er Jahren unternommen (*TEW et al*, 1994), so dass davon auszugehen ist, dass das ENS zukünftig als Quelle zur regenerativen Therapie auch im ZNS verwendet werden kann. In diesem Rahmen werden die Einflüsse zusätzlich gewonnener neurotropher Faktoren eine große Rolle spielen.

V ANHANG

1. Literaturverzeichnis

Baetge G, Gershon MD (1989): ***Transient Catechoaminergic (TC) Cells in the Vagus Nerves and Bowel of Fetal Mice: Relationship to the Development of Enteric Neurons.*** Developmental Biology 132, 189 – 211

Baetge G, Pintar JE, Gershon MD (1990): ***Transiently Catecholaminergic (TC) Cells in the Bowel of the Fetal Rat: Precursors of Noncatecholaminergic Enteric Neurons.*** Developmental Biology 141, 353 – 380

Bannerman P, Mirsky R, Jessen K (1988): ***Establishment and properties of separate cultures of enteric neurons and enteric glia.*** Brain Research 440: 99 – 108

Barbacid M (1995): ***Neurotrophic factors and their receptors.*** Current Opinion in Cell Biology 7: 148 – 155

Bottenstein JE, Sato GH (1979): ***Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplement medium.*** Proc Natl Acad Sci ; 76 (1), 514 – 517.

Brookes S (2001): ***Classes of Enteric Nerve Cells in the Guinea-Pig Small Intestine.*** The Anatomical Record 262: 58 – 70

Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, Rosenthal A, Davies AM (1995): ***GDNF Is an Age-Specific Survival Factor for Sensory and Autonomic Neurons.*** Neuron 15: 821 – 826

Carnahan J, Anderson D, Patterson P (1991): ***Evidence That Enteric Neurons May Derive from the Sympathoadrenal Lineage.*** Developmental Biology 148: 552 – 561

Cajal SR: ***El plexo de Auerbach de los batracios. Nota sobre el plexo de Auerbach de la Rana.*** Trab Laborat histol Fac Méd, Barcelona: 23 – 28

Chalazonitis A, Rothman TP, Gershon MD (1994): ***Neurotrophin-3 induces neural crest-derived cells from fetal rat gut to develop in vitro as neurons or glia.*** Journal of Neuroscience 14: 6571 – 6584

Chao MV(1992): ***Neurotrophin Receptors: A Window into Neuronal Differentiation.*** Neuron 9: 583 – 593

Choi-Lundberg DI, Bohn MC (1995). ***Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat.*** Brain Research. Developmental Brain Research. Mar 16; 85 (1): 80 - 88

Cochard P, Goldstein M, Black IB ((1978): ***Ontogenetic appearance and disappearance of tyrosin hydroxylase and catecholamines in the rat embryo.*** Proc Natl Acad Sci USA Jun; 75(6):2986 - 2990

Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ (1996): ***Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum.*** Neuroscience; 75: 949 – 967

Cummings AG, Thompson FM (2002): ***Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of small intestine in humans.*** Gut; 51: 748 - 754

Drasch O: ***Beiträge zur Kenntnis des feineren Baues des Dünndarms, insbesondere über die Nerven desselben.*** Sitz Ber Akad Wiss (Wien), Math-Naturw KI AbtIII 82: 162 - 198

Dogiel A.S.: ***Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere.*** Arch.Anat.Phys.Anat.Abt.(Lpz),1899, 130 – 158

Ebendal T, Tomac A, Hoffer BJ, Olson L (1995): ***Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Stimulates Fiber Formation and Survival in Cultured Neurons From Peripheral Autonomic Ganglia.*** Journal of Neuroscience Research 40: 276 – 284

Eccleston PA, Jessen KR, Mirsky R (1987). ***Control of peripheral glial cell proliferation: a comparison of division rates of enteric glia and Schwann cells and their response to mitogens.*** Developmental Biology, Dec; 124(2): 409 – 417

Eckenstein et al (1994)

Ernfors P, Lee K-F, Jaenisch R (1994): ***Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits.*** Nature 368: 147 – 150

Fariñas I, Jones KR, Backus C, Wang XY, Reichardt LF (1994): ***Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3.*** Nature 369: 658 – 661

Furness JB, Costa M (1980): ***Types of nerves in the enteric nervous system.*** Neuroscience 5: 1 – 20

Furness JB, Costa M (1987): ***The enteric nervous system.*** Glasgow: Churchill Livingstone,

Furness JB, Johnson PJ, Pompolo S, Bornstein JC (1995): ***Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine.*** Neurogastroenterology Motil. 7: 89 – 96

Furness JB (2000): ***Types of neurons in the enteric nervous system.*** Journal of Autonomic Nervous System 81: 87 – 96

Gabella G (1971): ***Glial cells in the myenteric plexus.*** Z Naturforsch B. 26(3): 244 – 245

Gabella G (1981): ***Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells.*** Neuroscience 6(3): 425 – 436

Gershon MD, Chalazonitis A, Rothman P (1993): ***From Neural Crest to Bowel: Development of the Enteric Nervous System.*** Journal of Neurobiology 24(2): 199 – 214

Gershon MD (1997): ***Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system.*** Current Opinion in Neurobiology 7: 101 – 109

Giehl KM, Schacht C, Yan Q, Mestres-Ventura P (1998): ***Infusion of GDNF into the cerebral spinal fluid through two different routes: effects on body weight and corticospinal neuron survival.*** Neuroreport 9: 2809 – 2813

Hartnick CJ, Staecker H, Malgrange B, Lefebvre PP, Liu W, Moonen G, Van De Water TR (1996): ***Neurotrophic Effects of BDNF and CNTF, on Postnatal Day 5 Rat Acoustic Ganglion Neurons.*** Journal of Neurobiology 30: 246 – 254

Henderson CE, Phillips H, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simpson LC, Moffet B, Vandlen RA, Koliatsos VE, Rosenthal A (1994): ***GDNF: A Potent Survival Factor for Motoneurons Present in Peripheral Nerve and Muscle.*** Science 266: 1062 – 1064

Hirschsprung H (1888): ***Stuhlträgheit Neugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Colons.*** Jahrbuch Kinderheilkunde 27: 1 – 7

Hofer MM, Barde Y-A (1988): ***Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo.*** Nature 331: 261 – 262

Höpker VH, Saffrey MJ, Burnstock G (1994): ***Myenteric plexus explants promote neurite elongation and survival of striatal neurons in vitro.*** Brain Research 648: 332 – 336

Hoyle CHV, Burnstock G (1989): ***Neuromuscular transmission in the gastrintestinal tract.*** In: JD Wood, ed. Handbook of Physiology, Sect.6: The Gastrointestinal System, Volume 1: Motility and Circulation. Washington: American Phsiological Society, 435 – 464

Jessen KR, Saffrey J, Baluk P, Hanani M, Burnstock G (1983): ***The enteric Nervous System in Tissue culture. III. Studies on Neuronal Survival and the Retention of Biochemical and Morphological Differentiation.*** Brain Research 262: 49 – 62

Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis J-C, Hu S, Altrock BW, Fox GM (1996): ***GDNF-induced Activation of the Ret Protein Tyrosine Kinase Is Mediated by GDNFR-a, a Novel Receptor for GDNF.*** Cell 85: 1113 – 1124

Jonakit GM, Wolf J, Cochard P, Goldstein M, Black IB (1979) ***Selective loss of noradrenergic phenotypic characters in neuroblasts of the rat embryo.*** Proc Natl Acad Sci USA, Sep; 76(9): 4683 - 4686

Jones K, Fariñas I, Backus C, Reichardt LF (1994): ***Targeted Disruption of the BDNF Gene Perturbs Brain and Sensory Neuron Development but Not Motor Neuron Development.*** Cell 76: 989 – 999

Karaosmanoglu T, Aygun B, Wade PR, Gershon MD (1996): ***Regional Differences in the Number of Neurons in the Myenteric Plexus of the Guinea Pig Small Intestine and Colon: An Evaluation of Markers Used to Count Neurons.*** The Anatomical Record 244: 470 – 480

Kerekes N, Landry M, Rydh-Rinder M, Hökfelt T (1997): ***The effect of NGF, BDNF and bFGF on expression of galanin in cultured rat dorsal root ganglia.*** Brain Research 754: 131 – 141

Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long LK, Auerbach BA, Joyner AL, Barbacid M (1993): **Targeted disruption of the *trkB* neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death.** *Cell* 75(1): 113 – 122

Koldovsky O, Sunshine P, Kretchmer N (1966): **Cellular migration of intestinal epithelia in suckling and weaned rats.** *Nature*, 212: 1389 – 1390

Le Douarin NM, Teillet MA (1973): **The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo.** *J Embryol. Exp.Morphol.* 30: 31 – 48

Levi-Montalcini, R (1987): **The nerve growth factor: thirty-five years later.** *Science* 237, 1154 – 1164

Lin L-F, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993): **GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons.** *Science* 260: 1130 – 1132

März P, Heese K, Dimitriades-Schmutz B, Rose-John S, Otten U (1999): **Role of Interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression.** *Glia* 26(3): 191 – 200

Massagué J (1996): **Crossing receptor boundaries.** *Nature* 382: 29 – 30

Matheson CR, Carnahan J, Urich JL, Zhang TJ, Yan Q (1996): **Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Is a Neurotrophic Factor for Sensory Neurons: Comparison with the Effects of the Neurotrophins.** *Journal of Neurobiology* 32: 22 –32

Moore MW, Klein RD, Fariñas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver.Moore K, Rosenthal A (1996): **Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF.** *Nature* 382: 76 – 79

Mulholland MW, Romanchuk G, Flowe K (1991): ***Dendritic Outgrowth of Myenteric Plexus Neurons in Primary Culture.*** Journal of Surgical Research 52: 320 – 327

Müller E (1892): ***Zur Kenntnis der Ausbreitung und Endigungsweise der Magen-, Darm- und Pankreasnerven.*** Arch Mikroskop Anat 40: 390 – 408

Nakabayashi H, Taketa K, Yamane T, Miyazaki M, Miyano K, Sato J (1984): ***Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium.*** Japanese Journal of Cancer Research; 75 (2): 151 - 158

Nishi R (1994): ***Neurotrophic Factors: Two Are Better Than One.*** Science 265: 1052 – 1053

Peterziel H, Unsicker K, Krieglstein K (2002): ***TGF beta induces GDNF responsiveness in neurones by recruitment of GFR alpha to the plasma membrane.*** Journal of cell biology 14;159(1): 157 - 167

Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm A-C, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H (1996): ***Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF.*** Nature 382: 73 – 76

Puri P (2003): ***Intestinal neuronal Dysplasia.*** Semin Pediatr Surg. Nov, 12(4): 259 – 264

Rauch U, Haensgen A, Hagl C, Holland-Cunz S, Schäfer KH (2005): ***Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis.*** International Journal of Colorectal Disease

Rosenthal A (1999): ***The GDNF protein family: gene ablation studies reveal what they really do and how.*** Neuron 22: 201 – 203

Saffrey MJ, Bailey DJ, Burnstock G (1991): ***Growth of enteric neurons from isolated myenteric ganglia in dissociated cell culture.*** Cell and Tissue Research 265: 527 – 534

Saffrey MJ, Hassall CJS, Allen TGJ, Burnstock G (1992): ***Ganglia within the Gut, Heart, Urinary Bladder, and Airways: Studies in Tissue Culture.*** International Review of Cytology 136: 93 – 144

Saffrey MJ, Burnstock G (1994): ***Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system.*** Journal of Autonomic Nervous System 49: 183 – 196

Saffrey MJ, Wardhaugh T, Walker T, Daisley J, Silva AT (2000): ***Trophic actions of neurotrophin-3 on postnatal rat myenteric neurons in vitro.*** Neuroscience Letters 278(3): 133 – 136

Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisén J, He B, Lira SA, Barbacid M (1996): ***Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF.*** Nature 382: 70 – 73

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

Schäfer KH, Jung M, Mestres P (1998): ***Protein extracts from the gut wall influence the postnatal development of the rat myenteric neurons in vitro.*** Neuroscience Letters 244:

177 – 179

Schäfer KH, Mestres-Ventura P (1999): ***The GDNF-induced neurite outgrowth and neuronal survival in dissociated myenteric plexus cultures of the rat small intestine decreases postnatally.*** Experimental Brain Research 125: 447 – 452

Schäfer KH, Saffrey J, Burnstock G, Mestres-Ventura P (1997): ***A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract.*** Brain Research Protocols 1: 109 – 113

Schäfer KH, Saffrey J, Burnstock (1995): ***Trophic actions of 2-chloroadenosin and b-FGF on cultured myenteric neurons.*** Neuro Report 6: 937 – 941

Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V (1994): ***Defect in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret.*** Nature 367: 380 – 383

Sendtner M, Holtmann B, Hughes RA (1996): ***The Response of Motoneurons to Neurotrophins.*** Neurochemical Research 21: 831 – 841

Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde Y-A (1992): ***Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section.*** Nature 360: 757 – 759

Simeone DM, Romanchuk G, Mulholland W (1994): ***Dual pathways regulate neurite outgrowth in enteric ganglia.*** American Journal of Physiology 30: G723 – G729

Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, Kong LK, Briant S, Lewin A, Lira SA, Barbacid M (1994): ***Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene.*** Nature 368 : 246 – 249

Stach W (1989): ***A revised morphological classification of neurones in the enteric nervous system.*** In: Singer MV, Goebell H, editors: Nerves and the gastrointestinal tract. Lancaster, UK: Kluwer Academic Publishers, 29 - 45

Stromberg I, Bjorklund L, Johansson M, Tomac A, Collins F, Olson L, Hoffer B, Humpel C (1993): ***Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo.*** Experimental neurology 124: 401 – 412

Teitelmann G, Joh TH, Reis DJ (1981). ***Transformation of catecholaminergic precursors into Glucagon (A) cells in mouse embryonic pancreas.*** Proc Acad Natl Sci USA. Aug;78(8): 5225 - 5229

Tew EM, Anderson PN, Saffrey MJ, Burnstock G (1994): ***Transplantation of the postnatal rat myenteric plexus into the adult rat corpus striatum: an electron microscopic study.*** Experimental Neurology 129: 120 – 129

Thoenen H, Barde YA (1980). ***Physiology of nerve growth factor.*** Physiological reviews Oct. 60(4); 1284 - 1335

Thompson FM, Catto-Smith AG, Moore D (1998): ***Epithelial growth of the small intestine in human infants.*** Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 26: 506 - 512

Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J (1983): ***PGP 9,5- a new marker for vertebrate neurones and neuroendocrine cells.*** Brain Res 278: 224 – 228

Tomac A, Lindqvist E, Lin LH, Orgon SO, Young D, Hoffer B, Olson L (1995): ***Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo.*** Nature 373: 335 – 339

Trava J (1994): ***Glial: The Brain's Other Cells***. Science 266: 970 – 972

Treanor JJS, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips H, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A (1996): ***Characterization of a multicomponent receptor for GDNF***. Nature 382: 80 – 83

Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson A-S, Sieber B-A, Grigoriou M, Kilkenny C, Salazar-Gruoso E, Pachnis V, Arumäe U (1996): ***Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene***. Nature 381: 785 – 789

Unsicker K, Reichert-Preibsch H, Schmidt R, Pettmann B, Labourdette G, Sensenbrenner M (1987): ***Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons***. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 5459 – 5463

Unsicker K, Grothe C, Lüdecke G (1993): ***Fibroblast growth factors: their roles in the central and peripheral nervous system***. In: Loughlin SE and Fallon JH, eds. Neurotrophic factors. San Diego: Academic press: 313 – 338

Vanner S, Surprenant A (1996): ***Neural reflexes controlling intestinal microcirculation***. American Journal of Physiology; 271: G223 – G230

Von Boyen GBT, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer K-H, Adler G, Kirsch J (2004): ***Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia***. Gut; 53: 222 - 228

Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, Guillemin R (1986): ***Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension***. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 3012 – 3016

Walicke PA (1988): **Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions.** Journal of Neuroscience 8(7): 18 – 27

Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Terao S, Mitsuma T (1996): **Expression of mRNAs for Neurotrophic Factors (NGF, BDNF, NT-3 and GDNF) and Their Receptors (p75^{NGFR}, TrkA, TrkB, and TrkC) in the Adult Human Peripheral Nervous System and Nonneural Tissues.** Neurochemical Research 21: 929 – 938

Yntema CL, Hammond WS (1954): **The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo.** Journal of Comparative Neurology 101: 515 – 542

Young HM, Bergner AJ, Anderson RB, Enomoto H, Milbrandt J, Newgreen DF, Whittington PM (2004): **Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut.** Developmental biology 270: 455 – 473

Zuelzer WW, Wilson JL (1948): **Functional intestinal obstruction on a congenital neurogenic basis in infancy.** Am J Dis Childh 75: 40 – 64

Zurn AD, Baetge EE, Hammang JP, Tan SA, Aebischer P (1994): **Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons.** NeuroReport 6: 113 – 118

Zurn AD, Winkel L, Menoud A, Djabali K, Aebischer P (1996): **Combined Effects of GDNF, BDNF and CNTF on Motoneuron Differentiation In Vitro.** Journal of Neuroscience Research 44: 133 – 141

2. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin Triphosphat
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serumalbumin
2 CA	2- Chloradenosin
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CNTR α	Ciliary neurotrophic factor receptor α
DM	Definiertes Medium
GDNF	Glial cell-line derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
ENS	Enterisches Nervensystem (oder enteric nervous system)
E 1 – 10	Embryonalzeit Tag 1 – 10
GFAP	Gliales fibrilläres Protein
5-HAT	5-Hydroxytryptamin
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin 6
MDT	Magen-Darm-Trakt
NGF	Nerve growth factor
NT 3	Neurotrophin 3
NT 4/5	Neurotrophin 4/5
P75 NTR	Neurotrophinrezeptor
PNS	Peripheres Nervensystem
P 1 – 15	Postnatalzeit Tag 1 – 15
PGP 9,5	Protein G-product 9,5
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
TGF- β	Transforming growth factor β
TrK A,B,C	Tyrosinkinase-Rezeptor A,B,C
ZNS	Zentrales Nervensystem

3. Herstellung der Poly-L-Lysin beschichteten Coverslips

- Autoklavierung der 13mm durchmessenden Deckplättchen
- Ausgiebiges Spülen der Deckplättchen zur Erzielung vollkommener Fettfreiheit in einer Lösung aus 70%-igem Ethanol mit 1%-iger Salzsäure (HCl)
- Ansetzen der Poly-L-Lysin-Lösung in einem Verdünnungsverhältnis von 1:50 (SIGMA P1524, 1mg/ml)
- Herausnehmen der Deckplättchen, Abschütteln der Spüllösung und Einbringen in die Poly-L-Lysin-Lösung für 10 Minuten
- Unter dem Abzug Entnahme der Deckplättchen mit einer sterilen Pinzette (Dumont Nr.5).
- Abschütteln der restlichen Beschichtung
- Aufstellen der Deckplättchen in einer sterilen Petrischale zur Trocknung
- Aufbewahrung nach der vollständigen Trocknung in einer sterilen Umgebung

4. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Karl-Herbert Schäfer für die Bereitstellung des Themas. Während der gesamten Zeit war er mir immer beratend zur Seite gestanden und hat für mich auch einiges an Freizeit – die ihm nicht üppig zur Verfügung steht – opfern müssen.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts der Universitätskliniken des Saarlandes (Homburg/Saar) bedanken, insbesondere bei Herrn Norbert Pütz, der mir die Techniken der Immunhistochemie beibrachte und auch immer ein Ansprechpartner bei Problemen war. Frau Gabi Kiefer war geduldig bei meinen Versuchen, Semidünnschnitte anzufertigen (die ich letztendlich doch nicht benötigte).

Herrn Prof.Dr. Pedro Mestres möchte ich für die Bereitstellung seiner Ausrüstung danken.

Mein weiterer Dank gilt meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit immer wieder ermutigten und ohne deren Hilfe ich meine Dissertation wahrscheinlich längst aufgegeben hätte.

Dies gilt auch für Herrn Dr. Holger Gögelein, der die Arbeit Korrektur gelesen und mit kritischen Anmerkungen zur Verbesserung beigetragen hat.

Frau Dr. Silke Müller konnte mir bei der Erstellung des Layout großartige Hilfe leisten, da sie erst kürzlich Ihre eigene Dissertation beendete und sich deswegen in diesen Dingen hervorragend auskannte. Herzlichen Dank dafür.

5. Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Matthias Andreas Lintz
Geburtsdatum/-ort: 25. August 1968 in Zweibrücken
Eltern: Werner Daniel Lintz, Vizepräsident des
OLG a.D., geb. am 30. Dezember 1929 in
Edenkoben/Pfalz
Gabriele Lintz, Hausfrau, geb. am 30. Mai 1935
in Neustadt an der Weinstraße

Schulbildung

1975 – 1979: Grundschule (Hilgardschule) Zweibrücken
1979 – 1988: Staatliches Herzog-Wolfgang-Gymnasium
Zweibrücken

Studium

1988 - 1994: Medizinstudium an den Universitätskliniken
des Saarlandes (Homburg/Saar)
1994: Wechsel an die Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg zur Absolvierung des Praktischen
Jahres am Akademischen Lehrkrankenhaus
der Universität Freiburg
Villingen-Schwenningen
November 1995: Examen zum 3. Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung

Beruflicher Werdegang

seit 01.05.1998:	Arzt in der Fachweiterbildung für Urologie Schwarzwald-Baar Klinikum Villingen- Schwenningen GmbH, Klinik für Urologie und Kinderurologie Absolvierung des Chirurgischen Jahres durch Rotation innerhalb der Klinik vom 01. Februar 2001 bis zum 31. Januar 2002.
Januar 2004:	Ablegen der fachärztlichen Prüfung Gebietsbezeichnung „Urologie“
01/2004 – 06/2006	Weiterbildung mit Schwerpunktthema der „speziellen operativen Urologie“.
Seit Juli 2006	Niedergelassen als Facharzt für Urologie in Villingen-Schwenningen

Villingen-Schwenningen, den 09. November 2008

Matthias Lintz