

# 1 EINFÜHRUNG

## 1.1 Gliederung des peripheren Nervensystems

Ende des 19. Jahrhunderts gab es zwei Ansichten zum Aufbau des Nervensystems. Golgi (1894) hielt es für ein weitverzweigtes, nicht unterbrochenes Netzwerk, während Cajal (1909) Nervenzellen mit Nervenfortsätzen und "Nervenendknospen" beschrieb. 1891 gab Waldeyer-Hartz den deutlich unterscheidbaren Einheiten den Begriff "Neuron" (Toellner, 1986). Der Neuron-Theorie folgend besteht eine Signalvermittlung durch die Nervenzellen. Aufgrund anatomischer wie physiologisch-pharmakologischer Untersuchungen wurde von Gaskell und Langley die auch noch heute akzeptierte Gliederung des vegetativen Nervensystems vorgenommen.

Der Begriff autonomes Nervensystem (ANS) geht auf die Beschreibung Langleys (1898) zurück. Das ANS beinhaltet alle efferenten Signalsysteme zur Steuerung der unwillkürlich innervierten Gewebe wie Herz, Drüsen, glatte Muskulatur der visceralen Organe und Gefäße. Das autonome Nervensystem besteht aus Sympathikus, Parasympathikus und dem enterischen Nervensystem. In vielen experimentellen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Nervenfasern autonomer Nervenzellen in bestimmten Hirnnervenkernen und sakralen Rückenmarksegmenten Signale leiten, die in der Regel das Gegenteil dessen bewirken, was durch die Signale der Nervenfasern der Seitenhornzellen im thorakolumbalen Rückenmarksegmenten geschieht. Aus funktionellen Gründen werden daher die kranialen und sakralen Nervenzellgruppen als Parasympathikus und die thorakolumbalen Nervenzellen als Sympathikus zusammengefasst. Gemeinsam ist beiden Systemen, dass die das zentrale Nervensystem in Hirnnerven bzw. ventralen Wurzeln verlassenden Nerven vor Erreichen des Erfolgsorgans in Ganglien umgeschaltet werden. Daher sind prä- von postganglionären Axonen zu unterscheiden. Die Zellkörper der parasympathischen Fasern sind im Hirnstamm und im Sakralmark lokalisiert. Die Fasern aus dem Hirnstamm laufen im III. Hirnnerv über das Ganglion ciliare zum Auge, im VII. Hirnnerv über das Ganglion

pterygopalatinum zu den Tränendrüsen und den Drüsen der Nase, sowie über das Ganglion submandibulare zu den Speicheldrüsen des Mundbodens, im IX. Hirnnerv verlaufen sie über das Ganglion oticum zur Glandula parotidea, und im X. Hirnnerven, demjenigen mit dem größten Anteil an parasymphatischen Fasern, zu den Brust- und Bauchorganen. Die Neurone des sakralen parasymphatischen Anteils versorgen den distalen Dickdarm, die ableitenden Harnwege und den Genitaltrakt.

Das anatomische Korrelat des sympathischen Nervensystems sind die Seitenhornzellen in dem thorakolumbalen Rückenmarksegmenten (Gaskell 1886). Sie setzen sich peripher in sympathischen Ganglienketten als paravertebrale Grenzstränge von der Schädelbasis bis zum Steißbein fort und bestehen weiter aus den prävertebralen Ganglien (Plexus coeliacus, mesentericus superior et inferior, aorticorenalis, hypogastricus superior et inferior).

Langley und Dickinson (1889) entdeckten die lähmende Wirkung des Nikotins auf Zellen in sympathischen Ganglien. So konnten sie die Signalübermittlung lokalisieren und konnten folglich deren Nervenzellen erstmals in "prä-" beziehungsweise "postganglionäre Neurone" differenzieren.

Viszero-afferente Nervenfasern gehören im ursprünglichen System Langleys nicht zum ANS, obwohl er 1900 die Modulation von viszeralen Reflexen durch Schmerzimpulse in den Eingeweiden beschrieb.

## 1.2 Neurotransmission im PNS

In weiteren Untersuchungen zur Neurotransmission differenzierte Dale (1933) die Übertragungsweise in "adrenerg" und "cholinerg". Dabei bezog Dale adrenerg bzw. cholinerg ursprünglich lediglich auf postganglionäre Fasern. Es zeigte sich jedoch, dass Acetylcholin (ACh) auch an präganglionären Fasern und Ganglienzellen als Botenstoff fungiert.

Im efferenten sympathischen Teil des ANS konnten Adrenalin und das ihm eng verwandte

Noradrenalin als neuronale Botenstoffe identifiziert werden. Eine herausragende Funktion des Adrenalins ist die als Hormon; in der Marksubstanz der Nebennieren synthetisiert und als Sekret ins Blut abgegeben, bewirkt es eine Verengung der Blutgefäße, eine Beschleunigung des Herzschlages, eine Erhöhung des Blutzuckergehaltes und eine Hemmung der Darmmotilität.

Als wichtigster Neurotransmitter im parasympathischen System ist dagegen Acetylcholin anzusehen. An den Endigungen der präganglionären Axone des 1. Neurons von Sympathikus und Parasympathicus dient Acetylcholin als Mediator. Die Impulsübertragung von den postganglionären parasympathischen Neuronen auf die Erfolgsorgane geschieht ebenfalls durch Acetylcholin, und zwar, im Gegensatz von der Übertragung von prä- auf postganglionär durch nicht-nikotinische Rezeptortypen. Die Signalübertragung auf die Erfolgsorgane im sympathischen System verläuft dagegen (mit Ausnahme der Schweißdrüsen) mittels Noradrenalin.

Durch morphologische und neurophysiologische Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass in den Axonen die Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert werden. Durch elektrische Impulse (Aktionspotentiale) kommt es zur Verschmelzung von Vesikeln mit den Zellmembranen und zur Freisetzung der chemischen Substanzen, die dann einen mikroskopisch kleinen Spalt, die Synapse, überwinden und sich mit Rezeptoren der postsynaptischen Membran verbinden. Im Anschluss findet eine Inaktivierung des Stoffs durch enzymatischen Abbau oder Wiederaufnahme in die Nervenendigung statt. Eine solche Übertragung von nervalen Impulsen stellt bis heute die Neurotransmission im klassischen Sinn dar.

Während lediglich die Grundlagen bezüglich der Nervenversorgung und der Neurotransmitter im efferenten parasympathischen und sympathischen Nervensystem gut erklärt und dokumentiert sind (Kuntz 1953), bestehen bis heute noch Defizite im Verständnis der neuronalen Steuerung im enterischen Nervensystem. Insbesondere blieb die Vermittlung von relaxierenden Mediatoren unklar. Deshalb postulierten Burnstock et al. 1963 (siehe auch Burnstock 1970, 1986a,b) die Existenz von "NANC"- (non-adrenerg-non-cholinerg)

Neuronen. Das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) und das ubiquitär vorhandene Adenosintriphosphat (ATP) gelten als NANC-Transmitter (Hoyle and Burnstock 1986, 1989). Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von Stickstoffmonoxid als NANC-Neurotransmitter haben in den letzten Jahren das Verständnis der Erregungsübertragung im peripheren Nervensystem wesentlich erweitert.

### 1.3 Synthese von Stickstoffmonoxid und Aufbau der Stickoxidsynthase

Das Radikal Stickstoffmonoxid (NO), welches zuerst als toxische Substanz z.B. im Rahmen der unspezifischen zellulären Immunität bekannt wurde, ist ein vielseitiger Mediator von physiologischen Prozessen. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen können nach Stimulation durch bakterielle Substanzen (Lipopolysaccharide, Endotoxin) oder Interferon NO bilden und Bakterien oder Tumorzellen zerstören (Hibbs et al. 1987). Im Körper entsteht das aus zwei Atomen bestehende Molekül durch das kompliziert aufgebaute Enzym Stickoxidsynthase (NOS). Dieses katalysiert die Bildung von NO aus einer für den Menschen essentiellen Aminosäure. L-Arginin wird dabei in Citrullin und NO überführt. Dieser Reaktionsvorgang konnte besonders durch Hibbs (1987) erklärt werden. Hibbs zeigte, dass Makrophagen ihre zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen in Kultur verlieren, wenn ihnen das Substrat Arginin entzogen wird. Er wies auch nach, dass bei der Reaktion Citrullin und Nitrate entstehen.

Drei Isoformen des Enzyms konnten kloniert werden. Die neuronale Form (Typ I, nNOS) und die endotheliale Form (Typ III, eNOS) benötigen  $\text{Ca}^{++}$  und Calmodulin zur Aktivität (Knowles et al. 1988). Das Vorkommen dieser Isoform der NOS wurde schon 1980 unwissentlich von Furchgott und Zawadzki in einer 1998 mit dem Nobelpreis gewürdigten Arbeit beobachtet. Sie stellten fest, dass nach Herauslösen des Endothels keine Gefäßerweiterung durch Acetylcholin eintritt und postulierten daraufhin einen "endothelium-derived relaxing factor, EDRF". Später (1987) konnten dann Ignarro et. al. und Palmer et al.

nachweisen, dass das durch die eNOS synthetisierte NO mit dem postulierten EDRF identisch ist,

Die induzierbare NOS-Form (iNOS, Typ II) wird im Gegensatz zu Typ I und III transskriptionell durch Zytokine und andere Mediatoren im Rahmen eines infektiösen Geschehens de novo synthetisiert und aktiviert. Diese Isoform dient nicht in der Neurotransmission, sondern der unspezifischen zellulären Immunabwehr (Marletta, 1989).

Durch die Isolierung des Enzyms aus Hirngewebe (Bredt und Snyder, 1990b; Mayer et al. 1990) konnte ein Monomer von 150 kd identifiziert werden. Neben den Bindungsstellen für Calmodulin und  $\text{Ca}^{++}$  fand sich eine weitere für Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH).

Die Klonierung des Gens (Bredt et al. 1991) und die Bestimmung der Aminosäure-Sequenz zeigten zudem Bindungsstellen für Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) sowie Flavinmononucleotid (FMN) und ließ eine Homologie zu der Cytochrom-P-450-Reduktase erkennen. Es konnten weiterhin Bindungsstellen für Eisen und Tetrahydrobiopterin gefunden werden (Mayer et al. 1991).

#### 1.4 Enzymatischer Reaktionsablauf

Bereits 1974 stellten Ferrendelli et al. fest, dass durch die Stimulation eines an Nervenzellen vorhandenen Rezeptors (N-Methyl-D-Aspartat) Ionenkanäle geöffnet werden, woraus wiederum ein intrazellulärer Kalziumeinstrom resultiert, der zu einem Anstieg an zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führt.

Bredt und Snyder zeigten 1989, dass infolge einer Bindungsreaktion am N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) sich das Verhältnis der Umwandlung von Arginin zu Citrullin und Stickoxid in gleicher Höhe ändert wie die Konzentration von cGMP. Demzufolge wurde ein Regulationsmechanismus postuliert, der mit der Bindung von Glutamat am NMDA-Rezeptor an der Zellmembran beginnt. Nach dem folgenden

Kalziumeinstrom bindet sich intrazelluläres Calmodulin an NOS. Es werden nun, wie in der Reaktion des Cytochroms P-450, Elektronen von NADPH zu den Flavinen FAD und FMN und auf das im Enzym vorhandene Häm übertragen, welche dann mit molekularem Sauerstoff in der Reaktion umgesetzt werden (Marletta 1994; Bredt und Snyder 1994).

Das synthetisierte NO aktiviert seinerseits die lösliche Guanylatcyclase (sGC) und es wird zyklisches GMP gebildet. Dies ist wiederum in der Lage den Aktivitätszustand von Proteinkinasen und die Struktur von Ionenkanälen zu steuern (Vincent 1994). Die Funktion des Tetrahydrobiopterins ist dabei noch nicht eindeutig geklärt (Giovanelli et al. 1991); Hevel und Marletta (1992) formulierten eine Stabilisierung von L-Arginin in der Enzymbindung. Der erste Hinweis darauf, dass NO eine Bedeutung in der Neurotransmission besitzt, wurde 1988 von Garthwaite et al. gegeben. Sie konnten nachweisen, dass der durch Glutamatanaloga (wie der synthetischen Aminosäure NMDA) in zerebellaren Purkinje-Zellen hervorgerufene Anstieg des cGMP durch EDRF hervorgerufen wird.

Nachdem die Identität von EDRF mit NO entdeckt, das synthetisierende Enzym gereinigt und spezifische Hemmstoffe (wie Methylarginin, Nitroarginin) beschrieben waren, konnten physiologische Experimente an der glatten Muskulatur des Intestinums die Blockierung der nonadrenergen-noncholinergen (NANC) Relaxierung durch Inhibitoren der NOS feststellen und damit NO als NANC-Transmitter etablierten (Bult et al. 1990; Boeckxstaens et al. 1991a; Tottrup et al. 1991).

Frühe histochemische Studien zu Dehydrogenasen im Nervensystem hatten gezeigt, dass die Reduktion des Chromogens Nitroblau Tetrazolium in Gegenwart von NADPH zum Nachweis von "solitary active cells" führte (Thomas and Pearse 1961). Da die Stickoxidsynthase in Nervenzellen NO und Citullin aus L-Arginin nicht bloß unter Regulation von Calmodulin katalysiert, sondern nur bei zusätzlicher Anwesenheit des Kofaktors NADPH, ist zu vermuten, dass in den Arbeiten von Thomas und Pearse die NADPH-Diaphorase-Aktivität zumindest teilweise auch durch NOS erzielt wurde.

## 1.5 Kolokalisation zu anderen Neurotransmittern

Scherer-Singer et al. identifizierten 1983 in Versuchen an aldehyd-fixiertem Hirngewebe mit Hilfe der NADPH-Diaphorase (NADPHd) deutlich neuronale Strukturen ("Golgi like image") und bestimmten Gruppen von Neuronen in verschiedenen Hirnregionen. Es folgten nun Studien, die NADPHd (NADPH-Diaphorase) positive Neurone im ZNS detailliert beschrieben und Kolokalisationen zu bekannten Neurotransmittern feststellten. Im Striatum fand sich eine vollständige Kolokalisation zu Neuropeptid Y (NPY) (Vincent et al. 1983; Vincent und Johansson, 1983), während im cerebralen Cortex nur eine Subpopulation mit Somatosatin und NPY in Kolokalisation zu finden ist (Vincent, 1986). Zudem konnten diese Autoren Neurone des Hirnstamms erkennen, die neben NADPH-Diaphoraseaktivität Substanz P, Corticotropin-Releasing-Faktor und Bombesin enthalten. In identischen amakrinen Zellen der Retina identifizierten Vaney und Young (1988) NADPH Diaphorase und Gamma-Amino-Buttersäure (GABA).

Hope et al. zeigten 1991, dass die neuronale NADPH-Diaphorase-Aktivität im zentralnervösen Gewebe der Ratte biochemisch offenbar untrennbar von der Stickoxidsynthase ist, daher mit dieser molekular identisch sein muss und NADPH-Diaphorase damit eine histochemische Nachweis-Reaktion bzw. ein Marker für NOS darstellt. Dawson et al. (1991) bestätigten dies in Untersuchungen, in denen die NADPH-Diaphorase-Aktivität und Messenger RNA der Stickoxidsynthase kolokalisiert wurden und beschrieben ebenfalls die NADPHd als mit der Stickoxidsynthase des zentralen und peripheren Nervengewebes identisch.

## 1.6 Spezifität der Antisera versus NADPH-Diaphorase-Aktivität

In Ermangelung spezifischer Antisera folgten viele Studien, die anhand der histochemischen Markierung NOS enthaltende (nitroerge) Zellen untersuchten und zudem

parallel immunzytochemisch die Kollokalisierung mit bekannten Neurotransmittern beschrieben.

Die Spezifität der NADPHd für nNOS soll nach Fixation mit Formaldehyd deutlich erhöht sein (Nakos et al. 1994), lässt aber dennoch die Möglichkeit einer positiven Reaktivität anderer NADPH-haltiger Enzyme erkennen. So konnten auch im mesencephalen Trigemuskern und Bulbus olfactorius der Schildkröte zwar mittels NADPHd markierte Nervenzellen detektiert werden, eine Immunreaktivität stellte sich jedoch nicht ein (Brüning et al. 1994d). Somit ist zu fordern, dass die Markierung durch die Diaphorase-Reaktion zumindest exemplarisch in dem untersuchten Gewebe mittels spezifischer Antikörperbindung überprüft wird.

## 1.7 Steuerbarkeit und Funktion von NOS

Die für einen Neurotransmitter bisher als unkonventionell betrachtete Signalvermittlung durch ungehinderte Diffusion eines extrem instabilen und reaktionsfreudigen freien Radikals steht im Gegensatz zu anderen Überträgerstoffen, die in Vesikeln gespeichert vorliegen und auf ein Aktionspotential hin ausgeschüttet werden. Daher muss man davon ausgehen, dass, im Gegensatz zu klassischen Neurotransmittern, wo der Wirkort präsynaptisch durch die Speicherung in Vesikeln und postsynaptisch durch die Expression spezifischer Rezeptoren festgelegt wird, im Falle von NO der Wirkort durch in der Nähe der NOS vorhandene Effektormoleküle, wie der Guanylat-Cyclase, definiert wird. Hierbei kann das Effektormolekül sowohl in benachbarten Zellen als auch in der NO-bildenden Zelle selbst liegen (parakriner bzw. autokriner Mechanismus).

Was das synthetisierende Enzym betrifft, so erscheint es aufgrund der vielen möglichen Bindungsstellen (Calmodulin-Rezeptor, FMN, FAD, NADPH, Häm) und der organspezifischen Lokalisation vielfältig steuerbar und unterschiedlichen Funktionen dienlich zu sein. Das entscheidende Signal für die Aktivierung der in dieser Arbeit untersuchten Form

der neuronalen NOS (Typ I) ist das  $\text{Ca}^{++}$ .

## 1.8 Zielsetzung

Bisherige anatomische, physiologische und pharmakologische Untersuchungen zu NO im peripheren Nervensystem haben sich auf Säugetiere konzentriert. Die Neurotransmission mittels Stickoxid erscheint aufgrund seiner prinzipiellen, von den etablierten Konzepten abweichenden Mechanismen als etwas grundlegend Neues. Das muss aber natürlich nicht bedeuten, dass es auch in der Natur etwas Neues, d.h. ein evolutionär spät entwickeltes Prinzip ist. Aufschlüsse in dieser Frage lassen sich aus dem Studium anderer Vertebraten-Klassen erhalten. Die vorliegende Arbeit untersucht einen Vertreter der Reptilien. Diese gelten als gemeinsame Vorläufer sowohl von Vögeln als auch von Säugetieren. Die Schildkröte gilt als ein phylogenetisch altes Reptil, d.h. eine der im Vergleich zu anderen Reptilien dem "Ur-Reptil" relativ nahestehende Art. Hierbei ist anzumerken, dass viele Schildkröten-Spezies aufgrund ihrer Bedrohung nicht mehr für wissenschaftliche Untersuchungen frei verfügbar sind. Wir haben als Spezies eine amerikanische Sumpfschildkröte, die Rotwangenschmuckschildkröte *Trachemys scripta elegans* ausgewählt, da diese nicht gefährdet, leicht in Gefangenschaft zu züchten ist, in Zoohandlungen erhältlich ist und sogar in Europa nach Aussetzung in die Natur ihrerseits eine Gefährdung für endogene Spezies wie Amphibien darstellt, die auf dem Futterplan dieser Tiere stehen.

Zur Lokalisation der Stickoxidsynthase wird vergleichend die NADPH-Diaphorase-Histochemie und Immunzytochemie verwendet. Es soll geklärt werden, ob überhaupt und in welchen Organsystemen der Schildkröte NOS vorhanden ist, ob Übereinstimmung der Ergebnisse in beiden Untersuchungsmethoden besteht und ob ein ähnliches Verteilungsmuster wie in anderen Spezies besteht.