

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Humanbiologie

Eigenschaften mechanosensitiver Neurone des myenterischen und submukösen Plexus nach Deformation

Florian Kreuz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation

Vorsitz: Prof. Dr. Martin Klingenspor

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Michael Schemann
2. Prof. Dr. Harald Luksch

Die Dissertation wurde am 24.10.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt am 22.01.2019 angenommen.

für meine Frau

Finanzielle Unterstützung

Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), MA-5202/1 und MA-5202/2, „Mechanosensitivity in the enteric nervous system“.

Inhaltsverzeichnis

Finanzielle Unterstützung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Summary.....	1
Zusammenfassung.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1 Das enterische Nervensystem.....	5
1.2 Anatomie und Physiologie des enterischen Nervensystems.....	6
1.2.1 Morphologische Klassifizierung enterischer Neurone.....	7
1.2.2 Elektrophysiologische Klassifizierung enterischer Neurone.....	8
1.2.3 Funktionale Klassifizierung enterischer Neurone.....	8
1.3 Exkurs: Physikalische Grundlagen.....	11
1.4 Mechanosensitivität im Darm.....	13
1.5 Mechanotransduktion und mechanosensitive Kanäle.....	15
1.5.1 Piezo Proteine.....	15
1.5.2 Transienten Rezeptor Potenzial Kanäle (TRP).....	16
1.5.3 Säuresensitive Ionenkanäle (ASIC).....	16
1.5.4 N-Methyl-D-Asparagin-Säure (NMDA) Rezeptor.....	17
1.5.5 Calciumaktivierte Kaliumkanäle (KCa).....	17
1.5.6 Chloridkanäle.....	18
1.6 Ziele.....	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
2.2 Ethische Genehmigung.....	21
2.3 Gewebegewinnung und Präparation.....	22
2.3.1 Präparation submuköser Plexus.....	22

2.3.2	Präparation myenterischer Plexus	23
2.4	Versuchsaufbau des Imaging-Setups.....	24
2.5	Ultrafast Neuroimaging Technik.....	26
2.5.1	Spannungssensitiver Farbstoff	26
2.5.2	Protokoll zum Färben eines Ganglions	27
2.6	Vitalitätstest	28
2.7	Protokolle zur mechanischen Stimulation.....	28
2.7.1	Kompression	29
2.7.2	Dehnung	31
2.8	Pharmakologie.....	33
2.8.1	Versuchsprotokoll.....	33
2.8.2	APETx2	33
2.8.3	Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate.....	34
2.8.4	HC-067047	34
2.8.5	KB-R7943	34
2.8.6	Nifedipin	34
2.8.7	Nifluminsäure	35
2.8.8	SKF-96365	35
2.8.9	TRAM-34.....	35
2.8.10	TTX.....	35
2.8.11	ω -Conotoxin GVIA	36
2.8.12	Pharmakologie Zusammenfassung.....	36
2.9	Immunhistochemie.....	37
2.10	Datenanalyse und Statistik	38
3.	Ergebnisse.....	40
3.1	Spontanaktivität submuköser Neurone	40
3.2	Submuköse Neurone sind sensitiv für Kompression	41
3.2.1	Reproduzierbarkeit.....	42

3.2.2	Stimulation mit unterschiedlicher Stimulusstärke	44
3.2.2.1	Unterschiedlicher Injektionsdruck	44
3.2.2.2	Unterschiedliche Injektionsdauer	46
3.3	Submuköse Neurone sind sensitiv für Dehnung	48
3.3.1	Reproduzierbarkeit.....	49
3.3.2	Korrelation zwischen Stimulusstärke und Aktionspotential Frequenz	50
3.4	Flächenberechnung	51
3.4.1	Neuron.....	51
3.4.2	Ganglion.....	52
3.5	Geschwindigkeit	54
3.5.1	Korrelation Geschwindigkeit und Aktionspotential Frequenz bei Deformation	54
3.5.2	Vergleich Geschwindigkeitsparameter zwischen Dehnung du Kompression	54
3.6	Zusammenfassung MEN im SMP.....	55
3.7	Submuköse Neurone sind sensitiv für Kompression und / oder Dehnung	56
3.8	Pharmakologie im submukösen Plexus	57
3.8.1	Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate.....	57
3.8.2	SKF-96365	59
3.8.3	TTX.....	61
3.8.5	ω -Conotoxin GVIA	63
3.9	Pharmakologie im myenterischen Plexus	64
3.9.1	APETx2	64
3.9.2	Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate.....	66
3.9.3	HC-067047	68
3.9.4	KB-R7943	70
3.9.5	Nifluminsäure	72
3.9.6	TRAM-34.....	74
3.10	Zusammenhang von Piezo-1 und MEN im MP	76
4.	Diskussion.....	77

Literaturverzeichnis	86
Abbildungsverzeichnis	101
Tabellenverzeichnis	103
Anhang.....	104
Berechnung des maximalen Injektionsvolumens im SMP.....	104
Manuelle Messung der Dehnungslänge von MEN im SMP	105
Manuelle Flächenmessung bei Dehnung von MEN im SMP	106
Manuelle Flächenmessung bei Kompression von MEN im SMP	106
Geschwindigkeitsberechnung bei Dehnung von MEN im SMP	107
Geschwindigkeitsberechnung bei Kompression von MEN im SMP.....	107
Digitaler Anhang.....	108
Danksagung	109
Lebenslauf	110
Publikationen.....	111
Eidesstattliche Erklärung.....	112

Summary

Mechanical forces (shear- and normal stress) are omnipresent throughout the gastrointestinal tract, due to the movements of the two muscle layers (longitudinal and circular muscles). Neurons of the myenteric plexus (MP) are activated directly by mechanical stimuli. They are multimodal (compression-sensitive and stretch-sensitive) and multifunctional (sensory neurons, interneurons, motor neurons). These neurons are called mechanosensitive enteric neurons, shortly MEN. Our hypothesis is that also in the submucosal plexus (SMP) exist mechanosensitive neurons. Aim of the present study was to identify MEN in the SMP and to check whether they have multimodal properties. For this purpose, submucosal tissue preparations from guinea pig colon were used. Neuronal activity after mechanical stimulation was detected using the neuroimaging technique in combination with a voltage-sensitive dye (DI-8-ANEPPS). As compression stimulus we used the intraganglionic volume injection technique and ganglionic stretch was used to mimic distension. Both mechanical stimuli had a comparable deformation speed.

Results showed that MEN also exist in the SMP. Submucosal MEN could be divided into two populations because of their different properties. Compression-sensitive MEN usually fired during dynamic deformation and seem to adapt quickly (rapidly adapting MEN, RAMEN). Whereas stretch-sensitive MEN responded only when they were sustaining deformed and adapted slowly (slowly adapting MEN, SAMEN). Reproducibility and a correlation of MEN responses with the deformation strength were shown. In addition, we showed that the degree of deformation of the used mechanical stimuli was similar to the deformation under physiological conditions. Mechanically gated cation channels, may play an important role in neuronal mechanotransduction in the enteric nervous system (ENS).

Concluding in the SMP exist both stretch- and compression sensitive neurons, which respond directly to mechanical deformation. The findings of this work help to understand and elucidate the complex processes of mechanotransduction in the ENS.

Zusammenfassung

Mechanische Spannungen (Tangential- und Normalspannung) sind, aufgrund der Bewegungen beider Muskelschichten (Längs- und Zirkulärmuskulatur), omnipräsent im gesamten Gastrointestinaltrakt. Neurone des myenterischen Plexus (MP) können direkt durch mechanische Stimuli aktiviert werden. Sie sind multimodal (kompressionssensitiv und dehnungssensitiv) und multifunktional (Sensorische Neurone, Interneurone, Motorneurone). Diese Neurone werden als mechanosensitive enterische Neurone, kurz MEN, bezeichnet. Es ist anzunehmen, dass auch im submukösen Plexus (SMP) Neurone existieren, die mechanosensitiv sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, MEN im SMP zu identifizieren. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob submuköse Neurone ebenfalls multimodale Eigenschaften besitzen. Hierfür wurden submuköse Gewebepräparate des Meerschweinchenkolons verwendet. Die neuronale Aktivität nach mechanischer Stimulation wurde mit Hilfe der Neuroimaging Technik in Kombination mit einem spannungssensitiven Farbstoff (DI-8-ANEPPS) nachgewiesen. Als Kompressionsstimulus wurde die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik verwendet und Elongation wurde mittels ganglionärer Dehnung erzeugt. Beide mechanischen Stimuli hatten eine ähnliche Geschwindigkeit, mit der MEN deformiert wurden.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MEN auch im SMP existieren. Diese ließen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften in zwei Populationen einteilen. Kompressionssensitive MEN feuern meistens während der dynamischen Deformation und scheinen schnell zu adaptieren (rapidly adapting MEN, RAMEN). Wohingegen dehnungssensitive MEN erst antworten, wenn sie sich in der andauernden Deformationsphase befinden und langsam adaptieren (slowly adapting MEN, SAMEN). Reproduzierbarkeit und eine Korrelation von MEN mit der Deformationsstärke wurden gezeigt. Außerdem wurde gezeigt, dass der Deformationsgrad der verwendeten mechanischen Stimuli ähnlich zur Deformation unter physiologischen Bedingungen ist. Mechanisch gesteuerte Kationkanäle spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der neuronalen Mechanotransduktion im enterischen Nervensystem (ENS).

Die Schlussfolgerung der vorliegenden Studie ist, dass sowohl dehnungs-, wie auch kompressionssensitive Neurone im SMP existieren, welche direkt auf mechanische Deformation antworten. Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit helfen dabei die komplexen Vorgänge der Mechanotransduktion im ENS besser zu verstehen und aufzuklären.

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin
AH	afterspike hyperpolarization
AI	Adaptation Index
ASIC	Säuresensitive Ionenkanäle
ATP	Adenosintriphosphat
BK _{Ca}	calciumaktivierte Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit
CCD	charge coupled device
CGRP	Calcitonin-Gen-Related-Peptid
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
DI-8-ANEPPS	1-(3-sulfonato-propyl)-4-[β-[2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium betaine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	Hinterwurzelganglion
ENaC/DEG	degeneriner epithelialer Natriumkanal
ENS	enterisches Nervensystem
EPSP	erregendes postsynaptisches Potential
fEPSP	schnell erregendes postsynaptisches Potential
FST	Fine Science Tools
IFAN	intestinofugale Neurone
IK _{Ca}	calciumaktivierte Kaliumkanäle mit mittlerer Leitfähigkeit
IPAN	Intrinsische primäre afferente Nervenzellen
LED	Leuchtdiode
MEN	mechanosensitive enterische Neurone
MP	<i>plexus myentericus</i>
MSORT	multi-site optical recording technique
NI	Neuroindex
NMDA Rezeptor	N-Methyl-D-Asparagin-Säure Rezeptor
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSC	nichtselektiver Kationkanal
PACAP	Hypophysen-Adenylat-Cyclase-aktivierendes Polypeptid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RAMEN	rapidly adapting mechanosensitive enteric Neuron
ROS	Sauerstoffspezies oder Sauerstoffradikal
SAC	stretch-activated channels

SAMEN	slowly adapting mechanosensitive enteric Neuron
SAP	Summenaktionspotential
SK _{Ca}	calciumaktivierte Kaliumkanäle mit kleiner Leitfähigkeit
SMP	<i>plexus submucous</i>
S-Neuron	synaptisches Neuron
TRP	transient receptor potential
TRPA	transient receptor potential ankyrin
TRPC	transient receptor potential canonical
TRPM	transient receptor potential melastin
TRPML	transient receptor potential mucolipin
TRPP	transient receptor potential polycystin
TRPV	transient receptor potential vanilloid
TTX	Tetrodotoxin
USAMEN	ultra -slowly adapting mechanosensitive enteric Neuron
VIP	vasoaktives Intestinalpeptid
VSD	spannungssensitiver Farbstoff
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Das enterische Nervensystem

Seit Mitte des 19. Jahrhunderts ist bekannt, dass im Gastrointestinaltrakt zwei Nervengeflechte existieren. 1857 wurden neuronale Strukturen entdeckt, welche in einer Bindegewebsschicht eingebettet waren und zusammenfassend als *plexus submucosus* (SMP) bezeichnet wurden (Meissner, 1857). Einige Jahre später wurde die Existenz eines „zweiten, sehr interessanten ganglio-nervösen Stratum(s)“ nachgewiesen, welches den Namen *plexus myentericus* (MP) erhielt (Auerbach, 1862).

Diese Entdeckungen waren jedoch nur anatomische Beschreibungen, die Funktionen hingegen waren unbekannt. Bis Anfang des 20. Jahrhunderts wurde das Nervensystem im Darm als „diffuses parasympathisches Ganglion“ bezeichnet. 1899 wurde an Kaninchen und Hunden gezeigt, dass der Darminhalt mit Hilfe lokaler Muskelbewegungen, die durch mechanische Reizung der Darmmuskulatur und Mukosa ausgelöst wurden, in anale Richtung transportiert wurde. Bei diesem Reflex, auch „law of the intestine“ genannt, kontrahiert der Darm im oralen und relaxiert im analen Bereich. Außerdem wurde festgestellt, dass der peristaltische Reflex erhalten blieb, wenn der Darm vom restlichen Körper getrennt wurde (Bayliss and Starling, 1899, 1901).

Einige Jahre später wurde mit Hilfe von isoliertem Meerschweinchendarmpräparaten in *in vitro* Experimenten nachgewiesen, dass die Grundfunktionen des Darms beziehungsweise der peristaltische Reflex weiterhin in Takt blieben. Es wurde somit der Beweis geliefert, dass das Nervensystem im Darm eigenständig und unabhängig vom zentralen Nervensystem (ZNS) arbeitet (Trendelenburg, 1917). 1921 prägte der Engländer John Langley den Begriff des enterischen Nervensystems (ENS), um das Nervensystem im Darm vom sympathischen und parasympathischen Nervensystem abzugrenzen (Langley, 1921). Heutzutage wird dem ENS eine Sonderstellung zugesprochen, da es anatomisch und funktionell unabhängig vom ZNS arbeitet. Zudem zählt es neben dem Sympathikus und dem Parasympathikus zum vegetativen beziehungsweise autonomen Nervensystem. Es entwickelte sich ein eigener Forschungsweig, der sich mit der Anatomie, Physiologie und Pathologie des ENS beschäftigt: Die Neurogastroenterologie. Das ENS wird außerdem als „Little Brain“ (Wood, 1981) oder „The Second Brain“ (Gershon, 1999) bezeichnet.

1.2 Anatomie und Physiologie des enterischen Nervensystems

Das ENS befindet sich in der Wand des gesamten Gastrointestinaltraktes sowie den dazugehörigen Drüsen (Speicheldrüse, Pankreas) und der Gallenblase. Es erstreckt sich vom Ösophagus bis zum Rektum (Furness, 2006; Hansen, 2003). Das ENS besteht aus Ganglien, einer Ansammlung von Nerven- (Synonym: Neurone) und Gliazellen, die über primäre intraganglionäre Fasern miteinander verbunden und hauptsächlich in zwei Plexus organisiert sind. In der Literatur wird von bis zu 600 Millionen Nervenzellen im menschlichen ENS gesprochen (Furness, 2006). Neuere Zählungen ergaben, dass es ungefähr 150 Millionen Nervenzellen im menschlichen ENS sind (Dr. Klaus Michel, persönliche Mitteilung).

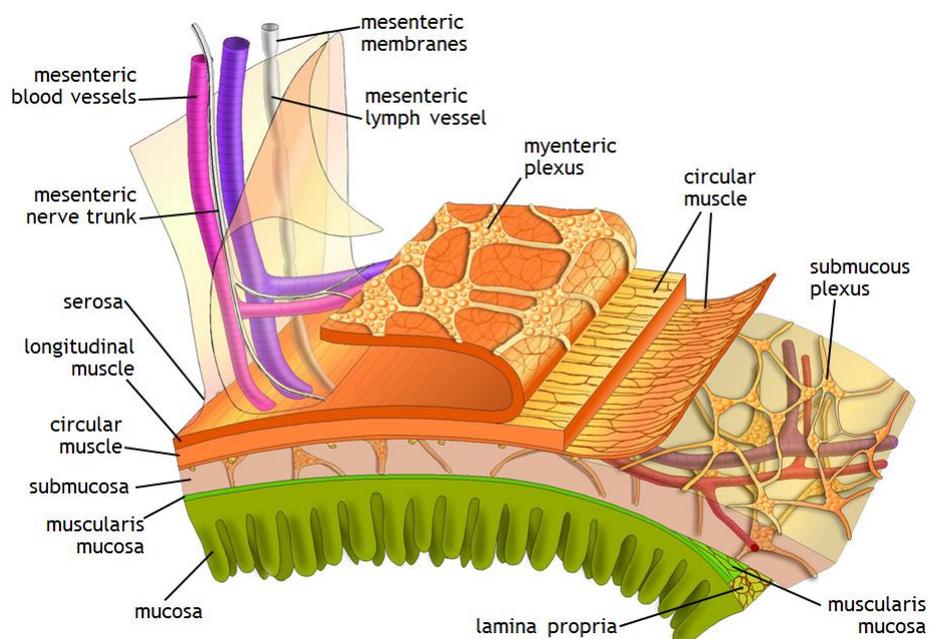


Abbildung 1: Aufbau der Darmwand. © Simon Brooks

Die Darmwand besteht aus zwei Plexus-Schichten: Dem *plexus myentericus* und dem *plexus submucosus*. Außerdem enthält sie noch Längs- und Zirkulärmuskeln, Blut- und Lymphgefäßen, Serosa, Muscularis mucosa, Mukosa und Lamina propria.

Der MP (Auerbach Plexus) erstreckt sich vom oberen Ösophagus bis hin zum *musculus sphincter ani internus* und liegt zwischen der äußeren Längs- und inneren Zirkulärmuskulatur. Die Ganglien des MP können sich sowohl von Spezies zu Spezies, wie auch zwischen den einzelnen Darmregionen in Größe, Form und Orientierung unterscheiden (Auerbach, 1862; Furness, 2006). Der SMP hingegen ist nur im Dün- und Dickdarm präsent und befindet sich zwischen der Mukosa und der Zirkulärmuskulatur (Abbildung 1). Die Ganglien beziehungsweise die intraganglionären Fasern des SMP sind meistens kleiner

beziehungsweise feiner als die Ganglien und intraganglionären Fasern des MP. Je nach Säugetierart variiert der SMP bezüglich der Anzahl der submukösen Netzwerke. Im Darm größerer Säugetiere existieren zwei submuköse Schichten: der innere SMP (Meissner Plexus), direkt unter der Muscularis mucosa und der äußere, an der Zirkulärmuskulatur gelegene, SMP (Schabadasch oder Henle Plexus) (Schemann and Neunlist, 2004). Im menschlichen Darm gibt es noch eine zusätzliche submuköse Schicht, die sich zwischen den beiden anderen Plexus befindet und als intermediärer Plexus bezeichnet wird (Hoyle and Burnstock, 1989). In kleinen Säugetieren, zum Beispiel dem Meerschweinchen, ist nur eine submuköse Schicht zu finden (Furness, 2006; Gunn, 1968; Hoyle and Burnstock, 1989; Meissner, 1857; Schabadasch, 1930; Schemann and Neunlist, 2004). Hinzu kommt die relativ einfache Haltung und die im Vergleich zu Mäusen wenig arbeitsintensive Gewebepräparation, weswegen die meisten Studien in der Neurogastroenterologie an diesen durchgeführt werden. Zählungen ergaben, dass insgesamt circa 15 Millionen Nervenzellen im ENS des Meerschweinchens existieren (Dr. Klaus Michel, persönliche Mitteilung).

Enterische Neurone lassen sich aufgrund ihrer morphologischen, elektrophysiologischen und funktionalen Eigenschaften klassifizieren (Tabelle 1) (Furness, 2000, 2006; Hansen, 2003).

1.2.1 Morphologische Klassifizierung enterischer Neurone

Breits im Jahr 1895 beschrieb Alexander Dogiel enterische Neurone, die sich in ihrer Form unterscheiden und unterteilte diese in drei Klassen: Dogiel Typ I Neurone sind abgeflachte, längliche Neurone, die aus 4 bis 20 kurzen, flachen Dendriten und einem langen Axon (uniaxonal) bestehen. Ihre Somata sind 13 μm bis 35 μm lang und 9 μm bis 22 μm breit (Dogiel, 1895, 1899). Im Gegensatz dazu besitzen Dogiel Typ II Neurone ovale beziehungsweise runde Zellkörper (großer Durchmesser: 22 μm bis 47 μm , kleiner Durchmesser: 13 μm bis 22 μm), bestehen aus 3 bis 10 langen Dendriten und haben, wie heutzutage nachgewiesen, mehrere Axone (multiaxonal) (Hendriks et al., 1990; Stach, 1981). Dogiel Typ III Neurone sind faserartige Neurone, die 2 bis 10 kurze, stark verzweigte, vom Zellkörper gesehen dünner werdende Dendriten besitzen. Das Axon beginnt an einer Vorwölbung des Zellkörpers oder eines Dendrits (Dogiel, 1895, 1899; Furness, 2006). Aktuell werden Neurone anhand ihrer Morphologie noch detaillierter in Dogiel Typ I bis Typ VII untergliedert (Stach, 1985, 1989).

1.2.2 Elektrophysiologische Klassifizierung enterischer Neurone

Das Konzept der elektrophysiologischen Klassifizierung enterischer Neurone wurde 1974 eingeführt, indem Neurone in AH-Neurone und in S-Neurone unterteilt wurden. AH steht dabei für Nachhyperpolarisation beziehungsweise „afterspike hyperpolarization“ und S für synaptisch (Hirst et al., 1974). Aktionspotentiale von AH-Neuronen haben eine größere Amplitude und eine längere Dauer als Aktionspotentiale von S-Neuronen. Des Weiteren weisen AH-Neurone in der Repolarisationsphase einen charakteristischen Calcium-Hügel auf, der dadurch zustande kommt, dass die Aktionspotentiale nicht nur durch Tetrodotoxin (TTX)-sensitive Natriumkanäle, sondern auch durch nicht TTX-sensitive Calciumkanäle vermittelt werden (North, 1973; Rugiero et al., 2003). S-Neurone besitzen nur TTX-sensitive Natriumkanäle. Die axonale Weiterleitung von Aktionspotentialen ist in AH- und S-Neurone TTX-sensitiv. Aufgrund der langen Dauer der Aktionspotentiale von AH-Neurone ist deren Aktionspotentialfrequenz meist niedriger als die von S-Neuronen (Galligan et al., 2000). Elektrische Stimuli führen in AH-Neurone meist zu langsam und in S-Neurone zu schnell erregenden postsynaptischen Potentialen (EPSPs) (Kunze et al., 1993). Im Dünndarm und Dickdarm des Meerschweinchens weisen AH-Neurone gewöhnlich Dogiel Typ II, S-Neurone hingegen Dogiel Typ I Morphologie auf (Furness, 2006; Hirst et al., 1974; Nurgali et al., 2004).

1.2.3 Funktionale Klassifizierung enterischer Neurone

Enterische Neurone können aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen und neurochemischen Eigenschaften in intestinofugale Neurone, sensorische Neurone, Interneurone und Motorneurone eingeteilt werden (Furness, 2000; Hansen, 2003).

Intestinofugale Neurone (IFANs) sind mit einer Population unter 1 % der myenterischen Neurone im Dünndarm des Meerschweinchens sehr gering vertreten. Diese Neurone haben ihren Zellkörper in der Darmwand und stehen über ihre Fortsätze mit prävertebralen Ganglien in Verbindung (Kuntz, 1938; Szurszewski et al., 2002). Intestinofugale Neurone sind immunreaktiv für Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), vasoaktives Intestinalpeptid (VIP) und Calcitonin-Gen-Related-Peptid (CGRP) (Mann et al., 1995; Szurszewski et al., 2002). Intestinofugale Neurone zeigen überwiegend Dogiel Typ I Morphologie und sind elektrophysiologisch S-Neurone (Lomax et al., 2000; Sharkey et al., 1998; Tassicker et al., 1999).

Sensorische Neurone sind die ersten Neurone eines lokalen Reflex-Signalweges, die auf mechanische, chemische oder thermische Stimuli reagieren und diese in elektrische Signale umwandeln (Bertrand et al., 1997; Hansen, 2003; Mazzuoli and Schemann, 2009; Neunlist et al., 1999; Schemann et al., 2002). Die Zellkörper, Dendriten und synaptischen Verbindungen sensorischer Neurone liegen in der Darmwand. Intrinsische primäre afferente Nervenzellen (IPANs) werden als sensorische Neurone bezeichnet (Furness et al., 1998). Die Bezeichnung „sensorisch“ ist jedoch für IPANs nicht ganz korrekt. Denn zum einen führt eine IPAN Aktivierung nicht zu einer bewussten Wahrnehmung und zum anderen können IPANs nicht nur direkt durch den Stimulus aktiviert werden, sondern auch durch andere Zellen, wie zum Beispiel enterochromaffine Zellen, die Adenosintriphosphat (ATP) und Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ausschütten (Furness et al., 2004; Kirchgessner et al., 1992). 11 % der submukösen und 26 % der myenterischen Neurone im Dünndarm des Meerschweinchens sind IPANs (Furness, 2000). IPANs gehören morphologisch zum Dogiel Typ II und elektrophysiologisch sind sie AH-Neurone (Bornstein et al., 1989; Furness, 2000). IPANs kommunizieren untereinander über langsame EPSPs (Kunze and Furness, 1999). Die Kommunikation zwischen IPANs mit Inter- oder Motorneurone läuft sowohl über schnelle, wie auch über langsame EPSPs ab (Furness et al., 1998; Kunze et al., 1993). Der Hauptneurotransmitter der IPANs ist das Neuropeptid Substanz P mit dem Co-Neurotransmitter Acetylcholin (Furness, 2000; Furness et al., 2004; Hansen, 2003; Kirchgessner et al., 1992).

Interneurone sind in allen Darmregionen jedoch nur im MP zu finden. 16 % der myenterischen Neurone des Meerschweinchendünndarms sind Interneurone (Furness, 2000). Es gibt auf- und absteigende Interneurone (Costa et al., 1996; Furness, 2000; Hansen, 2003). Sowohl die aufsteigenden, wie auch die absteigenden Interneurone sind cholinerg, jedoch werden die absteigenden Neurone aufgrund ihrer unterschiedlichen neurochemischen Kodierung in drei Klassen unterteilt: Klasse I exprimiert ChAT, Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und VIP. Sie ist am lokalen Motilitätsreflex beteiligt. Klasse II exprimiert ChAT und 5-HT und ist im Sekretomotorreflex involviert. Klasse III exprimiert ChAT und Somatostatin und ist am migrierenden motorischen Komplex aktiv (Furness, 2000; Hansen, 2003). Interneurone sind morphologisch hauptsächlich Dogiel Typ II Neurone und besitzen elektrophysiologisch gesehen sowohl AH, als auch S Eigenschaften (Hansen, 2003).

Motorneurone sind efferente Nervenzellen und lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: Muskelmotorneurone und Sekretomotorneurone. Muskelmotorneurone sind in MP lokalisiert und erregen oder hemmen von dort sowohl Längs-, wie auch Zirkulärmuskulatur. Für die Transmission der erregenden Muskelmotorneurone ist hauptsächlich Acetylcholin, das an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren bindet, verantwortlich (Furness, 2000). Die Neurotransmitter Substanz P,

Neurokinin A und die Neuropeptide K und Y spielen ebenfalls bei erregenden Motorneuronen eine Rolle (Lippi et al., 1998). Bei hemmenden Muskelmotorneuronen sind die Co-Transmitter Stickstoffmonoxid (NO), VIP, ATP, Hypophysen-Adenylat-Cyclase-aktivierendes Polypeptid (PACAP) und Kohlenstoffmonoxid (CO) beteiligt (Furness, 2000; Hansen, 2003). 55 % der myenterischen Neurone im Dünndarm des Meerschweinchens sind Muskelmotorneurone (Furness, 2000). Die zweite große Klasse von Motorneuronen sind die Sekretomotorneurone, die ausschließlich im SMP des ENS vorkommen und deren Hauptaufgabe es ist, die Sekretion und den lokalen Blutfluss zu regulieren. Sekretomotorneurone werden in eine cholinerge und nicht-cholinerge Unterklasse unterteilt. Der Hauptneurotransmitter der nicht-cholinergen Sekretomotorneuronen ist VIP, außerdem haben sie vasodilatorische Effekte. Bei den cholinergen Sekretomotorneuronen werden noch zwei weitere Klassen unterschieden: Sekretomotorneurone mit dem Co-Transmitter Neuropeptid Y, die ebenfalls vasodilatorische Effekte haben und nicht vasodilatorische Sekretomotorneurone mit dem Co-Transmitter Calretinin. 89 % der submukösen Neurone im Meerschweinchendünndarm sind Sekretomotorneurone (Furness, 2000). Elektrophysiologisch sind alle Motorneurone S-Neurone und morphologisch Dogiel Typ I Neurone (Hansen, 2003).

Tabelle 1: Unterschiedliche Typen von Nervenzellen im ENS des Meerschweinchendünndarms (Furness, 2000; Hansen, 2003)

	Verhältnis	Primärer Neurotransmitter	Morphologie	Elektrophysiol. Eigenschaften
Myenterische Neurone				
Erregende Muskelmotorneurone	37 %	Acetylcholin	Dogiel Typ I	S-Neurone
Hemmende Muskelmotorneurone	18 %	Mehrere Co-Transmitter	Dogiel Typ I	S-Neurone
Aufsteigende Interneurone	5 %	Acetylcholin	Dogiel Typ II	AH- & S-Neurone
Absteigende Interneurone	11 %	Acetylcholin	Dogiel Typ II	AH- & S-Neurone
Sensorische myenterische Neurone	26 %	Substanz P	Dogiel Typ II	AH-Neurone
Intestinofugale Neurone	<1 %	Acetylcholin	Dogiel Typ I	S-Neurone
Submuköse Neurone				
Nicht-Cholinerge Sekretomotorneurone	45 %	VIP	Dogiel Typ I	S-Neurone
Cholinerge Sekretomotorneurone	44 %	Acetylcholin	Dogiel Typ I	S-Neurone
Sensorische submuköse Neurone	11 %	Substanz P	Dogiel Typ II	AH-Neurone

1.3 Exkurs: Physikalische Grundlagen

Mechanische Kräfte sind aufgrund des peristaltischen Reflexes im Gastrointestinaltrakt omnipräsent. In diesem Kapitel werden zunächst physikalische Grundlagen, die im Zusammenhang mit Mechanosensitivität stehen, erläutert. Die Begriffe stammen aus der Kontinuumsmechanik. Da die Thematik sehr umfassend ist, werden nur für diese Arbeit relevante Begriffe im Detail beschrieben, zusammenhängende Definitionen dagegen nur erwähnt. Die Kontinuumsmechanik beschreibt die Deformation verschiedener Substanzen als Antwort auf äußere Belastungen. Mechanische Kräfte im Gastrointestinaltrakt bestehen aus zwei Komponenten: Der Normalkraft (F_N) und der Tangentialkraft (F_T) (Abbildung 2) (Tipler et al., 2012).

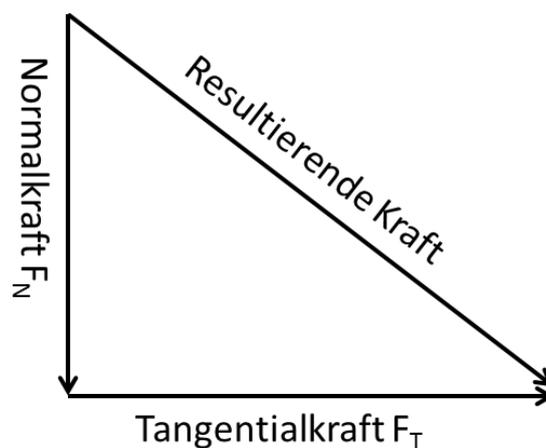


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Resultierenden Kraft

Die resultierende Kraft besteht aus den beiden Komponenten Normalkraft F_N und Tangentialkraft F_T .

Die auf eine Flächeneinheit A bezogene Kraft wird als mechanische Spannung bezeichnet. Die senkrecht zur Oberfläche wirkende Normalkraft F_N erzeugt Zug- oder Druckspannungen σ . Bei Zug- oder Druckspannungen ändern sich Volumen und Länge eines Körpers. Tangentialkraft F_T wirkt parallel zur Oberfläche und erzeugt Scherspannungen τ . Hier kommt es zu keiner Volumenänderung, jedoch ändert sich die Form des Körpers (Abbildung 3) (Tipler et al., 2012).

$$\sigma = \frac{F_N}{A} \quad \tau = \frac{F_T}{A} \quad \left[\frac{N}{m^2} \right]$$

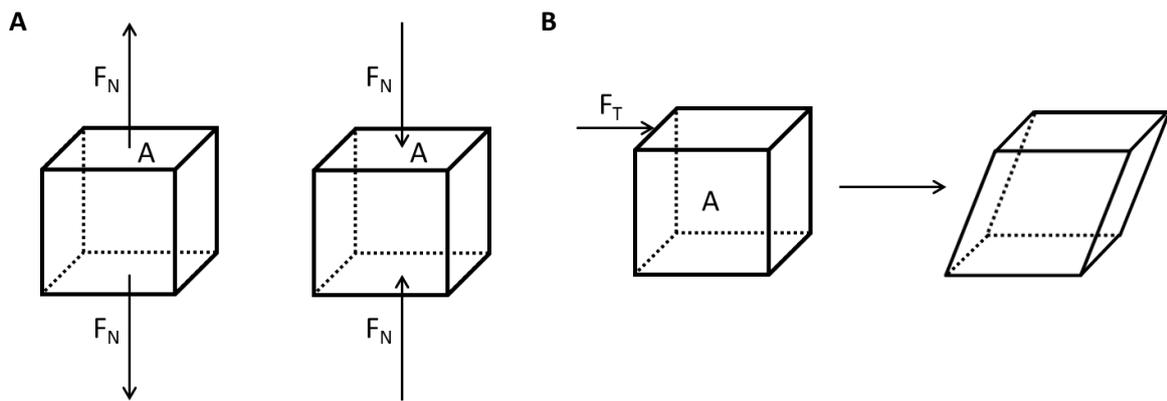


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Zug-, Druck- sowie Scherspannung
A: Zug-/Druckspannung σ = Normalkraft F_N wirkt senkrecht auf eine Fläche
B: Scherspannung τ = Tangentialkraft F_T wirkt parallel auf eine Fläche

Als Verformung eines Körpers wird in der Kontinuumsmechanik die Änderung seiner Form, infolge der Einwirkung einer äußeren Kraft bezeichnet. Diese Verformung kann als Längenänderung ε oder als Winkeländerung in Kraft treten (Tipler et al., 2012).

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

Dabei ist Δl die Längenänderung und l_0 die ursprüngliche Länge. Bei der positiven Längenänderung wird von Dehnung oder Streckung, andernfalls von negativer Dehnung oder Kompression gesprochen (Abbildung 4) (Tipler et al., 2012).

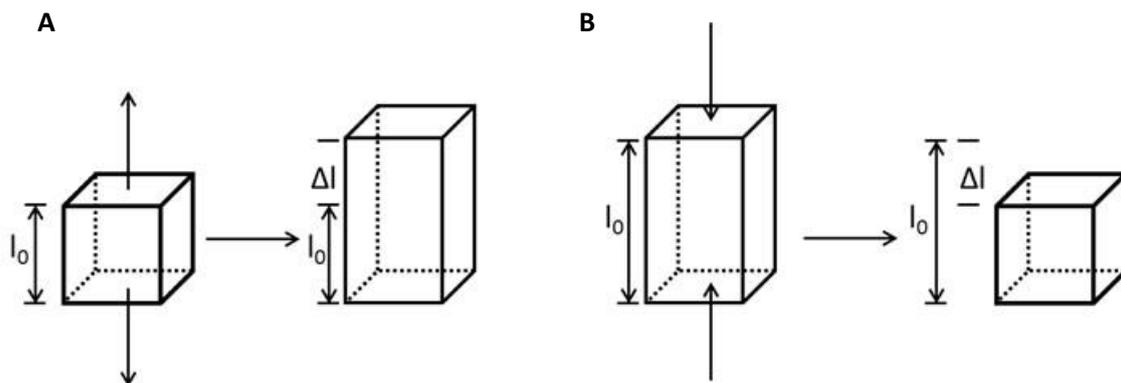


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Dehnung und Kompression
A: Dehnung: Ein Körper wird von der ursprünglichen Länge l_0 um die Länge Δl gedehnt
B: Kompression: Ein Körper wird von der ursprünglichen Länge l_0 um die Länge Δl komprimiert

1.4 Mechanosensitivität im Darm

Aufgrund der Aktivität beider Muskelschichten, Längs- und Zirkulärmuskulatur, wirken durchgehend mechanische Kräfte im Darm. Es kommt zu Kontraktionen und Relaxationen einzelner Segmente. Bei einer Kontraktion der Längsmuskulatur wird das kontrahierte Teilstück verkürzt. Kontrahiert hingegen die Zirkulärmuskulatur, wird der Durchmesser des kontrahierten Segments kleiner. Diese Kontraktionen können in phasische und tonische Kontraktionen unterteilt werden. Phasische Kontraktionen sind kurze, periodische Kontraktionen gefolgt von Relaxationen. Tonische Kontraktionen sind langanhaltende Kontraktionen (Golenhofen and Mandrek, 1991). Der peristaltische Reflex wird über das enterische Nervensystem gesteuert und garantiert, dass der intraluminale Transport von proximaler in distaler Richtung abläuft (Bayliss and Starling, 1899). Es wurde gezeigt, dass sowohl Zellkörper wie auch Fortsätze enterischer Neurone während der Muskelaktivität deformiert werden (Gabella and Trigg, 1984; Mazzuoli and Schemann, 2009). Enterische Neurone können entweder direkt durch mechanische Stimulation oder indirekt über Transmitterausschüttung aktiviert werden.

Ein Beispiel für mechanische Stimulation (direkte Aktivierung) ist die Dehnung des Darms, welche in Aktionspotentialentladungen enterischer Neurone resultiert (Kunze et al., 1998, 1999; Mayer and Wood, 1975; Spencer et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit, ist die Injektion einer kleinen Menge Krebslösung direkt in ein Ganglion (intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik). Dieser Stimulus ist keine physiologische Deformation, aber er ist ein Tool mit dem mechanische enterische Neurone (MEN) aktiviert werden können (Mazzuoli and Schemann, 2009, 2012; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a; Schemann and Mazzuoli, 2010). Mögliche Alternativen für mechanische Stimuli wären die Druckausübung mit Hilfe eines von Frey Haares oder die Applikation von hydrostatischem Druck auf isolierte enterische Neurone (Kugler et al., 2015, 2018).

Eine indirekte Aktivierung von MEN kann über den Neurotransmitter 5-HT erfolgen. Nach mechanischer Stimulierung der Mukosa schütten enterochromaffine Zellen 5-HT aus. 5-HT bindet wahrscheinlich an den 5-HT_{1P} Rezeptor mechanosensitiver Neurone und aktiviert diese (Bertrand and Bertrand, 2010; Kirchgessner et al., 1992).

Lange Zeit wurde angenommen, dass nur IPANs, eine spezialisierte Gruppe sensorischer Neurone (siehe Punkt 1.2.3.) mechanisch aktiviert werden können. IPANs reagieren sowohl direkt auf Dehnung oder Kompression, als auch indirekt auf 5-HT (Furness et al., 1998; Kirchgessner et al., 1992; Kunze et al., 1998; Kunze and Furness, 1999; Weber et al., 2001). Die IPAN Theorie ist heutzutage nicht mehr aktuell, da gezeigt wurde, dass auch Interneurone und Motorneurone mechanisch aktiviert werden können (Mazzuoli and Schemann, 2009). Intestinofugale Neurone besitzen ebenfalls mechanosensitive

Eigenschaften (Hibberd et al., 2012; Szurszewski et al., 2002). Heutzutage gibt es Beweise, dass MEN multifunktional sind: MEN können sowohl sensorische und motorische Aufgaben ausüben, wie auch Funktionen von Interneuronen besitzen (Blackshaw et al., 2007; Mazzuoli and Schemann, 2009; Pan and Gershon, 2000; Smith et al., 2007; Spencer and Smith, 2004).

Eine Möglichkeit MEN zu charakterisieren, ist der Adaptation Index (AI). Mit Hilfe des AI kann das Aktionspotential-Verhaltensmuster einzelner Neurone analysiert werden. So ergeben sich Neurone mit schneller Adaption (RAMEN) und Neurone, die eine langsame Adaption besitzen (SAMEN). Die exakte Verteilung von RAMEN und SAMEN ist noch nicht bekannt, jedoch gibt es Unterschiede in den einzelnen Darm-Regionen (Kugler et al., 2015; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a, 2015b). Außerdem wurde gezeigt, dass es mindestens zwei unterschiedliche Mechanorezeptoren auf MEN geben muss: Im Magen des Meerschweinchens antworteten 29 ± 16 % der Neurone auf einen Kompressionsstimulus und 22 ± 13 % der Neurone auf einen Dehnungsstimulus. MEN können aber auch multimodal sein, da es einige Neurone gab, die in gepaarten Experimenten auf beide Stimuli antworteten (Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a). Kugler und Kollegen fanden heraus, dass die vorherrschende Kraftkomponente bei mechanischer Stimulation im ENS die Normalkraft sein muss. Die zweite Komponente, die Tangentialkraft spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle, da bei primär kultivierten Neuronen nur 5,6 % der Neurone mit einer sehr geringen Aktionspotential Frequenz von 0,0 [0,0/0,6] Hz auf einen Scherspannungsstimulus reagierten (Kugler et al., 2018).

Die meisten Studien zur Mechanosensitivität im Darm wurden an myenterischen Neuronen durchgeführt, da der MP hauptsächlich für die Motilität verantwortlich ist (Furness, 2006; Kugler et al., 2015, 2018; Kunze et al., 1998, 1999; Mayer and Wood, 1975; Mazzuoli and Schemann, 2009, 2012; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a, 2015b; Schemann and Mazzuoli, 2010; Spencer and Smith, 2004). Einige Studien zeigten jedoch, dass es auch im SMP mechanosensitive Neurone geben muss, da eine Dehnung von Submukosa / Mukosa Präparaten in Ussing-Kammer Experimenten zu einer neural-vermittelten Chloridsekretion führte (Diener and Rummel, 1990; Frieling et al., 1992; Schulzke et al., 1995; Sidhu and Cooke, 1995; Weber et al., 2001).

Der Mechanismus der Mechanotransduktion und die verantwortlichen mechanosensitiven Kanäle beziehungsweise Rezeptoren sind aber sowohl im myenterischen, wie auch im submukösen Plexus unbekannt.

1.5 Mechanotransduktion und mechanosensitive Kanäle

Ionenkanäle sind porenbildende Transmembranproteine, die elektrisch geladenen Teilchen das Durchqueren von Biomembranen ermöglichen. Ein zwei-phasischer Ionenkanal kann offen oder geschlossen sein. Seine Zustandsform ist beispielsweise liganden-, spannungs-, thermisch-, licht- oder mechanisch gesteuert (Alberts et al., 2002).

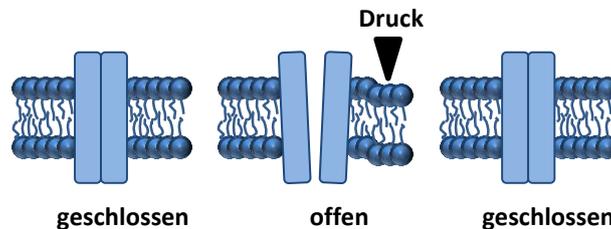


Abbildung 5: Mechanismus eines mechanisch gesteuerten Ionenkanals (Beispiel: Druck)

Der mechanisch gesteuerte Ionenkanal ist geschlossen. Wird auf die Doppellipidmembran Druck ausgeübt, öffnet sich der Kanal. Der Kanal schließt sich wieder sobald der Druck entfernt wird.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde eine Vielzahl mechanosensitiver Ionenkanäle in Organismen entdeckt, jedoch wurden die Mechanorezeptoren auf enterischen Neuronen noch nicht identifiziert. Im folgenden Kapitel wird eine kleine Auswahl mechanosensitiver Kanäle beschrieben, die möglicherweise eine Rolle bei der Mechanotransduktion im ENS spielen. Neuronale Mechanotransduktion ist die Umwandlung von mechanischen Reizen in elektrische oder chemische Signale (Biswas et al., 2015; Katsumi et al., 2004; Liu et al., 1996; Martinac, 2004).

1.5.1 Piezo Proteine

Piezo Proteine sind multipass Transmembranproteine und wurden zuerst in DRG Neuronen gefunden. Beim Menschen und bei Mäusen gibt es zwei Piezo Proteine, Piezo-1 (Synonym: FAM38A) und Piezo-2 (Synonym: FAM38B) (Delmas et al., 2011). Piezo-1 und Piezo-2 induzieren mechanisch-aktivierte Kationströme in Zellen, jedoch war zunächst unklar, ob die Piezo Proteine selbst porenbildende Ionenkanäle sind oder ob sie andere Ionenkanäle modulieren. Einige Zeit später wurden die Piezo Proteine tatsächlich als mechanosensitive Ionenkanäle identifiziert. Sie zählen zu den dehnungsempfindlichen Kationkanälen (english: stretch-activated channels, SACs) (Bagriantsev et al., 2014; Coste et al., 2012, 2010). Piezo-abhängige mechanosensitive Ströme können mit Hilfe von klassischen mechanosensitiven Kanalblockern, wie Gadolinium oder Rutheniumrot, geblockt werden (Delmas et al., 2011). GsMTx4, ein Gift der Spinne *Grammostola rosea* und blockt spezifisch Piezo-1 Ströme (Alcaino et al., 2017; Bae et al., 2011). Yoda1,

ein synthetisches Molekül, ist ein spezifischer Piezo-1 Agonist (Syeda et al., 2015). Inzwischen wurde außerdem gezeigt, dass Piezo-1 und Piezo-2 auch im Meerschweinchen und auf enterischen Neuronen vorhanden sind (Mazzuoli-Weber et al., 2018).

1.5.2 Transienten Rezeptor Potenzial Kanäle (TRP)

TRP-Kanäle zählen zu den nichtselektiven Kationkanälen (NSCs) und werden bei Säugetieren in sechs Unterfamilien eingeteilt (Montell, 2005; Zheng, 2013). Die Unterfamilien bestehen noch aus weiteren Untereinheiten: die TRPC-Gruppe (klassisch oder kanonisch) hat sieben, TRPM (Melastatin) acht, TRPV (Vanilloid) sechs, TRPML (Mucolipin) und TRPP (Polycystin) je drei, und TRPA (Ankyrin) eine Untereinheit (Zheng, 2013). Alle Unterfamilien bestehen aus sechs Transmembranregionen, die Homologie jedoch ist zwischen den Unterfamilien nur mäßig ausgeprägt. TRP-Kanäle kommen in vielen unterschiedlichen Organen und verschiedenen Arten vor (Kaleta and Palmer, 2011). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von Licht, Osmolarität, Temperatur pH-Wert, Pheromonen, Gerüchen oder Druck (Song and Yuan, 2010). Die Untereinheiten TRPC1 bis TRPC6, TRPV2 und TRPV4 sind auf enterische Neurone exprimiert (Boesmans et al., 2011; Kashiba et al., 2004; Kollmann, 2017; Liu et al., 2008). TRPC1, TRPC5 und TRPC6 sind wichtige Komponenten bei mechanosensitiven Kationkanälen (Gottlieb et al., 2008; Shen et al., 2015). TRPV2 Kanäle sind sensitiv für Membran Dehnung und TRPV4 Kanäle spielen beim Anschwellen von Zellen durch osmotische Stimuli eine wichtige Rolle (O’Neil and Heller, 2005). TRP-Kanäle können allgemein von Rutheniumrot blockiert werden (Cahusac, 2009; Randhawa and Jaggi, 2016). Die Substanz SKF-96365 inhibiert TRPC-Kanäle (Song et al., 2014). Die Substanz HC-067047 ist ein hoch spezifischer TRPV4-Kanalblocker (Everaerts et al., 2010; Kollmann, 2017).

1.5.3 Säuresensitive Ionenkanäle (ASIC)

Bei ASIC Proteinen handelt es sich um eine Unterfamilie der degenerierten epithelialen Natriumkanäle (ENaC/DEG). In Säugetieren gibt es fünf Untereinheiten: ASIC1, ASIC2, ASIC3, ASIC4, und ASIC5. Die Untereinheiten bestehen aus sechs Transmembranregionen (Hanukoglu, 2017). Im Darm sind ASICs (ASIC1, ASIC2 und ASIC3) primär auf Axone von vagalen und spinalen afferenten Neuronen exprimiert (Holzer, 2015). Die Hauptaufgabe ist die Regulation von protonen-gesteuerten Strömen. Bei mukosalen Säureanstieg mildern ASICs den extrazellulären pH-Wert ab, indem sie den lokalen Blutfluss erhöhen (Holzer, 2015; Waldmann and Lazdunski, 1998). ASIC2 und ASIC3 sind außerdem bei der Nozizeption auf viszerale afferente Neuronen beteiligt (Page et al., 2007). Allgemein spielen ENaC/DEG Kanäle eine wichtige Rolle bei der sensorischen Mechanotransduktion. Sie können sowohl auf Motor-, Inter-, wie auch auf sensorischen Neuronen exprimiert sein (Bazopoulou et al., 2007). Außerdem werden sie durch

die Substanz Amilorid geblockt (Hamill and McBride, 1996). Das Peptid APETx2, ein Gift der Seeanemone *Anthopleura elegantissima*, inhibiert spezifisch ASIC3 Kanäle (Chagot et al., 2005; Diochot et al., 2004).

1.5.4 N-Methyl-D-Asparagin-Säure (NMDA) Rezeptor

NMDA Rezeptoren werden zu den ionotropen Glutamatrezeptoren gezählt. Außerdem gehören noch AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) Rezeptoren und Kainat Rezeptoren zu den ionotropen Glutamatrezeptoren. Die drei Untergruppen unterscheiden sich im Aufbau ihrer Sequenz, ihren spezifischen Bindungs- und Aktivierungseigenschaften, sind aber alle hochaffin für Glutamat (Collingridge et al., 2009). Der NMDA Rezeptor ist ein heteromerer Membranproteinkomplex der aus den Untereinheiten NR1, NR2 und NR3 besteht (Misra et al., 2000). NMDA Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Transmembranspannung. Bei negativem Membranpotential ist der NMDA Rezeptor durch ein Mg^{2+} -Ion verschlossen. Präsynaptisch freigesetztes Glutamat aktiviert den NMDA Rezeptor und es kommt zur Depolarisation. Durch das positive Membranpotential verlässt das Mg^{2+} -Ion den Ionenkanal und Ca^{2+} strömt ein (Bading and Greenberg, 1991). NMDA Rezeptoren sind sowohl auf myenterische, wie auch auf submuköse Neurone exprimiert und können bei Nichtvorhandensein eines Agonisten mechanisch aktiviert werden (Liu et al., 1997; Maneshi et al., 2017; McRoberts et al., 2001). Mit Hilfe von KB-R7943 können NMDA Rezeptoren blockiert werden (Brustovetsky et al., 2011).

1.5.5 Calciumaktivierte Kaliumkanäle (KCa)

K_{Ca} Kanäle werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Leitfähigkeit in drei Untergruppen eingeteilt (Wei, 2005): BK_{Ca} (große Leitfähigkeit, 100 bis 220 pS), IK_{Ca} (mittlere Leitfähigkeit, 20 bis 85 pS) und SK_{Ca} (kleine Leitfähigkeit, 2 bis 20 pS) (Ishii et al., 1997). BK_{Ca} Kanäle, zu der der Subtyp $K_{Ca1.1}$ gehört, sind entweder spannungsabhängig oder werden durch intrazelluläres Ca^{2+} aktiviert. IK_{Ca} (Subtyp: $K_{Ca3.1}$) und SK_{Ca} (Subtypen: $K_{Ca2.1}$, $K_{Ca2.2}$, $K_{Ca2.3}$) hingegen sind nicht spannungssensitiv und werden nur durch die intrazelluläre Calciumkonzentration gesteuert (Beyder and Farrugia, 2012). BK_{Ca} Kanäle sind essentiell für die Regulation des Muskeltonus und der neuronalen Erregbarkeit. Außerdem führt das Öffnen der BK_{Ca} Kanäle unter physiologischen Bedingungen zu einer Hyperpolarisation (N’Gouemo, 2011). Mechanosensitive BK_{Ca} Kanäle wurden auf IPANs identifiziert. Diese können mit Hilfe Charybdotoxin geblockt werden (Kunze et al., 2000). IK_{Ca} Kanäle und SK_{Ca} Kanäle spielen sowohl bei der intrinsischen neuronalen Erregung, wie auch bei der synaptischen Übertragung im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle (Cui et al., 2014; Faber and Sah, 2007). IK_{Ca} Kanäle und SK_{Ca} Kanäle besitzen dieselbe tetramere Struktur wie spannungsabhängige Kaliumkanäle. Jede Kanaluntereinheit besteht aus sechs Transmembran- α -helikalen Domänen (Cui et al., 2014). K_{Ca} Kanäle sind auf sensorischen enterischen

Neuronen exprimiert (Clerc et al., 2002; Kunze et al., 2000). Apamin ist ein spezifischer Inhibitor für SK_{Ca} Kanäle und TRAM-34 blockiert IK_{Ca} Kanäle (Agarwal et al., 2013; Kato et al., 2006).

1.5.6 Chloridkanäle

Als Chloridkanäle werden Ionenkanäle zusammengefasst, die für Cl⁻ aber auch für andere kleine Anionen, wie Br⁻, I⁻, NO₃⁻ oder HCO₃⁻ permeabel sind. Die Namensgebung kommt dadurch zustande, dass die Cl⁻ Konzentration *in vivo* viel höher ist als bei den anderen Anionen (Jentsch et al., 2002). Chloridkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellvolumens und der ionischen Homöostase, beim transepithelialen Salztransport und bei der intrazellulären pH-Regulation (Jentsch et al., 2002; Suzuki et al., 2006). Besondere Bedeutung im ENS haben sowohl ligandengesteuerten Chloridkanäle, zum Beispiel: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), wie auch spannungsabhängigen Chloridkanäle (ClC). Chloridkanäle sind auf IPANs exprimiert und sind möglicherweise bei der Mechanotransduktion im ENS beteiligt (Bertrand and Galligan, 1994; Furness, 2006; Starodub and Wood, 2000). Mit Hilfe von Nifluminsäure können Chloridkanäle reversibel geblockt werden (Cruickshank et al., 2003; Knauf and Mann, 1984).

1.6 Ziele

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mechanosensitive Neurone des MP und SMP im Meerschweinchen nach Deformation durch unterschiedliche mechanische Stimuli zu identifizieren und zu charakterisieren.

Zu Beginn wurden bekannte Techniken zur mechanischen Stimulation myenterischer Neurone im submukösen Plexus validiert und etabliert. Als Kompressionsstimulus wurde die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik verwendet (Mazzuoli and Schemann, 2009, 2012; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a, 2015b). Des Weiteren wurde überprüft, ob submuköse Neurone auch dehnungssensitiv sind. Die neuronale Aktivität wurde mit Hilfe der Ultrafast Neuroimaging Technik in Kombination mit einem spannungssensitiven Farbstoff (Di-8-ANEPPS) gemessen. Vorversuche waren nötig, um die einzelnen Parameter wie Zeitdauer der Aufnahme, Injektionsdauer und Injektionsdruck zu bestimmen. Zur anschließenden Charakterisierung der MEN wurde der AI berechnet. Durch weitere Experimente konnten außerdem einzelne Stimulusmodalitäten beurteilt werden. Zusätzlich wurden die prozentuale Deformation und die Deformationsgeschwindigkeit während der Kompression und der Dehnung berechnet.

Nachdem MEN im SMP identifiziert waren, bestand ein weiterer Teil der Arbeit darin, Schlüsselemente der Mechanotransduktion im ENS zu finden. Hierfür sollten mit Hilfe der Pharmakologie, Mechanorezeptoren im ENS identifiziert werden. Als Stimulus wurde für diese Experimente sowohl im myenterischen, wie auch im submukösen Plexus die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, stammten die folgenden Substanzen und Lösungen von der Firma Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland).

Die Präparationskrebslösung (Tabelle 2) wurde während der Gewebegewinnung und Präparation (siehe Punkt 2.3) verwendet. Bei 4 °C betrug der pH-Wert 7,4. Die Versuchskrebslösung (Tabelle 3) wurde für die eigentliche Durchführung der Experimente benötigt. Bei 37 °C betrug der pH-Wert 7,4.

Tabelle 2: Präparationskrebslösung

Substanz	g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,244
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,368
NaH ₂ PO ₄	0,144
NaCl	6,84
NaHCO ₃	2,10
Glucose	1,98
KCl	0,35

Tabelle 3: Versuchskrebslösung

Substanz	g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,244
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,368
NaH ₂ PO ₄	0,144
NaCl	6,84
NaHCO ₃	1,68
Glucose	1,98
KCl	0,35

Die folgenden Lösungen wurden für die Immunhistochemie benötigt:

Tabelle 4: 4 % Paraformaldehyd „Fix“ - Lösung

Substanz	Menge
Phosphatpuffer (0,1 M)	50 ml
Paraformaldehyd	2 g
Pikrinsäure (1,2 %)	100 µl

Tabelle 5: Phosphatpuffer (0,1 M)

Substanz	Menge
H ₂ O bidest.	800 ml
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3 g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	32,68 g

Der pH-Wert des Phosphatpuffers (Tabelle 5) wurde mit Hilfe von 1 M NaOH und 1 M H₃PO₄ auf 7,44 eingestellt. Das Gesamtvolumen wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser auf 1 l erhöht.

Tabelle 6: Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Substanz	Menge
H ₂ O bidest.	800 ml
NaCl	8,8 g
Phosphatpuffer	116 g

Das Gesamtvolumen der PBS (Tabelle 6) wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser auf 1 l erhöht.

Tabelle 7: PBS/NaN₃ Puffer

Substanz	Menge
NaN ₃	1 g
PBS	1 l

Der pH-Wert des PBS/NaN₃ Puffers (Tabelle 7) wurde mit Hilfe von 1 M HCl auf 7,00 eingestellt.

Tabelle 8: Blockingserum

Substanz	Menge
PBS/NaN ₃	48 ml
Horse Serum	2 ml
Triton X-100	250 µl

Tabelle 9: Eindeckmedium

Substanz	Menge
PBS/NaN ₃	40 ml
Glycerol	160 ml

2.2 Ethische Genehmigung

Die Haltung und Tötung der Tiere entsprach den ethischen Richtlinien für Tierversuche in Deutschland (nach §4 und §11 Deutsches Tierschutzgesetz) und wurde durch die oberbayrische Regierung, die als Ethikkomitee der Technischen Universität München dient, unter der Referenznummer 32-568-2 genehmigt.

2.3 Gewebegewinnung und Präparation

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Meerschweinchen des Typs „Dunkin Hartley“ (Envigo RMS GmbH, Horst, Niederlande und Charles River International GmbH, Wilmington, Massachusetts, USA) verwendet, die bei ihrer Ankunft zwischen 150 g und 250 g wogen. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in entsprechenden Käfigen gehalten. Jeweils zwei Tiere waren in einem Käfig, welcher sich in einem Klimaschrank befand (Uni Protect, Ehret, Emmendingen, Deutschland). Die Temperatur lag zwischen 20 °C und 24 °C und die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60 % im Klimaschrank. Außerdem wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden automatisch simuliert. Die Meerschweinchen blieben mindestens eine Woche am Lehrstuhl für Humanbiologie, damit sie sich akklimatisieren konnten. Ihnen stand Standardfutter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und Trinkwasser ad libitum zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Experimente wogen die Tiere 348 ± 42 g (Mittelwert \pm Standardabweichung). Die Tötung erfolgte durch Betäubung mit anschließendem Durchtrennen der Halswirbel und der Kehle, um ein vollständiges Ausbluten zu ermöglichen.

2.3.1 Präparation submuköser Plexus

Mit Hilfe einer chirurgischen Schere (14001-13, Fine Science Tools (FST), Heidelberg, Deutschland) und einer Gewebepinzette (11023-10, FST, Heidelberg, Deutschland) wurde das Abdomen geöffnet. Anschließend wurde das distale Kolon entnommen und ein drei Zentimeter langes Stück herausgeschnitten, welches 36 cm bis 43 cm vom distalen Ende entfernt war. Dieses wurde in eine Plastikpetrischale (633161; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit Sylgardboden (Sylgard® 184, Down Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Das Gewebestück wurde für die Präparation unter konstanten Bedingungen mit 4 °C kalter Präparationskrebslösung, die mit Carbogen (95 % CO₂, 5 % O₂; Andeldinger, Freising, Deutschland) begast wurde, perfundiert. Die Präparation fand unter einem binokularen Mikroskop (SZ51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) statt. Das Gewebe wurde entlang des Mesenterialansatzes mit einer chirurgischen Schere (14028-10, FST, Heidelberg, Deutschland) geöffnet, der Inhalt entfernt und der geöffnete Darm mit Hilfe von Insektenpinnen (26002-10, FST, Heidelberg, Deutschland) mit der Mukosa nach oben aufgespannt. Diese wurde im Anschluss mit Hilfe einer abgerundeten Pinzette (Dumont #7, FST, Heidelberg, Deutschland) vorsichtig abpräpariert. Danach wurde das Gewebe geflippt und mit nach oben orientierter Serosa festgesteckt. Anschließend wurden Serosa, Längsmuskulatur, myenterischer Plexus und Teile der Zirkulärmuskulatur vorsichtig mit einer Fein-Schere (15370-52, FST, Heidelberg, Deutschland) abgeschnitten. Der nun freiliegende SMP wurde auf einen Silikonring, der eine rechteckige Öffnung von 2x1 cm enthielt, mit der mukosalen Seite nach oben aufgespannt. Abschließend konnten die restlichen zirkulären Muskeln und

Teile des Bindegewebes mit der Fein-Schere (15370-52, FST, Heidelberg, Deutschland) entfernt und die submukösen Ganglien freigelegt werden.

2.3.2 Präparation myenterischer Plexus

Das Abdomen der getöteten Tiere wurde mit Hilfe einer chirurgischen Schere (14001-13, FST, Heidelberg, Deutschland) und einer Gewebepinzette (11023-10, FST, Heidelberg, Deutschland) geöffnet, das Ileum entfernt und ein drei Zentimeter langes Stück in eine Plastikpetrischale (633161; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit Sylgardboden (Sylgard® 184, Down Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Das Gewebestück wurde für die Präparation unter konstanten Bedingungen mit 4 °C kalter Präparationskrebslösung, die mit Carbogen (95 % CO₂, 5 % O₂; Andelinger, Freising, Deutschland) begast wurde, perfundiert. In die Perfusion wurde 1 µM Nifedipin (siehe Punkt 2.8.6) pipettiert (Shen et al., 2000). Die Durchführung geschah auch hier unter einem binokularen Mikroskop (SZ51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Das Gewebe wurde entlang des Mesenterialansatzes mit einer chirurgischen Schere (14028-10, FST, Heidelberg, Deutschland) geöffnet, der Inhalt entfernt und der geöffnete Darm mittels Insektenpinnen (26002-10, FST, Heidelberg, Deutschland) mit der Mukosa nach oben aufgespannt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Entfernung der Mukosa, der Submukosa und der zirkulären Muskeln mit einer Fein-Schere (15370-52, FST, Heidelberg, Deutschland). Weitere zirkuläre Muskeln wurden mit einer spitzen Pinzette Dumont #5 (FST, Heidelberg, Deutschland) vorsichtig abgezogen. Abschließend wurde der MP auf einen Silikonring, der eine rechteckige Öffnung von 2x1 cm enthielt, mit der serosalen Seite nach oben aufgespannt.

2.4 Versuchsaufbau des Imaging-Setups

Der Silikonring mit dem submukösen beziehungsweise myenterischen Gewebepräparat wurde anschließend in eine selbst designte Acryl-Versuchskammer, die einen Boden aus 130 μm dünnen Deckglas (40 mm Durchmesser, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) besaß, überführt. Die Acryl-Kammer wurde durch Plastikschräuche (Tygon®R3603, Durchmesser 2,79 mm; Saint Gobain, Akron, Ohio, USA) und eine Peristaltikpumpe (Minipuls®3; Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA) mit 500 ml, 37 °C carbogengesättigter Versuchskrebslösung, die durch ein Wasserbad (WiseCircu®; Witeg, Wertheim, Deutschland) erwärmt wurde, perfundiert. Bei myenterischen Präparaten wurde zusätzlich 1 μM Nifedipin (siehe Punkt 2.8.6) in die Versuchskrebslösung gegeben. Die Geschwindigkeit der Peristaltikpumpe betrug 21,1 U/min, welche einer Durchflussrate von 9,1 ml/min entsprach.

Die Acryl-Kammer wurde auf einem inversen Mikroskop (Zeiss Axio Observer D1; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) befestigt. Für die Färbung der Ganglien (siehe Punkt. 2.5.2) wurde ein 10x Objektiv (Zeiss A-Plan 10x/0.25 Ph1 Var1 M27; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet. Die Aufnahmen neuronale Antworten erfolgten mit Hilfe eines 40x oder eines 100x Ölimmersionsobjektivs (Olympus UApo 40x OI3/340 Oil NA 1.35-0.5 und Olympus UPlanApo 100x Oil NA 1.35-0.5; Olympus Corporation, Tokyo, Japan), welche in 13,4 $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$ beziehungsweise 2,3 $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$ resultierten. Als Lichtquelle diente eine grüne 3 W LED (LE T A2A true green (521 nm) 700mA; OSRAM GmbH, München, Deutschland), die an ein selbstgebautes Netzteil angeschlossen war, bei dem der Strom manuell geregelt werden konnte. Die Lichtstrahlen wurden durch ein modifiziertes Filterset (565 nm dichroitischen Spiegel, Anregungsfilter: 530 – 560 nm, Sperrfilter: 575 – 645 nm; AHF Analysetechnik AG, Tübingen, Deutschland) geleitet. Für die Signal Detektierung wurde eine aus 80x80 Pixel bestehende, gekühlte CCD (charge coupled device) Kamera (NeuroCCD-SMQ imaging system; RedShirtImaging LLC, Decatur, Georgia, USA) verwendet. Die einzelnen Stimuli wurden mit Hilfe eines computergesteuerten Impulsgenerators (Pulse Pal v2; Sanworks LLC, Sound Beach, New York, USA) erzeugt (Sanders and Kepecs, 2014). Für hochauflösende Bilder der Ganglien wurde eine weitere Kamera (Axio Cam Icm1; 1388 x 1038 pixel, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Für die Positionierung von Elektroden, Spritz- und Färbepipetten wurden Mikromanipulatoren des Typs M3333 (Narishige International Limited, London, Großbritannien) verwendet. Mikroskop, CCD Kamera, hochauflösende Kamera und Mikromanipulatoren waren auf einem vibrationsgedämpften Labortisch (Technical Manufacturing Corporation, Peabody, Massachusetts, USA) montiert und von einem selbstgebaudem Faraday Käfig umgeben, um Störungen und Vibrationen während den Aufnahmen zu minimieren.

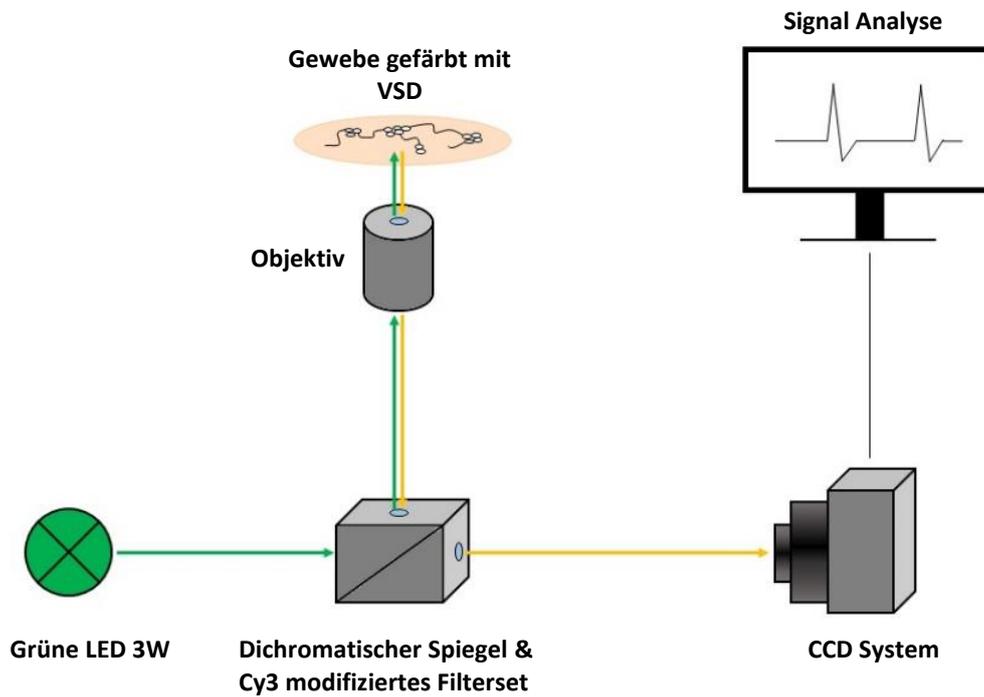


Abbildung 6: Versuchsaufbau des Imaging-Setups

Über eine grüne LED wird Licht durch ein modifiziertes Filterset geleitet. In diesem befindet sich ein dichromatischer Spiegel, der das Anregungslicht durch das Objektiv lenkt. Dadurch wird der spannungssensitive Farbstoff (VSD) im Präparat angeregt und emittiert Photonen, welche auf den Chip der CCD Kamera gelenkt und schließlich am Computer angezeigt werden.

2.5 Ultrafast Neuroimaging Technik

Bevor optische Methoden zur Messung der neuronalen Aktivität entwickelt wurden, konnten neurophysiologische Eigenschaften von enterischen Nervenzellen nur mit Hilfe von intrazellulären Ableitungen, wie zum Beispiel der Patch-Clamp-Technik, ermittelt werden (Bornstein et al., 1994). Die Gruppen Obaid et al. (Obaid et al., 1999) und Neunlist et al. (Neunlist et al., 1999) entwickelten fast zeitgleich die „Ultrafast Neuroimaging“ Methode, ein optisches Bildgebungsverfahren, bei dem in Kombination mit spannungssensitiven Farbstoffen, ein simultanes Erkennen beziehungsweise Aufnehmen von schnellen Potentialänderungen mehrerer Nervenzellen möglich war (Michel et al., 2011; Neunlist et al., 1999; Schemann et al., 2002). Bei dieser extrazellulären Methode, auch als „multi-site optical recording“ Technik (MSORT) bezeichnet, kann mit einer Geschwindigkeit von bis zu 2 kHz und einer optischen Auflösung von 80x80 Pixeln aufgenommen werden. Des Weiteren ist die MSORT Methode weniger invasiv als intrazelluläre Ableitungstechniken.

2.5.1 Spannungssensitiver Farbstoff

Als spannungssensitiver Farbstoff (englisch: voltage sensitive dye, VSD) wurde 1-(3-sulfonato-propyl)-4-[β -[2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium betaine (Abbildung 7) kurz Di-8-ANEPPS (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet. Di-8-ANEPPS lagerte sich in die Zellmembran ein und änderte sein Absorptions- und Emissionsspektrum ($\Delta F/F$) proportional zum Membranpotential (Fromherz and Lambacher, 1991; Neunlist et al., 1999). Diese Fluoreszenzänderungen ($\Delta F/F$) wurden mit Hilfe der CCD Kamera detektiert. Nachteile dieses Farbstoffes waren das schnelle Ausbleichen der Zellen sowie die Bildung freier Radikale und der damit einhergehenden Fototoxizität durch den Farbstoff bei längerer Belichtungszeit (Kalyanaraman et al., 1987; Mazzuoli and Schemann, 2009; Obaid et al., 1999).

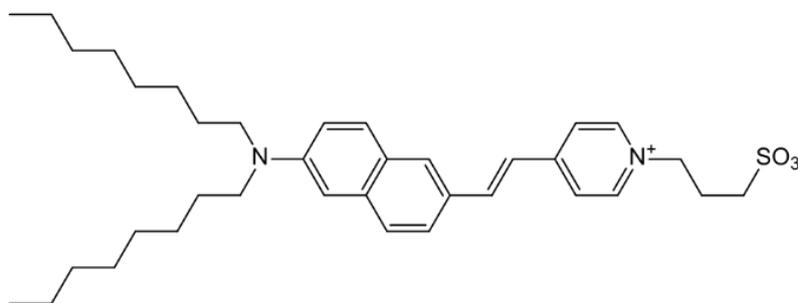


Abbildung 7: Di-8-ANEPPS Molekülstruktur (Bild stammt von der Herstellerwebsite)

2.5.2 Protokoll zum Färben eines Ganglions

20 μM Di-8-Anepps, gelöst in Versuchskrebslösung mit 0,0135 % Pluronic F-127 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) und 0,135 % DMSO (Acros Organics, Gell, Belgien) wurde mit Hilfe einer Glaspipette (Science products, Hofheim, Deutschland) mit kleiner Öffnung (äußerer Durchmesser der Pipettenöffnung bei submukösen Ganglien: circa 7 μm , äußerer Durchmesser der Pipettenöffnung bei myenterischen Ganglien: circa 11 μm) in ein Ganglion injiziert. Hierfür wurde die Glaspipette (Science products, Hofheim, Deutschland) über ein Ganglion oder einen intraganglionären Faserstrang positioniert und die Ganglienhülle vorsichtig angeritzt. Anschließend wurde der Farbstoff mit Hilfe von 5 bis 15 Druckimpulsen mit je 0,5 bar bis 1,0 bar über ein computergesteuertes Mikrospritzsystem (PDES-2L; npi electronic, Tamm, Deutschland) injiziert. Ein Druckimpuls dauerte 400 ms. Bis zur ersten Aufnahme wurde mindestens 15 Minuten gewartet, damit sich der Farbstoff in die Zellmembran einlagern konnte. Während dieser Zeit befand sich das Präparat im Dunkeln. Diese Färbemethode änderte nicht die elektrophysiologischen Eigenschaften der Nervenzellen (Neunlist et al., 1999).

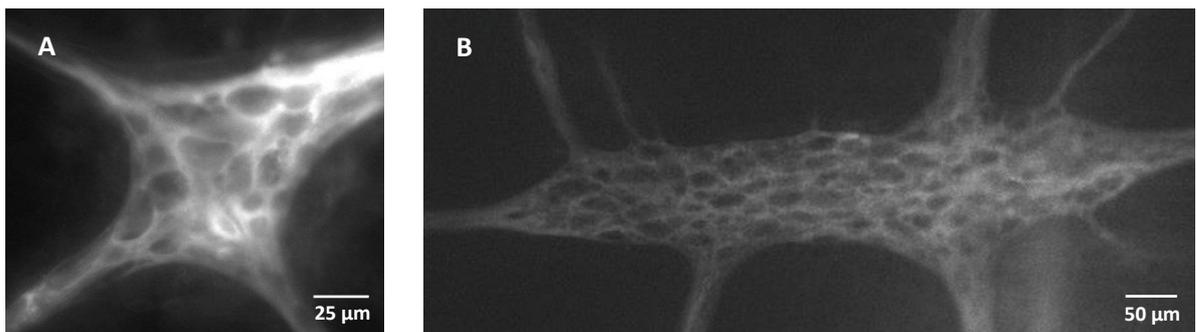


Abbildung 8: Ganglien gefärbt mit spannungssensitivem Farbstoff (Di-8-ANEPPS)

A: Submuköses Ganglion aufgenommen mit Axio Cam Icm1, Objektivvergrößerung: 40x

B: Myenterisches Ganglion aufgenommen mit Axio Cam Icm1, Objektivvergrößerung: 10x

2.6 Vitalitätstest

Die allgemeine Vitalität der Neurone wurde mittels elektrischer Stimulation intraganglionärer Fasern getestet. Die Punkt-Stimulations-Elektrode bestand aus einem, mit Teflon™ beschichteten, Platindraht (25 µm Durchmesser; Science products GmbH, Hofheim, Deutschland) und war mit einem konstanten Stromimpulsgenerator (A360; World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) verbunden. Durch einen einzelnen Stromimpuls von 600 µs Dauer und einer Amplitude von 20 µA bis 60 µA kam es bei vitalen Neuronen zu schnellen EPSPs (fEPSPs) (Abbildung 9).

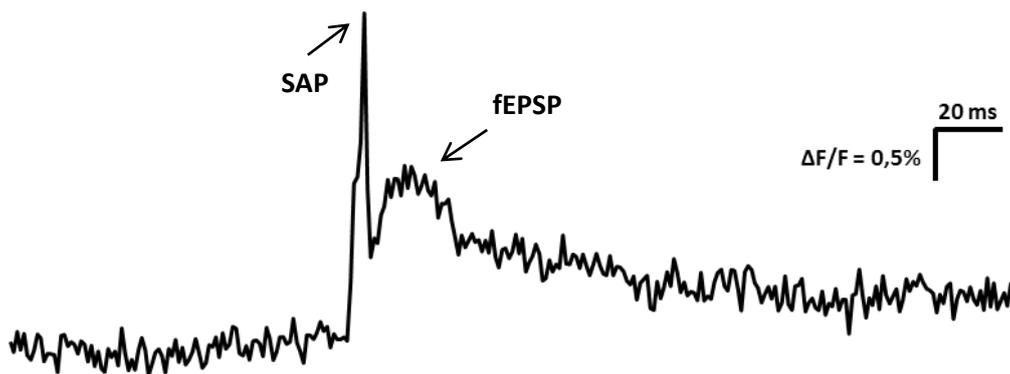


Abbildung 9: Trace eines schnellen EPSPs

Ein einzelner Stromimpuls von 600 µs Dauer auf einem intraganglionären Faserstrang löst in Nervenzellen zuerst ein Summenaktionspotential (SAP) gefolgt von einem schnell erregenden postsynaptischen Potential (fEPSP) aus. Ein SAP ist die Summe aller Aktionspotenziale verschiedener Nervenfasern.

2.7 Protokolle zur mechanischen Stimulation

Damit die Eigenschaften mechanosensitiver enterischer Neurone untersucht werden konnten, wurden verschiedene Protokolle zur mechanischen Stimulation verwendet. Bei der Deformation von Neuronen kommt es hauptsächlich zur Kompression oder zur Dehnung der Neurone. Um eine Kompression herbeizuführen, wurden $89,4 \pm 16,6$ nl/s Krebslösung direkt in das Ganglion injiziert (intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik). Eine andere mechanische Stimulationsmöglichkeit ist die Dehnung der Neurone. Im Folgenden wird das Protokoll zum Ablauf der mechanischen Stimulation deutlich:

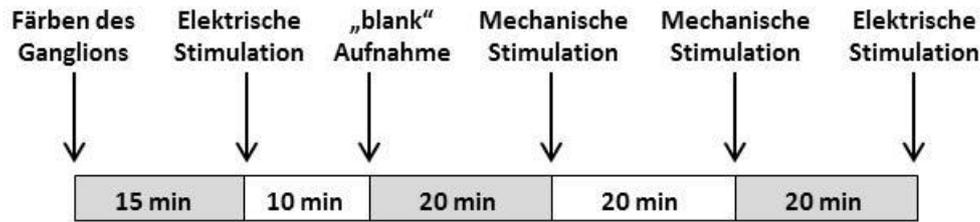


Abbildung 10: Protokoll mechanische Stimulation

15 Minuten nach dem Färben des Ganglions wurden die Neurone mittels elektrischer Stimulation auf Vitalität geprüft. Danach erfolgte eine „blank“ Aufnahme, um spontan aktive Neurone zu ermitteln. Nach weiteren 20 Minuten wurde mechanisch stimuliert. Dieser Schritt wurde je nach Experimentdesign bis zu zweimal wiederholt. Abschließend wurde nochmals überprüft, ob die Neurone weiter vital waren.

2.7.1 Kompression

Um eine Kompression der Neurone herbeizuführen, wurde die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik verwendet (Mazzuoli and Schemann, 2009, 2012; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a, 2015b). Bei dieser Technik kam es primär zu einer Kompression der Neurone. Es wirkten wahrscheinlich Scher- und Druckspannungen.

Zuerst erfolgte die Herstellung der Glaspipetten (Science products, Hofheim, Deutschland) eigens mit Hilfe eines Flaming/Brown Mikropipetten Puller P87 (Sutter instruments, Novato, Kalifornien, USA) mit anschließender Befüllung mit Versuchskrebslösung. Die Glaspipette (Science products, Hofheim, Deutschland) wurde mit einem Mikromanipulator des Typs M3333 (Narishige International Limited, London, Großbritannien) in einem Winkel von $76 \pm 6^\circ$ zur Gewebeoberfläche über ein Ganglion oder einen intraganglionären Faserstrang positioniert und die Ganglionhülle vorsichtig angeritzt. Der äußere Durchmesser der Glaspipettenöffnung für submuköse Ganglien lag bei circa $7 \mu\text{m}$ und für myenterische Ganglien bei circa $11 \mu\text{m}$. Anschließend wurden $89,4 \pm 16,6 \text{ nl/s}$ Krebslösung über ein computergesteuertes Mikrospritzsystem (PDES-2L; npi electronic, Tamm, Deutschland) in das Ganglion injiziert. Die Krebslösung strömte ein und vergrößert das Volumen des gesamten Ganglions. Aufgrund der Verdrängung wurden die einzelnen Neurone zusammengedrückt (Abbildung 11 und Abbildung 12). Bei diesem Stimulus gab es zwei unterschiedliche Deformationsphasen. Während des Einstroms der Krebslösung gab es eine initiale dynamische Phase, gefolgt von einer andauernden Phase (englisch: sustained Phase). Unspezifische Effekte konnten ausgeschlossen werden, da die Zusammensetzung, der pH-Wert und die Osmolarität der injizierten Lösung identisch mit der zu perfundierenden Lösung waren. Der Druck (im SMP: 0,2 bar bis 1,2 bar, im MP: 0,2 bar bis 1,0 bar) wurde so gewählt, dass visuell das ganze Ganglion deformiert wurde. Mit dieser Technik konnte der finale Druck, der auf die Neurone wirkte, und das injizierte Volumen nicht gemessen werden. Die Injektionsdauer der Krebslösung betrug für myenterische Ganglien 400 ms. Für submuköse Ganglien variierte sie je nach Versuchsdesign zwischen

200 ms bis 1000 ms. Normalerweise hatte sie die Dauer von 600 ms, da auch hier die visuelle Kontrolle der entscheidende Punkt war: Bei 600 ms kam es zur vollständigen sichtbaren Deformation der Ganglien. Die gesamte Aufnahmezeit war bei allen Experimenten mit der intraganglionären Krebslösungsinjektionstechnik 2000 ms.

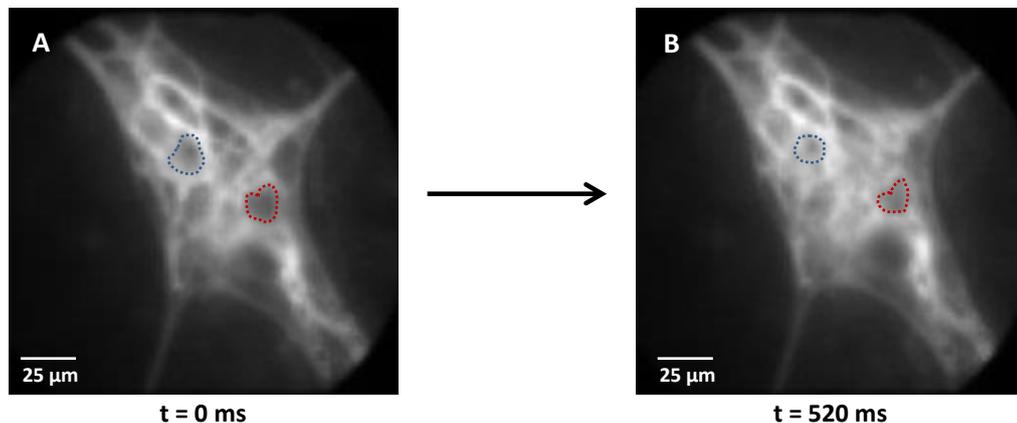


Abbildung 11: Deformation eines submukösen Ganglions während der intraganglionären Injektion
 A zeigt das Ganglion vor der Injektion, B zeigt dasselbe Ganglion zum Zeitpunkt des Deformationsmaximums. Zwei einzelne Neurone wurden farblich markiert, um die Kompression der einzelnen Neurone während der Stimulation sichtbar zu machen.

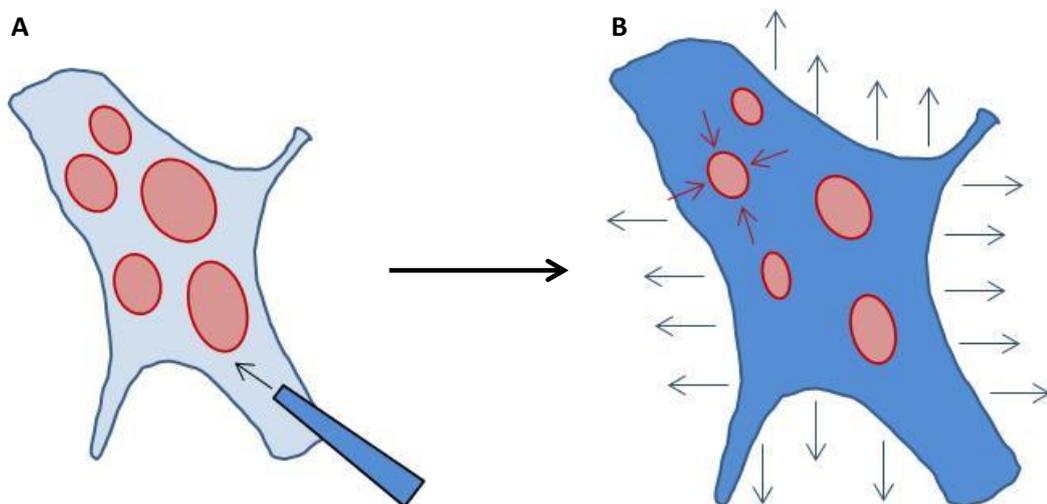


Abbildung 12: Skizze eines Ganglions während der intraganglionären Injektion
 Die Glaspipette mit der Versuchskrebslösung wird über ein Ganglion positioniert und die Ganglienoberfläche leicht angeritzt (A). Es erfolgt die intraganglionäre Injektion. Die Krebslösung strömt in das Ganglion und es kommt zu einer Oberflächenvergrößerung des Ganglions (durch blaue Pfeile symbolisiert). Auf die einzelnen Neurone wirken Druckspannungen und es kommt zu einer Kompression (durch rote Pfeile symbolisiert) (B).

2.7.2 Dehnung

Um einzelne Neurone dehnen zu können, wurde ein Ganglion mitsamt dem umgebenden Gewebe gedehnt. Es wirkten Zugspannungen.

Zuerst wurden zwei orthodontische Drähte (Ref. Nummer: E0010; RMO, Denver, Colorado, USA) mit einer Flachzange (3252145; Knipex, Wuppertal, Deutschland) in einem stumpfen Winkel von 118° gebogen. Die Drähte wurden anschließend links und rechts neben dem Ganglion platziert. Bei der Positionierung war es wichtig keine Faserstränge zu berühren, damit Verletzungen und spontane mechanische Aktivierung der Neurone vermieden werden konnten. Einer der Drähte wurde mit einem Mikromanipulator des Typs M3333 (Narishige International Limited, London, Großbritannien) an eine feste Position bewegt. Der andere Draht war mit einem motorisierten Piezo-Mikromanipulator (PM-10 mit DC-3K, Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) verbunden. Der mobile Draht wurde mit einer Geschwindigkeit von $150 \mu\text{m/s}$ senkrecht zur Ganglionachse bewegt und das Ganglion gedehnt (Abbildung 13 und Abbildung 14). Auch hier gab es die oben beschriebenen Deformationsphasen, eine dynamische Phase während der aktiven Dehnung des Ganglions und eine andauernde Phase nach Ende der Bewegung.

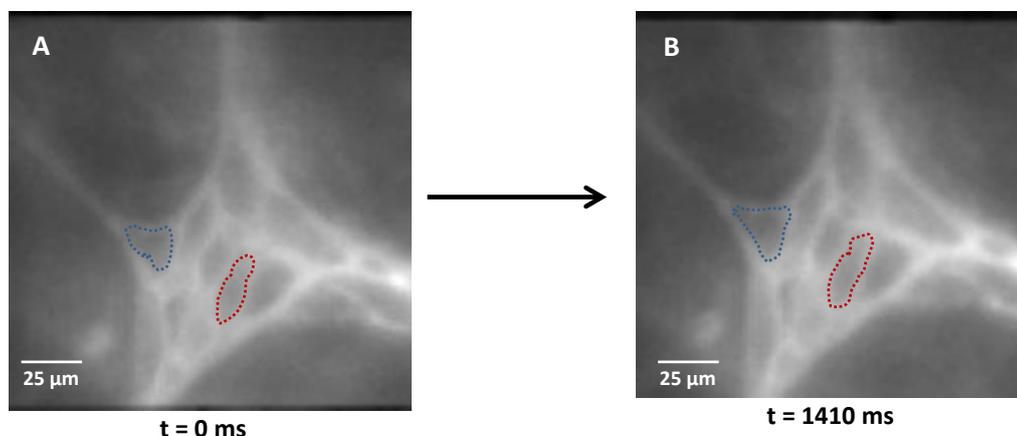


Abbildung 13: Deformation eines submukösen Ganglions während der Dehnung

A zeigt das Ganglion vor der Dehnung, B zeigt dasselbe Ganglion zum Zeitpunkt des Deformationsmaximums. Zwei einzelne Neurone wurden farblich markiert, um die Dehnung der einzelnen Neurone während der Stimulation sichtbar zu machen.

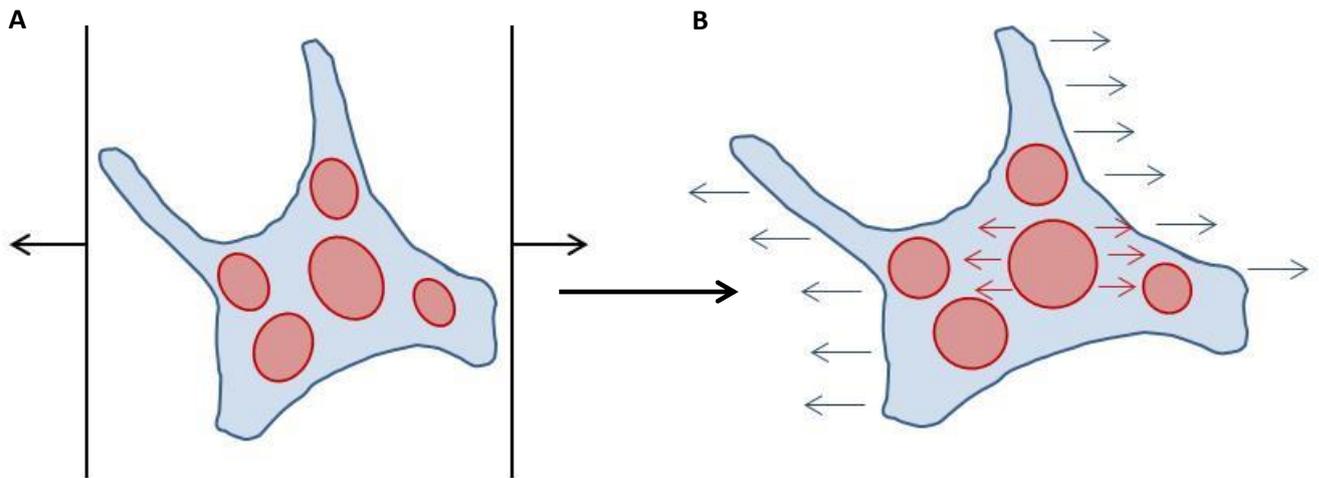


Abbildung 14: Skizze eines Ganglions während der Dehnung

Zwei gewinkelte Drähte werden vorsichtig links und rechts neben dem Ganglion platziert. Einer der Drähte hat eine feste Position. Der andere Draht bewegt sich mit einer Geschwindigkeit von $150 \mu\text{m/s}$ senkrecht zur Ganglionachse (A). Das Ganglion wird gedehnt und auf die einzelnen Neurone wirken Zugspannungen (B).

2.8 Pharmakologie

2.8.1 Versuchsprotokoll

Als mechanischer Stimulus wurde für die Pharmakologie, die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik gewählt. Dieser Stimulus ist bereits für Neurone im myenterischen Plexus validiert und etabliert (Mazzuoli and Schemann, 2009, 2012; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a; Schemann and Mazzuoli, 2010). Der einstellbare Druck wurde im MP zwischen 0,2 bar und 1,0 bar und im SMP zwischen 0,2 bar und 1,2 bar gewählt. Die Injektionsdauer betrug im MP 400 ms beziehungsweise im SMP 600 ms. Insgesamt wurde für 2000 ms aufgenommen. 15 Minuten nachdem das Ganglion gefärbt war, wurde mechanisch stimuliert. Anschließend wurde die jeweilige Substanz für mindestens 20 Minuten perfundiert und danach erneut mechanisch stimuliert. Abschließend folgte die 20-minütige Auswaschung des Blockers und eine erneute mechanische Stimulation (Abbildung 15).

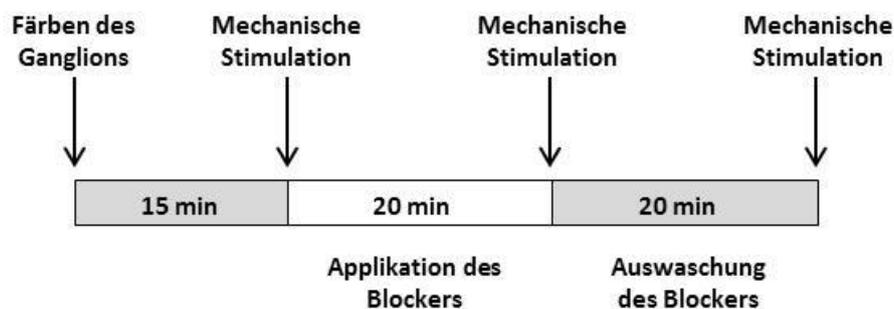


Abbildung 15: Versuchsprotokoll Pharmakologie

15 Minuten nachdem das Ganglion gefärbt war, wurde mechanisch stimuliert. Anschließend wurden die jeweiligen Substanzen für 20 Minuten perfundiert, danach erneut mechanisch stimuliert. Abschließend folgte die Auswaschung (mindestens 20 Minuten) des Blockers und eine erneute mechanische Stimulation.

2.8.2 APETx2

Das Peptid APETx2 (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) ist ein spezifischer Blocker für den säuresensitiven Ionenkanal 3 (ASIC3) (Chagot et al., 2005; Diochot et al., 2004). Die Pudersubstanz, mit einem Molekulargewicht von 4561,06 Da, wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und durch Zugabe in der Endkonzentration von 1 μ M in die Perfusions-Versuchskrebslösung appliziert.

2.8.3 Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate

Gd³⁺ (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) zählt zu den Metallen der seltenen Erden und ist ein Blocker für mechanisch gesteuerte Kationkanäle (Kunze et al., 1999; Weber et al., 2001). Die Substanz, mit einem Molekulargewicht von 371,70 Da, wurde in bidestilliertem Wasser gelöst. Die Experimente wurden mit der Endkonzentration von 100 µM durchgeführt und die Applikation erfolgte durch Zugabe zur Perfusions-Versuchskrebslösung.

2.8.4 HC-067047

HC-067047 (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) ist ein hoch spezifischer TRPV4 Antagonist (Everaerts et al., 2010). Die Substanz, mit einem Molekulargewicht von 471,51 Da, wurde in DMSO (Acros Organics, Gell, Belgien) gelöst. Die Applikation erfolgte in der Konzentration 0,15 µM durch Zugabe zur Perfusions-Versuchskrebslösung.

2.8.5 KB-R7943

KB-R7943 (Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien) blockiert N-Methyl-D-Asparagin-Säure (NMDA) Rezeptoren (Brustovetsky et al., 2011). Die Substanz in Puderform, mit einem Molekulargewicht von 427,49 Da, wurde in DMSO (Acros Organics, Gell, Belgien) gelöst. Die finale Konzentration für die Experimente betrug 10 µM. Die Substanz wurde in die Perfusions-Versuchskrebslösung pipettiert.

2.8.6 Nifedipin

Nifedipin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) blockiert den Calciumionen-Einstrom in Zellen der glatten Muskulatur, genauer gesagt handelt es sich um einen L-Typ Ca²⁺ Kanalblocker (Shen et al., 2000). Die Pudersubstanz, mit einem Molekulargewicht von 346,3 Da, wurde in Ethanol p.a. gelöst. Durch Zugabe von Nifedipin zur Perfusions-Krebslösung, in der finalen Konzentration von 1 µM, wurden spontane Muskelkontraktionen minimiert. Nifedipin hat keinen Einfluss auf mechanosensitive enterische Neurone (Mazzuoli and Schemann, 2009; Spencer et al., 2003; Spencer and Smith, 2004; Weber et al., 2001).

2.8.7 Nifluminsäure

Nifluminsäure (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) blockiert Chloridkanäle (Knauf and Mann, 1984). Die gelbliche Substanz, mit einem Molekulargewicht von 282,22 Da, wurde in DMSO (Acros Organics, Gell, Belgien) gelöst. Die Experiment-Endkonzentration betrug 10 μ M und die Applikation erfolgte durch Zugabe zur Perfusions-Versuchskrebslösung.

2.8.8 SKF-96365

SKF-96335 (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) blockiert TRPC-Kanäle. (Song et al., 2014). Die pudrige Substanz, mit einem Molekulargewicht von 402,91 Da, wurde in bidestilliertem Wasser gelöst. Die Endkonzentration bei der Durchführung der Experimente betrug 10 μ M. SKF-96365 wurde durch Zugabe in die Perfusions-Versuchskrebslösung appliziert.

2.8.9 TRAM-34

Das Clotrimazol TRAM-34 (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) ist ein selektiver Inhibitor für calciumaktivierte Kaliumkanäle mittlerer Leitfähigkeit (IK_{Ca}) (Agarwal et al., 2013; Wang et al., 2007). Die Substanz in Puderform, mit einem Molekulargewicht von 344,84 Da, wurde in DMSO (Acros Organics, Gell, Belgien) gelöst. Die finale Konzentration für die Experimente betrug 1 μ M. Die Applikation erfolgte durch Zugabe zur Perfusions-Versuchskrebslösung.

2.8.10 TTX

Das Nervengift TTX (Biozol Diagnostica, Eching, Deutschland) blockiert schnelle spannungsabhängige Natriumkanäle (Na_v 1.1, Na_v 1.2, Na_v 1.3, Na_v 1.6, und Na_v 1.7) (Colquhoun and Ritchie, 1972; Narahashi et al., 1964). Die Substanz, mit einem Molekulargewicht von 319,27 Da, wurde in bidestilliertem Wasser gelöst. Die Experimente wurden mit der Endkonzentration von 1 μ M durchgeführt und die Applikation erfolgte durch Zugabe zur Perfusions-Versuchskrebslösung.

2.8.11 ω -Conotoxin GVIA

Das Neurotoxin ω -Conotoxin GVIA (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) ist ein spezifischer spannungsabhängiger N-Typ Calciumkanalblocker (Ca_v 2.2) mit irreversibler Wirkung (Cruz and Olivera, 1986; Cunningham et al., 1998). Die Substanz, geliefert als Pulver mit einem Molekulargewicht von 3037 Da, wurde in bidestilliertem Wasser gelöst. Die Versuchskonzentration betrug 0,2 μ M und die Applikation erfolgte durch Zugabe zur Perfusions-Versuchskrebslösung.

2.8.12 Pharmakologie Zusammenfassung

In der folgenden Tabelle sind die Substanzen, die für Pharmakologieexperimente verwendet wurden, zusammengefasst.

Tabelle 10: Zusammenfassung der getesteten Substanzen

Substanz	Konzentration [μ M]	Zeit [min]	Wirkungsweise
APETx2	1	20	Blocker für ASIC3
Gadolinium(III)	100	20	Blocker für mechanisch gesteuerte Kationkanäle
HC-067047	0,15	20	TRPV4 Antagonist
KB-R7943	10	20	Blocker für NMDA-Rezeptor
Nifluminsäure	10	20	Blocker für Chlorid-Ionenkanäle
SKF-96365	10	20	Blocker für TRPC-Kanäle
TRAM-34	1	20	Calciumaktivierter Kaliumkanalblocker
TTX	1	20	Spannungsabhängiger Natriumkanalblocker
ω -Conotoxin GVIA	0,2	20	Spannungsabhängiger N-Typ Calciumkanalblocker

2.9 Immunhistochemie

Die Gewebe wurden nach dem Neuroimaging Experiment bei 4 °C mit Hilfe der Paraformaldehyd „Fix“-Lösung (Tabelle 4) über Nacht fixiert. Nach der Fixierung wurde das Präparat dreimal für je 10 Minuten mit PBS (Tabelle 6) gewaschen. Zur längeren Aufbewahrung wurde das gewaschene Präparat in PBS/Na₃N Puffer transferiert und in einem 4°C Kühlraum gelagert. Die immunhistochemische Färbung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu minimieren, wurde das Präparat zunächst für 1 Stunde in Blockingserum (Tabelle 8) preinkubiert. Anschließend folgte eine erneute Waschung in PBS (dreimal je 10 Minuten). Danach wurde das Gewebe mit 200 µl des spezifischen primären Antikörpers (Tabelle 12) für 16 Stunden über Nacht inkubiert, gefolgt von drei weiteren Waschungen in PBS. Das Präparat wurde nun mit dem verdünnten sekundären Antikörper (Tabelle 12) für zwei weitere Stunden inkubiert. Zum Schluss wurde das Präparat erneut dreimal mit PBS gewaschen und auf einem, mit poly L-Lysine beschichtetem, Objektträger (Superfrost Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) und einem Deckglas (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland), mit Hilfe des Eindeckmediums (Tabelle 9) eingedeckt. Die Betrachtung der gefärbten Präparate erfolgte mit Hilfe eines Olympus BX61WI Mikroskops (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) und den entsprechenden Filtern (Tabelle 11). Als Lichtquelle diente eine 100 W Quecksilberdampf Lampe (USH-102D; Ushio Inc., Tokyo, Japan), die an ein U-RFL-T Netzteil (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) angeschlossen war. Die Bilder wurden mit dem F-View Imaging System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) aufgenommen und anschließend mit der Analyse-Software Cell[^]P v.3.4 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) an einem Computer bearbeitet.

Tabelle 11: Filter des Mikroskops Olympus BX61WI

Filter	Dichroitischer Spiegel [nm]	Anregungsfilter [nm]	Sperrfilter [nm]	Hersteller
Cy2	505	470 – 490	510 – 530	Olympus Corporation (Tokyo, Japan)
Cy3	565	530 – 560	575 – 645	AHF Analysetechnik AG (Tübingen, Deutschland)
Cy5	660	590 – 650	665 – 735	AHF Analysetechnik AG (Tübingen, Deutschland)

Tabelle 12: Liste der verwendeten Antikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Lieferant
Primär rabbit anti PIEZO-1	1 : 5000	Novus Biologicals (Littleton, Colorado, USA)
Sekundär donkey anti rabbit Cy2	1 : 200	Dianova (Hamburg, Deutschland)

2.10 Datenanalyse und Statistik

Die Betrachtung und Auswertung der Rohdaten erfolgte durch die Software Neuroplex v.10.12 (RedShirtImaging, Decatur, Georgia, USA). Für das Sammeln der Daten wurden Tabellen in der Software Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmont, Washington, USA) angelegt. Die statistische Auswertung sowie Graphen wurden mit Sigma Plot v.12.5 (Systat Software Inc., Erkrath, Deutschland) und GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) erstellt. Signalspuren (englisch: traces) wurden mit Hilfe der Software Igor Pro v.6.3.4.1 (WaveMetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) dargestellt. Graphen, „traces“ und Bilder wurden mit der Software Microsoft Office Powerpoint 2010 (Microsoft Corp., Redmont, Washington, USA) nachbearbeitet.

Die auftretende Bewegung während der Dehnung wurde durch das Makro Neuroplex_Data6_6_1 (Lehrstuhl Humanbiologie Technische Universität München, Freising, Deutschland) in Igor Pro v.6.3.4.1 kompensiert. Hierfür wurde zunächst das Neuroplex Rohfile in Igor Pro importiert. Danach wurde die Bewegung wie folgt kompensiert: Reiter Neuroplex → Image Registration Movement Compensation → Image Registration. Abschließend wurde der „Regstack“ wieder als Neuroplex Datei gespeichert und konnte in Neuroplex ausgewertet werden (Thevenaz et al., 1998).

Längenmessungen beziehungsweise das Einfügen eines Längenmaßstabes in Bildern wurde mit dem Open Source Programm Fiji/ImageJ v.1.5.1 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) (Schneider et al., 2012) durchgeführt. Die Fläche der Neurone wurde ebenfalls mit Hilfe von Fiji/Image J v.1.5.1 manuell berechnet. Hierfür wurden sowohl für die Kompression, wie auch für die Dehnung einzelne Neurone zufällig ausgewählt und je dreimal die Fläche zum Zeitpunkt 0 und zum Zeitpunkt der maximalen Deformation berechnet. Die jeweiligen Werte wurden gemittelt. Die Fläche der Ganglien über die gesamte Aufnahmedauer wurde mit Hilfe des Fiji/ImageJ Makros NP_unwarp.ijm berechnet. Zuerst wurden die mit Igor Pro erstellten „Regstacks“ für die Dehnung und die Neuroplex Rohdateien für die Kompression über Plugins → Macros → Neuroplex file reader → select file in Fiji/ImageJ geladen. Anschließend wurde die Bildgröße über Image → Adjust → Canvas Size auf 100 x 100 Pixel gesetzt. Danach wurde über Analyze → Set measurements eingestellt, dass die Fläche (Area) der ganzen Einzelbilder (stack position) berechnet werden. Anschließend wurden die Flächenberechnungen des Ganglions aller Einzelbilder durchgeführt (Image → Adjust → Auto threshold → Method: Mean + Checkbox: Ignore black and Stack) und analysiert (Analyze → Analyze particals → Size: 100 – Infinity).

Außerdem wurde die Geschwindigkeit v , mit der die Neurone während der dynamischen Phase komprimiert beziehungsweise gedehnt wurden, mit folgender Formel berechnet:

$$v = \frac{\text{Neuronfläche (max. Deformation)} - \text{Neuronfläche (Zeitpunkt 0)}}{\text{Zeitdauer der dynamischen Phase}}$$

Die Ergebnisse der statistischen Analyse wurden entweder, falls die Daten normalverteilt waren, als Mittelwert \pm Standardabweichung oder als Median $[Q_{0,25} / Q_{0,75}]$, falls sie nicht normalverteilt waren, angegeben. Um zu prüfen, ob Normalverteilung vorlag, wurde der Shapiro-Wilk Test verwendet. Falls die Daten normalverteilt waren, wurde für ungepaarte Versuchsreihen ein Student t-Test (2 Gruppen) oder bei nicht normalverteilten Daten ein Mann-Whitney Rank Sum Test (2 Gruppen) gemacht. Bei gepaartem Versuchsdesign wurden für normalverteilte Daten der gepaarte Student t-Test (2 Gruppen) oder die Kruskal-Wallis One Way ANOVA (mehr als 2 Gruppen) mit anschließendem Holm-Sidak Test als Post-Hoc durchgeführt. Waren die Daten in gepaarten Versuchsreihen nicht normalverteilt, wurde entweder der Wilcoxon Signed Rank Test (2 Gruppen) oder der Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks Test (mehr als 2 Gruppen) mit anschließendem Tukey Test als Post-Hoc angewendet. Der Spearman Rangordnungstest wurde für nichtnormalverteilte Korrelationen verwendet. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzlevel von $p < 0,05$ gewählt.

Für die Auswertung der Daten wurden immer Aktionspotential Frequenz, die Burst Frequenz, der Prozentsatz antwortender Neurone pro Ganglion und der Neuroindex berechnet. Die Aktionspotential Frequenz wurde definiert als die Anzahl der Aktionspotentiale geteilt durch die Zeitdauer vom Stimulationsbeginn, bis hin zur Ende der Aufnahme (Mazzuoli and Schemann, 2009). Die Burst-Frequenz wurde definiert als die Anzahl der Aktionspotentiale geteilt durch die Zeitspanne vom ersten bis zum letzten Aktionspotential (Kugler et al., 2015). Der Neuroindex (NI) berechnete sich aus dem Prozentsatz antwortender Zellen pro Ganglion multipliziert mit der gemittelten Aktionspotential Frequenz (Buhner et al., 2014).

Um das Verhaltensmuster von Aktionspotentialen einzelner MEN zu charakterisieren, wurde der AI berechnet (Kugler et al., 2015; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a, 2015b). Der AI berechnete sich wie folgt:

$$AI = \frac{\text{Aktionspotential Frequenz (500 ms – Ende der Aufnahme)}}{\text{Aktionspotential Frequenz (0 ms – 500 ms)}}$$

Mit Hilfe des AI konnten MEN in RAMEN (Neurone mit schneller Adaption) und SAMEN (Neurone mit langsamer Adaption) eingeteilt werden. Neurone deren AI = 0 war, wurden als RAMEN und größer 0 als SAMEN klassifiziert.

3. Ergebnisse

3.1 Spontanaktivität submuköser Neurone

Bei dieser Messreihe sollte überprüft werden, ob ein mechanischer Stimulus Einfluss auf die Aktionspotential Frequenz von spontan aktiven Neuronen hat. Hierfür wurden zufällig 10 Ganglien aus 7 Meerschweinchen ausgewählt, bei denen spontan aktive Neurone vorhanden waren. Die Spontanaktivität wurde ermittelt, indem vor der mechanischen Stimulation eine Aufnahme ohne Stimulation („blank“ Aufnahme, Aufnahmedauer: 2000 ms), gemacht wurde. Danach wurde mindestens 20 Minuten gewartet und es erfolgte eine Aufnahme während der mechanischen Stimulation des Ganglions. 17 von insgesamt 143 Neuronen zeigten Spontanaktivität und hatten eine Aktionspotential Frequenz von $1,3 \pm 0,9$ Hz. Nach der mechanischen Stimulation antworteten alle zuvor spontan aktiven Neurone jedoch mit einer signifikant erhöhten Aktionspotential Frequenz von $2,9 \pm 1,9$ Hz ($p < 0,001$) (Abbildung 16).

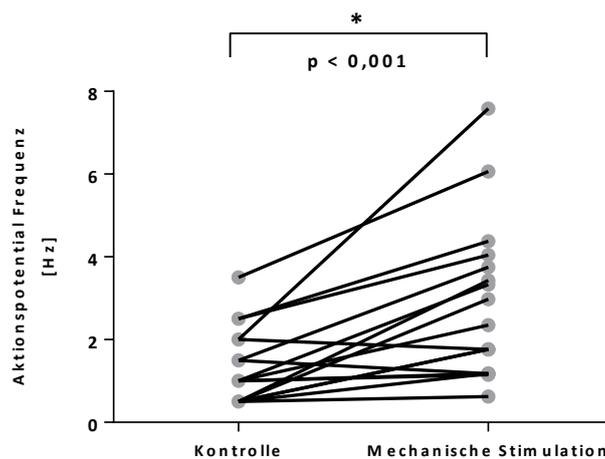


Abbildung 16: Auswertung Einfluss auf spontan aktive Neurone nach mechanischer Stimulation (gepaarter Student t-Test)
 17 von 143 Neurone zeigten Spontanaktivität und hatten eine Aktionspotential Frequenz von $1,3 \pm 0,9$ Hz. Nach der mechanischen Stimulation antworteten alle zuvor spontan aktiven Zellen jedoch mit einer signifikant unterschiedlichen Aktionspotential Frequenz von $2,9 \pm 1,9$ ($p < 0,001$). Eine Linie repräsentiert die Änderung der Aktionspotential Frequenz eines Neurons vor beziehungsweise nach der mechanischen Stimulation.

3.2 Submuköse Neurone sind sensitiv für Kompression

Experimente mit der intraganglionären Krebslösung-Injektionsmethode wurden an 21 Meerschweinchen, 34 Ganglien beziehungsweise 500 Neurone durchgeführt. Die Injektionsdauer betrug 600 ms und die Aufnahmedauer war 2000 ms. Insgesamt waren 23,6 [15,6/42,0] % der Neurone pro Ganglion sensitiv für den Kompressionsstimulus. Von diesen MEN wurden 35,2 % als RAMEN und 64,8 % als SAMEN identifiziert. Außerdem antworteten von den mechanosensitiven Neurone 83,0 % nur in der dynamischen und 2,3 % nur in der andauernden Phase. 14,7 % der MEN antworteten sowohl in der dynamischen wie auch in der andauernden Phase. Die dynamische Deformationsphase dauerte im Durchschnitt $663,3 \pm 78,4$ ms und die andauernden Phase 1137 ± 78 ms. Die Neurone hatten eine Aktionspotential Frequenz von $2,2 [1,1/3,4]$ Hz und eine Burst Frequenz von $12,2 [7,1/18,1]$ Hz. Der Neuroindex betrug $51,9 [24,2/100,8]$ Hz x %.

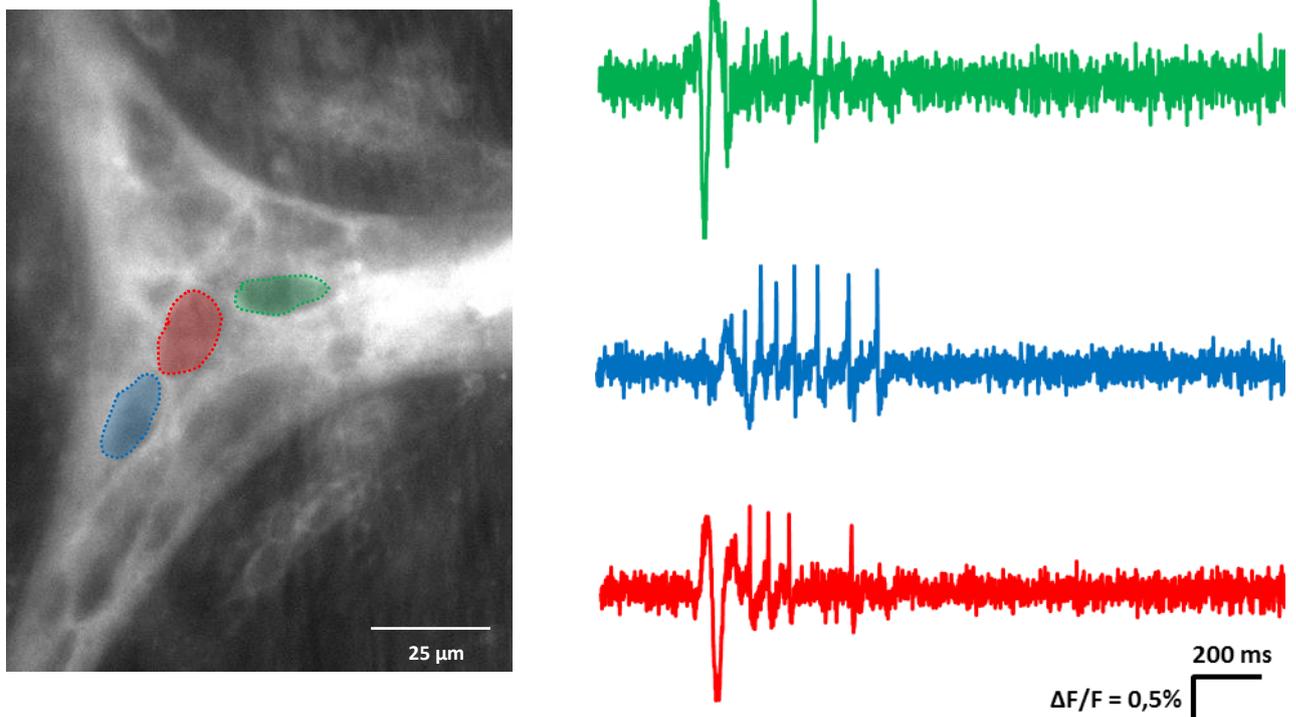


Abbildung 17: Beispiel: Antworten submuköser Neurone auf intraganglionäre Krebslösung-Injektion

Links: submuköses Ganglion, das mechanisch stimuliert wurde. Die drei Farben repräsentieren je ein Neuron, das für den Stimulus sensitiv war. Rechts: dazugehörige Traces. Am Anfang der Traces ist das mechanische Artefakt zu sehen gefolgt von Aktionspotentialen. Grüner Trace: 1 Aktionspotential, blauer Trace: 7 Aktionspotentiale, roter Trace: 4 Aktionspotentiale.

3.2.1 Reproduzierbarkeit

In dieser Studie wurde aus 6 Meerschweinchen, 7 Ganglien beziehungsweise 88 Neurone überprüft, ob die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik reproduzierbar ist. Hierfür wurde der Stimulus mit identischer Injektionsdauer und identischem Injektionsdruck dreimal appliziert. Zwischen jeder Applikation wurde mindestens 15 Minuten gewartet. Da es bei der Aktionspotential Frequenz, den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglien, im Neuroindex und der Burstfrequenz zu keinen signifikanten Unterschieden kam, wurde der Stimulus als reproduzierbar angesehen. Die Mediane der Aktionspotential Frequenz betrugen 2,3 [1,3/3,2] Hz (1. Injektion), 2,2 [1,7/2,7] Hz (2. Injektion) und 2,2 [1,7/2,3] Hz (3. Injektion) ($p = 0,326$) (Abbildung 18 A). Bei allen drei Injektionen antworteten je 12,5 [8,3/19] % der Neurone pro Ganglion ($p = 1,000$) (Abbildung 18 B). Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gab es für die drei Injektionen im Neuroindex: 19,8 [13,9/33,1] Hz x % (1. Injektion), 23,8 [20,8/28,3] Hz x % (2. Injektion) und 20,8 [13,9/28,3] Hz x % ($p = 0,486$) (Abbildung 18 C). Die Mediane der Burst Frequenz lagen für die erste Injektion bei 12,6 [6,6/18,3] Hz, für die zweite Injektion bei 13,2 [9,8/15,2] Hz und für die dritte Injektion bei 11,6 [9,3/14,4] Hz ($p = 0,115$) (Abbildung 18 D).

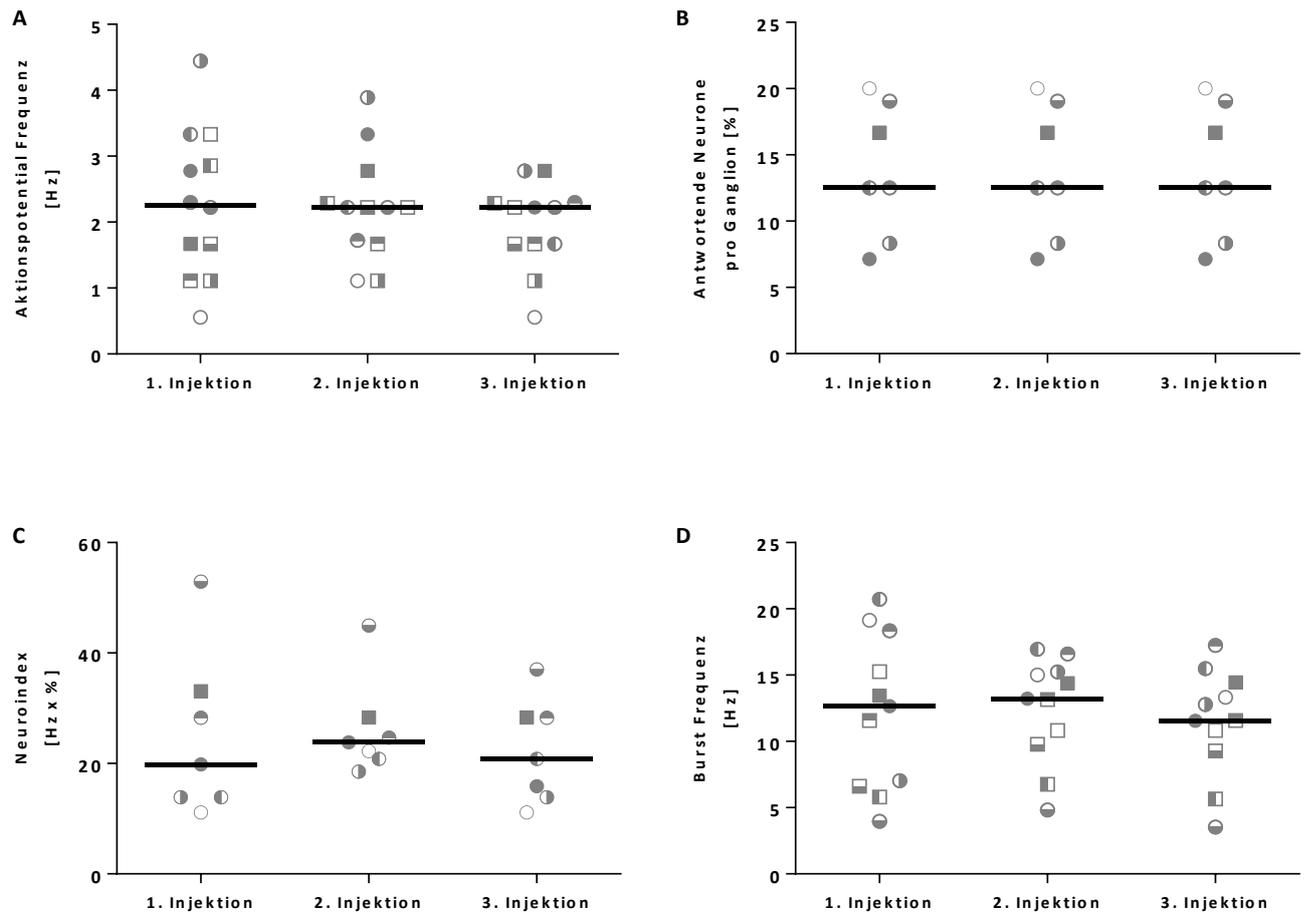


Abbildung 18: Reproduzierbarkeitstest für die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik

Der Stimulus war reproduzierbar, da es keine signifikanten Unterschiede für drei Injektionen bei der Aktionspotential Frequenz (A), bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglien (B), im Neuroindex (C) und bei der Burst Frequenz (D) gab. In A und D steht das gleiche Symbol für dieselbe Zelle. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.2.2 Stimulation mit unterschiedlicher Stimulusstärke

3.2.2.1 Unterschiedlicher Injektionsdruck

Mit dieser Studie sollte herausgefunden werden, ob ein Zusammenhang zwischen Antwortverhalten und Stimulusstärke existiert. Insgesamt wurden je drei mechanische Stimulationen mit Hilfe von Injektionen mit 0,4 bar, 0,7 bar und 1,0 bar in zufälliger Reihenfolge an 10 Meerschweinchen beziehungsweise 15 Ganglien durchgeführt. Die Injektionsdauer war 600 ms und die Aufnahmezeit betrug 2000 ms. 53 von 252 Neurone waren mechanosensitiv. Mit stärkerer Injektion erhöhte sich die Aktionspotential Frequenz signifikant: Von 1,1 [0,6/2,2] Hz (0,4 bar) auf 1,7 [1,1/2,5] Hz (0,7 bar) zu 2,2 [1,1/4,2] Hz (1,0 bar) (Abbildung 20 A). Bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglion gab es eine Tendenz: Während bei 0,4 bar und 0,7 bar noch 20,0 [9,1/27,8] % antworteten, erhöhte sich die Zahl der prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion bei 1,0 bar auf 25 [9,1/33,3] % (Abbildung 20 B). Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergab sich im Neuroindex zwischen 0,4 bar (41,7 [11,1/55,6] Hz x %) zu 1,0 bar (68,6 [13,9/108,3] Hz x %). Der Neuroindex bei 0,7 bar unterschied sich nicht signifikant zum Neuroindex bei 0,4 bar und 1,0 bar (Abbildung 20 C). Signifikante Unterschiede traten ebenfalls bei der Burst Frequenz bei 0,4 bar (8,1 [2,7/16,0] Hz) und bei 1,0 bar (11,8 [6,8/17,8] Hz) auf ($p < 0,05$). Die Burst Frequenz bei 0,7 bar betrug 11,6 [4,8/18,3] Hz (Abbildung 20 D).

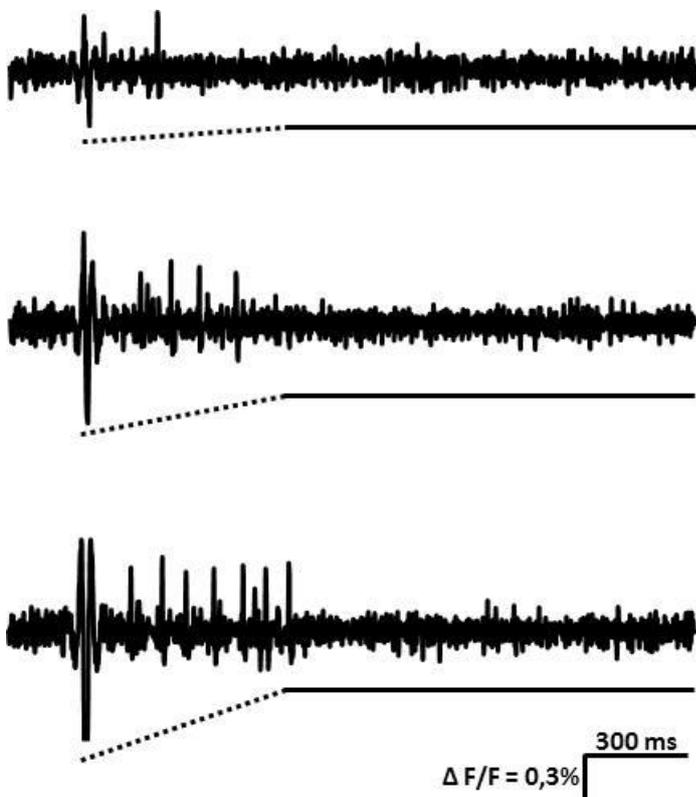


Abbildung 19: Beispiele für Injektionen mit unterschiedlichem Injektionsdruck
Diese Beispieltraces zeigen, dass das gleiche Neuron mit steigendem Injektionsdruck (erkennbar an der unterschiedlichen Steigung der gepunkteten Linie) eine höhere Aktionspotential Frequenz besitzt.

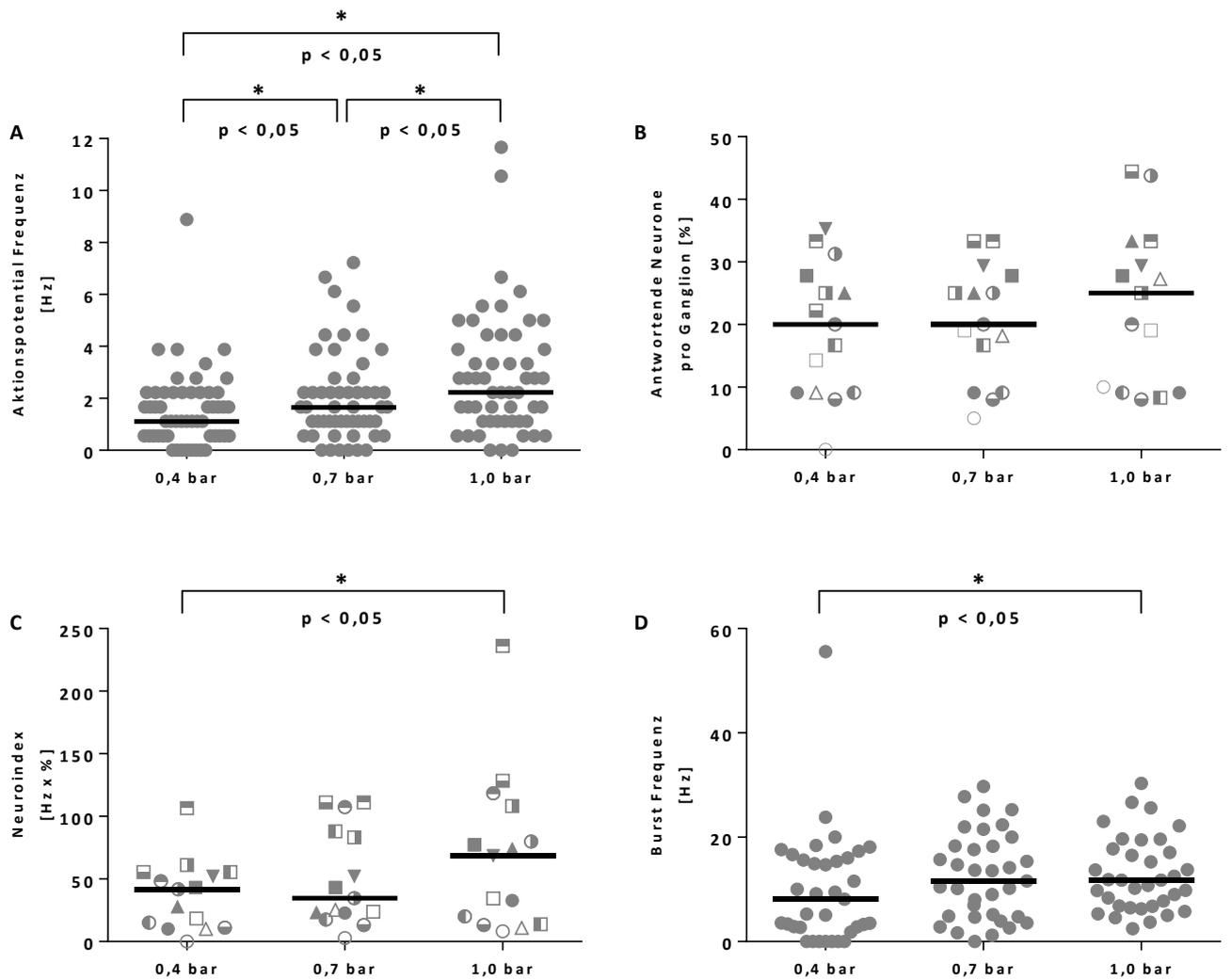


Abbildung 20: Unterschiedlicher Injektionsdruck (Friedman Test, Tukey-Test)

Mit Erhöhung des Injektionsdrucks ergaben sich signifikante Unterschiede für die Aktionspotential Frequenz (je $p < 0,05$) (A). Keine signifikanten Unterschiede traten bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglion auf (B). Der Neuroindex und die Burst Frequenz bei 0,4 bar waren signifikant unterschiedlich zum Neuroindex beziehungsweise zur Burst Frequenz bei 1,0 bar ($p < 0,05$). In A und D stellt jeder Punkt ein antwortendes Neuron dar. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.2.2.2 Unterschiedliche Injektionsdauer

Bei diesen Experimenten wurde getestet, ob auch die Injektionsdauer Einfluss auf das Antwortverhalten der Neurone hatte. Insgesamt wurden je drei mechanische Stimulationen mit Hilfe von Injektionen mit unterschiedlicher Dauer von 600 ms, 800 ms und 1000 ms an 3 Meerschweinchen beziehungsweise 4 Ganglien durchgeführt. Injiziert wurde mit einem konstanten Druck von 0,6 bar und die Aufnahmezeit betrug 2000 ms. 15 von 49 Neurone waren mechanosensitiv. Je länger injiziert wurde, desto höher war die Aktionspotential Frequenz. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) ergaben sich in der Aktionspotential Frequenz bei 600 ms (1,7 [1,1/2,2] Hz) im Vergleich zu 1000 ms (4,4 [3,3/6,1] Hz). Die Aktionspotential Frequenz bei 800 ms war 3,3 [2,2/4,4] Hz (Abbildung 22 A). Bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglion gab es keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,931$): 31,0 [30,8/40,0] % (600 ms), 34,9 [30,9/41,8] % (800 ms) und 31,0 [25,0/40,0] % (1000 ms) (Abbildung 22 B). Der Neuroindex für 1000 ms Injektionsdauer (144,1 [88,7/258,6] Hz x %) war signifikant höher ($p < 0,05$) wie der Neuroindex für 600 ms (65,4 [41,3/94,5] Hz x %). Der Neuroindex für 800 ms lag bei 94,0 [81,3/192,3] Hz x % (Abbildung 22 C). Bei der Burst Frequenz traten keine signifikanten Unterschiede zwischen 600 ms (9,0 [7,7/14,5] Hz), 800 ms (12,3 [4,4/20,3] Hz) und 1000 ms (9,6 [7,1/18,3] Hz) auf ($p < 0,794$) (Abbildung 22 D).

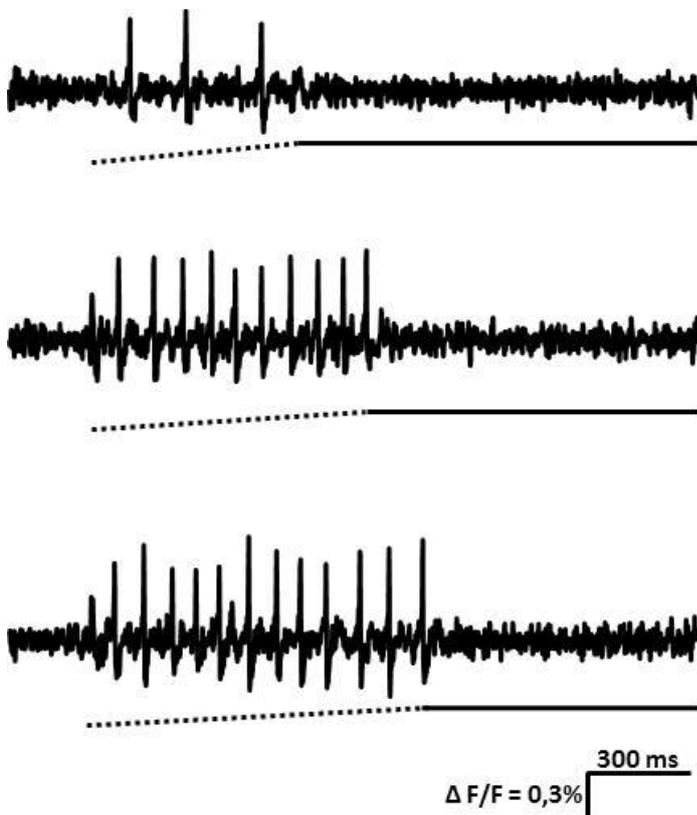


Abbildung 21: Beispiele für Injektionen mit unterschiedlicher Injektionsdauer
Diese Beispieltraces zeigen, dass das gleiche Neuron mit längerer Injektionsdauer (erkennbar an der unterschiedlichen Länge der gepunkteten Linie) eine höhere Aktionspotential Frequenz besitzen.

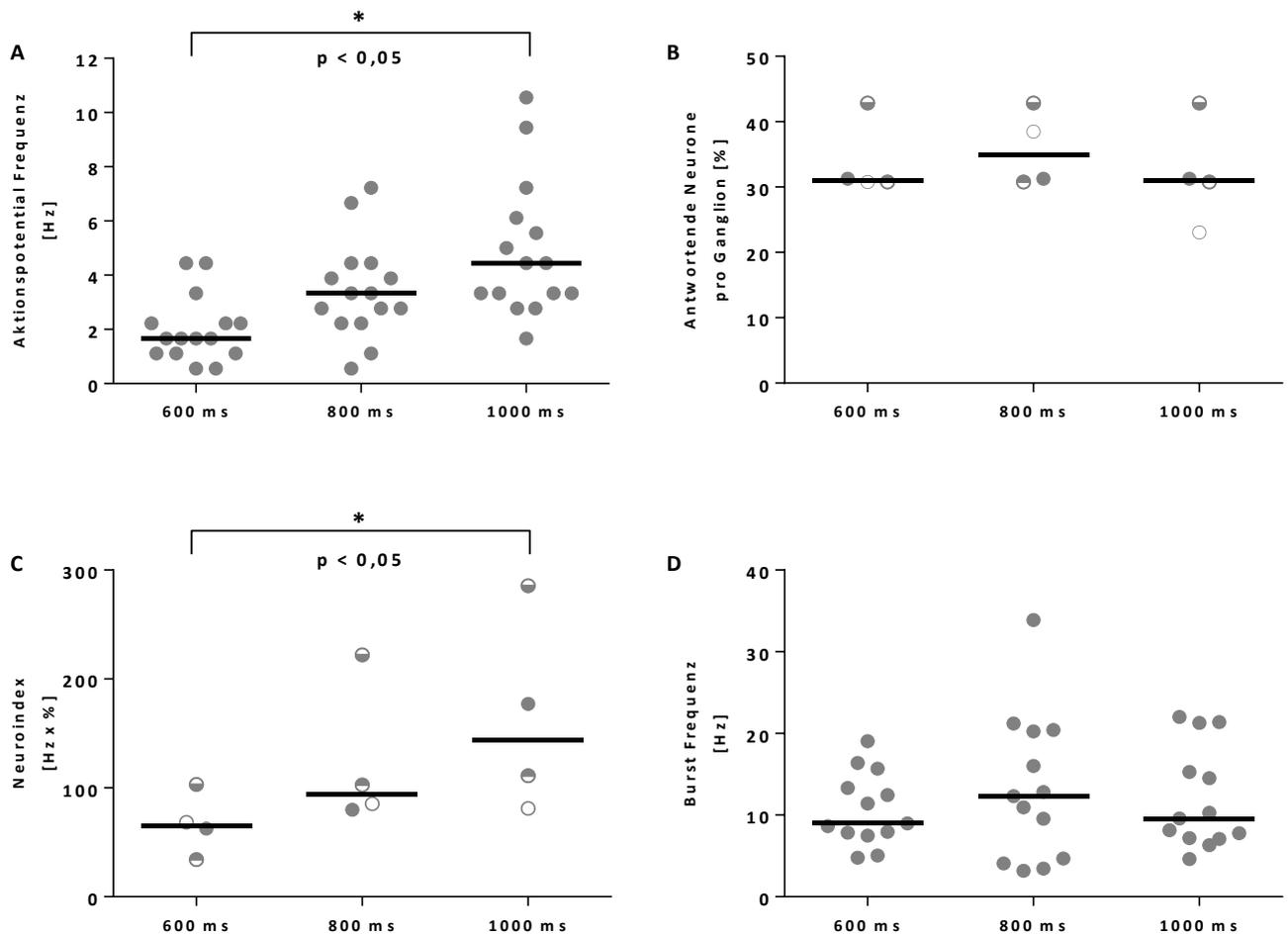


Abbildung 22: Unterschiedliche Injektionsdauer (Friedman Test, Tukey-Test)

Bei längerer Injektion ergaben sich signifikante Unterschiede für die Aktionspotential Frequenz (A) und den Neuroindex (C) für 600 ms im Vergleich zu 1000 ms (je $p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede traten jeweils bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglion (B) und bei der Burst Frequenz (D) auf. In A und D stellt jeder Punkt ein antwortendes Neuron dar. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.3 Submuköse Neurone sind sensitiv für Dehnung

Experimente mit dem Dehnungsstimulus wurden an 8 Meerschweinchen, 18 Ganglien beziehungsweise 273 Neurone durchgeführt. Die Aufnahmedauer betrug 4000 ms. Insgesamt waren 10,6 [8,3/20,6] % der Neurone pro Ganglion mechanosensitiv. Von diesen MEN wurden 100 % als SAMEN identifiziert. Des Weiteren antworteten 80 % der MEN nur in der andauernden Phase und 20 % der MEN in beiden Phasen. Die dynamische Deformationsphase dauerte im Durchschnitt $932,9 \pm 259,4$ ms und die andauernde Phase 2088 ± 305 ms. Die Neurone hatten eine Aktionspotential Frequenz von 0,9 [0,4/1,6] Hz und eine Burst Frequenz von 3,5 [2,9/4,8] Hz. Der Neuroindex betrug 10,2 [5,9/23,2] Hz x %.

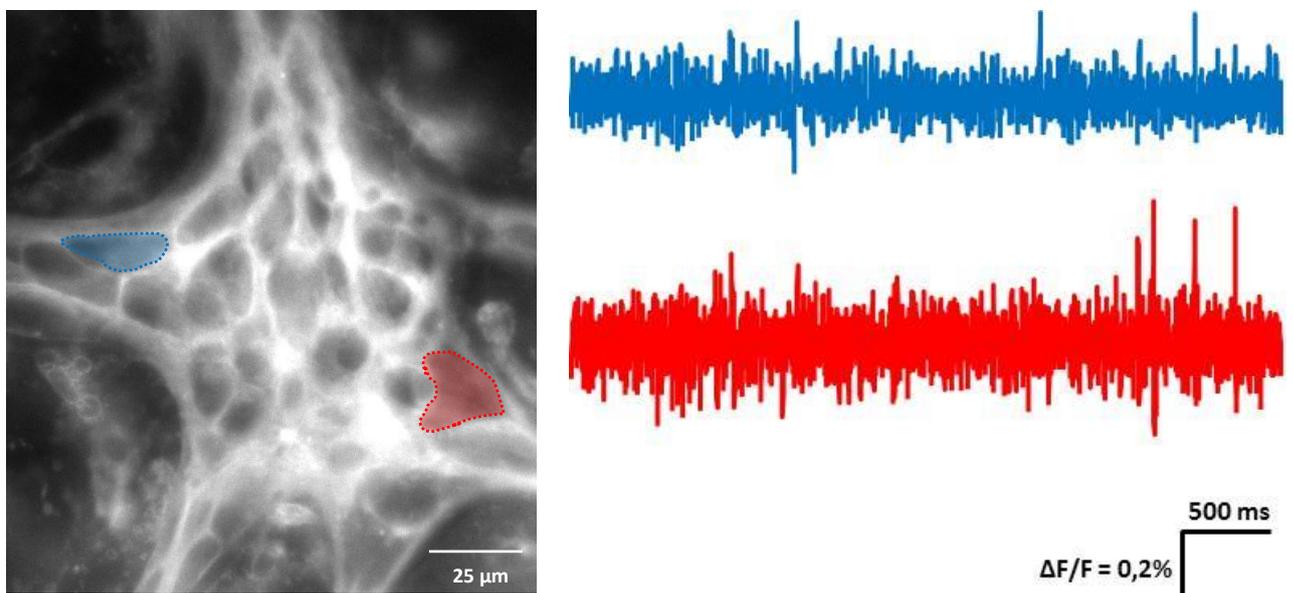


Abbildung 23: Beispiel: Antworten submuköser Neurone auf Dehnungsstimulus

Links: submuköses Ganglion, das mechanisch stimuliert wurde. Die zwei Farben repräsentieren je ein Neuron, das für den Stimulus sensitiv war. Rechts: dazugehörige Traces mit den Aktionspotentialen. Blauer Trace: 3 Aktionspotentiale, roter Trace: 4 Aktionspotentiale.

3.3.1 Reproduzierbarkeit

In dieser Versuchsreihe wurde an 3 Meerschweinchen, 5 Ganglien beziehungsweise 64 Neuronen überprüft, ob der Dehnungsstimulus reproduzierbar ist. Nach der ersten Dehnung wurde der bewegliche Draht manuell wieder in die Ausgangsposition gebracht, danach erfolgte die zweite Dehnung. Aufgrund der geringen Anzahl an Meerschweinchen wurde auf eine statistische Analyse verzichtet. Das Vorher-Nachher-Diagramm (Abbildung 24) zeigte jedoch, dass nur drei Neurone sowohl auf die erste wie auch auf die zweite Dehnung antworteten. Vier Neurone antworteten nur während der ersten Stimulation und vier weitere Neurone nur bei der zweiten Stimulation.

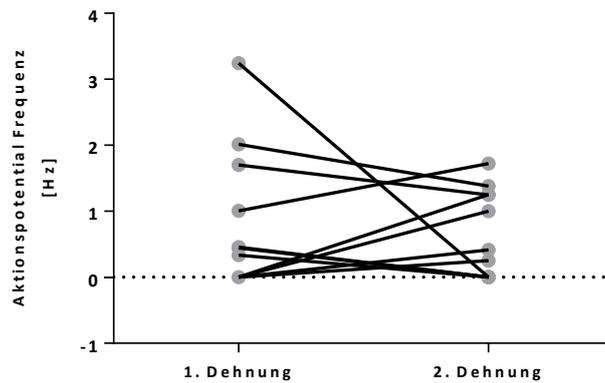


Abbildung 24: Reproduzierbarkeit-Test für den Dehnungsstimulus

Drei Neurone antworteten sowohl auf die erste wie auch auf die zweite Dehnung. Vier Neurone antworteten nur während der ersten Stimulation und vier weitere Neurone nur bei der zweiten Stimulation. Eine Linie repräsentiert die Änderung der Aktionspotential Frequenz eines Neurons zwischen erster und zweiter Dehnung.

3.3.2 Korrelation zwischen Stimulusstärke und Aktionspotential Frequenz

An 9 Meerschweinchen, 15 Ganglien beziehungsweise 21 Neurone wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Stimulusstärke, gemessen in der Längenänderung, und Aktionspotential Frequenz bestand. Die Spearman Rank Order Korrelation ergab, dass mit größerer Dehnung die Aktionspotential Frequenz signifikant zunahm (Korrelationskoeffizient: 0,507, $p = 0,0191$) (Abbildung 25).

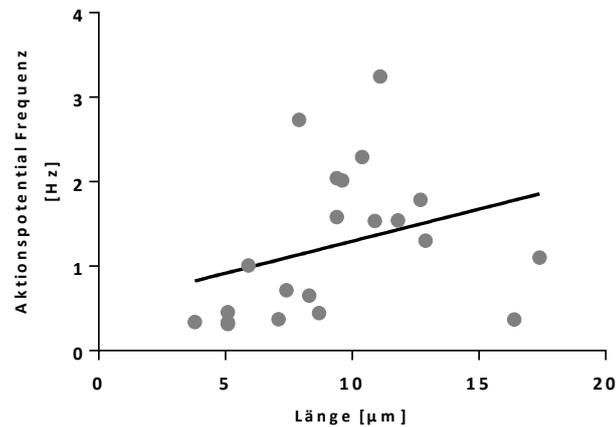


Abbildung 25: Korrelation Dehnung und Aktionspotential Frequenz (Spearman Rank Order Korrelation)
Mit größerer Dehnung nahm die Aktionspotential Frequenz signifikant zu (Korrelationskoeffizient: 0,507, $p = 0,0191$). Einzelne Punkte repräsentieren ein Neuron. Zur besseren Veranschaulichung wurde eine Regressionsgerade hinzugefügt.

3.4 Flächenberechnung

Einerseits wurde die Flächenänderung einzelner Neurone sowohl für den Kompressionsstimulus, wie auch für den Dehnungsstimulus gemessen. Des Weiteren wurde die Flächenänderung ganzer Ganglien für beide Stimuli berechnet.

3.4.1 Neuron

Für diese Analyse wurden je 15 zufällige MEN von 8 (Dehnungsstimulus) beziehungsweise 6 (Kompressionsstimulus) Meerschweinchen ausgewählt. Pro Neuron wurde die Fläche jeweils dreimal manuell gemessen und anschließend der Mittelwert gebildet (siehe Anhang: Manuelle Flächenmessung bei...). Bei der intraganglionären Krebslösung-Injektionsmethode wurden die Neurone durchschnittlich um $18,52 \pm 7,07$ % komprimiert. Bei der Dehnung wurden die Neurone um $14,73 \pm 6,07$ % gestreckt. Es trat kein signifikanter Unterschied ($p = 0,132$, t-Test) zwischen der Deformationsänderung beider Stimuli auf (Abbildung 26). Für den statistischen Test wurden die Absolutwerte (Betragswerte) und für die Abbildung die korrekten (negative und positive) Werte verwendet.

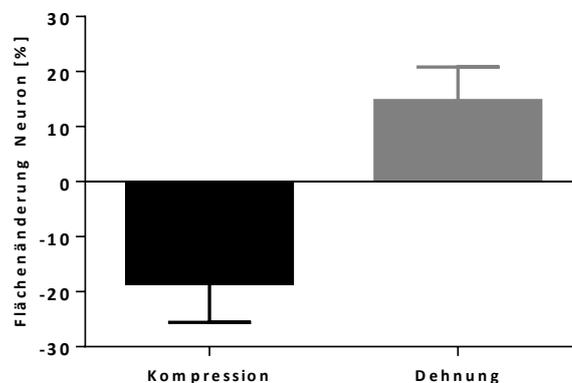


Abbildung 26: Prozentuale Neuron-Flächenänderung beider Stimuli (t-Test)

Die einzelnen Neurone wurden durchschnittlich um $18,52 \pm 7,07$ % komprimiert beziehungsweise um $14,73 \pm 6,07$ % gedehnt. Beim Vergleich der Absolutwerte (Betragswerte) beider Stimuli gab es keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,132$).

3.4.2 Ganglion

Für diese Analyse wurden zufällig 15 Ganglien von 13 Meerschweinchen für den Kompressionsstimulus und 15 Ganglien von 8 Meerschweinchen für den Dehnungsstimulus ausgewählt. Die Ganglionfläche wurde mit Hilfe eines Algorithmus (siehe Punkt 2.10) berechnet. Bei der intraganglionären Krebslösung-Injektionsmethode ergab sich eine durchschnittliche Flächenänderung von $5,98 \pm 3,48 \%$ und bei der Dehnung $8,99 \pm 8,00 \%$. Es gab keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,507$, Mann-Whitney Rank Sum Test) in der Flächenänderung zwischen den beiden Stimuli (Abbildung 27).

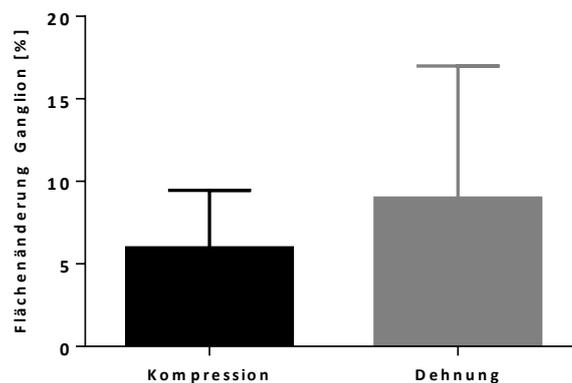


Abbildung 27: Prozentuale Ganglion-Flächenänderung beider Stimuli (Mann-Whitney Rank Sum Test)

Bei dem Kompressionsstimulus kam es zu einer Flächenänderung von $5,98 \pm 3,48 \%$ und bei der Dehnung von $8,99 \pm 8,00 \%$. Es gab keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,507$) in der Flächenänderung zwischen den beiden Stimuli.

Mit Hilfe dieser Technik konnten auch Graphen erstellt werden, die die prozentuale Flächenänderung eines Ganglions über die gesamte Aufnahmedauer zeigten. In den folgenden Abbildungen sind repräsentative Graphen für den Kompressionsstimulus (Abbildung 28 A) sowie für den Dehnungsstimulus (Abbildung 28 B) zu sehen. Außerdem ist noch ein Diagramm für drei Injektionen mit je gleichem Injektionsdruck und gleicher Injektionsdauer (Reproduzierbarkeit) (Abbildung 28 C) und ein weiteres mit unterschiedlichem Injektionsdruck (0,4 bar und 1,0 bar) (Abbildung 28 D) abgebildet. Zu erkennen sind ebenfalls dynamische und die andauernde Deformationsphase.

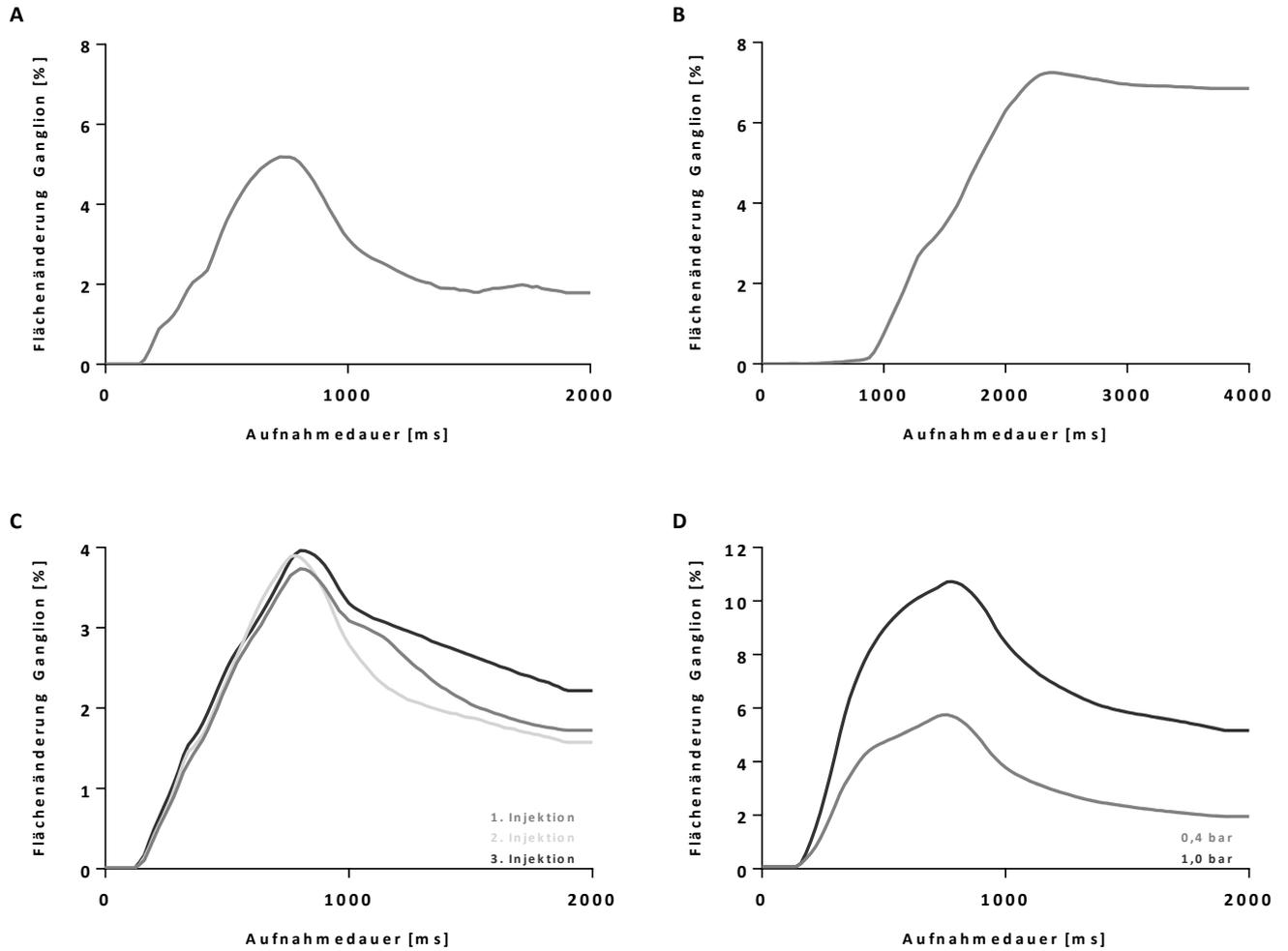


Abbildung 28: Beispiele - Flächenänderung pro Aufnahmedauer

A: Repräsentativer Graph bei Kompression

B: Repräsentativer Graph bei Dehnung

C: Drei Injektionen mit gleichem Injektionsdruck und gleicher Injektionsdauer

D: Zwei Injektionen mit unterschiedlicher Druckapplikationen (0,4 bar und 1,0 bar)

3.5 Geschwindigkeit

3.5.1 Korrelation Geschwindigkeit und Aktionspotential Frequenz bei Deformation

Anhand von 11 MEN in 7 Meerscheinchen wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Aktionspotentialfrequenz und der Geschwindigkeit während der Kompression gab (siehe Anhang: Geschwindigkeitsberechnung bei Kompression von MEN im SMP). Die Spearman Rank Order Korrelation ergab, dass die Aktionspotential Frequenz nicht mit der Kompressionsgeschwindigkeit korreliert (Korrelationskoeffizient: 0,0365, $p = 0,903$).

Ebenfalls keine Korrelation bestand zwischen der Dehnungsgeschwindigkeit und der Aktionspotential Frequenz. Der Korrelationskoeffizient war -0,243 bei einem p-Wert von 0,374 (Spearman Rank Order Korrelation, 15 MEN, 8 Meerscheinchen) (siehe Anhang: Geschwindigkeitsberechnung bei Dehnung von MEN im SMP).

3.5.2 Vergleich Geschwindigkeitsparameter zwischen Dehnung und Kompression

Der Median der Kompressionsgeschwindigkeit ($n = 7$ Meerscheinchen, 11 Neurone) lag bei $76,96 [54,38/154,87] \mu\text{m}^2/\text{s}$ und für die Dehnungsgeschwindigkeit ($n = 8$ Meerscheinchen, 15 Neurone) bei $72,31 [35,61/142,96] \mu\text{m}^2/\text{s}$. Zwischen beiden Stimuli gab es keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,836$, Mann-Whitney Rank Sum Test) (Abbildung.29).

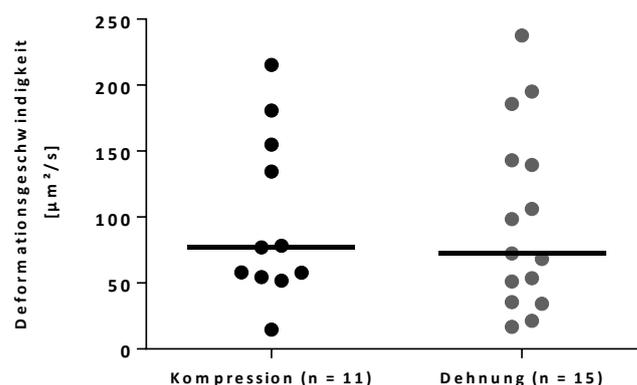


Abbildung 29: Deformationsgeschwindigkeit beider Stimuli (Mann-Whitney Rank Sum Test)

Der Median der Kompressionsgeschwindigkeit ($n = 7$ Meerscheinchen, 11 Neurone) lag bei $76,96 [54,38/154,87] \mu\text{m}^2/\text{s}$ und für die Dehnungsgeschwindigkeit ($n = 8$ Meerscheinchen, 15 Neurone) bei $72,31 [35,61/142,96] \mu\text{m}^2/\text{s}$. Beim Vergleich beider Stimuli traten keine signifikanten Unterschiede auf ($p = 0,836$).

3.6 Zusammenfassung MEN im SMP

Tabelle 13 Vergleich Kompression und Dehnung

	Kompression	Dehnung
Anzahl n gesamt (Tiere / Ganglien / Neurone)	21 / 34 / 500	8 / 18 / 273
Stimulusdauer [ms]	600	933
Antwortende Neurone pro Ganglion [%]	23,6 [15,6/42,0]	10,6 [8,3/20,6]
Aktionspotential Frequenz [Hz]	2,2 [1,1/3,4]	0,9 [0,4/1,6]
Burst Frequenz [Hz]	12,2 [7,1/18,1]	3,5 [2,9/4,8]
Neuroindex [Hz x %.]	51,9 [24,2/100,8]	10,2 [5,9/23,2]
Reproduzierbarkeit	Ja	nicht getestet
Abhängig von Stimulusstärke	ja	ja
Latenzzeit [ms]	208 [159/275]	1396 [1078/2214]
Adaption Index	35 % RAMEN 65 % SAMEN	0 % RAMEN 100 % SAMEN
Aktionspotentiale in unterschiedl. Phasen [%]	83 % nur in dynamischer 2 % nur in andauernder 15 % in beiden	0 % nur in dynamischer 80 % nur in andauernder 20 % in beiden
Dauer dynamische Phase [ms]	663 ± 78	933 ± 259
Dauer andauernde Phase [ms]	1137 ± 78	2088 ± 305
Flächenänderung Ganglion [%]	+ 5,98 ± 3,48	+ 8,99 ± 8,0
Flächenänderung Neuron [%]	- 18,52 ± 7,07	+ 14,73 ± 6,07
Deformationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	76,96 [54,38/154,87]	72,31 [35,61/142,96]
Aufnahmezeit [ms]	2000	4000

3.7 Submuköse Neurone sind sensitiv für Kompression und / oder Dehnung

An 16 Ganglien von 4 Meerschweinchen wurde überprüft, ob MEN in einem Ganglion sowohl kompressionssensitiv, wie auch dehnungssensitiv waren. Die Reihenfolge der beiden Stimuli war zufällig. $22,3 \pm 7,8$ % der Neurone pro Ganglion waren sensitiv für den Kompressionsstimulus, wohingegen nur $13,6 \pm 8,7$ % auf Dehnung reagierten. Von insgesamt 77 MEN antworteten 50 Neurone nur auf Kompression (Gruppe 1), 13 Neurone nur auf Dehnung (Gruppe 2) und 14 Neurone auf beide Stimuli (Gruppe 3). Die Aktionspotential Frequenz der Neurone, die nur kompressionssensitiv waren, betrug $1,5$ [1,1/3,3] Hz und die Aktionspotential Frequenz der Neurone nach Kompression aus Gruppe 3 lag bei $2,3$ [1,4/5,9] Hz ($p = 0,169$). Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,560$) gab es zwischen der Aktionspotential Frequenz der nur dehnungssensitiven Neurone ($0,7$ [0,3/1,3] Hz) im Vergleich mit der Aktionspotential Frequenz der Neurone aus Gruppe 3 nach Dehnung ($0,8$ [0,4/2,0] Hz). In Gruppe 1 wurden 54 % als RAMEN und 46 % als SAMEN identifiziert. In Gruppe 2 waren 100 % der antwortenden Neurone SAMEN. In Gruppe 3 wurden während des Kompressionsstimulus 28,3 % als RAMEN und 71,4 % als SAMEN identifiziert. Der AI in Gruppe 3 änderte sich nach der Dehnung (100 % SAMEN).

3.8 Pharmakologie im submukösen Plexus

3.8.1 Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate

Insgesamt wurde die Wirkung von 100 μM Gd^{3+} an 4 Meerschweinchen, 8 Ganglien beziehungsweise 132 Neurone getestet. 35 Neurone waren mechanosensitiv. Nach Zugabe von Gd^{3+} war die Aktionspotential Frequenz signifikant reduziert ($p < 0,05$). Der Median der Kontrollgruppe betrug 1,7 [1,1/3,4] Hz und nach Zugabe des Blockers 0,6 [0,0/1,7] Hz. Nach dem Auswaschen des Blockers erhöhte sich die Aktionspotential Frequenz wieder signifikant ($p < 0,05$) auf den Wert 1,4 [1,1/1,8] Hz (Abbildung 30 A). Auch die prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion waren nach Zugabe des Blockers (7,4 [0,0/31,2] %) im Vergleich zur Kontrolle (25,0 [12,5/43,3] %) signifikant reduziert ($p < 0,05$). Nach dem Auswaschen des Blockers antworteten wieder 25,0 [8,7/35,2] % (Abbildung 30 B). Signifikante Unterschiede traten beim Neuroindex der Kontrollgruppe (47,9 [16,1/105,9] Hz x %) im Vergleich mit dem Neuroindex nach Blockerzugabe (11,8 [0,0/27,4] Hz x %) auf. Nach dem Auswaschen lag der Neuroindex bei 31,0 [12,9/57,33] Hz x % (Abbildung 30 C). Keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,223$) gab bei es der Burst Frequenz (Kontrolle: 11,4 [7,9/16,7] Hz, Blocker: 5,5 [0,0/15,9] Hz, Auswaschung: 8,7 [5,4/15,6] Hz) (Abbildung 30 D).

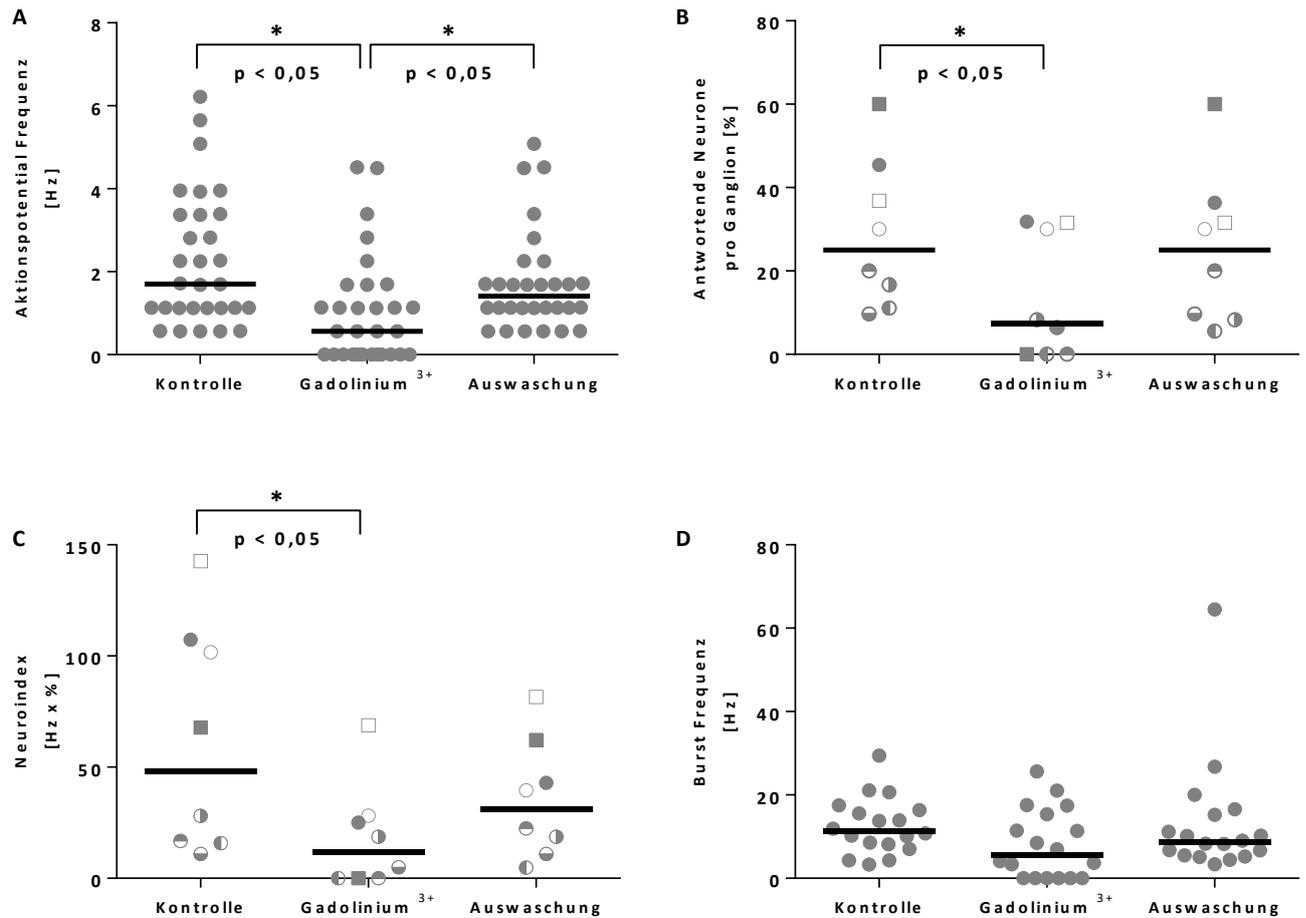


Abbildung 30: Auswertung der Substanz Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate (SMP) (Friedman Test, Tukey-Test)

Die Aktionspotential Frequenz war nach Zugabe von Gd^{3+} signifikant reduziert ($p < 0,05$). Nachdem Gd^{3+} ausgewaschen war, war die Aktionspotential Frequenz wieder signifikant erhöht ($p < 0,05$) (A). Nach der Blockerzugabe waren sowohl die antwortenden Neurone (B), wie auch der Neuroindex (C) im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant reduziert (je $p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede traten bei der Burst Frequenz (D) auf. In A und D stellt jeder Punkt ein antwortendes Neuron dar. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.8.2 SKF-96365

Insgesamt wurde die Wirkung von 10 μ M SKF-96365 an 3 Meerschweinchen, 7 Ganglien beziehungsweise 97 Neurone getestet. 35 von den 97 Zellen waren MEN. In den vier zu analysierenden Parametern traten jeweils keine signifikanten Unterschiede auf. Vor der Zugabe von SKF-96365 betrug der Median der Aktionspotential Frequenz 3,4 [1,0/4,0] Hz, nach der Zugabe 2,9 [1,7/3,9] Hz und nach Auswaschung 1,7 [1,1/4,2] Hz ($p = 0,476$) (Abbildung 31 A). Bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglion waren die Werte vor Zugabe, nach Zugabe und nach Auswaschen der Substanz 26,7 [18,8/54,5] %, 26,7 [25,0/54,5] % beziehungsweise 26,7 [20,0/54,5] % ($p = 0,964$) (Abbildung 31 B). Der Neuroindex lag bei 100,6 [50,6/135,1] Hz x % (Kontrolle), 122,9 [38,3/142,1] Hz x % (nach Blocker-Zugabe) und 89,8 [23,0/140,3] Hz x % (nach Auswaschung des Blockers) ($p = 0,768$) (Abbildung 31 C). Für die Burst Frequenz betrug die Mediane vor Zugabe, nach Zugabe beziehungsweise nach Auswaschen des Blockers 9,2 [4,9/15,1] Hz, 11,2 [6,8/17,2] Hz beziehungsweise 9,7 [6,7/15,5] Hz ($p = 0,779$) (Abbildung 31 D).

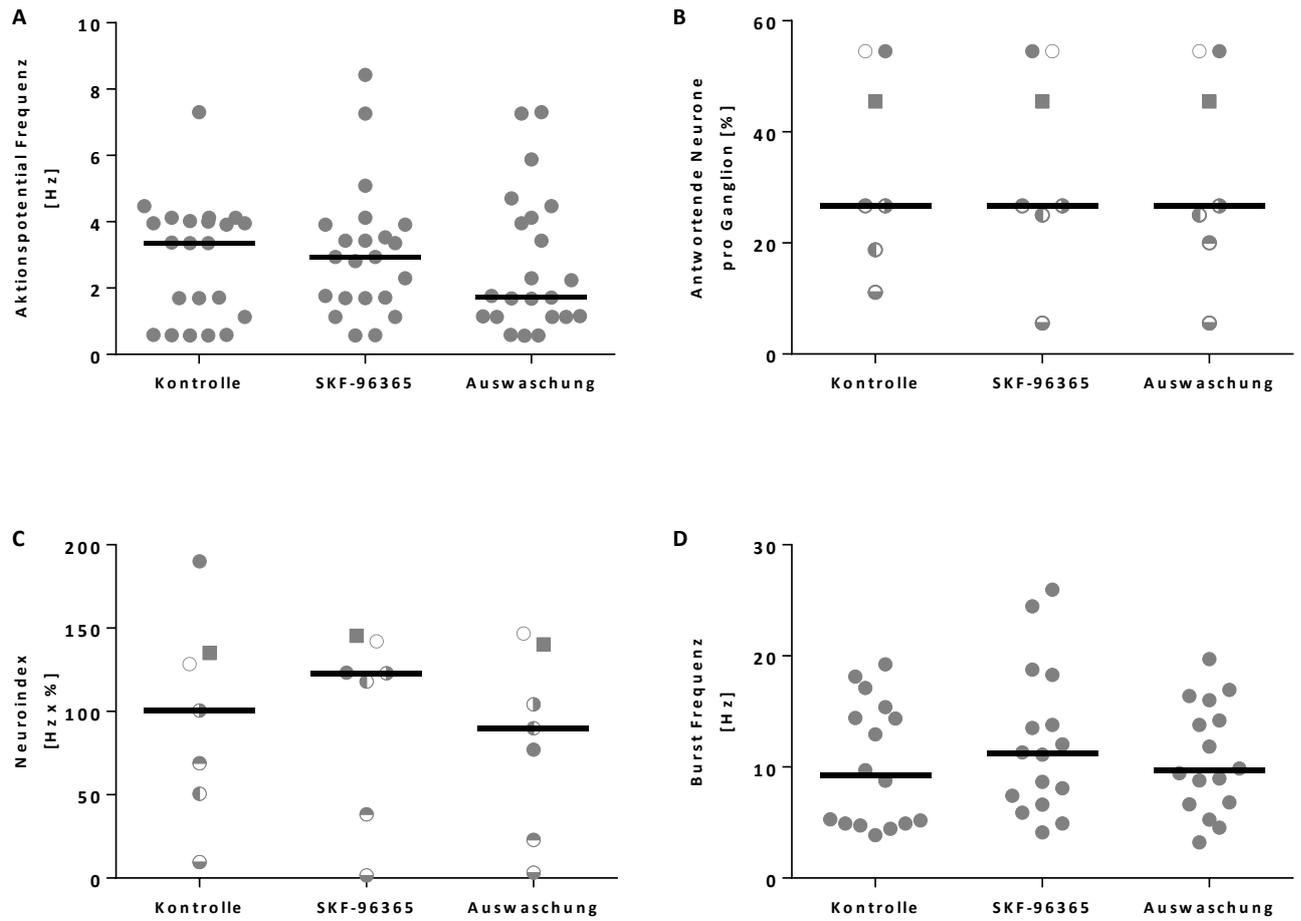


Abbildung 31: Auswertung der Substanz SKF-96365 (Friedmann Test)

Für Aktionspotential Frequenz (A), prozentual antwortende Neurone pro Ganglion (B), Neuroindex (C) und Burst Frequenz (D) gab es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Gruppen. In A und D stellt jeder Punkt ein antwortendes Neuron dar. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.8.3 TTX

Die Wirkung von 1 μ M TTX wurde an 3 Meerschweinchen, 6 Ganglien beziehungsweise 96 Neurone getestet. Insgesamt waren 31 Neurone mechanosensitiv. Die Aktionspotential Frequenz der Kontrolle (1,7 [1,1/2,3] Hz) war sowohl zu Gruppe nach TTX Zugabe (0,0 [0,0/0,0] Hz) wie auch nach der Auswaschung des Blockers (0,0 [0,0/1,7] Hz) signifikant höher (je $p < 0,05$) (Abbildung 32 A). Auch die prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion waren nach Zugabe des Blockers (5,8 [0,0/11,5] %) im Vergleich zur Kontrolle (28,2 [21,4/44,9] %) signifikant reduziert ($p < 0,05$). Nach dem Auswaschen des Blockers antworteten 20,5 [9,4/26,20] % (Abbildung 32 B). Eine signifikante Reduzierung ($p < 0,05$) zeigte sich auch im Neuroindex zwischen Kontrolle (51,5 [45,8/69,3] Hz x %) und nach Zugabe des Blockers (2,6 [0,0/6,2] Hz x %). Der Neuroindex nach der Auswaschung betrug 15,4 [5,9/25,2] Hz x % (Abbildung 32 C). Die Burst Frequenz der Kontrolle (12,2 [8,6/15,9] Hz) war zur Burst Frequenz nach Blocker Zugabe (0,0 [0,0/0,0] Hz) ebenfalls signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Nach dem Auswaschen von TTX lag sie bei 0,0 [0,0/22,1] Hz (Abbildung 32 D).

3.8.5 ω -Conotoxin GVIA

Insgesamt wurde die Wirkung von 0,2 μ M ω -Conotoxin GVIA an 6 Meerschweinchen, 6 Ganglien beziehungsweise 87 Neurone getestet. 28 Neurone waren MEN. Bei den vier getesteten Parametern traten jeweils keine signifikanten Unterschiede auf. Der Median der Aktionspotential Frequenz betrug vor der Zugabe des Blockers 1,8 [1,1/2,8] Hz und nach der Zugabe 1,6 [0,6/2,6] Hz ($p = 0,145$) (Abbildung 33 A). Bei der Burst Frequenz lagen die Mediane bei 10,5 [5,3/18,1] Hz und 10,2 [6,4/19,4] Hz ($p = 0,808$) (Abbildung 33 D). Bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglien gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,250$). Bei der Kontrolle antworteten 29,2 [18,6/45,2] % und nach Zugabe des Blockers 23,6 [16,0/41,0] % (Abbildung 33 B). Der Neuroindex lag bei 82,50 [44,2/104,9] Hz x % beziehungsweise 50,1 [20,8/93,2] Hz x % ($p = 0,188$) (Abbildung 33 C).

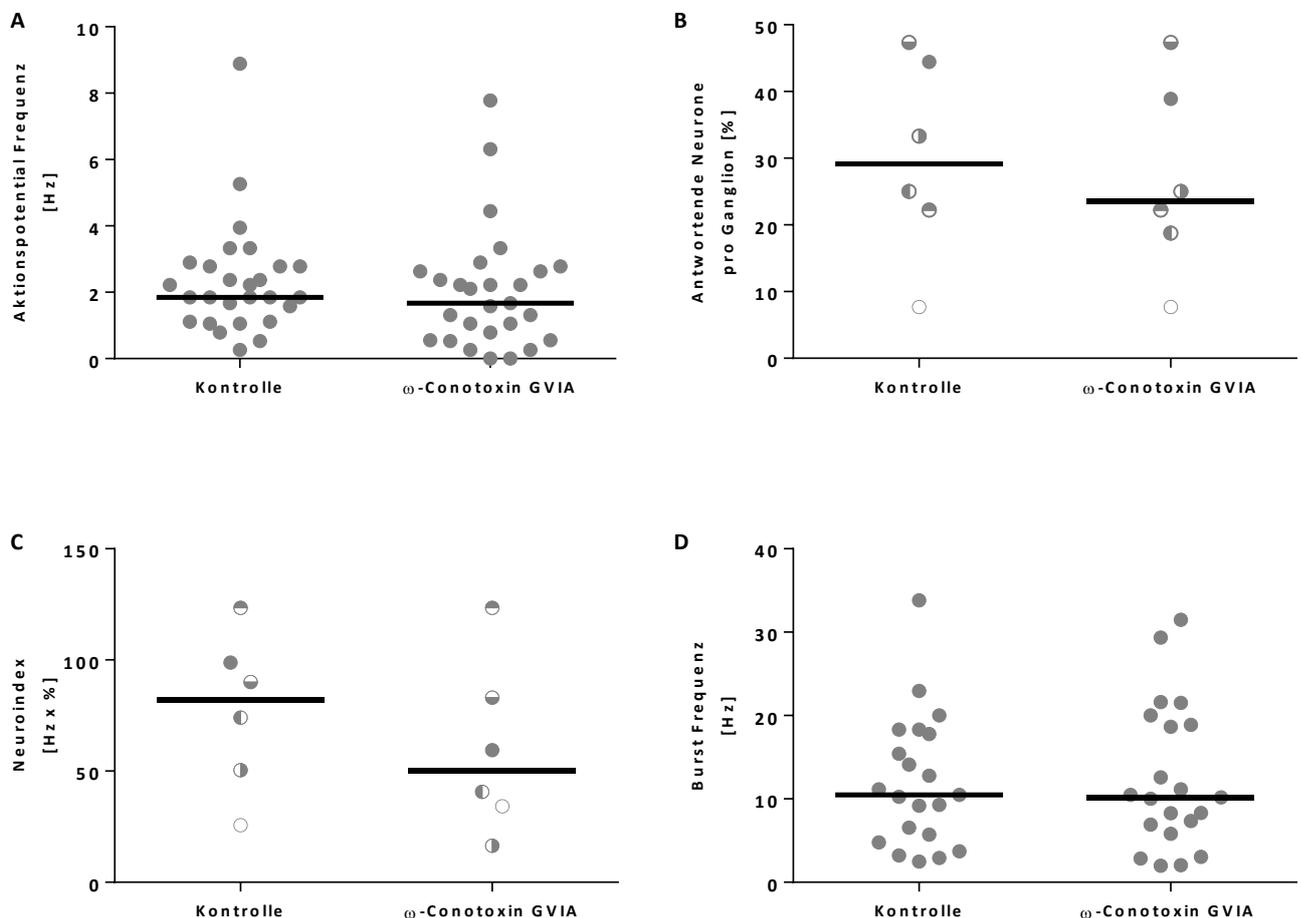


Abbildung 33: Auswertung der Substanz ω -Conotoxin GVIA (Wilcoxon Signed Rank Test)

Für Aktionspotential Frequenz (A), prozentual antwortende Neurone pro Ganglion (B), Neuroindex (C) und Burst Frequenz (D) gab es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen. In A und D stellt jeder Punkt ein antwortendes Neuron dar. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.9 Pharmakologie im myenterischen Plexus

3.9.1 APETx2

Insgesamt wurde die Wirkung von 1 μ M APETx2 an 3 Meerschweinchen, 8 Ganglien beziehungsweise 218 Neurone getestet. 44 von den 218 Zellen reagierten auf den mechanischen Stimulus. Beim Vergleich der Aktionspotential Frequenz gab es keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,582$). Der Median der Kontrolle lag bei 1,7 [1,1/2,7] Hz, nach Zugabe des Blockers bei 1,7 [1,1/3,4] Hz und nach dem Auswaschen des Blockers bei 1,1 [1,1/2,3] Hz (Abbildung 34 A). In den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglien traten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bei der Kontrolle (34 [23/45] %) und nach dem Auswaschen des Blockers (21 [10/35] %) auf (Abbildung 34 B). Die statistische Analyse des Neuroindex ergab keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,120$; Kontrolle: 65,8 [29,4/87,7] Hz x %, Zugabe des Blockers: 39,5 [24,4/72,7] Hz x % und nach dem Auswaschen des Blockers: 17,1 [4,7/40,4] Hz x %) (Abbildung 34 C). Die Burst Frequenz des Blockers (9,2 [5,6/13,4] Hz) war jeweils signifikant reduziert (je $p < 0,05$) zu der Burst Frequenz der Kontrolle (18,4 [12,6/22,7] Hz und zur Burst Frequenz nach dem Auswaschen des Blockers (21,0 [10,3/29,4] Hz) (Abbildung 34 D).

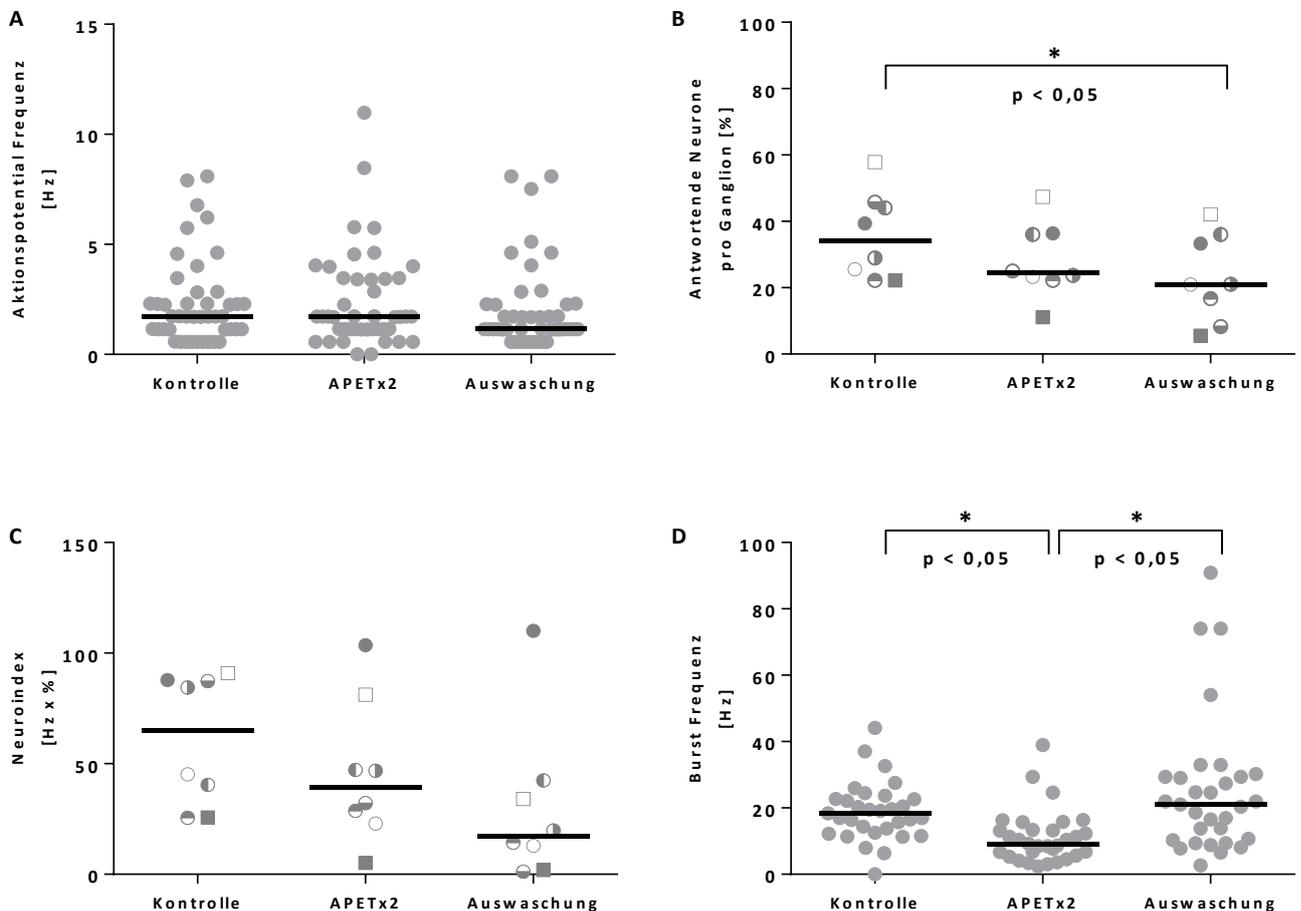


Abbildung 34: Auswertung der Substanz APETx2 (Friedman Test, Tukey-Test)

Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle, Blocker-Zugabe und Auswaschung des Blockers sowohl bei der Aktionspotential Frequenz (A) wie auch beim Neuroindex (C) auf. Bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglien (B) gab es einen signifikanten Unterschied im Vergleich Kontrolle und nach dem Auswaschen des Blockers ($p < 0,05$). Die Burst Frequenz des Blockers war jeweils signifikant reduziert (je $p < 0,05$) zu der Burst Frequenz der Kontrolle und zur Burst Frequenz nach dem Auswaschen des Blockers. In A und D stellt jeder Punkt ein antwortendes Neuron dar. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.9.2 Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate

Insgesamt wurde die Wirkung von 100 μM Gd^{3+} an 4 Meerschweinchen, 5 Ganglien beziehungsweise 124 Neurone getestet. 15 von den 124 Zellen reagierten auf den mechanischen Stimulus. Nach Zugabe von Gd^{3+} war die Aktionspotential Frequenz signifikant reduziert ($p < 0,05$). Der Median der Kontrollgruppe betrug 1,7 [1,1/3,3] Hz und nach Zugabe des Blockers 1,1 [0,6/1,7] Hz. Nach dem Auswaschen des Blockers erhöhte sich die Aktionspotential Frequenz wieder auf den Wert 1,7 [1,1/2,8] Hz (Abbildung 35 A). Die Mediane der prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion blieb konstant ($p = 0,691$): Kontrolle 11,8 [9,1/17,7] %, nach der Blocker Zugabe 11,1 [7,9/11,7] %, nach dem Auswaschen des Blockers 11,8 [9,1/17,7] % (Abbildung 35 B). Keine signifikanten Unterschiede traten innerhalb der Burst Frequenz ($p = 0,527$) und bei Betrachtung des Neuroindexes ($p = 0,367$) auf. Die Tendenz zeigte jedoch, dass sowohl Burst Frequenz (Kontrolle: 15,1 [6,7/25,6] Hz, Blocker: 10,7 [0,0/18,0] Hz, Auswaschung: 15,1 [11,1/20,4] Hz) (Abbildung 35 D), wie auch Neuroindex (Kontrolle: 26,1 [16,6/34,5] Hz x %, Blocker: 11,1 [3,7/14,8] Hz x %, Auswaschung: 24,1 [18,3/30,9] Hz x %) (Abbildung 35 C) nach Zugabe von Gd^{3+} reduziert werden.

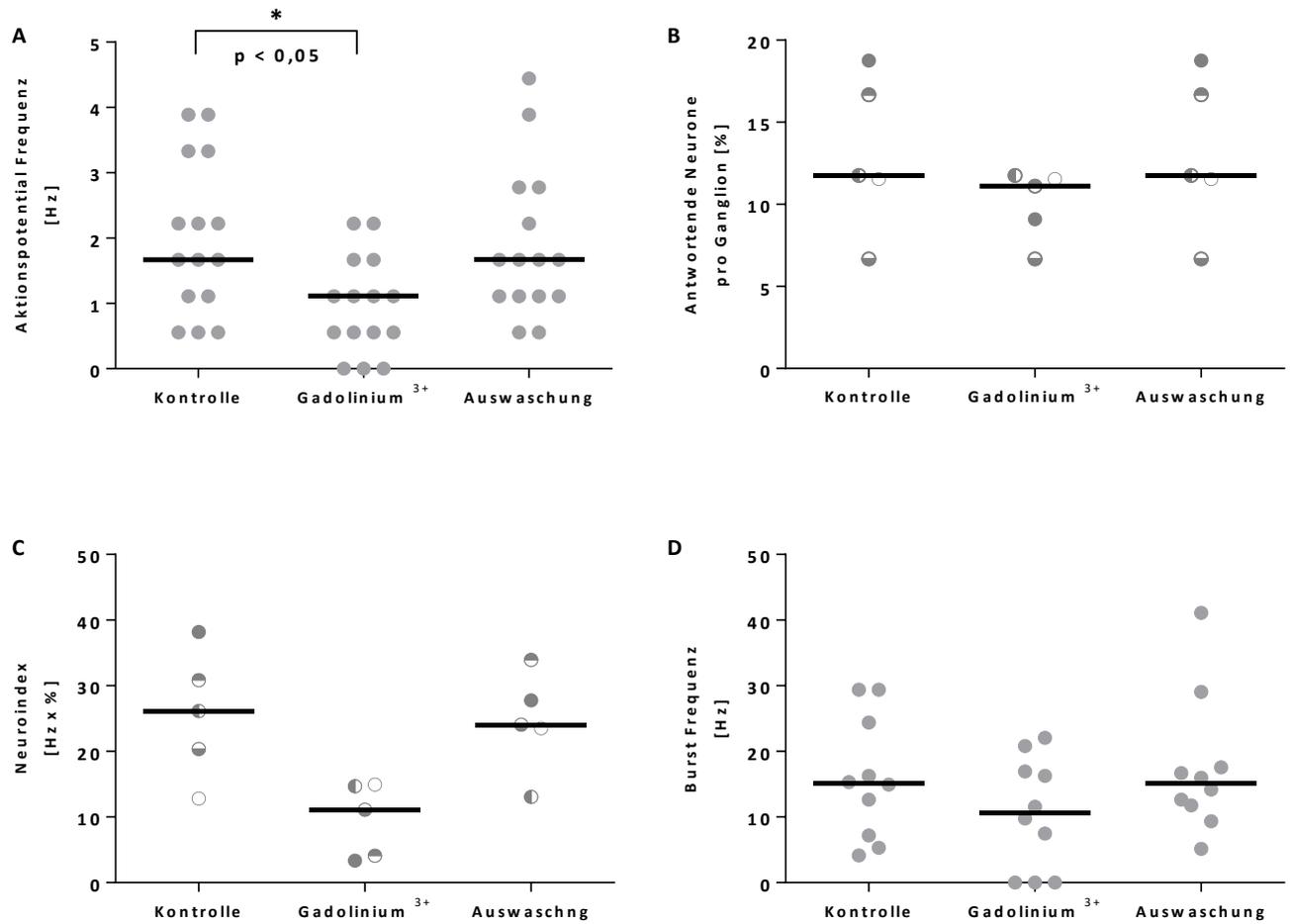


Abbildung 35: Auswertung der Substanz Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate (MP) (Friedman Test, Tukey-Test)

Die Aktionspotential Frequenz war nach Zugabe von Gd^{3+} signifikant reduziert ($p < 0,05$). (A). Keine signifikanten Unterschiede traten beim Neuroindex (C), bei der Burst Frequenz (D) und bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglion auf (B). In A und D stellt jeder Punkt ein antwortendes Neuron dar. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.9.3 HC-067047

Die Wirkung des TRPV4 Antagonisten HC-06747 (0,15 μ M) wurde an 2 Meerschweinchen, 6 Ganglien beziehungsweise 147 Neurone getestet. 20 Neurone waren mechanosensitive enterische Neurone. Keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,154$) traten bei der Aktionspotential Frequenz auf. Der Median der Kontrollgruppe lag bei 1,6 [1,1/2,2] Hz, nach Zugabe des Blockers bei 1,1 [0,7/2,0] Hz und nach dem Auswaschen des Blockers bei 1,1 [0,6/2,0] Hz (Abbildung 36 A). Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,273$) ergaben sich nach der Analyse der Burst Frequenz (Kontrolle: 16,7 [11,2/20,4] Hz, Blocker: 18,4 [9,5/28,0] Hz, Auswaschung: 22,0 [15,2/31,3] Hz) (Abbildung 36 D). Die prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion für die Kontrollgruppe (13,6 [7,7/19,4] %), nach Zugabe von HC-067047 (13,6 [7,7/19,4] %) und nach der Auswaschung (13,6 [7,7/19,4] %) waren nicht signifikant unterschiedlich ($p = 1,000$) (Abbildung 36 B). Der Neuroindex der Kontrolle (19,4 [15,8/39,5] Hz x %) war signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zum Neuroindex nach der Auswaschung (15,0 [8,6/31,7] Hz x %) (Abbildung 36 C).

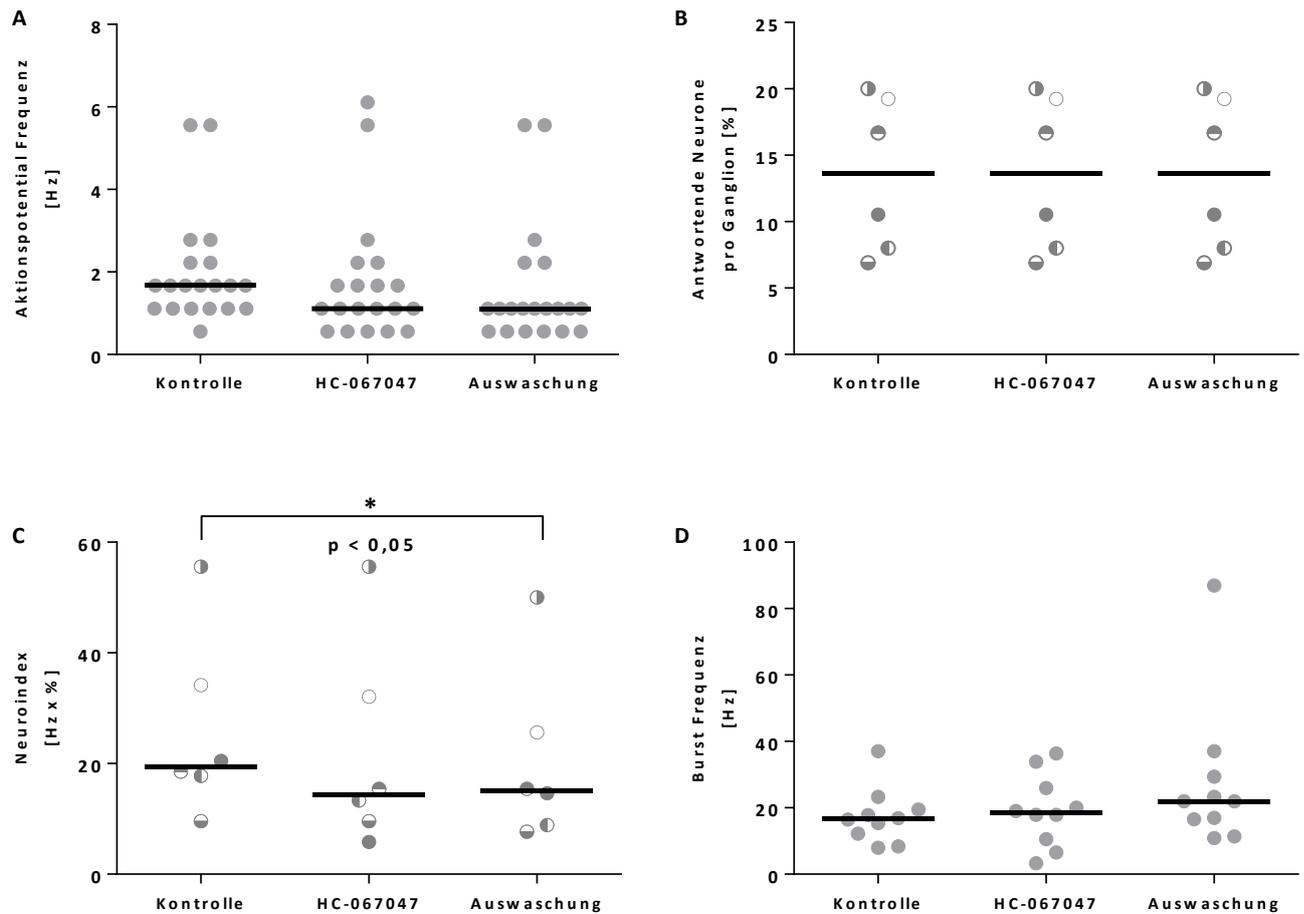


Abbildung 36: Auswertung der Substanz HC-067047 (Friedman Test, Tukey-Test)

Bei Betrachtung der Aktionspotential Frequenz (A), der Burst Frequenz (D) und der prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion (B) traten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Gruppen auf. Der Neuroindex der Kontrolle war signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zum Neuroindex nach der Auswaschung (C). In A und D stellt jeder Punkt ein antwortendes Neuron dar. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.9.4 KB-R7943

Insgesamt wurde die Wirkung von 10 μ M KB-R7943 an 3 Meerschweinchen, 9 Ganglien beziehungsweise 297 Neurone getestet. 47 von den 297 Zellen waren mechanosensitive enterische Neurone. Bei den vier zu analysierenden Parametern traten jeweils keine signifikanten Unterschiede auf. Vor der Zugabe von KB-R7943 betrug der Median der Aktionspotential Frequenz 1,7 [1,1/1,7] Hz, nach der Zugabe 1,7 [1,1/1,7] Hz und nach Auswaschung 1,4 [1,1/1,7] Hz ($p = 0,776$) (Abbildung 37 A). Bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglion vor Zugabe, nach Zugabe und nach Auswaschen der Substanz waren die Werte 13,5 [11,3/19,8] %, 12,5 [10,2/18,3] % beziehungsweise 11,1 [9,3/15,1] % ($p = 0,154$) (Abbildung 37 B). Der Neuroindex lag bei 21,5 [15,1/25,2] Hz x % (Kontrolle), 18,0 [13,8/21,5] Hz x % (nach Blockerzugabe) und 13,2 [8,8/17,3] Hz x % (nach Auswaschung des Blockers) ($p = 0,107$) (Abbildung 37 C). Für die Burst Frequenz betrug die Mediane vor Zugabe, nach Zugabe beziehungsweise nach Auswaschen des Blockers 23,0 [15,0/31,5] Hz, 28,6 [16,5/36,6] Hz beziehungsweise 23,7 [15,0/31,7] Hz ($p = 0,276$) (Abbildung 37 D).

3.9.5 Nifluminsäure

Insgesamt wurde die Wirkung von 10 μ M Nifluminsäure an 4 Meerschweinchen, 9 Ganglien beziehungsweise 230 Neurone getestet. 73 Neurone reagierten auf den mechanischen Stimulus. Die prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion vor der Nifluminsäurezugabe (29,0 [20,7/31,5] %) war im Vergleich mit den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglion nach dem Auswaschen der Nifluminsäure (19,4 [14,9/25,8] %) signifikant reduziert ($p < 0,05$). Nach der Zugabe des Blockers waren die prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion (22,6 [14,9/30,3] %) ebenfalls schon reduziert, jedoch nicht signifikant (Abbildung 38 B). Innerhalb der Aktionspotential Frequenz ($p = 0,705$; Kontrolle: 1,2 [0,6/1,7] Hz, nach Zugabe des Blockers: 1,2 [0,6/1,8] Hz, nach dem Auswaschen: 1,2 [0,6/1,7] Hz) (Abbildung 38 A) und der Burst Frequenz ($p = 0,840$; Kontrolle: 20,0 [10,7/27,5] Hz, nach Zugabe des Blockers: 20,0 [14,3/22,7] Hz, nach dem Auswaschen: 20,8 [8,6/23,4] Hz) (Abbildung 38 D) traten jeweils keine signifikanten Unterschiede auf. Auch für den Neuroindex ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die Kontrollgruppe (35,4 [26,1/41,1] Hz x %), nach Zugabe der Nifluminsäure (23,6 [7,2/40,4] Hz x %) und nach dem Auswaschen der Nifluminsäure (18,8 [7,7/26,3] Hz x %) (Abbildung 38 C).

3.9.6 TRAM-34

Insgesamt wurde die Wirkung von 1 μ M TRAM-34 an 4 Meerschweinchen, 10 Ganglien beziehungsweise 230 Neurone getestet. 73 von den 230 Neurone waren mechanosensitive Neurone. Der Neuroindex (13,4 [4,0/32,1] Hz x %) nach dem Auswaschen der Substanz war signifikant niedriger (je $p < 0,05$) im Vergleich zum Neuroindex nach Zugabe von TRAM-34 (25,5 [14,5/54,0] Hz x %) und zum Neuroindex der Kontrollgruppe (37,0 [21,6/43,7] Hz x %) (Abbildung 39 C). Keine signifikanten Unterschiede gab es für die Aktionspotential Frequenz. Vor der Zugabe des Blockers betrug die Aktionspotential Frequenz 1,7 [1,1/2,3] Hz, nach der Zugabe des Blockers 2,0 [1,2/2,9] Hz und nach dem Auswaschen 1,7 [1,1/2,3] Hz (Abbildung 39 A). Auch keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,666$) traten in der Burst Frequenz auf (Kontrolle: 10,3 [5,3/18,0] Hz, nach Zugabe des Blockers: 14,1 [5,0/20,5] Hz und nach dem Auswaschen: 14,4 [5,7/22,5] Hz) (Abbildung 39 D). Bei den prozentual antwortenden Neuronen pro Ganglion gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,114$) zwischen Kontrollgruppe (24,1 [19,2/35,4] %), nach der Zugabe von TRAM-34 (20,8 [10,8/25,6] %) und nach der Auswaschung [21,7 [8,2/25,0] %) (Abbildung 39 B).

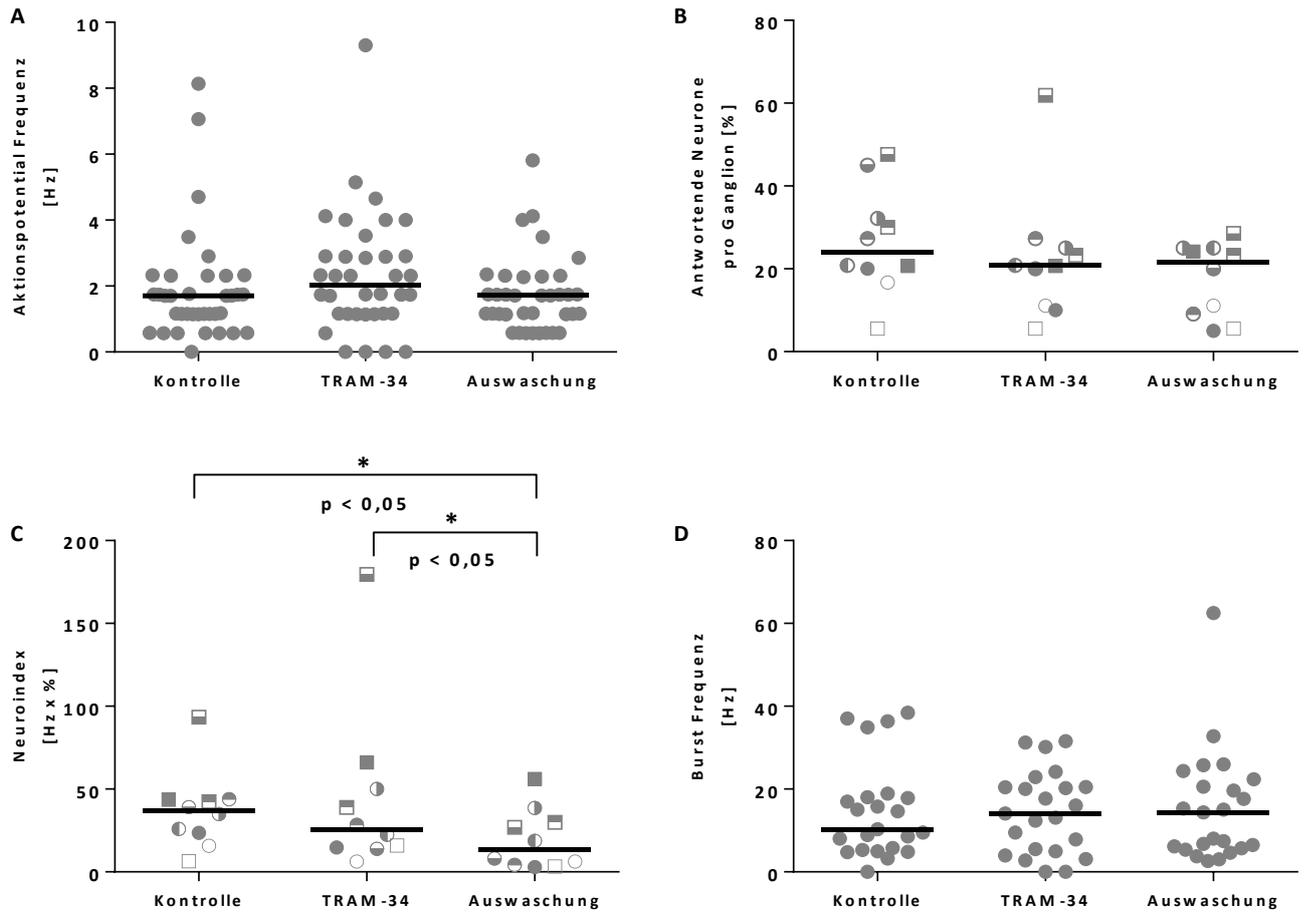


Abbildung 39: Auswertung der Substanz TRAM-34 (Friedman Test, Tukey-Test)

Der Neuroindex nach dem Auswaschen war signifikant unterschiedlich, sowohl zum Neuroindex nach Zugabe der Substanz wie auch zum Neuroindex, bevor die Substanz appliziert wurde (je $p < 0,05$) (C). Bei Betrachtung der Aktionspotential Frequenz (A), der prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion (B) und der Burst Frequenz (D) lagen keine signifikanten Unterschiede vor. In A und D stellt jeder Punkt ein antwortendes Neuron dar. In B und C repräsentieren gleiche Symbole dasselbe Ganglion.

3.10 Zusammenhang von Piezo-1 und MEN im MP¹

Der Zusammenhang zwischen Piezo-1 und MEN wurde in 2 Meerschweinchen, 8 Ganglien beziehungsweise 256 Zellen überprüft. Insgesamt waren 50 Neurone (19,5 %) mechanosensitiv und hatten eine Aktionspotential Frequenz von 1,7 [1,1/2,3] Hz. 42 Neurone (16,4 %) wurden immunhistochemisch positiv für Piezo-1 identifiziert. 19 Neurone (7,4 % von allen Zellen beziehungsweise 38 % von MEN) waren sowohl mechanosensitiv, wie auch Piezo-1 positiv. Von diesen 19 Neurone wurden 79 % als RAMEN und 21 % als SAMEN klassifiziert (Abbildung 40).

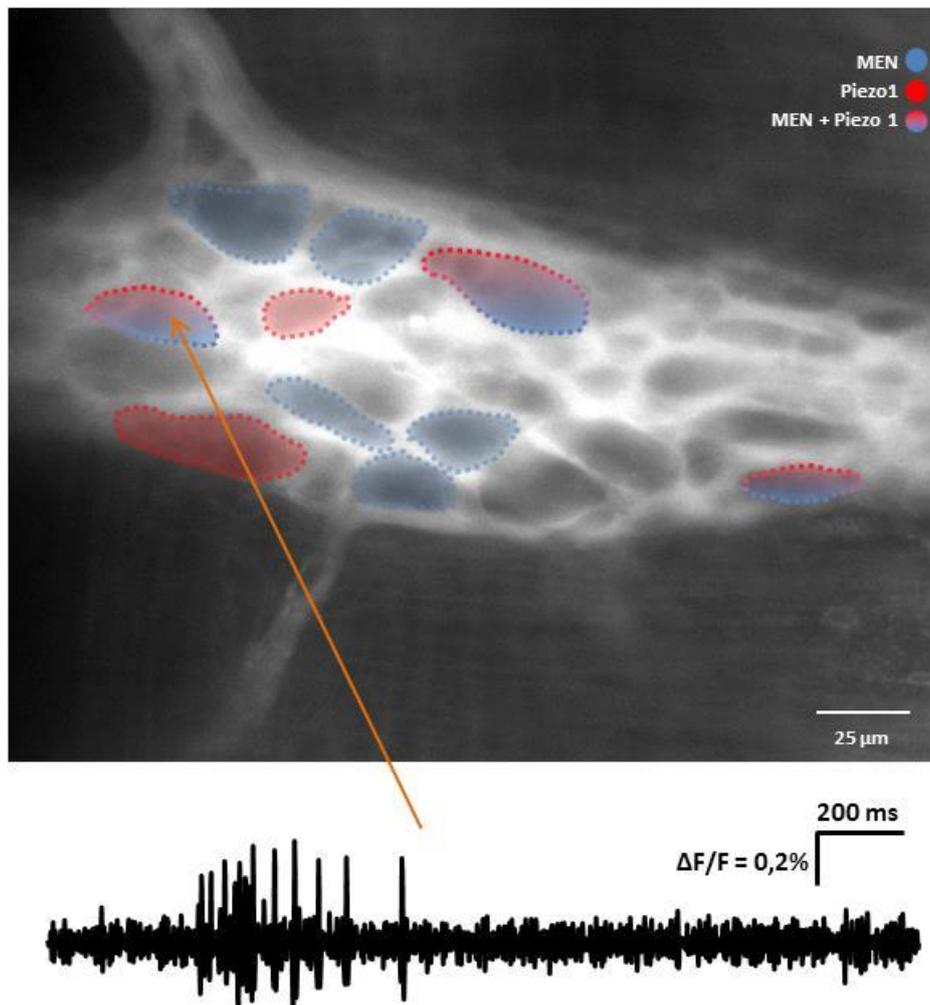


Abbildung 40: Myenterisches Ganglion mit MEN und Piezo-1 positiven Zellen

MEN wurden mit blau und Piezo 1 positive Zellen mit rot umkreist. Neurone die sowohl mechanosensitiv wie auch Piezo-1 positiv sind, wurden mit rot-blauem Farbverlauf gekennzeichnet. Unter dem Bild ist ein Trace eines Neurons, während mechanischer Stimulation zu sehen.

¹ Daten wurden schon vorab publiziert: Mazzuoli-Weber, G., Kugler, E.M., Bühler, C.I., Kreutz, F., Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Zeller, F., Schemann, M., 2018. Piezo proteins: incidence and abundance in the enteric nervous system. Is there a link with mechanosensitivity? *Cell Tissue Res. in Press.* (<https://doi.org/10.1007/s00441-018-2926-7>)

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit lieferte neue Erkenntnisse über die Mechanosensitivität im ENS. Es wurde nachgewiesen, dass im submukösen Plexus Neurone existieren, die durch mechanische Stimuli aktiviert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass es wahrscheinlich mehrere Mechanorezeptoren-Typen geben muss, da MEN unterschiedliche Charakteristika bei Kompression und Dehnung besaßen. MEN im SMP besitzen andere Eigenschaften wie MEN im MP. Die Verteilung von MEN im SMP und MP ist unterschiedlich. Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass eventuell TRPC-Kanäle im MP eine wichtige Rolle bei der Mechanotransduktion spielen im SMP dagegen nicht. Das dreifach positiv geladene Metall Gadolinium, welches mechanisch gesteuerte Kationkanäle blockiert, führte sowohl im MP wie auch im SMP zu einer signifikanten Reduzierung der Aktionspotential Frequenz.

Durch die Neuroimaging Technik in Kombination mit dem spannungssensitiven Farbstoff DI-8-ANEPPS konnten simultan Aufnahmen aller Nervenzellen im Sichtfeld gemacht werden. Vorteile dieser Methode gegenüber den intrazellulären Ableitungstechniken waren, dass einzelne Neurone, durch die Positionierung der Elektrode auf diese, nicht mechanisch strapaziert wurden (Suchyna et al., 2009) und dass auch von sehr kleinen Neuronen abgeleitet werden konnte (Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a). Die auftretende Fototoxizität, die durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, Sauerstoffradikale) bei langen Belichtungszeiten entstehen kann, wurde dadurch minimiert, dass die Aufnahmedauer relativ kurz (maximal 4 s) gehalten wurde (Obaid et al., 1999). Mit Hilfe der Neuroimaging Technik konnte somit gezeigt werden, dass ungefähr 20 % der submukösen Neurone im distalen Kolon des Meerschweinchens mechanosensitiv sind. Unter physiologischen Bedingungen werden enterische Neurone durchgehend während der Peristaltik deformiert (Gabella and Trigg, 1984; Mazzuoli and Schemann, 2009). Kompression und Dehnung sind die vorherrschenden Deformationsformen im Darm (Fung, 1993; Gregersen, 2010; Kugler et al., 2018; Lynn et al., 2005). Die Deformationsformen bestehen jeweils aus den Komponenten Normalkraft und Tangentialkraft. Studien zeigten, dass die Tangentialkraftkomponente nur eine untergeordnete Rolle bei der mechanischen Stimulation von enterischen Neuronen spielt (Kugler et al., 2018) und dass die Tangentialkraft wahrscheinlich dominant bei Zellen ist, die von einem flüssigem Milieu umgeben sind (White and Frangos, 2007). Deshalb lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Normalkraftkomponente.

Als Kompressionsstimulus wurde die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik verwendet. Diese Technik wurde bereits erfolgreich für Neurone im MP validiert (Mazzuoli and Schemann, 2009, 2012; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a). Der erste Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, diese Technik auch für Neurone im submukösen Plexus zu etablieren. Es stellte sich heraus, dass ein leicht höherer Injektionsdruck (SMP: 0,8 bar vs. MP: 0,5 bar) und eine längere Injektionsdauer

(SMP: 600 ms vs. MP: 400 ms) im Vergleich zur Anwendung im MP benötigt wurden. Die leicht veränderten Parameter könnten mit den unterschiedlichen Komponenten, aus denen beide Plexus bestehen, zusammenhängen. Der MP besteht hauptsächlich aus Nervenzellen und Nervensträngen die parallel zur Zirkulärmuskulatur verlaufen (Furness, 2006). Im SMP befinden sich ebenfalls Nervenzellen und Nervenstränge, die aber diffus verlaufen. Der Hauptunterschied ist allerdings, dass myenterische Ganglien zwischen Muskelschichten und submuköse Ganglien in Bindegewebe eingebettet sind (Furness, 2006). Letztendlich konnte die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik auch für submuköse Ganglien etabliert und validiert werden. Diese Methode muss aber auch kritisch gesehen werden, da sie kein physiologischer Stimulus ist, sondern lediglich ein Tool zur Aktivierung mechanosensitiver Neurone darstellt. Zur mechanischen Stimulation wird normalerweise die bestens etablierte von Frey Haar Technik verwendet. Diese Methode hatte aber gegenüber der intraganglionären Krebslösung-Injektion im SMP den Nachteil, dass sich das von Frey Haar stets in dem Bindegewebe verhakte und somit eine mechanische Stimulation deutlich schwerer machte als im MP (Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a). Außerdem konnte nicht exakt bestimmt werden, ob wirklich das submuköse Ganglion mechanisch stimuliert oder nur das darüber liegende Bindegewebe von dem Haar berührt wurde. Mazzuoli-Weber et al. fanden in gepaarten Experimenten allerdings heraus, dass 95 ± 2 % der Neurone, die bei intraganglionärer Krebslösung-Injektion antworteten, dies auch bei der von Frey Haar Stimulation taten. Eine nicht 100 %ige Übereinstimmung lässt sich dadurch erklären, dass beide Stimuli nicht exakt die gleichen Stimulusstärken hatten (Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a). Somit aktivieren beiden Techniken dieselben MEN und können als Kompressionsstimulus eingesetzt werden. Die ersten kompressionssensitiven Neurone im MP wurden bereits in den Siebzigern mit Hilfe von extrazellulären Aufnahmen durch Druckausübung mit einer Glaselektrode oder einem Platindraht nachgewiesen (Mayer and Wood, 1975). Bei der vorliegenden Arbeit wurden 24 % der submukösen Neurone mit einer Aktionspotential Frequenz von 2,2 Hz im Kolon des Meerschweinchens als kompressionssensitive MEN identifiziert. In der Literatur lassen sich keine Zahlen zu submukösen MEN in anderen Regionen des Gastrointestinaltraktes beziehungsweise anderen Spezies finden. Es ist allerdings anzunehmen, dass die Populationen zwischen den unterschiedlichen Regionen des Gastrointestinaltraktes variieren, da im MP des Meerschweinchens 12 % der Neurone im Kolon, 25 % im Ileum und 27 % im Magen mechanosensitiv waren (Mazzuoli-Weber, Persönliche Mitteilung; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015b). Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Verteilung von MEN könnten die verschiedenen Aufgaben der einzelnen Regionen des Gastrointestinaltraktes sein. Im Magen wird Nahrung gespeichert, zerkleinert und homogenisiert. Im Ileum werden Nährstoffe resorbiert und Gallensäure rückresorbiert. Die Hauptaufgabe des Kolons ist die Resorption von Wasser und Elektrolyten (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017; Klinker et al., 2003). Auch die Abweichung von MEN im MP und SMP in derselben Darmregion können mittels unterschiedlicher Aufgaben der Plexus erklärt werden. Der SMP ist hauptsächlich für die Sekretion verantwortlich und der MP für die Motilität zuständig (Furness, 2006). Des Weiteren wurden

11 % der submukösen Neurone im Kolon des Meerschweinchens mit einer Aktionspotential Frequenz von 0,9 Hz, als dehnungssensitive Neurone identifiziert. Dehnungssensitive Neurone wurden sowohl im MP (Kugler et al., 2018; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a; Spencer and Smith, 2004), wie auch im SMP (Diener and Rummel, 1990; Frieling et al., 1992; Schulzke et al., 1995; Weber et al., 2001) nachgewiesen. Zwei Studien identifizierten „dehnungssensitive“ Neurone durch Applikation mittels unterschiedlicher hypoosmotischer Stimuli (Dong et al., 2015; Kollmann, 2017). Diese Stimuli führten zu einem Anschwellen und zu einer Aktivierung der Neurone. Der Begriff „dehnungssensitiv“ muss im Zusammenhang mit diesen Studien aber kritisch gesehen werden, da noch nicht bekannt ist, ob die Neurone durch mechanosensitive Rezeptoren oder durch osmosensitive Rezeptoren und somit durch zwei unterschiedliche Modalitäten aktiviert werden. Nichtsdestotrotz antworteten bei Applikation einer 94 mOsm/kg Lösung 11 % und bei 144 mOsm/kg Lösung 18 % der submukösen Neurone im distalen Kolon (Kollmann, 2017). Im MP des Magens wurden mit Hilfe der angewandten Technik 27 % der MEN als dehnungssensitive Neurone identifiziert (Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a), wohingegen in kultivierten myenterischen Neuronen mit einer ähnlichen Methode 14 % der Neurone dehnungssensitiv waren (Kugler et al., 2018). Prinzipiell lassen sich die Daten aber nicht miteinander vergleichen, da in den Studien andere Darmregionen, verschiedene Zelltypen und unterschiedliche Stimulusstärken verwendet wurden.

Es gibt bislang nur sehr wenige Studien, die sich mit der Frage befassen, ob enterische Neurone durch einen einzigen deformationssensitiven Rezeptor mit unterschiedlichen Schwellwerten aktiviert werden oder durch mehrere Mechanorezeptoren, die auf unterschiedliche Deformationsmodalitäten reagieren und auf demselben Neuron exprimiert sein können. So konnte bisher in gepaarten Experimenten gezeigt werden, dass viszerale Neurone sowohl auf Kompression mittels von Frey Haar Stimulation, wie auch Dehnung antworteten (Hibberd et al., 2012; Lynn et al., 2005). Außerdem waren im Magen des Meerschweinchens 53 % der MEN und bei kultivierten Neuronen des Ileums 46 % der MEN sowohl kompressions-, wie auch dehnungssensitiv (Kugler et al., 2018; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a). In beiden Studien antworteten circa 50 % der MEN nur auf Kompression oder Dehnung. In der vorliegenden Arbeit wurden 18 % der MEN, die auf beide Stimuli und 82 % der MEN, die nur auf einen der beiden Stimuli antworteten, identifiziert. Die Tatsache, dass mindestens circa 50 % der MEN nur auf einen der beiden Stimuli antworteten, könnte einen ersten Hinweis dafür geben, dass es mehrere Mechanorezeptoren geben muss, die entweder kompressions- oder dehnungssensitiv sind. Keine eindeutige Antwort, die für eine der beiden Theorien spricht, lieferte zunächst die unterschiedliche Adaptation der MEN bei beiden mechanosensitiven Stimuli (siehe nächster Absatz). Allerdings sprechen die nicht signifikant unterschiedlichen Deformationsgeschwindigkeiten (Kompression: $77,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und Dehnung: $72,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$) wieder für die Theorie, dass es verschiedene Mechanorezeptoren geben muss, da die Schwellwerte und somit die Aktivierung der MEN zu einem ähnlichen Zeitpunkt stattfinden müssten.

Die Literatur unterscheidet zwischen schnell adaptierenden Mechanorezeptoren, die sowohl während der dynamischen, wie auch in der andauernden Phase antworten können und den langsam adaptierenden Mechanorezeptoren, die nur während der andauernden Phase feuern (Delmas et al., 2011). Die Adaptation der MEN unterschied sich bei den beiden mechanosensitiven Stimuli: Die dehnungssensitiven Neurone zeigten eine sehr viel langsamere Adaptation gegenüber den kompressionssensitiven Neuronen. So wurden mit Hilfe des AI (Kugler et al., 2015; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a, 2015b) 100 % der dehnungssensitiven MEN als SAMEN identifiziert. Wohingegen bei Kompression die Verteilung bei 65 % SAMEN und 35 % RAMEN lag. Eine ähnliche Verteilung wurde für myenterische kompressionssensitive MEN im Kolon gefunden (Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015b). Für dehnungssensitive Neurone zeigte sich ein ähnliches Bild: So wurden in *in vitro* Experimenten ebenfalls 100% der dehnungssensitiven MEN als SAMEN identifiziert (Kugler et al., 2018). Im Ileum wurden 88 % als SAMEN und 12 % als RAMEN klassifiziert (Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a). Die Literatur teilt MEN sogar noch in eine weitere Gruppe, den USAMEN, ein (Kugler et al., 2015, 2018; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015b). In der vorliegenden Studie wurden SAMEN und USAMEN zu einer Gruppe (SAMEN) zusammengefasst, da der AI abhängig von der Aufnahmedauer ist (siehe Punkt 2.10). Würde die Aufnahmedauer erhöht werden, müssten immer mehr, als SAMEN identifizierte, MEN der Gruppe der USAMEN zugeordnet werden.

Ein weiteres Merkmal von MEN im SMP ist die Abhängigkeit der Aktionspotential Frequenz kompressionssensitiver, wie auch dehnungssensitiver Neurone von der Stimulusstärke. Je stärker die Kompression durch Erhöhung des Injektionsdrucks oder der Injektionsdauer war, desto höher war die Aktionspotential Frequenz. Auch bei der Dehnung konnte nachgewiesen werden, dass eine stärkere Dehnung mit einer Erhöhung der Aktionspotential Frequenz positiv korrelierte. Smith et al. zeigten, dass eine stärkere Druckausübung auf mechanosensitive Interneuronen mit Hilfe eines von Frey Haares eine höhere Aktionspotential Frequenz zur Folge hat (Smith et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien von Mazzuoli-Weber und Kollegen. So wurde im Meerschweinchen mittels gepaarter Experimente nachgewiesen, dass mit steigendem Injektionsdruck (0,4 bar und 1,0 bar) beziehungsweise längerer Injektionsdauer (200 ms und 400 ms) ebenfalls die Aktionspotential Frequenz von 0,6 Hz auf 5,2 Hz beziehungsweise von 0,9 Hz auf 2,4 Hz steigt (Mazzuoli and Schemann, 2009; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a). Die Abhängigkeit der Aktionspotential Frequenz von der Stimulusstärke ist ein weiteres Argument dafür, dass die Einteilung in RAMEN und SAMEN mit Hilfe des AI kritisch betrachtet werden muss, da eine Erhöhung des Injektionsdrucks beziehungsweise der Injektionsdauer die Verteilung von RAMEN und SAMEN ändern würde. Zwischen Antwortverhalten der MEN und den unterschiedlichen Phasen könnte ein Zusammenhang bestehen. Ein Beispiel zeigt die Abbildung 21, bei der eine längere Injektionsdauer eine längere dynamische Phase auslöst und die Burst Zeit deutlich verlängert. Eine

bessere Einteilungsmöglichkeit, die nicht auf den Kriterien des AI beruht, könnte somit die Verteilung der MEN anhand der unterschiedlichen Phasen sein: Bei den kompressionssensitiven MEN antworteten 83 % nur in der dynamischen, 2 % nur in der andauernden und 15 % in beiden Phasen, wohingegen bei dehnungssensitiven MEN 0 % nur in der dynamischen, 80 % nur in der andauernden und 20 % in beiden Deformationsphasen feuerten.

Ebenfalls interessant ist die Betrachtung der Burst Frequenz (Kugler et al., 2015). So ergaben sich Unterschiede zwischen der Burst Frequenz dehnungs- und kompressionssensitiver Neurone. Während kompressionssensitive Neurone mit einer Burst Frequenz von 12,2 Hz feuerten, hatten die dehnungssensitiven Neurone eine Burst Frequenz von 3,5 Hz. In einer vergleichbaren Studie mit kultivierten myenterischen Neuronen ergaben sich ähnliche Burst Frequenzen (Kompression: 13,0 Hz und Dehnung: 2,6 Hz) (Kugler, 2015). Dies könnte einen möglichen Hinweis darauf geben, dass die kompressionssensitiven Neurone eher bei den schnellen phasischen Kontraktionen und die „langsamen“ dehnungssensitiven Neurone bei tonischen Kontraktionen aktiviert werden. Ein großer Nachteil der Burst Frequenz ist, dass Neurone mit nur einem Aktionspotential nicht ausgewertet werden können. Durch die Formel der Burst Frequenz sind Neurone mit einem Aktionspotential mathematisch nicht definiert.

Die Antworten von MEN auf einen mechanischen Stimulus waren nur bei der intraganglionären Krebslösung-Injektionstechnik reproduzierbar. Beim Kompressionsstimulus konnte durch dreimalige mechanische Stimulation gezeigt werden, dass die Antworten physiologisch waren. Bei den Wiederholungen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Aktionspotential Frequenz, der Burst Frequenz, beim Neuroindex und bei den antwortenden Neuronen pro Ganglion. Bei der Dehnung konnte nicht auf Reproduzierbarkeit getestet werden, da es mit der verwendeten Technik nicht möglich war, ein Ganglion mehrmals exakt gleich zu deformieren. Dennoch konnte bewiesen werden, dass die Mechanorezeptoren nach dem verwendeten Dehnungsstimulus immer noch vital waren, da die Neurone nach der mechanischen Stimulation schnelle EPSPs mittels elektrischer Stimulation zeigten.

Die elektrische Stimulation war ein effizienter Weg, um zu überprüfen, ob die Neurone vital waren. Es zeigte sich allerdings, dass durch diese Methode nicht alle vitalen Neurone eines Ganglions mit einem schnellen EPSP antworteten. Zum einen konnte es sein, dass Zellfortsätze von Neuronen nicht in der intraganglionären Faser lagen auf dem die Elektrode positioniert wurde und zum anderen gibt es einzelne Neurone, die kein schnelles EPSP auslösen können (Furness, 2006). Eine alternative Möglichkeit auf Vitalität der Neurone zu prüfen, wäre beispielsweise die Applikation von Nikotin gewesen, welches an nikotinerge Acetylcholin Rezeptoren bindet und zu einer Erregung der Neurone führt (Buhner et al., 2018; Kugler et al., 2015; Li et al., 2016; Ostertag et al., 2017). Jedoch würde bei der Nikotin Applikation eine längere Belichtungszeit benötigt werden, welche die Fototoxizität erhöhen würde. Der Vitalitätstest mit

Hilfe der elektrischen Stimulation sollte aber nur einen Gesamtüberblick darüber geben, ob die Mehrzahl der Neurone eines Ganglions vor beziehungsweise nach der mechanischen Stimulation vital war.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass der Kompressionsstimulus keine inhibierende Wirkung auf MEN hatte, da die Aktionspotential Frequenz bei spontan aktiven Neuronen nach der mechanischen Stimulation nicht kleiner wurde. Im Gegenteil, die Aktionspotential Frequenz war nach der mechanischen Stimulation erhöht. Spontanaktivität der Neurone kann durch verschiedene Faktoren entstehen. So können pH Schwankungen und Temperaturunterschiede zu spontan aktiven Neuronen führen (Bertrand et al., 1997; Furness et al., 1998; Zhao and Boulant, 2005). Diese Faktoren konnten aber in Versuchen der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da die Parameter kontrolliert und konstant gehalten wurden. Eine weitere Erklärung für das Zustandekommen der Spontanaktivität ist die Tatsache, dass das Gewebe mit einer geringen Grundspannung auf den Sylgardring gepinnt werden musste. Diese Grundspannung könnte schon ausgereicht haben, um sogenannte „low threshold“ (niedriger Schwellenwert) Mechanorezeptoren, die bisher noch nicht im Gastrointestinaltrakt identifiziert wurden, zu aktivieren. Auf der Haut werden vier Mechanorezeptor-Typen unterschieden: Typ I (low threshold, langsam adaptierend in der andauernden und dynamischen Phase), Typ II (low threshold, schnell adaptierend in der dynamischen Phase), Typ III (high threshold, langsam adaptierend in der dynamischen Phase) und Typ IV (high threshold, Schmerzrezeptoren) (Freeman and Wyke, 1967; Michelson and Hutchins, 1995; Roudaut et al., 2012). Da das vorgespannte Gewebe eine sehr kleine Grundspannung gegenüber dem physiologischen Zustand hatte und sich sozusagen in einer andauernden Deformationsphase befand, könnte somit der Mechanorezeptor Typ I für die Spontanaktivität verantwortlich sein, falls diese Einteilung auch im Gastrointestinaltrakt möglich ist.

Dadurch dass Neurone aufgrund der ständigen Muskelbewegungen im Gastrointestinaltrakt konstanter Deformation ausgesetzt sind (Gabella and Trigg, 1984; Mazzuoli and Schemann, 2009; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015b), war es wichtig den Deformationsgrad zu berechnen. In der vorliegenden Arbeit wurde die prozentuale Änderung bei Kompression und Dehnung sowohl für submuköse Ganglien, wie auch für einzelne submuköse MEN berechnet. Im Vergleich zu ihrem Anfangszustand, als sie auf den Sylgardring gespannt wurden, dehnten sich während der mechanischen Stimulation die Ganglien um 9 % beziehungsweise die Neurone um 15 %. Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass die Ganglionfläche mit Hilfe eines Algorithmus und die Neuronenfläche manuell berechnet wurden. Bei der intraganglionären Krebslösung-Injektionstechnik wurden die Neurone um 19 % komprimiert. Da Krebslösung in die Ganglien injiziert wurde und es dadurch zu einer Volumenzunahme im Ganglion kam, dehnten sich die Ganglien durchschnittlich um 6 % aus. Anhand der Zahlen kann festgestellt werden, dass der Kompressionsstimulus eine leicht stärkere Stimulusstärke wie der Dehnungsstimulus besaß. In der

Literatur gibt es nur eine Studie von 1984, die den Deformationsgrad unter physiologischen Bedingungen für submuköse Neurone angibt (Gabella and Trigg, 1984). So wurde im Rektum des Meerschweinchens festgestellt, dass im Normalzustand die durchschnittliche Fläche eines Neurons $174 \mu\text{m}^2$ und bei maximaler Dehnung, hervorgerufen durch ein Fäkalpellet, $190 \mu\text{m}^2$ betrug, das entspricht einer Änderung von 9 %. Im Ileum wurde eine maximale Änderung von 18 % (maximale Dehnung: $231 \mu\text{m}^2$, maximale Kontraktion: $196 \mu\text{m}^2$) errechnet (Gabella and Trigg, 1984). Der Wert der vorliegenden Studie kann also als physiologische Dehnung angesehen werden, da die 15 %ige Dehnung im Kolon genau zwischen den Ileum- und Rektumwerten liegt. Leider wurde keine Literatur gefunden, die die physiologischen Werte der Kompression beinhalten. Zwei Studien, die ebenfalls Deformationsstimuli verwendeten, kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Wie oben schon erwähnt, führt die Applikation einer hyper- beziehungsweise hypoosmolaren Lösung auch zu einer Deformation von Neuronen. Dong und Kollegen fanden heraus, dass bei kultivierten mechanosensitiven myenterischen Neuronen der Ratte, bei Applikation einer hyperosmolaren Lösung die Neurone um 5 % komprimiert und bei einer hypoosmolaren Lösung die Neurone um 10 % gedehnt wurden (Dong et al., 2015). Bei submukösen Neuronen wurde durch Applikation einer hypoosmolaren Lösung eine vergleichbare Dehnung von 9 % festgestellt (Kollmann, 2017). Ein Nachteil der verwendeten Methode bei der Berechnung des Deformationsgrades der vorliegenden Arbeit ist, dass nur Änderung in X- und Y-Achse messbar waren. Änderungen in Z-Achse waren mit dem inversen Lichtmikroskop nicht feststellbar. Eine Möglichkeit die Deformation drei dimensional und somit Änderungen in X- Y- und Z-Achse zu messen, wären Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit war es, Ionenkanäle beziehungsweise Mechanorezeptoren zu finden, die für die Mechanotransduktion im ENS verantwortlich sind. Hierfür wurden sowohl im MP, wie auch im SMP Substanzen eingesetzt, die bekanntermaßen mechanosensitive Ionenkanäle in anderen Teilen des Organismus blockieren können. Zuerst wurde überprüft, ob die Antworten in Form von Aktionspotentialen eine direkte Folge der mechanischen Stimulation oder synaptisch vermittelt waren. Das Neurotoxin ω -Conotoxin GVIA hemmt die synaptische Übertragung, indem es den spannungsabhängigen N-Typ Calciumkanal blockiert (Cruz and Olivera, 1986). Daraus resultierte, dass es nach der Applikation von ω -Conotoxin GVIA zu keinen schnellen EPSPs mehr kam, nachdem die Neurone elektrisch stimuliert wurden. Jedoch waren weder die Aktionspotentialfrequenz, die Burstfrequenz, der Neuroindex noch die prozentual antwortenden Neurone pro Ganglion nach mechanischer Stimulation (Kompression) signifikant reduziert. Das ist ein Argument dafür, dass enterische Neurone direkt durch mechanische Stimulation aktiviert werden, wie schon vorherige Studien im MP zeigten (Kunze et al., 2000; Mazzuoli and Schemann, 2012, 2009). Des Weiteren reduzierte TTX die Aktionspotential Frequenz, die Burst Frequenz, den Neuroindex und die antwortenden Ganglien. Dennoch gab es einige Neurone, die nach Applikation von TTX auf mechanische Stimulation antworteten. Diese Neurone besitzen

entweder TTX resistente Natriumkanäle oder die Aktionspotentiale wurden durch calciumsensitive Kanäle ausgelöst (Kunze et al., 2000; Mazzuoli-Weber and Schemann, 2015a; Yoshida, 1994). Einen ersten Hinweis darauf, welche Ionenkanäle bei der Mechanotransduktion im ENS beteiligt sind, liefert Gadolinium. Das dreifach positive geladene Ion blockiert mechanisch gesteuerte Kationkanäle (Kunze et al., 1999; Weber et al., 2001). Die Applikation von Gadolinium führte sowohl bei myenterischen, wie auch bei submukösen MEN zur Verringerung der Aktionspotential Frequenz. Im SMP waren nach Zugabe von Gadolinium zusätzlich die antwortenden Neurone pro Ganglion und der Neuroindex signifikant reduziert. Die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigen Studien anderer Arbeitsgruppen, die auch eine Beteiligung von mechanisch gesteuerten Kationkanälen bei der Mechanotransduktion im ENS feststellten (Farrugia et al., 1999; Kunze et al., 1999; Weber et al., 2001). Da Gadolinium ein unspezifischer Kationkanal Antagonist ist, wurden weitere Blocker getestet. TRAM-34 ist ein selektiver Blocker für IK_{Ca} Kanäle. Calciumaktivierte Kaliumkanäle (SK_{Ca} , IK_{Ca} und BK_{Ca}) sind auf einigen sensorischen enterischen Neuronen exprimiert und scheinen eventuell bei der Mechanotransduktion beteiligt zu sein (Clerc et al., 2002; Kunze et al., 2000). IK_{Ca} Kanäle hingegen spielen keine Rolle bei der Mechanosensitivität im MP, da es nach Applikation von TRAM-34 zu keiner signifikanten Änderung bei Aktionspotential Frequenz, Burst Frequenz, Neuroindex und antwortenden Neurone pro Ganglion kam.

Ebenfalls interessant sind die im peripheren Nervensystem vorkommenden mechanosensitiven NMDA Rezeptoren (Maneshi et al., 2017; McRoberts et al., 2001). Die Substanz KB-R7943, welche NMDA Rezeptoren blockiert (Brustovetsky et al., 2011), hatte jedoch keinen Einfluss auf die Mechanosensitivität der myenterischer Neurone und somit sind NMDA Rezeptoren nicht an der Mechanotransduktion im MP beteiligt. Des Weiteren können ASIC3 Kanäle ausgeschlossen werden, da es keine Änderungen von MEN in der Aktionspotential Frequenz und den antwortenden Neurone vor beziehungsweise nach Applikation von APETx2, welcher ASIC3 Kanäle blockiert (Chagot et al., 2005; Diochot et al., 2004), gab. Es ist aber anzumerken, dass APETx2 die Burst Frequenz signifikant reduzierte. Für diesen Effekt konnte nach Überprüfung der Traces kein physiologischer Grund gefunden werden. Als weitere Kandidaten, die möglicherweise an der neuronalen Mechanotransduktion im ENS beteiligt sein könnten, kommen TRP Kanäle in Frage (Boesmans et al., 2011; Cahusac, 2009; Christensen and Corey, 2007; Randhawa and Jaggi, 2016). In einer vorangegangenen Studie konnten bereits TRPA1 - und TRPV2 Kanäle ausgeschlossen werden (Kugler, 2015). Durch die vorliegende Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass weder TRPC- (Blocker: SKF-96365) noch TRPV4 Kanäle (Blocker: HC-06747) eine Rolle bei der Mechanotransduktion im submukösen Plexus spielen. Im myenterischen Plexus hingegen scheinen TRPC Kanäle eventuell bei der Mechanotransduktion beteiligt zu sein, da die Aktionspotential Frequenz von MEN nach Applikation von SKF-96365 signifikant reduziert war (Mazzuoli-Weber, Persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse lassen also den Schluss zu, dass eventuell unterschiedliche Kanäle im MP und SMP bei der Mechanotransduktion beteiligt sind. Chloridkanäle, welche auf IPANs exprimiert sind und mit Hilfe von Nifluminsäure geblockt werden können, wurden als potentielle Kanäle für die Mechanotransduktion im ENS ebenfalls

ausgeschlossen (Furness, 2006; Knauf and Mann, 1984; Starodub and Wood, 2000). Nifluminsäure hatte keinen Einfluss auf die Aktionspotential Frequenz, die Burst Frequenz, den Neuroindex und die antwortenden Neurone pro Ganglien. Weitere interessante Kandidaten, die möglicherweise bei der Mechanotransduktion im ENS beteiligt sind, sind Piezo Proteine. Piezo Proteine wurden bereits als Komponenten von mechanosensitiven Kationkanälen identifiziert (Coste et al., 2010, 2012). Außerdem wurde nachgewiesen, dass sowohl Piezo-1, wie auch Piezo-2 auf Neuronen im ENS von Mäusen, Meerschweinchen und Menschen exprimiert sind (Mazzuoli-Weber et al., 2018) Die vorliegende Arbeit demonstrierte, dass 38 % der myenterischen MEN im Ileum des Meerschweinchens Piezo-1 exprimierten. Jedoch hatten weder der Antagonist GMSTx4, noch der Agonist Yoda für Piezo-1 Einfluss auch die neuronale Aktivität und somit spielen Piezo Proteine keine wichtige Rolle bei der Mechanotransduktion im ENS (Mazzuoli-Weber et al., 2018).

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass es enterische Neurone im SMP gibt, die direkt auf mechanische Stimuli antworten und wahrscheinlich mehrere Mechanosensoren (kompressions- und dehnungssensitiv) besitzen. Nachdem nun gezeigt wurde, dass MEN im SMP existieren, ist es wichtig im nächsten Schritt die Stoffwechsellkaskade der Mechanotransduktion, durch Identifizierung der beteiligten Ionenkanäle, zu ermitteln. Die vorliegende Studie lieferte auch hier bereits erste wichtige Erkenntnisse: Zum einen spielen ein oder mehrere Kationkanäle (gezeigt durch Gadolinium) bei der Mechanotransduktion im ENS eine wichtige Rolle und zum anderen sind wahrscheinlich unterschiedliche Ionenkanäle in beiden Plexus für die Mechanotransduktion verantwortlich (gezeigt durch SKF-96365). Außerdem ist es wichtig, submuköse MEN sowohl in anderen Darmregionen, wie auch in anderen Spezies zu identifizieren.

Literaturverzeichnis

Agarwal, J.J., Zhu, Y., Zhang, Q.-Y., Mongin, A.A., Hough, L.B., 2013. TRAM-34, a putatively selective blocker of intermediate-conductance, calcium-activated potassium channels, inhibits cytochrome P450 activity. *PloS One* 8, e63028

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., 2002. Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26910/>, in: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, NY

Alcaino, C., Knutson, K., Gottlieb, P.A., Farrugia, G., Beyder, A., 2017. Mechanosensitive ion channel Piezo2 is inhibited by D-GsMTx4. *Channels Austin Tex* 11, 245–253

Auerbach, L., 1862. Ueber einen Plexus myentericus, einen bisher unbekanntem ganglio- nervösen Apparat im Darmkanal der Wirbeltiere. Verl. Von EMorgenstern Breslau

Bading, H., Greenberg, M.E., 1991. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* 253, 912–914

Bae, C., Sachs, F., Gottlieb, P.A., 2011. The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4. *Biochemistry* 50, 6295–6300

Bagriantsev, S.N., Gracheva, E.O., Gallagher, P.G., 2014. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J. Biol. Chem.* 289, 31673–31681

Bayliss, W.M., Starling, E.H., 1901. The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* 26, 125–138

Bayliss, W.M., Starling, E.H., 1899. The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* 24, 99–143

Bazopoulou, D., Voglis, G., Tavernarakis, N., 2007. The Role of DEG/ENaC Ion Channels in Sensory Mechanotransduction, in: Wang, D.H. (Ed.), *Molecular Sensors for Cardiovascular Homeostasis*. Springer US, Boston, MA, pp. 3–31

Bertrand, P.P., Bertrand, R.L., 2010. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 153, 47–57

Bertrand, P.P., Galligan, J.J., 1994. Contribution of chloride conductance increase to slow EPSC and tachykinin current in guinea-pig myenteric neurones. *J. Physiol.* 481 (Pt 1), 47–60

Bertrand, P.P., Kunze, W.A., Bornstein, J.C., Furness, J.B., Smith, M.L., 1997. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am. J. Physiol.* 273, G422-435

Beyder, A., Farrugia, G., 2012. Targeting ion channels for the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 5, 5–21

Biswas, A., Manivannan, M., Srinivasan, M.A., 2015. Vibrotactile sensitivity threshold: nonlinear stochastic mechanotransduction model of the Pacinian Corpuscle. *IEEE Trans. Haptics* 8, 102–113

Blackshaw, L.A., Brookes, S.J.H., Grundy, D., Schemann, M., 2007. Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 19, 1–19

Boesmans, W., Owsianik, G., Tack, J., Voets, T., Vanden Berghe, P., 2011. TRP channels in neurogastroenterology: opportunities for therapeutic intervention. *Br. J. Pharmacol.* 162, 18–37

Bornstein, J.C., Furness, J.B., Costa, M., 1989. An electrophysiological comparison of substance P-immunoreactive neurons with other neurons in the guinea-pig submucous plexus. *J. Auton. Nerv. Syst.* 26, 113–120

Bornstein, J.C., Furness, J.B., Kunze, W.A., 1994. Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate? *J. Auton. Nerv. Syst.* 48, 1–15

Brustovetsky, T., Brittain, M.K., Sheets, P.L., Cummins, T.R., Pinelis, V., Brustovetsky, N., 2011. KB-R7943, an inhibitor of the reverse Na⁺ /Ca²⁺ exchanger, blocks N-methyl-D-aspartate receptor and inhibits mitochondrial complex I. *Br. J. Pharmacol.* 162, 255–270

Buhner, S., Braak, B., Li, Q., Kugler, E.M., Klooker, T., Wouters, M., Donovan, J., Vignali, S., Mazzuoli-Weber, G., Grundy, D., Boeckxstaens, G., Schemann, M., 2014. Neuronal activation by mucosal biopsy supernatants from irritable bowel syndrome patients is linked to visceral sensitivity. *Exp. Physiol.* 99, 1299–1311

Buhner, S., Hahne, H., Hartwig, K., Li, Q., Vignali, S., Ostertag, D., Meng, C., Hörmannspurger, G., Braak, B., Pehl, C., Frieling, T., Barbara, G., De Giorgio, R., Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Zeller, F., Boeckxstaens, G., Haller, D., Kuster, B., Schemann, M., 2018. Protease signaling through protease activated receptor 1 mediate nerve activation by mucosal supernatants from irritable bowel syndrome but not from ulcerative colitis patients. *PLOS ONE* 13, e0193943

Cahusac, P.M.B., 2009. Effects of transient receptor potential (TRP) channel agonists and antagonists on slowly adapting type II mechanoreceptors in the rat sinus hair follicle. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* 14, 300–309

Chagot, B., Escoubas, P., Diochot, S., Bernard, C., Lazdunski, M., Darbon, H., 2005. Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton-gated channels. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 14, 2003–2010

Christensen, A.P., Corey, D.P., 2007. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 510–521

Clerc, N., Gola, M., Vogalis, F., Furness, J.B., 2002. Controlling the excitability of IPANs: a possible route to therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 657–664

Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., Spedding, M., 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2–5

Colquhoun, D., Ritchie, J.M., 1972. The interaction at equilibrium between tetrodotoxin and mammalian non-myelinated nerve fibres. *J. Physiol.* 221, 533–553

Costa, M., Brookes, S.J., Steele, P.A., Gibbins, I., Burner, E., Kandiah, C.J., 1996. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75, 949–967

Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E., Patapoutian, A., 2010. Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels. *Science* 330, 55–60

Coste, B., Xiao, B., Santos, J.S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K.S., Kim, S.E., Schmidt, M., Mathur, J., Dubin, A.E., Montal, M., Patapoutian, A., 2012. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* 483, 176–181

Cruikshank, S.F., Baxter, L.M., Drummond, R.M., 2003. The Cl(−) channel blocker niflumic acid releases Ca(2+) from an intracellular store in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 140, 1442–1450

Cruz, L.J., Olivera, B.M., 1986. Calcium channel antagonists. Omega-conotoxin defines a new high affinity site. *J. Biol. Chem.* 261, 6230–6233

Cui, M., Qin, G., Yu, K., Bowers, M.S., Zhang, M., 2014. Targeting the Small- and Intermediate-Conductance Ca-Activated Potassium Channels: The Drug-Binding Pocket at the Channel/Calmodulin Interface. *Neurosignals* 22, 65–78

Cunningham, S.M., Mihara, S., Higashi, H., 1998. Presynaptic calcium channels mediating synaptic transmission in submucosal neurones of the guinea-pig caecum. *J. Physiol.* 509 (Pt 2), 425–435.

Delmas, P., Hao, J., Rodat-Despoix, L., 2011. Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 139–153

Diener, M., Rummel, W., 1990. Distension-induced secretion in the rat colon: mediation by prostaglandins and submucosal neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 178, 47–57

Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., Lazdunski, M., 2004. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* 23, 1516–1525

Dogiel, A.S., 1899. Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Saeugethiere. *Arch Anat Physiol Leipzig Anat Abt Jg* 130–158

Dogiel, A.S., 1895. Zur frage über die Ganglion der Darmgeflechte bei den Säugethieren. *Anat Anz* 10, 517–528.

Dong, H., Jiang, Y., Dong, J., Mittal, R.K., 2015. Inhibitory motor neurons of the esophageal myenteric plexus are mechanosensitive. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308, C405-413

Everaerts, W., Zhen, X., Ghosh, D., Vriens, J., Gevaert, T., Gilbert, J.P., Hayward, N.J., McNamara, C.R., Xue, F., Moran, M.M., Strassmaier, T., Uykal, E., Owsianik, G., Vennekens, R., De Ridder, D., Nilius, B., Fanger, C.M., Voets, T., 2010. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19084–19089

Faber, E.L., Sah, P., 2007. Functions of SK channels in central neurons. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 1077–1083

Farrugia, G., Holm, A.N., Rich, A., Sarr, M.G., Szurszewski, J.H., Rae, J.L., 1999. A mechanosensitive calcium channel in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 117, 900–905

Freeman, M.A., Wyke, B., 1967. The innervation of the knee joint. An anatomical and histological study in the cat. *J. Anat.* 101, 505–532

Frieling, T., Wood, J.D., Cooke, H.J., 1992. Submucosal reflexes: distension-evoked ion transport in the guinea pig distal colon. *Am. J. Physiol.* 263, G91-96

Fromherz, P., Lambacher, A., 1991. Spectra of voltage-sensitive fluorescence of styryl-dye in neuron membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1068, 149–156

Fung, Y.-C., 1993. *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*. Springer New York, New York, NY

Furness, J.B., 2006. *The enteric nervous system*. Blackwell Pub, Malden, Mass

Furness, J.B., 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87–96

Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., Clerc, N., 2004. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143–164

Furness, J.B., Kunze, W.A., Bertrand, P.P., Clerc, N., Bornstein, J.C., 1998. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* 54, 1–18

Gabella, G., Trigg, P., 1984. Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *J. Neurocytol.* 13, 49–71

Galligan, J.J., LePard, K.J., Schneider, D.A., Zhou, X., 2000. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 97–103

Gershon, M.D., 1999. The enteric nervous system: a second brain. *Hosp. Pract.* 1995 34, 31–32, 35–38, 41–42 passim

Golenhofen, K., Mandrek, K., 1991. Phasic and Tonic Contraction Processes in the Gastrointestinal Tract. *Dig. Dis.* 9, 341–346

Gottlieb, P., Folgering, J., Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Bowman, C., Bichet, D., Patel, A., Sachs, F., Martinac, B., Hamill, O.P., Honoré, E., 2008. Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 455, 1097–1103

Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A.C., Grundy, D., 2017. Gastrointestinal Physiology and Function, in: Greenwood-Van Meerveld, B. (Ed.), *Gastrointestinal Pharmacology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–16

Gregersen, H., 2010. *Biomechanics of the gastrointestinal tract: new perspectives in motility research and diagnostics*. Springer

Gunn, M., 1968. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *J. Anat.* 102, 223–239

Hamill, O.P., McBride, D.W., 1996. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol. Rev.* 48, 231–252

Hansen, M.B., 2003. The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 105–113

Hanukoglu, I., 2017. ASIC and ENaC type sodium channels: conformational states and the structures of the ion selectivity filters. *FEBS J.* 284, 525–545

Hendriks, R., Bornstein, J.C., Furness, J.B., 1990. An electrophysiological study of the projections of putative sensory neurons within the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *Neurosci. Lett.* 110, 286–290

Hibberd, T.J., Zagorodnyuk, V.P., Spencer, N.J., Brookes, S.J.H., 2012. Identification and mechanosensitivity of viscerofugal neurons. *Neuroscience* 225, 118–129

Hirst, G.D.S., Holman, M.E., Spence, I., 1974. Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J. Physiol.* 236, 303–326

Holzer, P., 2015. Acid-sensing ion channels in gastrointestinal function. *Neuropharmacology* 94, 72–79

Hoyle, C.H., Burnstock, G., 1989. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J. Anat.* 166, 7–22

Ishii, T.M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C.T., Adelman, J.P., Maylie, J., 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11651–11656

Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A.A., 2002. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol. Rev.* 82, 503–568. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2001>

Kaletka, M., Palmer, C., 2011. TRP channels in yeast. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, 315–321

Kalyanaraman, B., Feix, J.B., Sieber, F., Thomas, J.P., Girotti, A.W., 1987. Photodynamic action of merocyanine 540 on artificial and natural cell membranes: involvement of singlet molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 2999–3003

Kashiba, H., Uchida, Y., Takeda, D., Nishigori, A., Ueda, Y., Kuribayashi, K., Ohshima, M., 2004. TRPV2-immunoreactive intrinsic neurons in the rat intestine. *Neurosci. Lett.* 366, 193–196

Kato, M., Tanaka, N., Usui, S., Sakuma, Y., 2006. The SK channel blocker apamin inhibits slow afterhyperpolarization currents in rat gonadotropin-releasing hormone neurones. *J. Physiol.* 574, 431–442

Katsumi, A., Orr, A.W., Tzima, E., Schwartz, M.A., 2004. Integrins in mechanotransduction. *J. Biol. Chem.* 279, 12001–12004

Kirchgessner, A.L., Tamir, H., Gershon, M.D., 1992. Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 235–248

Klinke, R., Silbernagl, S., Bauer, C., Gay, R., Rothenburger, A. (Eds.), 2003. *Lehrbuch der Physiologie*, 4., korrigierte Auflage. ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

Knauf, P.A., Mann, N.A., 1984. Use of niflumic acid to determine the nature of the asymmetry of the human erythrocyte anion exchange system. *J. Gen. Physiol.* 83, 703–725

Kollmann, P., 2017. Sensitivity of enteric neurons of osmotic stimuli, Technische Universität München, Deutschland (Doktorarbeit)

Kugler, E.M., 2015. Mechanosensitivity in isolated myenteric neuronal networks, Technische Universität München, Deutschland (Doktorarbeit)

Kugler, E.M., Michel, K., Kirchenbüchler, D., Dreissen, G., Csiszár, A., Merkel, R., Schemann, M., Mazzuoli-Weber, G., 2018. Sensitivity to Strain and Shear Stress of Isolated Mechanosensitive Enteric Neurons. *Neuroscience* 372, 213–224

Kugler, E.M., Michel, K., Zeller, F., Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Schemann, M., Mazzuoli-Weber, G., 2015. Mechanical stress activates neurites and somata of myenteric neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 9

Kuntz, A., 1938. The structural organization of the celiac ganglia. *J. Comp. Neurol.* 69, 1–12

Kunze, W.A., Clerc, N., Bertrand, P.P., Furness, J.B., 1999. Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *J. Physiol.* 517 (Pt 2), 547–561

Kunze, W.A., Clerc, N., Furness, J.B., Gola, M., 2000. The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation. *J. Physiol.* 526 Pt 2, 375–385

Kunze, W.A., Furness, J.B., 1999. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 117–142

Kunze, W.A., Furness, J.B., Bertrand, P.P., Bornstein, J.C., 1998. Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. *J. Physiol.* 506 (Pt 3), 827–842

Kunze, W.A., Furness, J.B., Bornstein, J.C., 1993. Simultaneous intracellular recordings from enteric neurons reveal that myenteric AH neurons transmit via slow excitatory postsynaptic potentials. *Neuroscience* 55, 685–694

Langley, J.N., 1921. *The Autonomic Nervous System*. Camb. Heffer

Li, Q., Michel, K., Annahazi, A., Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Zeller, F., Komorowski, L., Stöcker, W., Beyak, M.J., Grundy, D., Farrugia, G., De Giorgio, R., Schemann, M., 2016. Anti-Hu antibodies activate enteric and sensory neurons. *Sci. Rep.* 6

Lippi, A., Santicioli, P., Criscuoli, M., Maggi, C.A., 1998. Depolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 357, 245–251

Liu, M., Qin, Y., Liu, J., Tanswell, A.K., Post, M., 1996. Mechanical strain induces pp60src activation and translocation to cytoskeleton in fetal rat lung cells. *J. Biol. Chem.* 271, 7066–7071

Liu, M.T., Rothstein, J.D., Gershon, M.D., Kirchgessner, A.L., 1997. Glutamatergic enteric neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 4764–4784

Liu, S., Qu, M.-H., Ren, W., Hu, H.-Z., Gao, N., Wang, G.-D., Wang, X.-Y., Fei, G., Zuo, F., Xia, Y., Wood, J.D., 2008. Differential expression of canonical (classical) transient receptor potential channels in guinea pig enteric nervous system. *J. Comp. Neurol.* 511, 847–862

Lomax, A.E., Zhang, J.Y., Furness, J.B., 2000. Origins of cholinergic inputs to the cell bodies of intestinofugal neurons in the guinea pig distal colon. *J. Comp. Neurol.* 416, 451–460

Lynn, P., Zagorodnyuk, V., Hennig, G., Costa, M., Brookes, S., 2005. Mechanical activation of rectal intraganglionic laminar endings in the guinea pig distal gut: Rectal IGLM mechanotransduction. *J. Physiol.* 564, 589–601

Maneshi, M.M., Maki, B., Gnanasambandam, R., Belin, S., Popescu, G.K., Sachs, F., Hua, S.Z., 2017. Mechanical stress activates NMDA receptors in the absence of agonists. *Sci. Rep.* 7, 39610

Mann, P.T., Furness, J.B., Pompolo, S., Mäder, M., 1995. Chemical coding of neurons that project from different regions of intestine to the coeliac ganglion of the guinea pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* 56, 15–25.

Martinac, B., 2004. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J. Cell Sci.* 117, 2449–2460

Mayer, C.J., Wood, J.D., 1975. Properties of mechanosensitive neurons within Auerbach's plexus of the small intestine of the cat. *Pflugers Arch.* 357, 35–49

Mazzuoli, G., Schemann, M., 2012. Mechanosensitive Enteric Neurons in the Myenteric Plexus of the Mouse Intestine. *PLoS ONE* 7, e39887

Mazzuoli, G., Schemann, M., 2009. Multifunctional rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN) in the myenteric plexus of the guinea pig ileum: Mechanosensitive enteric neurons. *J. Physiol.* 587, 4681–4694

Mazzuoli-Weber, G., Kugler, E.M., Bühler, C.I., Kreutz, F., Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Zeller, F., Schemann, M., 2018. Piezo proteins: incidence and abundance in the enteric nervous system. Is there a link with mechanosensitivity? *Cell Tissue Res. in Press.* (<https://doi.org/10.1007/s00441-018-2926-7>)

Mazzuoli-Weber, G., Schemann, M., 2015a. Mechanosensitive enteric neurons in the guinea pig gastric corpus. *Front. Cell. Neurosci.* 9

Mazzuoli-Weber, G., Schemann, M., 2015b. Mechanosensitivity in the enteric nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9

McRoberts, J.A., Coutinho, S.V., Marvizón, J.C.G., Grady, E.F., Tognetto, M., Sengupta, J.N., Ennes, H.S., Chaban, V.V., Amadesi, S., Creminon, C., Lanthorn, T., Geppetti, P., Bunnett, N.W., Mayer, E.A., 2001. Role of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats. *Gastroenterology* 120, 1737–1748

Meissner, G., 1857. Ueber die Nerven der Darmwand. *Z.Ration.Med.N.F.* 8, 364–366.

Michel, K., Michaelis, M., Mazzuoli, G., Mueller, K., Vanden Berghe, P., Schemann, M., 2011. Fast calcium and voltage-sensitive dye imaging in enteric neurones reveal calcium peaks associated with single action potential discharge. *J. Physiol.* 589, 5941–5947

Michelson, J.D., Hutchins, C., 1995. Mechanoreceptors in human ankle ligaments. *J. Bone Joint Surg. Br.* 77, 219–224

- Misra, C., Brickley, S.G., Farrant, M., Cull-Candy, S.G., 2000. Identification of subunits contributing to synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in Golgi cells of the rat cerebellum. *J. Physiol.* 524 Pt 1, 147–162
- Montell, C., 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2005, re3
- Narahashi, T., Moore, J.W., Scott, W.R., 1964. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.* 47, 965–974
- Neunlist, M., Peters, S., Schemann, M., 1999. Multisite optical recording of excitability in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 11, 393–402
- N’Gouemo, P., 2011. Targeting BK (big potassium) channels in epilepsy. *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 1283–1295
- North, R.A., 1973. The calcium-dependent slow after-hyperpolarization in myenteric plexus neurones with tetrodotoxin-resistant action potentials. *Br. J. Pharmacol.* 49, 709–711
- Nurgali, K., Stebbing, M.J., Furness, J.B., 2004. Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of enteric neurons in the mouse colon. *J. Comp. Neurol.* 468, 112–124
- Obaid, A.L., Koyano, T., Lindstrom, J., Sakai, T., Salzberg, B.M., 1999. Spatiotemporal patterns of activity in an intact mammalian network with single-cell resolution: optical studies of nicotinic activity in an enteric plexus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 3073–3093
- O’Neil, R.G., Heller, S., 2005. The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflügers Arch.* 451, 193–203
- Ostertag, D., Annahazi, A., Krueger, D., Michel, K., Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Zeller, F., Schemann, M., 2017. Tryptase potentiates enteric nerve activation by histamine and serotonin: Relevance for the effects of mucosal biopsy supernatants from irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol. Motil.* 29, e13070
- Page, A.J., Brierley, S.M., Martin, C.M., Hughes, P.A., Blackshaw, L.A., 2007. Acid sensing ion channels 2 and 3 are required for inhibition of visceral nociceptors by benzamil. *Pain* 133, 150–160

Pan, H., Gershon, M.D., 2000. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3295–3309

Randhawa, P.K., Jaggi, A.S., 2016. Gadolinium and ruthenium red attenuate remote hind limb preconditioning-induced cardioprotection: possible role of TRP and especially TRPV channels. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 389, 887–896

Roudaut, Y., Lonigro, A., Coste, B., Hao, J., Delmas, P., Crest, M., 2012. Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors. *Channels Austin Tex* 6, 234–245

Rugiero, F., Mistry, M., Sage, D., Black, J.A., Waxman, S.G., Crest, M., Clerc, N., Delmas, P., Gola, M., 2003. Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na⁺ current and NaV1.9 subunit in myenteric sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 2715–2725

Sanders, J.I., Kepecs, A., 2014. A low-cost programmable pulse generator for physiology and behavior. *Front. Neuroengineering* 7, 43

Schabadasch, A., 1930. Intramurale Nervengeflechte des Darmrohrs. *Z Für Zellforsch Mikrosk Anat* 10, 320–385

Schemann, M., Mazzuoli, G., 2010. Multifunctional mechanosensitive neurons in the enteric nervous system. *Auton. Neurosci.* 153, 21–25

Schemann, M., Michel, K., Peters, S., Bischoff, S.C., Neunlist, M., 2002. III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G919–G925

Schemann, M., Neunlist, M., 2004. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 55–59

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675

Schulzke, J.D., Riecken, E.O., Fromm, M., 1995. Distension-induced electrogenic Cl⁻ secretion is mediated via VIP-ergic neurons in rat rectal colon. *Am. J. Physiol.* 268, G725–731.

Sharkey, K.A., Lomax, A.E., Bertrand, P.P., Furness, J.B., 1998. Electrophysiology, shape, and chemistry of neurons that project from guinea pig colon to inferior mesenteric ganglia. *Gastroenterology* 115, 909–918

Shen, B., Wong, C.-O., Lau, O.-C., Woo, T., Bai, S., Huang, Y., Yao, X., 2015. Plasma membrane mechanical stress activates TRPC5 channels. *PLoS One* 10, e0122227

Shen, J.B., Jiang, B., Pappano, A.J., 2000. Comparison of L-type calcium channel blockade by nifedipine and/or cadmium in guinea pig ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 562–570

Sidhu, M., Cooke, H.J., 1995. Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am. J. Physiol.* 269, G346–351

Smith, T.K., Spencer, N.J., Hennig, G.W., Dickson, E.J., 2007. Recent advances in enteric neurobiology: mechanosensitive interneurons. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 19, 869–878

Song, M., Chen, D., Yu, S.P., 2014. The TRPC channel blocker SKF 96365 inhibits glioblastoma cell growth by enhancing reverse mode of the Na⁽⁺⁾ /Ca⁽²⁺⁾ exchanger and increasing intracellular Ca⁽²⁺⁾. *Br. J. Pharmacol.* 171, 3432–3447

Song, M.Y., Yuan, J.X.-J., 2010. Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 661, 99–108

Spencer, N.J., Hennig, G.W., Smith, T.K., 2003. Stretch-activated neuronal pathways to longitudinal and circular muscle in guinea pig distal colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284, G231–241

Spencer, N.J., Smith, T.K., 2004. Mechanosensory S-neurons rather than AH-neurons appear to generate a rhythmic motor pattern in guinea-pig distal colon. *J. Physiol.* 558, 577–596

Stach, W., 1989. A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. *Sing. MV Goebell H Eds Nerves Gastrointest. Tract* 29–45

Stach, W., 1985. Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinedünndarm. V. Typ V-Neurone. *Z Mikrosk-Anat Forsch* 99, 562–582

Stach, W., 1981. Zur neuronalen Organisation des Plexus myentericus (Auerbach) im Schweinedundarm II. Typ II-Neurone. *Z Mikrosk-Anat Forsch* 95, 161–182

Starodub, A.M., Wood, J.D., 2000. Histamine H2 Receptor Activated Chloride Conductance in Myenteric Neurons From Guinea Pig Small Intestine. *J. Neurophysiol.* 83, 1809–1816

Suchyna, T.M., Markin, V.S., Sachs, F., 2009. Biophysics and Structure of the Patch and the Gigaseal. *Biophys. J.* 97, 738–747

Suzuki, M., Morita, T., Iwamoto, T., 2006. Diversity of Cl⁻ Channels. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 12–24

Syeda, R., Xu, J., Dubin, A.E., Coste, B., Mathur, J., Huynh, T., Matzen, J., Lao, J., Tully, D.C., Engels, I.H., Petrassi, H.M., Schumacher, A.M., Montal, M., Bandell, M., Patapoutian, A., 2015. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *eLife* 4

Szurszewski, J.H., Ermilov, L.G., Miller, S.M., 2002. Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* 51, i6–i10

Tassicker, B.C., Hennig, G.W., Costa, M., Brookes, S.J., 1999. Rapid anterograde and retrograde tracing from mesenteric nerve trunks to the guinea-pig small intestine in vitro. *Cell Tissue Res.* 295, 437–452.

Thevenaz, P., Ruttimann, U.E., Unser, M., 1998. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process.* 7, 27–41

Tipler, P.A., Mosca, G., Basler, M., 2012. Physik: für Wissenschaftler und Ingenieure ; 6. dt. Aufl., korr. Nachdr. ed, Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin

Trendelenburg, P., 1917. Physiological and pharmacological investigations of small intestinal peristalsis. Translation of the article “Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik”, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 81, 55-129, 1917. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 373, 101–133

Waldmann, R., Lazdunski, M., 1998. H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 418–424

Wang, J., Xu, Y.-Q., Liang, Y.-Y., Gongora, R., Warnock, D.G., Ma, H.-P., 2007. An intermediate-conductance Ca(2+)-activated K (+) channel mediates B lymphoma cell cycle progression induced by serum. *Pflugers Arch.* 454, 945–956

Weber, E., Neunlist, M., Schemann, M., Frieling, T., 2001. Neural components of distension-evoked secretory responses in the guinea-pig distal colon. *J. Physiol.* 536, 741–751

Wei, A.D., 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 463–472

White, C.R., Frangos, J.A., 2007. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 1459–1467

Wood, J.D., 1981. Intrinsic neural control of intestinal motility. *Annu. Rev. Physiol.* 43, 33–51

Yoshida, S., 1994. Tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14, 227–244

Zhao, Y., Boulant, J.A., 2005. Temperature effects on neuronal membrane potentials and inward currents in rat hypothalamic tissue slices: Thermal effects on neuronal membrane potential and current. *J. Physiol.* 564, 245–257

Zheng, J., 2013. Molecular mechanism of TRP channels. *Compr. Physiol.* 3, 221–242

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Darmwand. © Simon Brooks	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Resultierenden Kraft	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Zug-, Druck- sowie Schwere Spannung.....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung von Dehnung und Kompression	12
Abbildung 5: Mechanismus eines mechanisch gesteuerten Ionenkanals (Beispiel: Druck)	15
Abbildung 6: Versuchsaufbau des Imaging-Setups	25
Abbildung 7: Di-8-ANEPPS Molekülstruktur.....	26
Abbildung 8: Ganglien gefärbt mit spannungssensitivem Farbstoff (Di-8-ANEPPS)	27
Abbildung 9: Trace eines schnellen EPSPs.....	28
Abbildung 10: Protokoll mechanische Stimulation	29
Abbildung 11: Deformation eines submukösen Ganglions während der intraganglionären Injektion	30
Abbildung 12: Skizze eines Ganglions während der intraganglionären Injektion.....	30
Abbildung 13: Deformation eines submukösen Ganglions während der Dehnung.....	31
Abbildung 14: Skizze eines Ganglions während der Dehnung	32
Abbildung 15: Versuchsprotokoll Pharmakologie	33
Abbildung 16: Auswertung Einfluss auf spontan aktive Neurone nach mechanischer Stimulation	40
Abbildung 17: Beispiel: Antworten submuköser Neurone auf intraganglionäre Krebslösung-Injektion..	41
Abbildung 18: Reproduzierbarkeitstest für die intraganglionäre Krebslösung-Injektionstechnik.....	43
Abbildung 19: Beispiele für Injektionen mit unterschiedlichem Injektionsdruck	44
Abbildung 20: Unterschiedlicher Injektionsdruck	45
Abbildung 21: Beispiele für Injektionen mit unterschiedlicher Injektionsdauer	46
Abbildung 22: Unterschiedliche Injektionsdauer	47
Abbildung 23: Beispiel: Antworten submuköser Neurone auf Dehnungsstimulus.....	48
Abbildung 24: Reproduzierbarkeit-Test für den Dehnungsstimulus.....	49
Abbildung 25: Korrelation Dehnung und Aktionspotential Frequenz	50
Abbildung 26: Prozentuale Neuron-Flächenänderung beider Stimuli	51
Abbildung 27: Prozentuale Ganglion-Flächenänderung beider Stimuli	52
Abbildung 28: Beispiele - Flächenänderung pro Aufnahmedauer	53
Abbildung 29: Deformationsgeschwindigkeit beider Stimuli.....	54
Abbildung 30: Auswertung der Substanz Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate (SMP).....	58
Abbildung 31: Auswertung der Substanz SKF-96365	60
Abbildung 32: Auswertung der Substanz TTX	62
Abbildung 33: Auswertung der Substanz ω -Conotoxin GVIA.....	63
Abbildung 34: Auswertung der Substanz APETx2	65

Abbildung 35: Auswertung der Substanz Gadolinium(III)-chlorid-hexahydrate (MP)	67
Abbildung 36: Auswertung der Substanz HC-067047	69
Abbildung 37: Auswertung der Substanz KB-R7943.....	71
Abbildung 38: Auswertung der Substanz Nifluminsäure	73
Abbildung 39: Auswertung der Substanz TRAM-34	75
Abbildung 40: Myenterisches Ganglion mit MEN und Piezo-1 positiven Zellen.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterschiedliche Typen von Nervenzellen im ENS des Meerschweinchendünndarms	10
Tabelle 2: Präparationskrebslösung	20
Tabelle 3: Versuchskrebslösung	20
Tabelle 4: 4 % Paraformaldehyd „Fix“ - Lösung	20
Tabelle 5: Phosphatpuffer (0,1 M)	21
Tabelle 6: Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).....	21
Tabelle 7: PBS/ NaN_3 Puffer	21
Tabelle 8: Blockingserum.....	21
Tabelle 9: Eindeckmedium	21
Tabelle 10: Zusammenfassung der getesteten Substanzen	36
Tabelle 11: Filter des Mikroskops Olympus BX61WI.....	37
Tabelle 12: Liste der verwendeten Antikörper für Immunhistochemie.....	37
Tabelle 13 Vergleich Kompression und Dehnung	55

Anhang

Berechnung des maximalen Injektionsvolumens im SMP

In dieser Messreihe wurde das maximale Volumen gemessen, dass in ein submuköses Ganglion injiziert wurde. Für eine genauere Messung wurden 50 Injektionen mit 600 ms Injektionsdauer pro Ganglion durchgeführt. Der innere Durchmesser der Pipette betrug 0,58 mm, also Radius $r = 0,29$ mm. Das Volumen berechnete sich wie folgt:

$$V = (\pi r^2 l)/50$$

Gemessene Länge l [mm]	Volumen [nl/Injektion]	Volumen [nl/s]
12,5	66,1	110,1
6,8	35,9	59,9
11,6	61,3	102,2
11,1	58,7	97,8
10,1	53,4	89,0
7,4	39,1	65,2
8,8	46,5	77,5
11,0	58,1	96,9
11,4	60,2	100,4
10,8	57,1	95,1

Manuelle Messung der Dehnungslänge von MEN im SMP

Präp ID	Ganglion	Zelle	Länge [μm]
20170720	1	3	8,7
20170720	3	1	5,1
20170725	1	6	10,9
20170725	1	7	11,8
20170725	3	1	10,4
20170801	2	5	9,4
20170801	5	7	11,1
20180424	1	10	5,1
20180424	1	13	9,6
20180424	1	15	5,9
20180306	3	8	7,4
20180314	1	3	7,1
20180314	2	4	12,7
20180314	6	2	5,1
20180314	6	10	9,4
20180315	2	6	3,8
20180315	3	7	12,9
20180315	3	8	8,3
20180320	2	3	16,4
20180320	2	8	17,4
20180320	5	3	7,9

Manuelle Flächenmessung bei Dehnung von MEN im SMP

Präp ID	Ga.	Zelle	Messung 1 [%]		Messung 2 [%]		Messung 3 [%]		Durchschnitt [%]	
			0	Max	0	Max	0	Max	0	Max
20170720	1	3	100	114,28	100	101,85	100	108,00	100	107,84
20170725	1	6	100	102,32	100	110,75	100	105,36	100	106,10
20170725	1	7	100	102,82	100	112,59	100	108,63	100	107,94
20170725	3	1	100	102,63	100	111,11	100	111,22	100	108,09
20170801	2	5	100	116,00	100	120,76	100	112,24	100	116,45
20170801	5	7	100	104,44	100	119,44	100	130,56	100	117,65
20180424	1	10	100	128,57	100	107,69	100	126,67	100	121,43
20180424	1	13	100	106,25	100	103,89	100	105,00	100	105,07
20180306	3	8	100	121,59	100	115,39	100	115,39	100	117,23
20180314	2	4	100	147,22	100	121,43	100	105,56	100	123,58
20180315	2	6	100	133,33	100	118,15	100	106,67	100	118,41
20180315	3	8	100	126,81	100	122,68	100	108,33	100	118,84
20180315	5	2	100	140,55	100	116,67	100	105,26	100	119,39
20180315	5	19	100	127,22	100	126,32	100	104,15	100	118,91
20180320	2	8	100	117,65	100	126,67	100	100,00	100	114,00

Manuelle Flächenmessung bei Kompression von MEN im SMP

Präp ID	Ga.	Zelle	Messung 1 [%]		Messung 2 [%]		Messung 3 [%]		Durchschnitt [%]	
			0	Max	0	Max	0	Max	0	Max
20160602	1	6	100	84,44	100	87,50	100	89,80	100	87,32
20160608	1	7	100	91,89	100	65,74	100	84,37	100	79,20
20160608	1	11	100	75,00	100	93,94	100	90,38	100	85,81
20170627	1	1	100	68,66	100	81,48	100	78,48	100	76,04
20170627	1	19	100	88,57	100	76,72	100	70,59	100	78,65
20170706	2	4	100	79,76	100	76,53	100	95,83	100	83,63
20180116	1	6	100	94,34	100	75,00	100	86,27	100	85,00
20180116	1	12	100	96,67	100	95,03	100	88,12	100	93,17
20180116	2	1	100	70,93	100	92,16	100	76,35	100	80,40
20180117	3	1	100	83,33	100	92,86	100	89,66	100	93,65
20180117	3	2	100	73,91	100	76,06	100	91,57	100	80,49
20180117	2	9	100	67,24	100	96,30	100	92,98	100	85,21
20180117	2	1	100	57,14	100	79,17	100	70,83	100	68,42
20180207	3	1	100	76,56	100	69,84	100	60,29	100	68,72

Geschwindigkeitsberechnung bei Dehnung von MEN im SMP

Präp ID	Ga.	Ze	Messung 1		Messung 2		Messung 3		Durchschnitt		Δ [μm^2]	Zeit [s]	v [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
			0	Max	0	Max	0	Max	0	Max			
20170720	1	3	252	288	278	283	257	278	262	283	21	0,578	35,61
20170725	1	6	396	405	386	427	401	423	395	419	24	1,13	21,30
20170725	1	7	731	751	699	787	715	777	715	772	57	1,11	51,16
20170725	3	1	196	201	185	206	162	180	181	196	15	0,87	16,82
20170801	2	5	257	298	273	329	252	283	261	304	43	0,8	53,60
20170801	5	7	232	242	185	221	211	275	209	246	37	1,08	34,20
20180424	1	10	643	827	597	643	689	873	643	781	138	0,58	237,60
20180424	1	13	735	781	689	716	919	965	781	820	40	0,58	68,20
20180306	3	8	505	614	597	689	597	689	567	664	98	1,35	72,31
20180314	2	4	689	1014	643	781	827	873	720	889	170	0,87	195,06
20180315	2	6	551	735	505	597	689	735	582	689	107	1,01	106,09
20180315	3	8	1057	1340	827	1014	1102	1194	995	1183	188	1,01	185,71
20180315	5	2	689	968	827	965	873	919	796	951	154	1,08	142,96
20180315	5	19	689	877	873	1102	827	861	796	947	151	1,08	139,38
20180320	2	8	781	919	689	873	827	827	766	873	107	1,09	98,34

Geschwindigkeitsberechnung bei Kompression von MEN im SMP

Präp ID	Ga.	Ze	Messung 1		Messung 2		Messung 3		Durchschnitt		Δ [μm^2]	Zeit [s]	v [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
			0	Max	0	Max	0	Max	0	Max			
20160602	1	6	269	227	287	251	293	263	283	247	36	0,62	57,89
20160608	1	7	221	203	282	185	191	162	232	183	48	0,615	78,31
20160608	1	11	239	179	197	185	215	195	217	187	31	0,595	51,82
20170627	1	1	514	353	485	395	473	371	490	373	117	0,65	180,76
20170627	1	19	209	185	227	174	203	144	213	168	46	0,784	58,11
20170706	2	4	502	401	467	357	431	413	467	390	76	0,568	134,49
20180116	1	6	317	299	335	251	305	263	319	271	48	0,88	54,38
20180116	1	12	179	173	187	178	194	171	187	174	13	0,87	14,66
20180117	3	1	395	329	419	389	347	311	387	343	44	0,57	76,96
20180117	3	2	550	407	425	323	496	455	491	395	96	0,618	154,87
20180207	3	1	383	293	377	263	407	245	389	267	122	0,565	215,27

Digitaler Anhang

Ordner: Blocker (je drei Dateien: Graph, Rohdaten, Statistische Analyse)

MP APETx2	MP Gadolinium	MP HC067047
MP KB-R7943	MP Nifluminsäure	MP TRAM-34
SMP Conotoxin	SMP Gadolinium	SMP SKF96365
SMP TTX		

Ordner: SMP GS Flächenberechnung Neuron Bilder

Ordner: SMP KI Flächenberechnung Neuron Bilder

!Thesis.pdf
!Thesis.docx
!Figures.pptx
Durchmesser Pipette Rohdaten
MP Blocker Gesamt Zusammenfassung
MP KI Piezo Immunhistochemie
SMP Beispiele - Flächenänderung pro Aufnahmedauer
SMP Blocker Gesamt Zusammenfassung
SMP Flächenänderung Ganglion (Graph, Rohdaten, Statistische Analyse)
SMP Flächenänderung Neuron (Graph, Rohdaten, Statistische Analyse)
SMP Deformationsgeschwindigkeit (Rohdaten, Statistische Analyse)
SMP Deformationsgeschwindigkeit Vergleich KI vs GS (Graph, Statistische Analyse)
SMP GS Gesamt
SMP GS Korrelation Stimulusstärke - AP Frequenz (Graph, Rohdaten, Statistische Analyse)
SMP GS Reproduzierbarkeit Graph
SMP GS Reproduzierbarkeit Statistische Analyse
SMP KI Gesamt
SMP KI Reproduzierbarkeit (Graph, Rohdaten, Statistische Analyse)
SMP KI Spontan Aktiv (Graph, Rohdaten, Statistische Analyse)
SMP KI Unterschiedliche Druckapplikation (Graph, Rohdaten, Statistische Analyse)
SMP KI Unterschiedliche Spritzdauer (Graph, Rohdaten, Statistische Analyse)
SMP Paired KI vs GS Rohdaten
SMP Paired Vergleich GS-GSBeide und KI - KIBeide Statistische Analyse

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Schemann dafür bedanken, dass ich am Lehrstuhl Humanbiologie promovieren durfte. Er gab mir immer konstruktive Kritik und jede Menge hilfreicher Ideen. Zusätzlich ermöglichte er mir die Teilnahme an vielen nationalen und internationalen Kongressen.

Prof. Dr. Gemma Mazzuoli-Weber danke ich, dass sie mich in diesen vier Jahren so herzlich betreut hat. Ich danke ihr, dass sie trotz Elternzeit und dem Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe an einer Hochschule in einem anderen Bundesland immer erreichbar und hilfsbereit war. Liebe Gemma, ich wünsche dir, dem Felix und euren beiden Töchtern alles Liebe und Gute für die Zukunft.

Ganz besonders möchte ich auch Dr. Klaus Michel danken. Klaus, du musstest nur in den Raum kommen und fast alle Probleme lösten sich in Luft auf. Du warst immer hilfsbereit und hattest jede Menge Geduld, egal wann und wofür ich deine Hilfe brauchte.

Unseren technischen Assistenten Birgit Kuch und Marlene Redl danke ich für die Arbeit, die sie im Labor übernommen haben. Ohne euch würde der Laden doch gar nicht laufen.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Die Espressopausen oder die Fußballdebatten, keine Angst, Herr Schemann, auch der FC wird wiederkommen, werden mir fehlen. Die Zeit am Lehrstuhl Humanbiologie wird immer ein wichtiger Abschnitt meines Lebens bleiben, auf den ich gerne zurückblicke.

Mein abschließender und herzlichster Dank geht aber an meine Frau Stefanie. Der schönste Moment während meiner Doktorarbeit war sicherlich unsere Hochzeit. Außerdem hat sie immer an mich geglaubt und in schwierigen Zeiten zu mir gehalten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 26.11.1984
Geburtsort Dachau, Deutschland
Nationalität Deutsch
Familienstand Verheiratet

Berufserfahrung

seit 06/2014 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, Technische Universität München, Lehrstuhl für Humanbiologie, Freising, **Ziel: Promotion**

01/2013 – 06/2014 **Nebenberuflicher Mitarbeiter**, Technische Universität München, Lehrstuhl für Zoologie, Freising, BTA Tätigkeiten

10/2013 – 01/2014 **Studentische Hilfskraft**, Technische Universität München, Lehrstuhl für Zoologie, Freising, BTA Tätigkeiten

08/2010 – 09/2010 **Studentische Hilfskraft**, Technische Universität München, Lehrstuhl für Genetik, Freising, Betreuung von Studenten

Ausbildung

10/2011 – 11/2013 **Master of Science (Biologie)**, Technische Universität München, Abschluss: 1,6
Thema der Masterarbeit: Single qPCR Expressionsprofile von ausgewählten Genen bei pathogen beeinflussten Bachforellen (Note: 1,3)

10/2008 – 10/2011 **Bachelor of Science (Biologie)**, Technische Universität München, Abschluss: 2,1
Thema der Bachelorarbeit: Immunhistochemische Untersuchung zum Vorkommen des TRPV1 Rezeptors in den verschiedenen Schichten der humanen Colonwand (Note: 1,3)

09/2006 – 09/2008 Bachelor of Science (Geowissenschaften), Technische Universität München

09/1995 – 05/2005 **Allgemeine Hochschulreife**, Gymnasium Carl-Orff, Unterschleißheim, Abschluss: 2,3, Leistungskurse: Biologie, Mathematik

Zivildienst

05/2005 – 01/2006 **Wehrersatzdienst**, Sehbehinderten- und Blinden-Zentrum Südbayern, Unterschleißheim

Publikationen

van Wanrooij, S.J.M.; Wouters, M.M.; van Oudenhove, L.; Vanbrabant, W.; Mondelaers, S.; Kollmann, P.; **Kreutz, F.**; Schemann, M.; Boeckstaens, G.: Sensitivity testing in Irritable Bowel Syndrome with rectal capsaicin stimulations: role of TRPV1 upregulation and sensitization in visceral hypersensitivity? *The American Journal of Gastroenterology*, 2013
doi: 10.1038/ajg.2013.371

Mazzuoli-Weber, G.; Kugler, E.M.; Bühler, C.I.; **Kreutz, F.**; Demir, I.E.; Ceyhan, G.O.; Zeller, F.; Schemann, M.: Piezo proteins: incidence and abundance in the enteric nervous system. Is there a link with mechanosensitivity? *Cell Tissue Res.*, 2018 (in Press)
doi.org/10.1007/s00441-018-2926-7

Abstracts

Kreutz, F.; Schemann, M. und Mazzuoli-Weber, G.: Submucous plexus neurons are mechanosensitive. *Neurogastroenterology and motility* 29, Issue S2, 2017
doi: 10.1111/nmo.13179

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel: „Eigenschaften mechanosensitiver Neurone des myenterischen und submukösen Plexus nach Deformation“ am Lehrstuhl für Humanbiologie unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Michael Schemann ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß §6 Absatz 6 und §7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt. Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt. Die vollständige Dissertation wurde noch nicht veröffentlicht. Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentliche zugängliche Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von §28 (Nichtigkeit der Promotion) und §29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst. Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei der Technischen Universität München bin ich einverstanden.

Freising, den 10.10.2018

Florian Kreuz