

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar

Interstitielle Zellen von Cajal vermitteln exzitatorische und nitrerge inhibitorische Neurotransmission im Gastrointestinaltrakt

Sabine Elisabeth Klein

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Prof. Dr. Radu Roland Rad
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. Dieter K. M. Saur
	2. Prof. Dr. Michael Schemann

Die Dissertation wurde am 02.05.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.08.2017 angenommen.

Zusammenfassung

Exzitatorische und inhibitorische Neuronen des enterischen Nervensystems kontrollieren die Motilität des Magen-Darms-Trakts und damit die Kontraktionen und Relaxationen der glatten Muskelzellen ebenso wie die gastrointestinale Motoraktivität. Bisher ist allerdings wenig über die genauen zellulären Mechanismen bekannt, mittels derer die neuronalen Signale zur Steuerung der glatten Muskelzellen übertragen werden. In dieser Arbeit wird ein neues Mausmodel vorgestellt, mit dessen Hilfe eine bestimmte Zellart untersucht werden kann, die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC). ICC sind bekannt als die Schrittmacherzellen des Gastrointestinaltrakts, da sie spontane elektrische Depolarisationswellen, sogenannte *slow waves*, und somit die rhythmischen Kontraktionen der gastrointestinalen Muskulatur generieren. Ihre Rolle in der Neurotransmission ist aber sehr umstritten. Bisher waren Untersuchungen diesbezüglich auch limitiert. Es existierten keine geeigneten Tiermodelle, mit deren Hilfe man ICC spezifisch im adulten Tier auf genetischer Ebene beeinflussen und somit gezielt deren Rolle untersuchen hätte können.

Das in der Arbeitsgruppe generierte *c-Kit^{CreERT2}* Allel, ein *knock-in* in den endogenen c-Kit Lokus, ermöglicht erstmals eine zelltyp- und zeitspezifische Aktivierung oder Inaktivierung von Genen in den c-Kit-positiven Cajalzellen. Unter Verwendung dieses Modells wurde mittels *loss-of-function* Studien die Rolle der ICC in der exzitatorischen und nitrergen inhibitorischen Neurotransmission *in vivo* in adulten Versuchstieren analysiert.

Durch konditionale Expression eines Diphtherietoxin A Allels spezifisch in den Cajalzellen wurde das ICC-Netzwerk depletiert. Infolgedessen zeigten die Tiere eine gravierend beeinträchtigte gastrointestinale Motilität. Diese manifestierte sich *in vivo* in einer stark verzögerten gastrointestinalen Transitzeit, ausgelöst durch dysrhythmische Kontraktionen der Muskulatur und dem Verlust der elektrischen Aktivität (*slow waves*). Zudem konnte anhand einer ICC-spezifischen Deletion der cGMP-abhängigen Proteinkinase (*Prkg1*), ein zentrales Enzym in der NO-abhängigen inhibitorischen Signalweiterleitung, nachgewiesen werden, dass ICC auch in der nitrergen Neurotransmission eine essentielle Rolle spielen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die interstitiellen Zellen von Cajal neben der Vermittlung der *slow wave* Aktivität auch für die Transmission von exzitatorischen und nitrergen inhibitorischen Signalen der enterischen Neuronen zu den gastrointestinalen Muskelzellen essentiell sind um die Peristaltik des Darms abzustimmen. Diese Studie weist daher erstmals auf genetischer Ebene nach, dass eine Beeinträchtigung der Funktion dieser Zellen zu motorischen Funktionsstörungen des Magen-Darm-Trakts führt. Dies legt den Schluss nahe, dass mit Veränderungen des ICC-Netzwerks assoziierte Krankheitsbilder nicht nur auf den

Verlust der *slow wave* Aktivität sondern auch auf die beeinträchtigte Neurotransmission zurückzuführen sind.

Summary

The enteric nervous system contains excitatory and inhibitory neurons, which control contraction and relaxation of smooth muscle cells as well as gastrointestinal (GI) motor activity. Little is known about the exact cellular mechanisms of neuronal signal transduction to smooth muscle cells in the gut. Here a new mouse model is used to analyze a distinct population of cells in the GI tract, called interstitial cells of Cajal (ICC). ICC are known to act as pacemaker in the gastrointestinal tract by generating spontaneously waves of depolarization, the so called slow waves, which induce rhythmic contractions of the smooth musculature. However, their role in excitatory and inhibitory neurotransmission is highly controversial and hampered by the lack of genetically defined models enabling time-specific targeting of ICC in adult animals.

To analyse ICC function in adult mice *in vivo*, the newly generated *c-Kit^{CreERT2}* knock-in allele at the endogenous c-Kit locus was used. This mouse line enables for the first time genetic manipulation of ICC at defined time points during development and in adults *in vivo*. With the help of this novel model, we analyzed the specific role of ICC in enteric excitatory and inhibitory neurotransmission by genetic loss of function studies.

We crossed *c-Kit^{CreERT2/+}* mice with conditional *LSL-R26^{DTA/+}* animals, which carry a latent diphtheria toxin A (DTA) expression cassette, to deplete ICC. This leads to a disruption of the network of ICC in healthy animals and results in a severely disturbed GI motility with significantly increased GI transit time. The disturbed motility is caused by dysrhythmic spontaneous phasic myogenic contractions and lack of slow-wave type electrical activity in circular small intestinal smooth muscle cells. Furthermore, deletion of *cGMP-dependent protein kinase I* (*Prkg1*), a central mediator of the non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmission, in ICC showed, that the role of ICC in nitrergic neurotransmission is essential as well.

Thus ICC are essential for transmission of signals from enteric neurons to gastrointestinal smooth muscle cells and therefore integrate excitatory and inhibitory neurotransmission with slow-wave activity to orchestrate peristaltic motor activity of the gut. Impairment of the function of interstitial cells of Cajal causes severe gastrointestinal motor disorders. The results of our study show at genetic level that these disorders are not only due to loss of slow-wave activity but also due to disturbed neurotransmission.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfa	assung	
Summary		V
Inhaltsverzei	chnis	. VI
Abkürzungsv	erzeichnis	. IX
Abbildungsve	erzeichnis	XIII
Tabellenverz	eichnis	XIV
1 Einleitur	ng	1
1.1 Die	gastrointestinale Motilität	1
1.2 Reg	elung der Motilität über enterisches Nervensystem und interstitielle Zellen	3
1.2.1	Enterisches Nervensystem (ENS)	3
1.2.2	Die NO-vermittelte inhibitorische NANC Neurotransmission	4
1.2.3	Klassisches und neues Konzept der Motilitätssteuerung	5
1.3 Inte	rstitielle Zellen von Cajal (ICC)	7
1.3.1	ICC exprimieren <i>c-Kit</i>	9
1.3.2	Vorhandene Tiermodelle zur Untersuchung der ICC	.10
1.4 Das	Tamoxifen-induzierbare Cre ^{ERT2/} loxP System	.12
1.5 Fra	gestellung	.13
2 Material	und Methoden	.15
2.1 Mat	erial	. 15
2.2 Ver	suchstiere	.21
2.2.1	Haltung & Ethikkommission	.21
2.2.2	Mauslinien	.21
2.2.3	Genotypisierung der Versuchstiere	.24
2.2.4	Tamoxifenbehandlung der Tiere	.26
2.2.5	Organentnahme	.27
2.3 Imn	nunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie	.28
2.3.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	.28

Inhaltsverzeichnis

	2.3.	2	Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten	.28
	2.3.	3	Bestimmung der Rekombinationseffizienz mittels Immunfluoreszenz	.29
	2.3.	4	Immunfluoreszenz an Whole Mount Präparaten des Darms	.30
	2.3.	5	Immunfluoreszenz an Whole Mount Präparaten der Haut	.31
	2.4	Gas	strointestinale Motilität <i>in vivo</i>	.31
	2.4.	1	Bestimmung der Gesamttransitzeit mit Karminrot	.31
	2.4.	2	Messung der Magenentleerung und des Dünndarmtransits	.32
	2.4.	3	Messung der Colontransitzeit, Colonexpulsionstest	.33
	2.5	Mes	ssung der Muskelkontraktionen <i>ex vivo</i> im Organbad	.33
	2.6	Elel	ktrophysiologe – intrazelluläre Ableitungen	.35
	2.7	Bes	trahlung und Knochenmarktransplantation	.37
	2.8	Sta	tistik	.37
3	Erg	ebni	SSE	.38
	3.1	Zeit	spezifische genetische Manipulation von ICC in adulten Mäusen	.38
	3.2	ICC	Depletionsmodell <i>c-Kit^{CreERT2/+};</i> R26 ^{DTA/+}	.40
	3.3	Aku	te Depletion der ICC beeinträchtigt die gastrointestinale Motilität	.42
	3.4	Effe	ektive Depletion von Mastzellen <i>in vivo</i>	.43
	3.5 dysrhy	Dep ythm	bletion der ICC führt zu einem Verlust der <i>slow wave</i> -Aktivität im Ileum und ischen Muskelkontraktionen	.43
	3.6	Dep	pletion der ICC führt zu einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials	.46
	3.7	Dep	pletion der ICC blockiert die exzitatorische Neurotransmission	.47
	3.8	ICC	-Depletion hat keine Auswirkung auf PDGFR α^+ interstitielle Zellen	.48
	3.9	Del	etion von Prkg1 in ICC beeinträchtigt die gastrointestinale Motilität	.50
	3.10	ICC	s-spezifische Deletion von Prkg1 blockiert die inhibitorische Neurotransmissior	า51
4	Disl	kussi	ion	.54
	4.1	Die	<i>c-Kit^{CreERT2/+}</i> -Maus als Modell zur Manipulation der ICC in adulten Tieren	.55
	4.1.	1	Zweckmäßigkeit und Effizienz des <i>c-Kit^{CreERT2/+}</i> Modells	.55
	4.1.	2	c-Kit-positive Mastzellen in der GI-Motilität und im Mausmodell	.58
	4.1.	3	Weitere Zelltypen weisen <i>c-Kit</i> Expression auf	.59

	4.1.	4	Limitation des <i>c-Kit^{CreERT2/+}</i> Modells: Alle ICC-Subpopulationen exprimieren c- 59	Kit
4	1.2	ICC	spielen eine essentielle Rolle in der enterischen Neurotransmission	60
	4.2. Neu	1 urotra	Rolle der ICC bei der Vermittlung von <i>slow wave</i> Aktivität und exzitatorischer Insmission	61
	4.2.	2	ICC in der NO-abhängigen inhibitorischen Neurotransmission	64
2	4.3	Wei	tere Spieler in der gastrointestinalen Neurotransmission	65
2	1.4	Aus	blick	67
5	Lite	ratur	verzeichnis	70
6	Eig	ene \	/eröffentlichungen	82
7	Dar	nksag	jung	84

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μI	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
A	Adenin
Ach	Acetylcholin
ad.	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
Ano1	Anoctamin 1
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
С	Cytosin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophoshpat
c-Kit	Kit-Protoonkogenrezeptortyrosinkinase
cm	Zentimeter
Cre	Cre-Rekombinase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleotidsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTA	Diphtherietoxin A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green flourescent protein, Fluoreszenzprotein
EJP	exzitatorisches Junktionspotential
ENS	enterisches Nervensystem
ER	Östrogenrezeptor
ER^{T2}	mutierter Östrogenrezeptor
ESF	elektrische Feldstimulation

Ex	Exon
f/f	lox/lox; homozygot gefloxt
FCS	Fötales Kälberserum
fIJP	schnelle (fast) Komponente des inhibitorischen Junktionspotentials
G	Guanin
GI	gastrointestinal
Gy	Gray
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HSP90	Hitzeschockprotein 90
Hz	Hertz
i.p.	intra peritoneal
ICC	interstitielle Zellen von Cajal
ICC-DMP	interstitielle Zellen von Cajal, deep muscular plexus (Dünndarm)
ICC-IM	intramuskuläre interstitielle Zellen von Cajal
ICC-MY	interstitielle Zellen von Cajal am myenterischen Plexus
ICC-SMP	interstitielle Zellen von Cajal am submukosalen Plexus (Dickdarm)
ICG	Indocyaningrün
IF	Immunfluoreszenz
IJP	inhibitorisches Junktionspotential
КО	knock out
I	Liter
L-NNA	L-NG-nitroarginin
lox/lox	gefloxt, beinhaltet <i>lox</i> P Sequenzen
<i>lox</i> P	loxP Sequenz, Bindestelle für Cre-Rekombinase
LP	lower primer
LSL	loxP-Stop-loxP
LSM	Laserscanningmikroskop
Μ	Mol
MeV	Megaelektronenvolt
mG	membrangebundenes EGFP

mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMF	Midazolam, Medetomidin, Fentanyl; Narkose- und Schmerzmittel
mN	Millinewton
ms	Millisekunde
mT	membrangebundenes tdTomato
mut	mutiert
mV	Millivolt
NANC	nicht-adrenerg nicht-cholinerg
ng	Nanogramm
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxydsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
p.o.	per oral
PBS	phoshpatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehydlösung
PKG1	cGMP-abhängige Proteinkinase 1 (Protein)
pmol	Picomol
Prkg1	cGMP-abhängige Proteinkinase 1 (Gen)
R26	Rosa26 Lokus
Rek.	Rekombination / rekombiniert
RMP	Ruhemembranpotential
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
Sek	Sekunde
SEM	standard error of the mean
sGC	lösliche Guanlyzyklase

sIJP	langsame (slow) Komponente des inhibitorischen Junktionspotentials	
т	Thymin	
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	
ТАМ	Tamoxifen	
tdTomato	tandemdimer Tomato, Fluoreszenzprotein	
TE	TRIS-EDTA-Puffer	
UP	upper primer	
UV	ultraviolet	
V	Volt	
VIP	Vasoaktives Intestinalpeptid	
W	white spotting Lokus	
WT	Wildtyp	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Darmwand	2
Abbildung 1.2: Der NO-vermittelte Signalweg	5
Abbildung 1.3: Innervation des Darms – klassisches und neues Konzept	6
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der wichtigsten ICC-Subpopulationen	8
Abbildung 1.5: Nachweis von ICC mittels c-Kit-Färbung	10
Abbildung 1.6: Das Cre ^{ERT2} -System	13
Abbildung 2.1: Targetingschema und Genkonstrukt des <i>c-Kit</i> Lokus	21
Abbildung 2.2: Pigmentierungsphänotyp der <i>c-Kit^{CreERT2/+}</i> Maus	22
Abbildung 2.3: Gefloxte Mauslinien - Schematische Darstellung der Konstrukte	23
Abbildung 2.4: Zeitschema der Tamoxifenbehandlung und Gesamttransitzeitmessung	32
Abbildung 2.5: Aufbau des vertikalen Organbads	34
Abbildung 2.6: Auswertungsschema der Reaktion des Colons nach elektrischer Feldstimulation im Organbad	34
Abbildung 2.7: Aufbau der Messapparatur für die Elektrophysiologie	36
Abbildung 3.1: Gewichtsverlust der Versuchstiere bei Tamoxifenbehandlung	38
Abbildung 3.2: Zeitspezifische genetische Manipulation von ICC	39
Abbildung 3.3: Rekombinationseffizienz der <i>c-Kit^{CreERT2/+};R26^{mT-mG/+}</i> Maus	40
Abbildung 3.4: <i>c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}</i> : Depletion der ICC	41
Abbildung 3.5: Depletion der ICC führt zu Störung der Motilität	42
Abbildung 3.6: <i>c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}</i> : Depletion der Mastzellen	44
Abbildung 3.7: ICC vermitteln <i>slow wave</i> Aktivität im Dünndarm	45
Abbildung 3.8: Elektrophysiologische Aktivität im Dünn- und Dickdarm	46
Abbildung 3.9: Verlust der exzitatorischen Neurotansmission bei Tieren mit ICC-Depletion	n.48
Abbildung 3.10: ICC-Depletion hat keine Auswirkung auf PDGFR α^{+} Zellen	49
Abbildung 3.11: Expression von cGMP-abhängiger Proteinkinase 1 (Prkg1) im Colon	50
Abbildung 3.12: Deletion von <i>Prkg1</i> in ICC des Darms verursacht eine Verzögerung des Transits	GI- 52

Abbildung 3.13: ICC vermitteln die	NO-abhängige inhibitorische Neurotransmission	53
Abbildung 4.1: Innervation des Dar	ms – Konzept des SIP-Synzytiums	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Technische Ausstattung	15
Tabelle 2.2: Materialien	16
Tabelle 2.3: Chemikalien	17
Tabelle 2.4: Gebrauchslösungen	18
Tabelle 2.5: Antikörper und Färbechemikalien für Fluoreszenzfärbungen	19
Tabelle 2.6: Genotypisierungesprimer	20
Tabelle 2.7: Software	20
Tabelle 2.8: Primermengen	25
Tabelle 2.9: PCR-Bedingungen	26
Tabelle 2.10: Annealingtemperaturen und Größen der PCR-Produkte	26

1 Einleitung

1.1 Die gastrointestinale Motilität

Eine wichtige Funktion des Gastrointestinal- (GI) Trakts besteht darin, feste und flüssige Nahrung sowie deren Abfallprodukte zu durchmischen und zu transportieren. Dies geschieht mittels lokal synchronisierter peristialtischer Bewegungsmuster der Muskulatur. Die aktive Bewegungsfähigkeit des GI-Trakts wird als Motilität bezeichnet. Dieser Begriff umfasst sämtliche Kontraktionen und Relaxationen der in den Wänden der Organe des GI-Trakts vorhandenen Muskulatur (Olsson & Holmgren, 2001; Sanders, 2008). Während der digestiven Phase wird die aufgenommene Nahrung aufbereitet und aboral transportiert um eine ausreichende Nährstoffresorption zu gewährleisten. Hierzu ist sowohl eine Vermischung des Inhalts durch Segmentation, der Transport in aboraler Richtung durch Propulsion sowie die Speicherung der Nahrung an bestimmten Stellen (insbesondere im Magen) und damit einhergehend eine Relaxation des entsprechenden Organs sowie das Schließen und Öffnen der Sphinkter nötig. In der interdigestiven Phase wird unverdauliches Material mittels rhythmischer Kontraktionen abtransportiert (Klinke, 2005). Das Muskelgewebe (Tunica muscularis) der Organwände besteht aus zwei Schichten die zirkulär beziehungsweise longitudinal orientierte Muskelbündel enthalten (Schmidt, 2003), siehe Abbildung 1.1. Diese Muskeln führen die Bewegungen des GI-Trakts aus (Sanders, 2008). Dabei setzt sich das komplexe Muster der Motilität aus spezifischen Kontraktionen und Relaxationen beider Muskelschichten, der äußeren, dünneren Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale) und der inneren, dickeren Ringmuskelschicht (Stratum circulare), zusammen (Schmidt, 2003). Mit Ausnahme des Pharynx, des oberen Drittels des Ösophagus und des externen analen Sphinkters zählen alle Muskeln im GI-Trakt zur glatten Muskulatur. Benachbarte Muskelzellen sind zu einem Synzytium gekoppelt, welches sowohl regulatorische Signale von verschiedenen übergeordneten Kontrollsystemen wie Motoneurone oder Hormone empfängt. als auch eine intrinsische spontane elektrische Rhythmizität und Kontraktionsfähigkeit aufweist (Sanders, 2008).

Die rhythmischen Muskelkontraktionen werden durch zyklische Veränderungen im Membranpotential der Muskelzellen gesteuert. Misst man gleichzeitig sowohl das Membranpotential als auch die Kontraktion, lässt sich feststellen, dass jeder Kontraktion eine lang anhaltende Depolarisationswelle zu Grunde liegt. Aufgrund der langsamen Frequenz und langen Dauer wurden diese Membranpotentialdepolarisationen von etwa 10 mV als *slow waves* bezeichnet (Tomita, 1981; Hirst & Ward, 2003; Schmidt, 2003). *Slow waves* werden durch Aktivierung oder Deaktivierung verschiedener Ionenkanäle oder –pumpen hervorgerufen. Sie sind direkt oder indirekt ausschlaggebend für die Muskelkontraktionen indem durch die Membranpotentialveränderung die Wahrscheinlichkeit für Aktionspotentiale

erhöht ist (Olsson & Holmgren, 2001). Sofern sich keine weiteren Signale hinzuaddieren erreichen die *slow waves* das bei etwa – 40 mV liegende Schwellenpotential nicht. Ist dies doch der Fall erfolgt die Bildung von Aktionspotentialen und es kommt zur Kontraktion (Schmidt, 2003). Die elektrische Stimulation kann sich dann über *gap junctions*, mittels derer die einzelnen Muskelzellen eines Synzytiums verbunden sind, ausbreiten. So reagieren ganze Teile der Muskelschicht als eine Einheit. Kontraktionsmuster und –stärke werden von einem Zusammenspiel exzitatorischer und inhibitorischer Signale gesteuert. Dies kann über Motoneurone des enterischen Nervensystems, Hormone, parakrine Substanzen oder Entzündungsmediatoren geregelt sein. Unabhängig davon wie die Steuerung abläuft, führt ein Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ und eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration zu einer Aktivierung das Kontraktionsapparates (Aktin-Myosin-Komplex), während eine verminderte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration letztendlich Relaxation bewirkt (Olsson & Holmgren, 2001; Sanders, 2008; Sanders et al., 2012).



Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Darmwand

Vereinfachte Schemazeichnung eines Längsschnitts der Darmwand. Die Wand des Hohlorgans ist in den meisten Bereichen des GI-Trakts nach dem gleichen Schema aufgebaut und besteht aus verschiedenen Schichten. Zum Lumen hin wird die Darmwand von der Mukosa abgegrenzt, die Zotten bildet und aus unterschiedlichen Zelltypen besteht, hier nicht näher beschrieben. Darunter befindet sich eine Bindegewebsschicht, die Submukosa, und die Muskulatur bestehend aus zwei Bereichen von Muskelfasern unterschiedlicher Ausrichtung (Zirkulär- und Longitudinalmuskelschicht). Die Muskulatur wird von Neuronen durchzogen. Die enterischen Nervenzellen sind in spezifischen Regionen (myenterischer Plexus und submukosaler Plexus) angeordnet. Es gibt exzitatorische (rot) und inhibitorische Motoneuronen (blau) sowie sonstige z.B. sensorische Nervenzellen (grau). Nach außen hin begrenzt die Serosa den Darm.

1.2 Regelung der Motilität über enterisches Nervensystem und interstitielle Zellen

1.2.1 Enterisches Nervensystem (ENS)

Das in der Darmwand lokalisierte Nervengeflecht wird als enterisches Nervensystem (ENS) bezeichnet. Diesem verdankt der GI-Trakt seine Ausnahmestellung: Er ist in der Lage seine Funktionen auch im isolierten Zustand und damit unabhängig von zentralnervösen Einflüssen aufrechtzuerhalten. Bereits 1899 wurde beschrieben, dass Reflexe auch an einem isolierten Darmstück ablaufen können. Diese sorgen unter anderem dafür, dass der Darm seinen Inhalt koordiniert in anale Richtung transportieren kann (Bayliss & Starling, 1899). Das Ausmaß, mit welchem das ENS für die Steuerung der Muskelbewegungen ausschlaggebend ist, variiert mit der Region des GI-Trakts und auch den physiologischen Umständen. Im Allgemeinen wird aber, mit Ausnahme der vom zentralen Nervensystem geregelten Defäkation, die Kontrolle der Motilität des Dünn- und Dickdarms vom ENS dominiert (Furness, 2012).

Anatomisch besteht das ENS im GI-Trakt hauptsächlich aus zwei Plexus, in deren Ganglien sich fast alle Neuronen befinden (Olsson & Holmgren, 2001; Furness, 2012). Der myenterische Plexus (auch Auerbach-Plexus genannt) ist zwischen den Schichten der zirkulären und longitudinalen Muskulatur lokalisiert und breitet sich über die gesamte Länge des Verdauungstrakts aus, vom Ösophagus bis zum Rektum. Im Gegensatz dazu beschränkt sich der submukosale Plexus (Meissner-Plexus), der sich Richtung Darmlumen an die Zirkulärmuskulatur anschließt, auf Dünn- und Dickdarm (Furness, 2012). Siehe hierzu die Schemazeichnung in Abbildung 1.1. Das enterische Nervensystem besteht neben intrinsischen sensorischen Neuronen und Interneuronen aus Motoneuronen. Hier sind zwei Gruppen von Neuronen hervorzuheben: 1) Exzitatorische Motoneurone, die exzitatorische Signale weiterleiten und somit eine kontraktile Antwort der Muskelzellen vermitteln. Acetylcholin, welches muskarinerge Rezeptoren aktiviert und motilitätsstimulierend wirkt, ist der Hauptneurotransmitter. Als weiterer Neurotransmitter ist Substanz P zu nennen. 2) Inhibitorische Motoneurone, die mittels hemmender Signale eine Relaxation der glatten Muskulatur hervorrufen. Wichtige Neurotransmitter der inhibitorischen Neurotransmission sind Stickstoffmonoxid (NO), Purine (Adenosintriphosphat, ATP) sowie vasoaktives intestinales Peptid (VIP). Diese Art der Hemmung wird als NANC-Hemmung bezeichnet (nicht-adrenerg nicht-cholinerg vermittelt), da weder Noradrenalin noch Acetylcholin primär beteiligt sind (Wood, 2011; Furness, 2012).

1.2.2 Die NO-vermittelte inhibitorische NANC Neurotransmission

Die nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC) Neuronen des GI-Trakts exprimieren neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) und setzen NO frei, welches im GI-Trakt als ein Neurotransmitter wirkt der die Relaxation der Muskulatur vermittelt (Xue et al., 2000; Hofmann, 2005; Hofmann et al., 2006; Furness, 2012; Lies et al., 2014). Das freigesetzte gasförmige NO diffundiert zu den umgebenden Zellen. Dort aktiviert NO, neben anderen Funktionen, die lösliche Guanylyzyklase (soluble guanyly cyclase, sGC) und den daran angeschlossenen Signalweg. Somit kommt es zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration in den entsprechenden Zellen (Hofmann et al., 2000) (Abbildung 1.2). In der glatten Muskulatur des GI-Trakts sind die zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen gehörenden cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) die Haupteffektoren dieses Signalwegs (Lies et al., 2014). Säugetiere besitzen drei Isoformen des Prkg Gens, zwei zytoplasmatisch vorkommende Spleißvarianten des Prkg1 Gens (PKG1a und PKG1b) sowie das membrangebundene PKG2. In der Muskulatur des GI-Trakts sind nur PKG1α und PKG1β von Bedeutung (Keilbach et al., 1992). Die PKG-Enzyme bestehen aus drei funktionellen Domänen: Einer N-terminalen Domäne zur Interaktion mit Effektorproteinen, einer regulatorischen Domäne mit zwei Bindestellen für cGMP, die allosterisch interagieren und cGMP mit starker bzw. schwacher Affinität binden, sowie einer katalytischen Domäne mit Kinase-Funktion. Die Bindung von zwei cGMPs induziert eine Konformationsänderung wodurch die Substratproteine phosphoryliert werden können (Hofmann et al., 2000; Hofmann, 2005).

In den Zellen der glatten Muskulatur wird die PKG1-vermittelte Relaxation sowohl durch Ca²⁺-abhängige als auch Ca²⁺-unabhängige Mechanismen herbeigeführt (Frei et al., 2009). Interessanterweise inhibiert der cGMP/PKG1 Signalweg in Mäusen die Kontraktion auf Wegen: So herrscht im Dünndarm eine Aktivierung unterschiedlichen der Myosinphosphatase ohne Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration vor, während im Colon eine Interaktion von PKG1 mit dessen Substrat Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor assoziierte cGMP Kinase (IRAG) die Ca²⁺-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum und den Eintritt von extrazellulärem Ca²⁺ inhibiert (Frei et al., 2009; Lies et al., 2014). Nichtsdestotrotz führt dieser Signalweg letztendlich zu einer Relaxation der Muskulatur.

PKG1, sowohl PKG1 α als auch PKG1 β , wurden im GI-Trakt in Zellen der glatten Muskulatur (Keilbach et al., 1992) ebenso wie in interstitiellen Zellen von Cajal (ICC, siehe 1.3) (Salmhofer et al., 2001; lino et al., 2009c) nachgewiesen. *Prkg1*-defiziente Mäuse (*Prkg1*^{-/-}, genereller *knock-out*) zeigen unter anderem schwerwiegende intestinale Dysfunktionen, hervorgerufen durch den Verlust der NO-vermittelten Muskelrelaxation (Pfeifer et al., 1998). Einen ähnlichen Phänotyp weisen Tiere mit *sGC knock-out* auf (Friebe et al., 2007).



Abbildung 1.2: Der NO-vermittelte Signalweg

Schematisch vereinfachte Darstellung des durch NO/cGMP vermittelten Signalwegs. NO: Strickstoffmonoxid, sGC: lösliche Guanylatzyklase, cGMP: zyklisches Guanosionmonophosphat, GTP: Guanosintriphosphat, PKG1: cGMP-abhängige Proteinkinase, ER: Endoplasmatisches Retikulum. (nach Hoffmann, 2000 und 2004)

1.2.3 Klassisches und neues Konzept der Motilitätssteuerung

Es herrschte lange Zeit die Meinung vor, die Muskelkontraktionen in GI-Trakt seien durch Innervation der glatten Muskelzellen gesteuert. So geht die traditionelle Betrachtungsweise von enterischen Neuronen aus, deren post-ganglionäre Axone sich zwischen den Muskelzellen befinden und dort sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Neurotransmitter freisetzen, welche dann an Rezeptoren auf der Oberfläche der Muskelzellen binden und diese aktivieren (Hirst & Ward, 2003), wie in Abbildung 1.3 a dargestellt.

Neben diesem ursprünglichen Konzept existiert seit Jahren die Hypothese, dass weitere Zelltypen eine Rolle in der Weiterleitung der neuronalen Signale zu den glatten Muskelzellen spielen könnten (Sanders et al., 2012; Blair et al., 2014). Diese Theorie kam erstmals bei Morphologen auf, die spezielle interstitielle Zellen in der räumlichen Nähe von sowohl Muskelzellen als auch den Axonen der enterischen Neuronen beschreiben (Cajal, 1893; Cajal, 1911; Daniel & Posey-Daniel, 1984). Heute sind diese Zellen als interstitiellen Zellen von Cajal bekannt, siehe hierzu Abschnitt 1.3. Inzwischen erbrachte Nachweise, dass intramuskuläre ICC sowohl mit benachbarten glatten Muskelzellen mittels *Gap Junctions* in Kontakt stehen (Daniel & Posey-Daniel, 1984; Faussone-Pellegrini et al., 2013), als auch für die Transduktion neuronaler Signale nötige Rezeptoren aufweisen (Chen et al., 2007; lino et al., 2009c), sprechen für eine wichtige Rolle der Cajal-Zellen in der Neurotransmission (Hirst & Ward, 2003; Sanders et al., 2012). So wird heute vermutet, ICC könnten eine essentielle

Zwischenstation der Neurotransmission von exzitatorischen und inhibitorischen Signalen der Neuronen zu den kontraktilen Muskelzellen darstellen, wie in Abbildung 1.3 b schematisch gezeigt.



Abbildung 1.3: Innervation des Darms – klassisches und neues Konzept

a: Klassische Betrachtungsweise der Innervation der glatten Muskelzellen im Darm. Von Neuronen freigesetzte Neurotransmitter wie Stickstoffmonoxyd (NO) oder Acetylcholin (Ach) wirken direkt an den Muskelzellen. **b**: Das neue Konzept beinhaltet zusätzlich interstitielle Zellen. Demnach wirken die von den Neuronen ausgesandten Botenstoffe zuerst auf interstitielle Zellen von Cajal (ICC), die dann wiederum die Signale zu den Muskelzellen weiterleiten.

Auch der Ursprung der schon jahrelang in den glatten Muskelzellen des GI-Trakts messbaren Depolarisationswellen (*slow waves*) war lange Zeit unklar und es wurde anfangs vermutet, dass die Muskelzellen die Quelle der *slow waves* sind (Tomita, 1981; Huizinga & Lammers, 2009). Allerdings stellte sich heraus, dass isolierte Muskelzellen des Darms kaum spontan elektrische Aktivität generieren (Farrugia, 1999). Stattdessen sind ICC die Zellen

des GI-Trakts mit Schrittmacheraktivität (Ordog, 2008; Huizinga & Lammers, 2009; Sanders et al., 2012). Dies ist sowohl an unterschiedlichen Tiermodellen wie Meerschweinchen (Cousins et al., 2003; Hirst & Edwards, 2006) oder Mäusen (Der-Silaphet et al., 1998; Koh et al., 1998; Thomsen et al., 1998) als auch an humanen Darmpräparaten (Lee et al., 2007) nachgewiesen. Somit bezeichnet man heute ICC als die Schrittmacherzellen des GI-Trakts.

Eine Rolle der ICC in der Neurotransmission hingegen wird weiterhin sehr kontrovers diskutiert (Goyal & Chaudhury, 2010; Blair et al., 2014; Sanders, 2014).

1.3 Interstitielle Zellen von Cajal (ICC)

Erstmals beschrieben wurden interstitielle Zellen im GI-Trakt vor etwa einem Jahrhundert von dem spanischen Pathologen und Neurowissenschaftler Santiago Ramón y Cajal. Unter Verwendung von Methylenblau und Silberfärbung nach Golgi beschreibt Cajal interstitielle Zellen im Bereich des myenterischen Plexus. Aufgrund ihrer Lokalisation interpretiert er diese Zellen als spezielle Neuronen, interkalierend zwischen den enterischen Neuronen und Zellen der glatten Muskulatur. Und vermutet bereits eine Funktion dieser Zellen in der Neurotransmission (Cajal, 1893; Cajal, 1911). Die nach ihm benannten interstitiellen Zellen von Cajal (interstitial cells of Cajal, ICC) sind spindel- oder sternförmige Zellen mit prominentem Zellkern und varikösen Fortsätzen mittels derer die Zellen ein Netzwerk bilden, welches in der Muskulatur des GI-Trakts eingebettet ist (Cajal, 1893; Cajal, 1911; Sanders, 1996). Nachdem der Anatom Keith kurze Zeit nach ihrer Entdeckung die Hypothese aufstellt, ICC könnten Schrittmacherzellen im GI-Trakt sein (Keith, 1915), erbrachte Faussone-Pellegrini 1977 erste Nachweise für diese Theorie. Sie lokalisiert mittels Elektronenmikroskopie die interstitiellen Zellen in der Peripherie von Muskelzellbündeln und weist enge Kontakte einerseits zwischen den Fortsätzen einzelner Cajalzellen und andererseits zwischen diesen und den Muskelzellen nach. Ebenso beschreibt sie, dass Axone der enterischen Neurone in engem Kontakt mit ICC stehen und eine vergleichsmäßig größere Anzahl von Verbindungen zwischen Neuronen und ICC als zwischen Neuronen und Muskelzellen existieren. Zudem weisen die Cajal-Zellen, ähnlich wie Schrittmacherzellen im Herzen, viele Mitochondrien und wenig kontraktile Filamente auf (Faussone-Pellegrini et al., 2013; Huizinga et al., 2013). Weitere wichtige Ergebnisse in der Erforschung dieser speziellen Zellen, wie den ersten physiologischen Beweis für die Rolle der Cajal-Zellen als Schrittmacher im GI-Trakt erbrachte Thuneberg vor etwa 30 Jahren (Thuneberg et al., 1982; Sarna, 2008; Huizinga et al., 2013).

Heute ist zudem bekannt, dass ICC etwa 5% der Zellen der Darmwand ausmachen (Ordog, 2008) und man unterscheidet verschiedene Subpopulationen von Cajal-Zellen anhand ihrer

Morphologie und ihrer Lokalisation in der Darmwand. In der Literatur variiert die Bezeichnung der einzelnen Klassen. In der vorliegenden Arbeit werden die im Folgenden aufgeführten Bezeichnungen bzw. Abkürzungen verwendet, die sich an der Nomenklatur von Sanders und Ward orientieren (Blair et al., 2014), schematisch dargestellt in Abbildung 1.4.



Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der wichtigsten ICC-Subpopulationen ICC-MY: ICC im Bereich des myenterischen Plexus, ICC-IM: intramuskuläre ICC, sie befinden sich zwischen den Muskelzellen der Zirkulärmuskelschicht, kommen aber in geringer Anzahl auch in der Längsmuskulatur vor, ICC-SMP (Dickdarm) und ICC-DMP (Dünndarm): ICC an der luminalen Seite der Zirkulärmuskulatur im Bereich des submukosalen Plexus.

Oft befinden sich ICC in unmittelbarer Nähe zu Neuronen, wie im Bereich des myenterischen Plexus zwischen den beiden Muskelschichten. Diese ICC-MY sind multipolare Zellen mit drei bis fünf primären hauptsächlich zytoplasmatischen Fortsätzen welche sich weiter verästeln und so zahlreiche Kontakte zu benachbarten Zellen bilden können. So ergibt sich ein dreidimensionales Netzwerk, welches den myenterischen Plexus aber nicht penetriert, sondern die neuronalen Strukturen umgibt (Komuro, 2006). ICC-MY sind im GI-Trakt aller untersuchten Säugetiere anzufinden, weisen aber im Dünndarm eine höhere Dichte als in anderen Bereichen auf (Streutker et al., 2007) und werden als die primären Schrittmacher in Magen und Dünndarm angesehen (Garcia-Lopez et al., 2009; Blair et al., 2014).

Zwischen den Muskelzellen der sowohl zirkulären als auch longitudinalen Muskelschicht befinden sich die intramuskulären ICC (ICC-IM). Diese bipolaren, oft spindelförmigen Zellen sind parallel zu den Zellen der umgebenden Muskulatur ausgerichtet und werden hauptsächlich als Mediatoren der enterischen Neurotransmission angesehen (Burns et al.,

1996; Ward et al., 2000; Blair et al., 2014). ICC-IM kommen ebenfalls im gesamten GI-Trakt vor, sind aber in der zirkulären Muskelschicht weiter verbreitet als in der longitudinalen Muskulatur. Ebenso sind sie im Colon und Magen zahlreicher vertreten als im Dünndarm (Komuro, 2006).

Im Bereich des submukosalen Plexus befindet sich ebenfalls eine Subgruppe von Cajal-Zellen. Im Dünndarm erstrecken sich die ICC-DMP (*deep muscular plexus*) parallel der Muskulatur, ähnlich der ICC-IM. Diese multipolaren ICC-DMP mit sternförmigen Somata bilden ein hauptsächlich zweidimensional ausgerichtetes Netzwerk und sind eng mit den Nervenbündeln und Muskelzellen assoziiert (Komuro, 2006; Garcia-Lopez et al., 2009; Blair et al., 2014). Die Zellen mit entsprechender Lokalisation im Magen und Colon bezeichnet man als ICC-SMP (*submucosal plexus*) (Komuro, 2006; Streutker et al., 2007). Neben den aufgeführten wichtigen Subpopulationen werden in der Literatur weitere Untergruppen wie subserosale oder submukosale ICC unterschieden (Blair et al., 2014; Sanders, 2014).

Wenn ICC bei der normalen gastrointestinalen Motilität eine Funktion ausüben, liegt die Vermutung nahe, dass Beeinträchtigungen des ICC-Netzwerks pathologische Auswirkungen haben. So werden einige die Motilität des GI-Trakts betreffenden Erkrankungen mit einer reduzierten Anzahl und/oder Strukturveränderung der ICC sowie einer gestörten Integrität des Netzwerks assoziiert (Streutker et al., 2007; Mostafa et al., 2010). Insbesondere diabetische Gastrophathie wird anhand von Resultaten bei Patienten als auch am Mausmodell mit einem Verlust der Cajal-Zellen in Verbindung gebracht (Ordog et al., 2000; He et al., 2001; Bashashati & McCallum, 2015) . Ebensolche Hinweise gibt es für Verstopfung mit verzögerter Passagezeit (*slow-transit constipation*). Weitere Studien berichten u.a. von Krankheitsbildern wie Morbus Hirschsprung, chronisch intestinaler Pseudoobstruktion, Achalasie sowie entzündlichen Darmerkrankungen oder auch dem Reizdarmsyndrom im Zusammenhang mit ICC-Defekten (Streutker et al., 2007; Mostafa et al., 2007; Mostafa et al., 2010; Eshraghian & Eshraghian, 2011).

1.3.1 ICC exprimieren *c-Kit*

Ein Meilenstein in der Erforschung der Cajal-Zellen war die Entdeckung, dass diese Zellen das Protoonkogen *c-Kit* (Kit-Protoonkogenrezeptortyrosinkinase) exprimieren (Maeda et al., 1992). Der *c-Kit* Lokus, identisch mit dem bereits zuvor bei der Maus bekannten sogenannten *white spotting* Lokus (W) (Chabot et al., 1988; Geissler et al., 1988), befindet sich im humanen Genom auf Chromosom 4 bzw. auf Chromosom 5 bei der Maus und codiert für ein 160 Kilodalton großes Glykoprotein. Dieses Transmembranprotein mit der Funktion eines Rezeptors weist eine extrazelluläre, eine membrandurchspannende und eine

intrazelluäre Domäne auf. An der extrazellulären Domäne bindet der Ligand Stammzellfaktor (SCF, Steel factor). Die zytoplasmatische Domäne beinhaltet neben einer Tyrosinkinasefunktion eine Bindestelle für zytoplasmatische Signalproteine. Die Bindung von SCF an c-Kit hat eine Dimerisierung des Rezeptors zur Folge, wodurch dieser aktiviert wird und eine Autophosphorylierung erfolgt. Dadurch werden verschiedene Signalwege aktiviert, die Funktionen wie Zellwachstum, Differenzierung oder Zellmigration beeinflussen können (Sanders, 1996; Blume-Jensen & Hunter, 2001). Der Signalweg über den Rezeptor c-Kit ist für die Entwicklung einiger Zelltypen essentiell, unter anderem bei der Melanogenese, Hämatopoiese oder Gametogenese (Yarden et al., 1987; Dubreuil et al., 1990; Blume-Jensen & Hunter, 2001; Roskoski, 2005). Neben ICC, für die der Kit-Signalweg nicht nur für die Embryonalentwicklung der Zellen sondern auch für die Aufrechterhaltung der adulten Zellen essentiell ist (Sanders, 1996), sind es vor allem Melanozyten (Yoshida et al., 2001) und Mastzellen (Kitamura et al., 1978), deren Funktion im adulten Zustand ebenfalls einen intakten Kit-Signalweg erfordert. Im GI-Takt sind jedoch nur die verschiedenen ICC-Typen und Mastzellen als c-Kit-exprimierende Zellen relevant. In der Maus kommen zudem im Vergleich zu humanem Gewebe verhältnismäßig wenig Mastzellen vor (De Winter et al., 2012). Somit wird c-Kit als der spezifische Marker für ICC angesehen und seit einiger Zeit werden Cajal-Zellen mit Antikörperfärbung gegen Kit sicher nachgewiesen (Abbildung 1.5), sowohl in murinem als auch humanem Gewebe des GI-Trakts (Ward et al., 1994; Torihashi et al., 1995; Romert & Mikkelsen, 1998).



Abbildung 1.5: Nachweis von ICC mittels c-Kit-Färbung

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen c-Kit zum Nachweis von ICC auf einem Gewebsschnitt (links, Colonlängsschnitt) und *Whole Mount* Präparat (rechts, Colon). Rot: c-Kit-positive ICC zwischen den Muskelzellen und als Netzwerk am submukosalen Plexus. Blau: Zellmembranen (links) bzw. Zellkerne (rechts). Maßstab: 50 µm. (nach Klein et al., 2013)

1.3.2 Vorhandene Tiermodelle zur Untersuchung der ICC

Die Existenz des Kit-Signalwegs und/oder die Aufrechterhaltung der ICC durch diesen scheint auch für die gastrointestinale Motilität essentiell zu sein. So führt die Behandlung von

jungen Mäusen mit Antikörpern gegen die Rezeptordomäne von c-Kit zu einem Verschwinden der c-Kit-immunopositiven Zellen während gleichzeitig die intestinale Muskulatur dieser Tiere ein abnormales Kontraktionsmuster zeigt (Maeda et al., 1992). Ebenso weisen Tiere mit Mutationen im *c-Kit* Lokus Störungen der Muskelkontraktion auf, so dass Tiere mit entsprechenden Mutationen geeignete Modelle zur Analyse der Cajal-Zellen darstellen.

Mutationen, die die Funktion des Tyrosinkaserezeptors c-Kit vollständig inhibieren sind fatal, Tiere mit homozygoten Mutationen versterben meist vor der Geburt in utero. Ein Beispiel dafür ist die spontan aufgetretene Punktmutation W (Nocka et al., 1990). Es existieren aber auch überlebensfähige Tiere mit milderen Spontanmutationen. Dies sind größtenteils loss-offunction Mutationen, die nur zu einem partiellen Verlust der Kinasefunktion des Kit-Rezeptors (Punktmutation W^{ν} ; W^{ν}/W^{ν} oder W/W^{ν} Mäuse) oder dessen Liganden SCF (SI/SI^d Mäuse) führen (Nocka et al., 1990; Sanders, 1996; Sanders & Ward, 2007). Diese Tiere boten eine gute Möglichkeit für erste Untersuchungen zur Funktion der Cajal-Zellen bei der Motilität. Sie weisen in unterschiedlichen Regionen des GI-Trakts Defekte an den ICC auf. Bei den bereits erwähnten Mausmutanten W/W^{\vee} und SI/SI^{d} ist ein unterentwickeltes ICC-Netzwerk beschrieben. Neben der beeinträchtigten Netzwerk-Integrität zeigen diese Tiere aber keine größeren Veränderungen an weiteren Zellen der gastrointestinalen Muskulatur oder den enterischen Neuronen (Sanders & Ward, 2007). Allerdings weisen diese Tiere einen Verlust der slow waves und eine Depolarisation des Membranpotentials in Muskelzellen des Dünndarms auf (Ward et al., 1994; Huizinga et al., 1995; lino et al., 2011). Für die W/W^{ν} Tiere ist spezifisch eine stark reduzierte Anzahl der ICC-MY im Dünn- und Dickdarm beschrieben. Der Verlust der intramuskulären Cajal-Zellen hingegen ist bei den W/W^{ν} Mutanten etwas anders ausgebildet: Im Dünndarm sind sie erhalten, während sie sowohl im Magen als auch im Colon fehlen (lino et al., 2011). Ähnliche Befunde treten auch bei Tieren mit der nichtletalen Mutation SI/SI^d auf (Beckett et al., 2002; Sanders & Ward, 2007). Tiere mit einer weiteren c-Kit Mutation, W^{jic}/W^{jic}, die im Vergleich zu *W/W^v* Mäusen einen stärkeren Verlust der Kinaseaktivität des Rezeptors aufweisen, zeigen eine ähnliche Verteilung der Cajal-Zellen (lino et al., 2011). Bei einer weiteren Mauslinie, *Kit^{W-sh/W-sh}*, ist die Veränderung des c-Kit Lokus eine Inversion upstream der c-Kit Promotorregion. Dies führt zu einem vergleichbaren Phänotyp mit Verlust der c-Kit-positiven Zellen (ICC, Mastzellen und Melanozyten) (lino et al., 2009b). Auch an Ratten mit Kit-Mutationen wurden ähnliche morphologische Beobachtungen gemacht: Ws/Ws Tieren, die eine Deletion der Tyrosinkinasedomäne haben, fehlen im Dünndarm die ICC-MY (Tsujimura et al., 1991; Takeda et al., 2001).

Einleitung

All diesen Modellen gemein ist, dass die Mutationen und somit die Veränderungen bereits in der Embryonalentwicklung der Tiere vorhanden sind und einen Einfluss auf die Entstehung der Zellen bzw. Organe ausüben. Somit muss der bei diesen Modellen beobachtete Phänotyp nicht unbedingt auf eine Funktionsstörung der ICC, sondern könnte auch auf einen systemischen Effekt zurückgeführt werden. Daher sind diese Modelle für Analysen einer Beeinträchtigung des ICC-Netzwerks am adulten Tier von großem Nachteil. Um die tatsächliche Rolle der ICC bei der Motilität bzw. der dieser zugrundeliegenden Neurotransmission im adulten Organismus zu untersuchen, sind Analysen unter Verwendung von konditionalen Tiermodellen erforderlich.

1.4 Das Tamoxifen-induzierbare Cre^{ERT2/}IoxP System

Zur Analyse von Genen und deren Funktion am Tiermodell wird seit geraumer Zeit die Cre/*loxP* Technologie benutzt, da unter Verwendung dieses Systems Gene spezifisch aktiviert oder deaktiviert werden können. Das aus dem Bakteriophagen P1 stammende Enzym Cre erkennt eine spezifische Nukleotidsequenz (*loxP* Stelle), bindet daran und rekombiniert die dazwischen befindliche Sequenz, was zu Genomveränderungen führt. Bei gleicher Orientierung der *loxP* Stellen kommt es zu einem Verlust der flankierten Sequenz. Abhängig davon, unter Kontrolle welchen Promotors die Cre-Rekombinase exprimiert wird, kann sie *in vitro* ebenso wie *in vivo* im transgenen Mausmodell gewebs- bzw. zelllinienspezifisch wirken (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992). Eine mögliche Anwendung ist der zelllinienspezifische *knock-out* eines Gens, dabei ist ein oft für die Funktion eines Proteins essentielles Exon von *loxP*-Stellen flankiert (Nagy, 2000). Dies ist beispielsweise bei der in dieser Arbeit verwendeten *PKG1^{lox}* Maus (Wegener et al., 2002) der Fall. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist das Anschalten eines Gens mittels Exzision einer vorgelagerten *loxP*-flankierten STOP-Region (Novak et al., 2000) oder das Umschalten von der Expression eines (Reporter-)Gens zu einem anderen Gen (Muzumdar et al., 2007).

Allerdings hat auch die Genommanipulation mittels Cre-Expression Limitationen, da mit diesem System die Rekombination ebenfalls bereits im Embryo stattfindet und nicht die Möglichkeit besteht diese erst im adulten Tier anzuschalten. Ein solches System, in dem die Cre-Aktivität nicht nur zelllinien- sondern auch zeitspezifisch kontrolliert werden kann, wird durch Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptor (*estrogen receptor*, ER) erreicht. Die Mutationen verändern den Östrogenrezeptor so, dass die Bindung des natürlichen Liganden 17β-Östradiol unter physiologischen Konzentrationen verhindert wird. Im Gegensatz dazu ist die Affinität von synthetischen Liganden wie Tamoxifen, die den Tieren gezielt verabreicht werden können, gesteigert. Eine sehr effektive Veränderung des Östrogenrezeptors ist das sogenannte ER^{T2}

mit den Mutationen G400V/M543A/L540A (Feil et al., 1997). Induziert man Mäuse mit Tamoxifen wird dies im Tier zu 4-Hydroxy-Tamoxifen umgesetzt welches an ER^{T2} bindet. So kann eine Cre-vermittelte Rekombination zeitspezifisch in adulten Tieren oder auch bei bestimmten Stadien der Embryonalentwicklung induziert werden (Feil et al., 1996; Hayashi & McMahon, 2002; Leone et al., 2003). Die Wirkungsweise ist schematisch in Abbildung 1.6 dargestellt.



Abbildung 1.6: Das Cre^{ERT2}-System

Ist die Cre-Rekombinase mit einer mutierten Östrogenrezeptordomäne fusioniert, liegt Cre in uninduzierten Zellen inaktiv im Zytoplasma vor, ein daran assoziiertes Protein (HSP90) verhindert den Eintritt in den Nukleus. Behandelt man die Tiere mit Tamoxifen (kleine blaue Punkte) kann dieses an ER^{T2} binden, HSP90 wird frei und das Fusionsprotein Cre^{ERT2} wird in den Nukleus transloziert. Dort kann das nun aktive Cre seine Funktion als Rekombinase ausüben (Schemazeichnung nach (Leone et al., 2003)).

1.5 Fragestellung

Die interstitiellen Zellen von Cajal spielen bei der Regulation der gastrointestinalen Motilität eine wichtige Rolle. So generieren die auch als Schrittmacherzellen des Darms bezeichneten Zellen langsame Depolarisationswellen (*slow waves*) und organisieren dadurch die Kontraktionen der glatten Muskulatur. ICC bilden mit ihren Zellfortsätzen Netzwerke und befinden sich in räumlicher Nähe von sowohl enterischen Neuronen als auch Muskelzellen. Die Rolle dieser Zellen in der exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmission wird allerdings kontrovers diskutiert. Da bei verschiedenen humanen Motilitätsstörungen eine Beeinträchtigung des ICC-Netzwerks beschrieben wird, können Untersuchungen dieser Zellen im Mausmodell Antworten bieten, die zu einem besseren Verständnis der Rolle der ICC und möglicherweise zu Therapiemodellen führen.

Um die Cajalzellen im adulten Tier *in vivo* untersuchen zu können, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Saur die *c-Kit^{CreERT2} knock-in* Mauslinie generiert. Diese Tiere ermöglichen es, anhand des tamoxifenaktivierbaren Cre/*loxP* Systems zeitspezifisch Manipulationen der c-Kit-positiven Cajalzellen durchzuführen. Ziel dieser Arbeit war es, die *c*-

Kit^{CreERT2} Maus zu charakterisieren und die Auswirkung von Manipulationen dieser Zellen in Form von Genaktivierung und -inaktivierung auf die gastrointestinale Motilität sowie die Neurotransmission zu untersuchen. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Analyse der Rekombinationseffizienz der Mauslinie und der Manipulation der c-Kitpositiven ICC mit Hilfe von Reportergenen, unter Verwendung von konditional aktivierbarer Expression von EGFP in den ICC, sowie Immunfluoreszenzfärbungen und Konfokalmikroskopie.
- 2. Induktion eines (partiellen) ICC-Verlusts im adulten Versuchstier und Untersuchung der Auswirkungen dieses Verlusts auf die gastrointestinale Motilität. Um einen Verlust der ICC hervorzurufen wurde die *c-Kit^{CreERT2}* Mauslinie genutzt um die c-Kit-positiven Zellen durch konditionale Expression von Diphtherietoxin A zu depletieren, und die Auswirkungen des Verlusts der Integrität des ICC-Netzwerks auf die gastrointestinale Motilität der Tiere *in vivo* (GI-Transit) und *ex vivo* (Muskelkontraktionen) sowie auf die *slow waves* und die Neurotransmission im Darm dieser Tiere untersucht.
- 3. Untersuchung der Rolle der ICC bei der NO-abhängigen inhibitorischen Neurotransmission durch gezielte Deletion eines Enzyms des NO/cGMP-Signalwegs, der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG1) in den Cajalzellen. Dazu wurde die *c*-*Kit^{CreERT2}* Maus mit der *Prkg1^{lox/lox}* Linie verkreuzt und die Auswirkungen des Verlusts dieses Signalwegs auf die gastrointestinale Motilität der Tiere *in vivo* (GI-Transit) und *ex vivo* (Muskelkontraktionen) sowie auf die *slow waves* und die Neurotransmission im Darm dieser Tiere untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2.1: Technische Ausstattung

Technische Geräte	Modell	Hersteller
Analysenwaage	Analytical Balance Kern AGB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen
Eismaschine	Scotsman [®] AF-20	Scotsman Ice Systems, Milano, Italien
Elektrischer Stimulator (Organbad)	Stimulus Accupulsor A310; Isolator A385	WPI, New Heaven, USA
Elektrischer Stimulator (intrazelluläre Messung)	Grass SIU59 bzw. Grass SD9	Grass Instruments, Quincy, MA, USA
Elektrophorese-Power Supply	Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Feinwaage	Precision Balance Kern FTB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen
Fluoreszenzscanner	Odyssey [®] Infrared Imaging System	Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA
Gel Dokumentationssystem	Gel doc XR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glaswaren		Schott UK Ltd, Stafford, UK
Horizontalgelektrophoresesyst em		Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Horizontalschüttler	Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co.K. Schwabach
Isometrischer Kraftaufnehmer (Organbad)	FSG-01	Experimetria, Budapest, Ungarn
Kapillarglasmikroelektroden (intrazelluläre Messungen)	1.0 mm OD x 0.58 mm ID	Clark Electromedical Instruments, Kent, UK
Konfokales Fluoreszenzmikroskop Zeiss	LSM 510, Axiovert 100	Zeiss AG, Oberkochen
Konfokales Fluoreszenzmikroskop Leica	Leica TCS SP5; Leica DMI 6000 CS	Leica Microsystems, Wetzlar
Kryotom	Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Laborschüttler	Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.K, Schwabach
Magnetrührer	COMBIMAG	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Metallkugeln	Durchmesser 2,5 mm	Metallbau Gerd Kucharczyk, Röthlein
Mikroelektrodenpuller	Model P-97, 3 mm	Sutter Instrument Co.
(intrazelluläre Messungen)	Heizfaden	Novato, CA, USA
Mikrowelle		Siemens AG, München
Organbad		Panlab, AD Instruments, Spechbach
PCR Thermocycler	T-1, TPersonal, TGradient	Biometra, Analytik Jena AG, Jena

Technische Geräte	Modell	Hersteller
pH-Meter	521	WTW Wissenschaftlich-
		Technische Werkstätten
		GmbH, Weilheim
Pipetten	verschiedene	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Multikanal	Transferpette [®] S -8	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Pipetus [®]		Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Quadbridge mit analog/digital	DUO733 microelectrode	World Precision Instrument,
Konverter (intrazeluäre	amplifier;	Sarasota, FL, USA;
Messung)	SCB 68 interface	National Instruments,
		Austin, TX, USA
Quadbridge mit analog/digital Konverter (Organbad)	MacLab/4S	AD Instruments, Spechbach
Schüttler	WT 18	Biometra, Analytik Jena AG, Jena
Thermostat (Organbad)	LE 13206	AD Instruments, Spechbach
Tischzentrifuge	Galaxy Mini Centrifuge	VWR International,
Tischzontrifugo		Tomy Kogyo Co. Ltd
lischzentnuge		Tolliy Rogyo Co, Liu,
Spektrophotometer	NanoDrop 1000	Pedlah Biotechnologie
Spekilopholomelei		GmbH, Erlangen
Stereomikroskop	OPMI 1-FC	Zeiss AG, Jena
Stereromikroskop (für	SZ30	Olympus GmbH, Hamburg
Organbadversuche)		
Umlaufpumpe (Organbad)	ISM 827	Ismatec, Zürich, Schweiz
Vortex-Schüttler	Genius 3	IKA [®] Werke GmbH & Co.
		KG, Staufen

Tabelle 2.2: Materialien

Materialien	Hersteller
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalinjektionskanüle 100 Sterican 26 G x 1"	B. Braun Petzold GmbH, Melsungen
Einmalinjektionskanüle 100 Sterican 27 G x ³ / ₄ "	B. Braun Petzold GmbH, Melsungen
Knopfsonde, 140 mm, Ø 2 mm	Medical Solution GmbH, Hünenberg, Schweiz
Kryobehälter	NuncTM Brand Products, Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Kryotomklingen	Feather Safety Razor Co, Ltd., Osaka, Japan
Minutiennadeln Sphinx V2A	Bioform, Nürnberg
Objektträger Superfrost [®] Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Omnifix [®] F 1 ml Spritze	B. Braun Petzold GmbH, Melsungen
Omnifix [®] Solo 5 ml Einwegspritze	B. Braun Petzold GmbH, Melsungen
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
PCR Reaktionsgefäßestreifen	Eppendorf AG, Hamburg; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Petrischalen 10cm Plastik	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Materialien	Hersteller
Petrischalen 10 cm Glas	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pipetten serologisch 10 ml steril	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe Plus GmbH, Winsen (Luhe)
Polyamidfaden	Gütermann, Gutach
Polypropylen Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Polypropylen Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Reaktionsgefäß 0,65 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Nagellack schwarz	verschiedene Hersteller
Scheren (Organpräparation)	Fine Science Tools, Heidelberg
Schere (Vannas-Tübingen, für Whole Mounts)	Fine Science Tools, Heidelberg
Skalpell Nr.11 und Nr. 20	Feather Safety Razor Co., Ltd, Osaka,
	Japan
Sylgard [®]	Dow Corning, Midland, MI, USA
Verschlussfolie Parafilm	Brand GmbH &Co KG, Wertheim
Zellkulturplatten (6 Well, 12 Well, 24 Well)	Corning Incorporated, Corning, NY,

Tabelle 2.3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	
6x LB Blau	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Aqua B.Braun Ecotainer® 1000 ml	B. Braun Petzold GmbH, Melsungen	
Atropin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Bovines Serumalbumin (BSA)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	
DeMineralisiertes Wasser, 10 I	SAV Liquid Production GmbH,	
	Flintsbach am Inn	
DMEM (+ 4.5 g/l D-Glucose)	Gibco, Life Technologies GmbH,	
	Darmstadt	
dNTP Mix (jeweils 10mM)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Erdnussöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Ethanol 100 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Life Technologies GmbH, Darmstadt	
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrome AG, Berlin	
GeneRulerTM 100 bp DNA Leiter	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	
Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Guanethidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
ICG Pulsion® 25 mg Indocyaningrün	Pulsion Medical Systems, Feldkirchen	
Isofluran Forene [®]	Abbott GmbH und Co KG, Wiesbaden	
Kaliumchlorid (KCI)	Merck KGaA, Darmstadt	
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
KarMinrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
L-NG-nitroarginin (L-NNA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt	
Methylcellulose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	

Chemikalien	Hersteller
Midazolam, Medetomidin, Fentanyl (MMF)	Zentrum für Präklinische Forschung,
	Klinikum rechts der Isar
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphoshpat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nifedipin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Orange G	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Orange LB	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphat gepufferte Salzlösung (ohne Ca ²⁺ ,	Gibco, Life Technologies GmbH,
ohne Mg ²⁺) (PBS)	Darmstadt
Phosphat gepufferte Salzlösung (ohne Ca ²⁺ ,	Biochrome AG, Berlin
ohne Mg ²⁺) (PBS Dublecco)	
Proteinase K, recombinant PCR Grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ready Mix TM Readtag® PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
with MgCl ₂	
Roti [®] -Histofix 4% Formaldehydlösung (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Saponin aus Quillaja Bark (reinst)	AppliChem, Darmstadt
TAE Stammlösung (50x)	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Tamoxifen free base, Minimum 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TE-Puffer	AppliChem, Darmstadt
Tissue-Tek [®]	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan
	Den Rijn, Niederlande
Tris-HCI	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton [®] X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Vectashield [®] H-1000	Vector Laboratories, Burlingame, CA,
	USA
Wasser PCR Reagent W1754-1VL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 2.4: Gebrauchslösungen

Gebrauchslösung	Zusammensetzung
0,5 % Methylcellulose in PBS	50 mg Methylcellulose; ad 10 ml PBS
Färbelösung A	1,5 g BSA; ad 50 ml PBS
Färbelösung C	1,5 g BSA; 0,5 g Saponin; 500 µl Triton X-100; ad 50 ml PBS
Färbelösung O	0,5 g BSA; ad 50 ml PBS
GeneRuler Marker	1600 μl TE 1x, 40 μl 6x LB blau, 260 μl Orange G, 0,15 % Orange LB; 60 % Glycol; 10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA (pH 8); ad 100 %
Karminrotlösung	60 mg Karminrot; 100 μl 0,5% Methylcellulose in PBS
Krebslösung	117 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl ₂ (2H ₂ O), 1,5 mM MgCl ₂ (6H ₂ O), 25 mM NaHCO ₃ , 1,2 mM NaH ₂ PO ₄ , 11 mM Glukose
PBS	95,5 g PBS Dulbecco (ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺), 10 I demin. Wasser

Gebrauchslösung	Zusammensetzung
Sorianopuffer	5040 μl demin. H ₂ O; 600 μl Gitschier's Puffer: 300 μl 10% (w/v) Triton X-100: 60
	µl 2-Mercaptoethanol
Gitschier's Puffer	1825 μl demin. H ₂ O; 1675 μl 2 M Tris
	(pH= 8,8); 830 μl 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 670 μl
	0,5 M MgCl ₂
TAE-Lösung	20 ml TAE Stammlösung + 980 ml
	demin. Wasser
Tamoxifenlösung (2 mg Tamoxifen/100 µl)	300 mg Tamoxifen, 1500 µl Ethanol
	(99,9%), 13,50 ml Erdnussöl

Tabelle 2.5: Antikörper und Färbechemikalien für Fluoreszenzfärbungen

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Primäre Antikörper			•
c-Kit (M14)	sc-1494	Santa Cruz	1:100 für Gefrierschnitte, 1:30 für <i>Whole Mounts</i>
PDGFRα (Klon APA5)	14-1401	eBioscience	1:300
PKG1common (Hofmann)		von Prof. Hofmann (TU München)	1:100
PKG1β (Hofmann)	105-4	von Prof. Hofmann (TU München)	1:100
PKG1common (Feil)		von Prof. Feil (Tübingen)	1:100
TMEM16A = Ano1	ab53212	Abcam	1:100
Sekundäre Antikörper			
Alexa Fluor® 488 Huhn anti-Kaninchen IgG (H+L)	A21441	Invitrogen	1:500
Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	A11034	Invitrogen	1:500
Alexa Fluor® 594 Esel anti-Ziege IgG (H+L)	A11058	Invitrogen	1:500
Alexa Fluor® 680 Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L)	A21088	Invitrogen	1:500
Alexa Fluor® 680 Esel anti-Ratte (IgG (H+L)	A21209	Invitrogen	1:500
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) DyLight (R) 680 nm	5366s	Cell Signaling Technology	1:500
Chemikalien zur			
Texas red™ Avidin	A820	Invitrogen	1.200
	7020	Invitogen	1.000
4',6-Diamidin-2- phenylindol (DAPI)	D9542	Sigma-Aldrich	1:250
ToPro-3 Jodid	T3605	Invitrogen	1:1000

PCR	Primername	Sequenz (5' – 3')
c-Kit ^{CreERT2}	cKIT-ATG-KA-scUP2	CCTCCACCATAAGCCGAATA
c-Kit ^{CreERT2}	cKIT-ATG-GT-mut-LP1	CCTTCGAGGTGGTAGGCATG
c-Kit ^{CreERT2}	pIRES-UP-2(1582)	CCCCATTGTATGGGATCTGATC
Cre	Cre-neu-UP	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG
Cre	Cre-neu-LP	CAGGGTGTTATAAGCAATCCC
Cre	Gabra1_UP	AACACACACTGGAGGACTGGCTAGG
Cre	Gabra1_LP	CAATGGTAGGCTCACTCTGGGAGATGATA
LSL-R26/	R26-GT UP	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
R26 ^{mT-mG}		
LSL-R26	R26-GT-SA-mut_LP	GCGAAGAGTTTGTCCTCAACC
LSL-R26/	R26-GT-WT I P	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
R26 ^{mT-mG}		
R26 ^{mT-mG}	CAG-sc-LP	GTACTTGGCATATGATACACTTGATGTAC
R26 ^{DTA}	DTA-GT-UP	AACTTTTCTTCGTACCACGGGAC
R26 ^{DTA}	DTA-GT-LP	TTCCGTTCCGACTTGCTCC
PKG1 ^{lox}	cGK1-UP	CCTGGCTGTGATTTCACTCCA
PKG1 ^{lox}	cGK1-LP	GTCAAGTGACCACTATG

 Tabelle 2.6: Genotypisierungesprimer

Alle Primer wurden von Eurofins MWG, Ebersberg bezogen.

Tabelle 2.7: Software

Software	Modell	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe CS4	Adobe Systems Software,
<u>Flattershusialasia</u>		Dublin, manu
Elektrophysiologie	LABVIEW 5.0	National Instruments,
		Munchen
Leica SP5	LAS AF; LAS AF Lite	Leica Mikrosystems,
		Wetzlar
Odyssey [®] Imagingsystem	Odyssey [®] Application	LI-COR Biocience, Lincoln,
	Software 1.2	NE, USA
Organbad	Chart 4.2	AD Instruments, Spechbach
Statistik	GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La
		Jolla, CA, USA
Zeiss LSM 510	AxioVision LE 4.3;	Zeiss AG, Oberkochen
	LSM Imagebrowser	

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Haltung & Ethikkommission

Alle Tierexperimente wurden von den örtlichen zuständigen Behörden genehmigt. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in den Maushaltungsräumen des Klinikums rechts der Isar gehalten. Die Mauslinien wiesen einen gemischten genetischen Hintergrund der Stämme c57/Bl6 und 129/S6 auf. Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet, wobei soweit möglich bei Versuchs- und Kontrolltieren ein ähnliches Verhältnis der Geschlechter und Alter der Tiere eingehalten wurde.

2.2.2 Mauslinien

c-Kit^{CreERT2}

Die in der AG Saur generierte *c-Kit^{CreERT2}* Mauslinie ermöglicht eine zell- und zeitspezifische Manipulation *c-Kit* exprimierender Zellen, wie der ICC (Nagl et al., 2007; Klein et al., 2013). Dazu wurde mittels homologer Rekombination eine Cre^{ERT2} Expressionskassette (Feil et al., 1996) in Exon 1 hinter dem Startcodon ATG in den endogenen *c-Kit* Lokus eingebracht (Targetingschema siehe Abbildung 2.1).



Abbildung 2.1: Targetingschema und Genkonstrukt des c-Kit Lokus

Von oben nach unten: muriner *c-Kit* Wildtyp-Lokus, *c-Kit* Targetingvektor mit *Cre*^{ERT2} Expressionskassette, getargeter Lokus. Neben den enthaltenen Bestandteilen sind die Größen der DNA-Fragmente, Schnittstellen und Sonden zum Nachweis mittels *Southern Blot* angegeben. (B. Seidler und D. Saur, Klinikum rechts der Isar, TU München)



Abbildung 2.2: Pigmentierungsphänotyp der *c-Kit*^{CreERT2/+} **Maus** Foto einer *c-Kit*^{CreERT2/+} Maus. Gut sichtbar sind die weißen Fellbereiche an den Pfoten, an der Schwanzspitze und ein weißer Fleck am Bauch welcher unterschiedlich groß ausfallen kann.

Homozvoote *c-Kit^{CreERT2/CreERT2}* Mäuse sind embryonal letal, ebenso wie Tiere mit anderen homozygoten c-Kit Defekten die zum Verlust der Funktion des Proteins führen (Maeda et al., 1992; Nagl et al., 2007). Dies kann mit der essentiellen Rolle von c-Kit während der Embryogenese begründet werden. Heterozygote *c-Kit^{CreERT2/+}* Tiere weisen keine Auffälligkeiten bezüglich Überlebenszeit, Gewicht oder Zuchtverhalten auf (eigene Erfahrungen der AG Saur). Sie zeigen aber einen Pigmentierungsphänotyp, wie er ebenfalls für andere heterozygote c-Kit knock-out Tiere beschrieben ist: Ein weißer Fellfleck am Bauch, weiße Pfoten sowie eine weiße Schwanzspitze (Abbildung 2.2). Dieser Phänotyp tritt als Folge der Haploinsuffizienz des mutierten c-Kit Gens auf. Die c-Kit exprimierenden Melanozyten sind aufgrund der Mutation in ihrer Migration gestört, so dass sie in der Entwicklung nicht bis in die distalsten Regionen einwandern können und so die entsprechenden Körperteile keine Pigmentierung aufweisen (Nocka et al., 1990).

Mit der *c-Kit^{CreERT2}* Maus können sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Tier Gene spezifisch in c-Kit positiven Zellen an- bzw. ausgeschaltet werden (Nagl et al., 2007).

R26^{*m*T-*m*G}

Die Mauslinie R26^{mT-mG} wurde von The Jackson Laboratorys bezogen. Es handelt sich hierbei um ein Reporterkonstrukt zum Nachweis der Cre-Rekombinationsaktivität, das unter Kontrolle des ubiquitär exprimierten Rosa26-Lokus steht (Muzumdar et al., 2007). Abbildung 2.3 a zeigt schematisch die Funktionsweise dieses Reporters. Bei inaktiver Cre-Rekombinase wird das für ein membranständiges Protein mit Fluoreszenz im roten Bereich des Spektrums (TomatoRed, mT) codierende Gen exprimiert. Cre-Aktivität hingegen führt zu Rekombination der loxP Stellen. Deletion des für TomatoRed codierenden Gens und somit Expression des membranständigen grün fluoreszierenden Proteins (EGFP, mG) findet statt. Die Cre-Aktivität kann also durch den Wechsel in der Expression der beiden fluoreszierenden Proteine nachgewiesen werden. Entscheidender Vorteil dieses Systems ist,
dass nicht nur die rekombinierten, sondern auch nicht-rekombinierte Zellen markiert werden. Ebenfalls können durch die Membranständigkeit von mT und mG Rückschlüsse auf die Zellmorphologie gezogen werden.

Um die Rekombinationseffizienz der *c-Kit^{CreERT2/+}* Mauslinie zu bestimmen, wurde sie mit der Reporterlinie *R*26^{*m*T-*m*G} gekreuzt. Für die Versuche kamen Tiere sowohl homozygot als auch heterozygot für R26^{mT-mG} zur Verwendung, da zwischen beiden Genotypen keine visuell auffälligen Unterschiede auftraten (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 2.3: Gefloxte Mauslinien - Schematische Darstellung der Konstrukte a: $R26^{mT-mG}$, b: $R26^{DTA}$, c: $Prkg1^{lox}$. Die Mauslinien exprimieren unter Kontrolle des ubiquitär exprimierten *Rosa26* Promotors (a und b) bzw. das endogenen *Prkg1* Promotors (c) die schematisch gezeigten knock-in Konstrukte. In Zellen mit aktiver Cre-Rekombinase werden die von loxP Stellen, dargestellt als Dreiecke, flankierten Sequenzen ausgeschnitten. EGFP: enhanced green flourescent protein; DTA: Diphtherietoxin A; Prkg1 Ex 10: Exon 10 des Prkg1 Gens.

R26^{DTA}

Die Mauslinie R26^{EGFP-DTA} wurde von The Jackson Laboratorys bezogen. Bei dieser Linie ist ein für das Diphtherietoxin A codierendes Gen, welches sich hinter einer von loxP Sequenzen flankierten Stop-Kassette befindet, in den ubiguitär exprimierten Rosa26-Lokus eingebracht (siehe Abbildung 2.3 b) (Ivanova et al., 2005). Diphtherietoxin, welches von pathogenen Stämmen des Corynebacterium diphtheriae sekretiert wird, besteht aus den beiden Untereinheiten A und B. Untereinheit B vermittelt die Internalisierung des Toxins nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor, der z.B. beim Menschen, aber nicht auf murinen Zellen vorhanden ist. Untereinheit A (DTA) vermittelt die Toxizität, die zum apoptotischen Zelltod führt. Wird DTA in einer Zelle exprimiert, entsteht ein enzymatisch aktives Toxin, das die Proteinbiosynthese in der Zelle inhibiert. Durch Katalyse der ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor 2 wird die Elongation der Translation gestört (Pappenheimer, 1977; Maxwell et al., 1986; Collier, 2001; Ivanova et al., 2005). Die R26^{EGFP-DTA} Mauslinie wird verwendet um mittels Cre/loxP System gesteuert spezifische Zellen zu depletieren. In den Cre-exprimierenden Zellen (im vorliegenden Fall ICC) wird die Stop-Kassette ausgeschnitten und das für DTA codierende Gen abgelesen, was zur Depletion der entsprechenden Zellen führt. Zudem ist in der *loxP-Stop-loxP* Kassette dieser Tiere ein für EGFP codierendes Gen enthalten, so dass diese Maus auch als generelle Reporterlinie eingesetzt werden kann (Ivanova et al., 2005).

Prkg1^{lox}

Die *Prkg1^{lox/lox}* Mauslinie (Wegener et al., 2002) wurde von Prof. F. Hofmann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU München) zu Verfügung gestellt. Bei diesem Genotyp ist das Exon 10 des murinen *Prkg1* Gens von *lox*P Sequenzen flankiert (Schemazeichnung siehe Abbildung 2.3 c). Die Expression des *Prkg1* Gens wird durch die *lox*P Sequenzen nicht behindert, sodass sich *Prkg1^{lox/+}* und *Prkg1^{lox/lox}* Mäuse hinsichtlich ihres Phänotyps nicht von Wildtyp Tieren unterscheiden. Nach der Rekombination der *lox*P Sequenzen und somit Deletion des Exons kann bei *Prkg1^{lox/lox}* Mäusen keine PKG1-Expression mehr nachgewiesen werden. Diese Tiere weisen den gleichen Phänotyp wie Mäuse mit einem generellen *Prkg1 knock-out* auf (Pfeifer et al., 1998; Wegener et al., 2002).

Ebenfalls von Prof. F. Hofmann wurde eine Maus mit generellem *Prkg1 knock-out* (*Prkg1^{-/-}*) (Pfeifer et al., 1998) zur Verfügung gestellt, die zur Spezifitätsprüfung des PKG1β Antikörpers verwendet wurde (siehe Abbildung 3.11).

2.2.3 Genotypisierung der Versuchstiere

Zur Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere wurde eine Biopsie des Mausschwanzes zur Isolierung der DNA verwendet. Hierzu wurden die Mäuse im Alter von drei Wochen mit Isofluran Forene[®] betäubt und eine 1 mm große Schwanzspitzenbiopsie mit einem Skalpell entnommen. Diese Probennahme erfolgte ebenso bei allen verstorbenen Tieren zur Überprüfung des Genotyps.

2.2.3.1 Isolierung der DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zur Genotypisierung mittels PCR wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien der Versuchstiere gewonnen. Die Extraktion der DNA erfolgte nach der von Soriano (Soriano, 1999) beschriebenen Methode unter Zugabe von 1 µl Proteinase K und 49 µl Sorianopuffer (Zelllyse bei 55 °C für 90 Min, Abstoppen der Reaktion bei 95 °C für 15 Min). Nach einer kurzen Durchmischung auf dem Laborschüttler und Zentrifugation (10 Min, 14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in PCR-Gefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR), Agarosegelelektrophorese

Die Amplifikation der DNA mittels PCR (Mullis et al., 1986) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz. Dabei kam ein *RedTaq-ReadyMix* (Sigma) zur Verwendung, dem nur noch die Primer (Konzentration 10 pmol/µl) sowie die aus den Schwanzbiopsien isolierte DNA zugefügt wurden. Pro PCR-Ansatz wurden jeweils 12,5 µl *RedTaq-ReadyMix* sowie 1,5 µl DNA und die entsprechenden Primer eingesetzt sowie zum Erreichen des Gesamtvolumens mit dest. Wasser aufgefüllt. Die Primer wurden entsprechend der PCR-Produkte optimiert eingesetzt, Primersequenzen siehe Tabelle 2.6, eingesetzte Primermengen für einen Gesamtansatz von 25 µl siehe

Tabelle 2.8. Die Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 2.9 beschrieben, die entsprechenden Annealingtemperaturen und Größen der Amplifikationsprodukte in Tabelle 2.10. *c-Kit^{CreERT2}* wurde zum Teil mittels einer generellen *Cre*-PCR nachgewiesen, bei der die Gabra-Primer als interne Kontrolle dienen. Beim *R26*-Lokus diente die LSL-R26 PCR zum Nachweis der Anzahl der veränderten Allele im Lokus, während die R26^{DTA} PCR spezifisch das *R26^{DTA}* Allel aufzeigt. Das *R26^{mT-mG}* Allel kann nicht mittels oben genannter LSL-R26 PCR amplifiziert werden, der Nachweis erfolgte ausschließlich über die R26^{mT-mG} PCR.

DCD Nama	Primor	Eingesetzte	
FCR-Name		Primermenge (µI)	
c-Kit ^{CreERT2}	cKIT-KA-ATG-scUP2	0,6	
	cKIT-GT-mut-LP1	0,6	
	pIRES-UP2(1582)	0,5	
Cre-Generell	Cre-neu-UP	0,6	
	Cre-neu-LP	0,6	
	Gabra1-UP	0,6	
	Gabra1-LP	0,6	
LSL-R26	R26-GT-UP	0,5	
	R26-GT-SA-mut-LP	0,3	
	R26-GT-WT-LP	0,8	
R26 ^{mT-mG}	CAG-sc-LP	0,8	
	R26-GT-UP	0,5	
	R26-GT-WT-LP	0,8	
R26 ^{DTA}	R26-DTA-UP	0,6	
	R26-DTA -LP	0,6	
PKG1 ^{lox}	cGK1-UP	0,6	
	cGK1-LP	0,6	

Tabelle 2.8: Primermengen

Standard-PCR-Bedingungen			PCR-Bedingungen <i>c-Kit^{CreERT2}</i>		
95°C	5 Min		95°C	5 Min	
95°C	45 Sek		95°C	45 Sek	
55°C-66°C	1 Min	40x	58°C	1 Min	40x
72°C	1 Min 30 Sek		72°C	4 Min	
72°C	5 Min	1	72°C	5 Min	

Tabelle 2.9: PCR-Bedingungen

Tabelle 2.10: Annealingtemperaturen und Größen der PCR-Produkte

PCR-Name	Annealingtemperatur	Bandengröße
c-Kit ^{CreERT2}	58°C	330 bp (mut), 680 bp (WT)
Cre-Generell	58°C	390 bp (mut), 290 bp (Gabra)
LSL-R26	62°C	600 bp (WT), 310 bp (mut)
R26 ^{mT-mG}	62°C	650 bp (WT), 450 bp (mut)
R26 ^{DTA}	60°C	320 bp (mut), keine Bande (WT)
PKG1 ^{lox}	55°C	340 bp (mut), 280 bp (WT)

WT: Wildtyp, mut: mutiert, Gabra: interne Kontrolle

Die PCR-Produkte wurden bei 4°C bis zur Auftrennung mittels Gelelektrophorese gelagert. Diese erfolgte entsprechend der Bandengrößen auf 1,5 bis 2%igen Agarosegelen bei 115 V für 1,5 Stunden oder bis die Banden gut getrennt waren. Sowohl zum Ansetzen der Gele als auch als Laufpuffer wurde 1x TAE Puffer verwendet. Zur Detektion der DNA-Banden wurde sowohl dem Laufpuffer als auch den Agarosegelen eine entsprechende Menge einer 1 mg/ml Ethidiumbromidlösung zugegeben und die Gele mit einem UV-Transilluminationsgerät fotografiert. Zur Bestimmung der Bandengrößen diente ein mitgelaufener Marker (*GeneRuler*) von dem jeweils 20 µl aufgetragen wurden.

2.2.4 Tamoxifenbehandlung der Tiere

Zur Induktion der Cre-Rekombinase wurde den Tieren eine Tamoxifenlösung per oral (p.o.) verabreicht. Zur Herstellung der Lösung mit einer Endkonzentration von 2 mg Tamoxifen / 100 µl Lösung wurden 300 mg Tamoxifen (*free base*, Sigma) mit 1500 µl Ethanol (100 %) durch Schütteln vermischt und anschließend in 13,5 ml Erdnussöl (Sigma) vollständig gelöst. Die Lösung wurde alliquotiert und bis zu ihrer Verwendung lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Den Tieren wurde jeweils pro Versuchstag 4 mg / 30 g Körpergewicht p.o. mittels Knopfsonde zugeführt, wobei die Behandlung an drei bis maximal fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt wurde (siehe Zeitschema Abbildung 2.4). Teilweise wurde die

Tagesdosis auf zwei Behandlungen aufgeteilt und morgens und abends jeweils die halbe Dosis verabreicht, da dies von den Mäusen erfahrungsgemäß besser toleriert wurde. Ebenfalls aus diesem Grund wurde die Tamoxifenlösung zum Teil so angesetzt, dass sie die doppelte Konzentration des Tamoxifens enthielt und entsprechend einer Verabreichungsdosis von 4 mg / 30 g Körpergewicht eine geringere Menge appliziert. Die Tamoxifenbehandlung erfolgte sowohl bei Test- als auch bei Kontrolltieren unterschiedlichen Genotyps. Ebenfalls als Kontrollen dienten Tiere des Testgenotyps, die mit einer entsprechenden Menge der Erdnussöllösung mit Ethanol aber ohne den Wirkstoff Tamoxifen scheinbehandelt wurden.

Bei der Versuchstagbezeichnung entspricht Tag 1 (T1) dem ersten Tag der Verabreichung. Da die Tiere an maximal fünf Tagen induziert wurden, bedeutet eine größere Anzahl an Versuchstagen, dass nach den ersten fünf Tagen mit Behandlung ab T6 keine weitere Gabe erfolgte. Versuchstag 0 (T0) steht für unbehandelt bzw. vor der Behandlung.

Da Tamoxifen zu einer Gewichtsreduktion führt, wurde das Gewicht der Mäuse kontinuierlich überwacht (siehe hierzu exemplarische Daten in Abbildung 3.1). Wurden die Tiere nicht direkt nach der Tamoxifenbehandlung zur Durchführung von *ex vivo* Versuchen getötet, normalisierte sich der anfänglichen Gewichtsverlust einige Tage nach der letzten Behandlung, unabhängig vom Genotyp der Mäuse.

2.2.5 Organentnahme

Um die Organe der Tiere histologisch untersuchen oder für *ex vivo* Versuche verwenden zu können, wurden die Tiere entweder mittels Genickbruch (für Organbadversuche), Perfusion mit PFA nach Anästhesieren mit MMF (für Immunfluoureszenzfärbungen) oder einer Überdosis des Inhalationsnarkotikums Isofluran Forene[®] getötet. In allen Fällen erfolgte bei den in Rückenlage fixierten Tieren eine Laparotomie vom Schambein bis zum Rippenbogen, so dass anschließend die entsprechenden Organe entnommen werden konnten.

Bei Verwendung der Perfusionsmethode wurde den Tieren zur Betäubung 6 µl MMF pro Gramm Körpergewicht i.p. injiziert. Das Anästhesieren sowie die Abwesenheit des Schmerzempfindens wurde anhand des Zwischenzehenreflexes sichergestellt. Zur Perfusion wurde PFA (4% in PBS) in das schlagende Herz injiziert und anschließend die *Vena cava* durchschnitten um ein Abfließen des Blutes zu ermöglichen.

Zur weiteren Behandlung der Gewebe siehe die jeweilige Versuchsmethode.

2.3 Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

2.3.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Gewebsschnitte sowie *Whole Mount* Präparate wurden mit konfokalen Laser-Scanning Mikroskopen analysiert. Sowohl ein Zeiss LSM 510 Axiovert 100 Mikroskop, ausgestattet mit einem x20/0,5 Luft sowie einem x40/1,3 Immersionsöl Objektiv (optische Schnittdicke 4,4 mm), als auch ein Leica TCS SP5 DMI 6000 S Mikroskop, ausgestattet mit einem x20/0,7 Immersionsöl Objektiv (optische Schnittdicke 3 mm) bzw. einem x40/1,25 Immersionsöl Objektiv (optische Schnittdicke 1,5 mm) kamen zu Verwendung. Die Fluoreszenzaufnahmen, einzelne optische Schnitte durch das Gewebe oder Z-Stapel (Abstand der einzelnen Aufnahmen eines Z-Stapels 0,5 mm), hatten jeweils eine Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und eine Kantenlänge von 225 x 225 mm (Zeiss, x40/1,3 Objektiv), 450 x 450 mm (Zeiss, x20/0,5 Objektiv) bzw. 387,5 x 387,5 mm (Leica, x40/1,25 Objektiv) und 775 x 775 mm (Leica, x20/0,7 Objektiv). Die Aufnahmen wurden mit den entsprechenden Programmen Leica LAS AF (Aufnahmen das Leica Mikroskops) bzw. LSM Imagebrowser und AxioVision LE 4.3 (Aufnahmen des Zeiss Mikroskops) bearbeitet und exportiert.

2.3.2 Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten

Für histologische Untersuchungen wurden Abschnitte das Dünndarms und des Colons unter Verwendung einer Kanüle mit PBS ausgespült. Nach Fixierung in 4% PFA für 2 h bei 4°C, bzw. für 10 Minuten auf Eis bei Präparaten für Färbungen mit dem Antikörper gegen Ano,1 und einem Waschschritt (PBS, 4°C) wurden die Gewebe in Saccharoselösung entwässert (15% Saccharose in PBS für 4 h, 30% Saccharose in PBS über Nacht, beides bei 4°C) und in Tissue-Tek[®] (Miles, USA) eingebettet. Bei den Darmstücken erfolgte das Einbetten so, dass sowohl Quer- als auch Längsschnitte möglich sind. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Proben bei -80°C gelagert. Unter Verwendung eines Kryotoms wurden 10 – 30 µm dicke Schnitte hergestellt, die bis zu ihrer Verwendung bei -20°C lagerten.

Für die Färbungen wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet, in 4% PFA 1 Minuten nachfixiert, zwei Mal für 5 Minuten in PBS gewaschen und für eine Stunde mit 200 µl Blockierlösung (Lsg. A oder C, je nach verwendeten Antikörpern) inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 48 oder 72 Stunden bei 4°C in einer feuchten Kammer, wobei ein aufgelegter Parafilm vor Austrocknung schützte. Es wurden jeweils 100 µl einer Antikörperverdünnung (siehe Tabelle 2.5) in den entsprechenden Lösungen verwendet. Nach drei Waschschritten für jeweils 30 Min wurden die Schnitte im Dunklen mit dem entsprechenden sekundären Antikörper entweder 2 Stunden bei RT, über Nacht oder ebenfalls für 48 Stunden jeweils bei 4°C inkubiert. Für Doppelfärbungen konnte dasselbe Protokoll verwendet werden, da bei den Doppelfärbungen weder die Verteilung noch die Intensität der entsprechenden Einzelfärbungen verändert waren (Daten nicht gezeigt). Zellkerne wurden mit TO-PRO[®]-3-Jodid (1:1000) oder DAPI (1:250) gegengefärbt. Bei gleichzeitiger Färbung mit Antikörpern und Kernfärbung (TO-PRO[®]-3-Jodid bzw. DAPI) wurde dieses der Lösung mit den sekundären Antikörpern beigefügt. Wurde nur eine Kernfärbung durchgeführt, erfolgte die Inkubation für 2 Stunden im Dunklen bei RT. Nach drei abschließenden Waschschritten für 30 Minuten in den entsprechenden Waschlösungen und einem 10-minütigen Waschschritt in PBS wurden die Präparate mit Vectashield[®] und einem Deckglas eingedeckelt sowie mit schwarzem Nagellack versiegelt.

2.3.3 Bestimmung der Rekombinationseffizienz mittels Immunfluoreszenz

Die Bestimmung der ICC-Zahlen erfolgte an je drei Tiere pro Versuchsgruppe. Es wurden jeweils 30 Gesichtsfelder pro Tier ausgezählt, wobei mindestens zwei verschiedene Schnitte pro Tier für die Auswertung verwendet wurden. Alle Schnitte hatten eine Dicke von 30 µm. Bei der Auswahl der Gesichtsfelder wurde sichergestellt, dass keine schräg angeschnittenen Bereiche des Gewebes zur Verwendung kamen. Alle Zellzählungen erfolgten mit dem Zeiss Mikroskop und dessen 40-fach Objektiv. Als ICC wurden alle angefärbten Zellen (Antikörperfärbung oder EGFP-Fluoreszenz) gezählt, deren Zellkörper mit angefärbtem Zellkern im Gesichtsfeld sichtbar waren. Eine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen ICC-Typen wurde dabei nicht vorgenommen.

Rekombinationseffizienz Reportermodell c-Kit^{CreERT2/+};R26^{mT-mG}

Um die Rekombinationseffizienz der *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{mT-mG}* Mauslinie zu bestimmen wurden *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{mT-mG}* Tiere nach 3 Tagen Tamoxifenbehandlung (siehe 2.2.4) erlöst. ICC wurden mittels Antikörperfärbung gegen c-Kit detektiert und die Anzahl der c-Kit-IF-positiven und durch Rekombination EGFP-positiven Zellen im Colon, Dünndarm (Ileum) ausgewertet. Rekombinierte Zellen waren doppelt positiv, nicht-rekombinierte Zellen hingegen wiesen keine EGFP-Fluoreszenz auf. Als Kontrolle dienten *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{mT-mG}* Mäuse, die eine Erdnussöllösung ohne den Wirkstoff Tamoxifen (Vehikel) oral verabreicht bekommen haben. Eine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen ICC-Typen wurde nicht vorgenommen.

Rekombinationseffizienz Depletionsmodell c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA}

Um die Rekombinationseffizienz und somit die Effizienz der ICC-Depletion in der *c-Kit^{CreERT2/+}; R26^{DTA}* Mauslinie zu bestimmen wurden *c-Kit^{CreERT2}; R26^{DTA}* Tiere nach 3 Tagen Tamoxifen- bzw. Vehikelbehandlung erlöst. Die ICC wurden mittels Antikörperfärbung gegen c-Kit detektiert und die Anzahl der c-Kit-positiven Zellen pro Gesichtsfeld im Magen, Dünn-

und Dickdarm bestimmt. Dies erfolgte an den *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA}* Versuchsgruppen und an *c-Kit^{CreERT2/+}* sowie Wildtyp Kontrollgruppen. Eine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen ICC-Typen wurde nicht vorgenommen.

Rekombinationseffizienz Prkg1 knock-out Modell

Bei *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{lox/lox}* und *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{lox/+}* sowie Wildtyp Tieren als Kontrolle wurde die Anzahl der PKG1-positiven ICC bestimmt. Um die Rekombinationseffizienz und somit die *Prkg1*-Deletion zu bestimmen, wurden Tiere der oben genannten Gruppen nach fünftägiger Tamoxifen- oder Vehikelbehandlung erlöst. ICC wurden mittels Antikörperfärbung gegen c-Kit detektiert, *Prkg1*-Expression mittels Antikörperfärbung gegen PGK1 (der Antikörper wurde von Prof. Hofmann zur Verfügung gestellt). Die Anzahl der sowohl c-Kitpositiven als auch PKG1-positive Zellen pro Gesichtsfeld im Colon wurde bestimmt. Eine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen ICC-Typen wurde nicht vorgenommen.

2.3.4 Immunfluoreszenz an *Whole Mount* Präparaten des Darms

Für die Präparation von *Whole Mounts* wurden die Tiere nicht perfundiert, sondern nur Proben von proximalem Colon und distalem lleum entnommen und bei Raumtemperatur in PBS gelegt. Die Darmstückchen wurden an ihnen Enden mittels Minutiennnadeln (Bioform) auf einer mit Sylgard[®] (Dow Corning, USA) beschichteten Petrischale befestigt, im Bereich des Mesenteriums längs aufgeschnitten und mit PBS ausgespült. Mit der mukosalen Seite nach oben wurde das Gewebe mit weiteren Insektennadeln flach aufgespannt. Unter Verwendung eines Stereomikroskops (OPMI 1-FC, Zeiss) und Präzisionspinzetten (Fine Science Tools) wurde die Mukosa abpräpariet, so dass nur die Muskelschichten und Plexus übrig blieben. Diese Gewebsstücke wurden für 30 Minuten bei 4°C in 4% PFA fixiert und anschließend einige Male mit PBS gewaschen. Bei den Colon-Präparaten wurde zum Teil im Anschluss an die Fixierung zudem der submukosale Plexus ab präpariert um eine bessere Färbung zu gewährleisten.

Zur Färbung der *Whole Mount* Präparate wurden diese für 1 Stunde in Lösung O (3% BSA in PBS) unter schütteln blockiert bevor die primären Antikörper (Tabelle 2.5) ebenfalls in Lösung O zugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte für mindestens 48 Stunden unter ständigem Schütteln bei 4°C. Nach drei Waschschritten für jeweils 5 Minuten wurden die *Whole Mounts* im Dunklen mit den entsprechenden sekundären Antikörpern über Nacht oder ebenfalls für bis zu 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Zellkerne wurden mit TO-PRO[®]-3-Jodid (1:1000) oder DAPI (1:250) gegengefärbt. Wurde nur die Kernfärbung durchgeführt, erfolgte die Inkubation unter ständigem Schütteln für 2 Stunden im Dunklen bei RT oder ebenfalls über Nacht bei 4°C. Bei gleichzeitiger Kernfärbung bei Verwendung von sekundären

Antikörpern wurde TO-PRO[®]-3-Jodid beziehungsweise DAPI der Färbelösung mit den sekundären Antikörpern beigefügt. Nach drei abschließenden Waschschritten für jeweils 5 Minuten unter Schütteln in PBS wurden die Präparate unter einem Stereomikroskop (OPMI 1-FC, Zeiss) auf Objektträger gelegt und mit Vectashield[®] und einem Deckglas eingedeckelt sowie mit schwarzem Nagellack versiegelt und bei 4°C gelagert.

2.3.5 Immunfluoreszenz an Whole Mount Präparaten der Haut

Um Mastzellen in der Haut anzufärben wurden die Ohren der entsprechenden Mäuse verwendet (Heger et al., 2013). Die Tiere haben an den Ohren nur wenige Haare, die aufgrund von Eigenfluoreszenz störend für Fluoreszenzaufnahmen wären. Mittels Präzisionspinzetten wurden ventrale und dorsale Hautschicht der Ohren auseinandergezogen und getrennt. Die Schicht ohne Knorpel wurde für die Färbung verwendet. Dazu wurden die Gewebe in 1% PFA über Nacht bei 4°C fixiert. Nach einer Inkubation in Lösung O (1% BSA in PBS, 1 Stunde bei RT unter Schütteln) erfolgte die Färbung der Mastzellen mit Avidin-Texasrot (Invitrogen, 1:500 in Lösung O) (Bergstresser et al., 1984) für 90 bis 120 Minuten auf einem Horizontalschüttler. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mittels Zugabe von TO-PRO[®]-3-Jodid (1:1000) zu der Färbelösung. Nach drei Waschschritten für jeweils 5 Minuten unter Schütteln in PBS wurden die Präparate auf Objektträger gelegt und mit Vectashield[®] und einem Deckglas eingedeckelt sowie mit schwarzem Nagellack versiegelt. Zur Bestimmung der Anzahl der Mastzellen wurden die Ohren von 3 Mäusen pro Genotyp und Zeitpunkt verwendet und jeweils 15 Gesichtsfelder pro Tier analysiert. Die Zählung erfolgte am konfokalen Lasermikroskop (Zeiss LSM 510) unter Verwendung des x20/0,5 Luftobjektivs.

2.4 Gastrointestinale Motilität in vivo

2.4.1 Bestimmung der Gesamttransitzeit mit Karminrot

Die gastrointestinale Gesamttransitzeit *in vivo* wurde mit dem Lebensmittelfarbstoff Karminrot gemessen, der den Versuchstieren oral verabreicht wurde. Dazu wurde jedem Tier 100 µl einer Karminrotsuspension (60 mg Karminrot pro 1 ml 0,05%ige (w/v) Methylzellulose in PBS) mit einer Knopfsonde p.o. verabreicht. Die Versuchstiere wurden einige Zeit nach der Farbstoffgabe getrennt, in separate Käfige gesetzt und beobachtet bis ein rot gefärbter Stuhl zu sehen war. Die Zeit von der Farbstoffgabe bis zu Ausscheidung des ersten angefärbten Stuhls wurde gestoppt. Diese gemessene Zeit ist die Gesamttransitzeit des entsprechenden Tiers. Um einen Einfluss von interindividuellen Unterschieden auszuschließen erfolgte für jedes Tier separat eine Basismessung der Gesamttransitzeit. Die Basiszeit des unbehandelten Tiers wurde als Referenzwert zur Kalkulation der Transitzeitveränderung nach Tamoxifenbehandlung verwendet. Um einen Einfluss von z.B. Cre-Toxizität auszuschließen, wurde die Gesamttransitzeit sowohl bei den Versuchsgruppen mit depletierten Cajal-Zellen bzw. deletiertem PKG1-Protein als auch bei verschiedenen Kontrollgruppen gemessen. Die Gesamttransitzeitmessung erfolgte an Versuchs- und entsprechenden Kontrolltieren sowohl des Depletionsmodells *c-Kit^{CreERT2/+}*; *R26^{DTA}* als auch des *Prkg1 knock-out* Modells bei 4 bis 7 Tieren pro Gruppe.



Abbildung 2.4: Zeitschema der Tamoxifenbehandlung und Gesamttransitzeitmessung Schwarze Pfeile kennzeichnen Versuchstage mit Tamoxifenbehandlung, rote Pfeile Tage mit Karminrotgabe zur Bestimmung der Transitzeit.

2.4.2 Messung der Magenentleerung und des Dünndarmtransits

Die Magenentleerung und der Dünndarmtransit wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Indocyaningrün (ICG, Pulsion Medical Systems) gemessen, der den Tieren mittels Knopfsonde p.o. verabreicht wurde. 60 Minuten nach der Gabe von 100 µl einer 1:500 Verdünnung des Farbstoffs wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran und Genickbruch erlöst und nach zügiger Laparotomie Magen und Darm zusammenhängend entnommen. 70 Minuten nach der ICG-Gabe wurde der GI-Trakt auf dem Odyssey[®] Imagingsystem (LI-COR Bioscience) gescannt. Zur Bestimmung der prozentualen Magenentleerung wurde mit der Odyssey Application Software 1.2 analysiert, wie viel Fluoreszenzsignal sich anteilig noch im Magen befindet. Der prozentuale Dünndarmtransit wurde aus der Länge des Fluoreszenzsignal enthaltenden Dünndarms im Verhältnis zur Länge des gesamten Dünndarms berechnet. Da für diese Messung die Tiere getötet werden mussten, konnte nicht an denselben Tieren eine Bestimmung vor und nach Induktion stattfinden. So wurde der Versuch einerseits mit unbehandelten Mäusen und andererseits mit Tieren nach dreitägiger Tamoxifenbehandlung durchgeführt, es wurden jeweils 3 bis 4 Tiere pro Gruppe untersucht.

2.4.3 Messung der Colontransitzeit, Colonexpulsionstest

Zur Bestimmung des Colontransits wurde der Colonexpulsionstest angewandt (Raffa et al., 1987; Broccardo et al., 1998; Radzievsky et al., 2002). Dabei wurde mit Isofluran leicht betäubten Mäusen eine Metallkugel (Durchmesser 2,5 cm) 2 cm weit in das Colon eingeführt und die Zeit gemessen, die es dauerte, bis die Kugel wieder ausgestoßen wurde. Um einen Einfluss von interindividuellen Unterschieden auszuschließen erfolgte für jedes Tier separat eine Basismessung vor Tamoxifenbehandlung. Zudem erfolgte die Messung pro Tier als Triplikat an 3 aufeinander folgenden Tagen: 3 Tage vor Tamoxifengabe sowie während der 5-tägigen Behandlung an den Tagen 3, 4 und 5. Um individuelle Schwankungen zu minimieren wurde aus den Triplikaten der Messwerte jeweils der Mittelwert gebildet. Die Basiszeit eines jeden Tiers wurde als Referenzwert zur Kalkulation der veränderten Expulsionszeit nach Tamoxifenbehandlung verwendet.

2.5 Messung der Muskelkontraktionen ex vivo im Organbad

Zur Analyse der Muskelkontraktionen ex vivo im Organbad (Labor Prof. Schemann) wurde der gesamte Darm entnommen und sofort in eiskalte Krebslösung gelegt. Für diesen Versuch wurden sowohl lleum, ein Bereich ca. 2 cm proximal des Caecums, als auch distales Colon verwendet. Die entsprechenden Darmstückchen wurden an ihnen Enden mittels Minutiennadeln auf einer mit Sylgard[®] beschichteten Petrischale befestigt, im Bereich des Mesenteriums längs aufgeschnitten und mit Krebslösung ausgespült. Im Verlauf der weiteren Präparation erfolgte alle 10 Minuten ein Austausch der eiskalten Krebslösung. Das mit weiteren Insektennadeln mit der mukosalen Seite nach oben befestigte Gewebe wurde entlang der Zirkulärmuskulatur in ca. 1 cm lange Abschnitte unterteilt. Unter Verwendung eines Stereomikroskops (Olympus SZ30) wurde an beiden Enden Fäden angebracht, die zur Befestigung im Organbad dienen. Die Präparation erfolgte so, dass die Zirkulärmuskulatur längs verläuft. Die präparierten lleum- bzw. Colonsegmente wurden jeweils in ein mit 25 ml begaster (95% O₂, 5% CO₂), 37°C warmer Krebslösung befülltes Organbad platziert. Das eine Ende des Präparates war dabei an einem fixierten Haken befestigt und das andere Ende über einen Faden mit einem isometrischen Kraftaufnehmer (FSG-01, Experimenta) verbunden. Dieser stand mit einem Brückenverstärker (Quadbridge) und einem digital/analog-Konverter (MacLab/4S, AD Instruments) in Kontakt. Rechts und links des Präparats befanden sich Platinelektroden, die an einem Grass SD9 Stimulator (Grass Instruments) angeschlossen waren, was eine elektrische Stimulation möglich machte (siehe Abbildung 2.5). Die Kontraktionen des Gewebes wurden mit der Chart 4.2 Software (AD Instruments) aufgezeichnet und analysiert.





Abbildung 2.5: Aufbau des vertikalen Organbads

a: Foto des Organbadsystems im Labor von Prof. Schemann: Vierkammerorganbad (links) mit angeschossenem Stimulator (mitte oben) sowie Brückenverstärker und PC zur Aufzeichnung der Messungen (rechts). (Foto: Sabine Klein) **b:** Schemazeichnung einer Kammer des Organbads mit eingespanntem Präparat, Begasung und Elektroden zur Stimulation des Präparats.



Abbildung 2.6: Auswertungsschema der Reaktion des Colons nach elektrischer Feldstimulation im Organbad

a und **b**: Aufgezeichnete Muskelkontraktionen eines repräsentativen Colonpräparats im Organbad. Neben schwachen spontanen Kontraktionen reagierten die Zellen der Zirkulärmuskelschicht auf elektrische Feldstimuation (EFS). Bei jedem Präparat wurden mehrere Stimulationen im Abstand von 7 Minuten durchgeführt, die Dauer einer jeden Stimuation betrug 10 Sekunden. **b**: Die physiologische Antwort des Gewebes während der Stimulation wird als on-Antwort bezeichnet, die Reaktion nachdem diese bereits beendet ist als off-Antwort. Bei allen Colonpräparaten war die off-Antwort eine Kontraktion der Zirkulärmuskulatur. Zur Bestimmung der Kontraktionsstärke (ΔmN) wurde der Unterschied zwischen dem höchsten Punkt der off-Antwort und dem Basiswert des jeweiligen Präparats vor EFS ausgewertet.

Nach dem Einbau der Präparate in das Organbad wurden sie mit einer Vorspannung von 15 mN für 30 Minuten equilibriert. Alle für die Versuche verwendeten Darmstücke waren vital

und reagierten auf elektrische Feldstimulation (EFS), die zu Beginn eines jeden Experiments durchgeführt wurde. Alle Stimulationen erfolgten für 10 Sekunden mit Pulsabständen von 0,6 Millisekunden und einer konstanten Spannung von 10 Hz.

Das lleum zeigte *ex vivo* deutliche phasische Kontraktionen. Zu deren Analyse wurde jeweils eine Minute der aufgezeichneten Spur herangezogen und Frequenz sowie Standardabweichung der Amplitude ausgewertet (n=8 bis 9 pro Genotyp). Zur Bestimmung der Rhythmizität der Kontraktionen wurde jeweils eine Minute der Spuren analysiert und in diesem Bereich der Abstand zwischen den einzelnen Kontraktionen gemessen (n=11). Kontraktionen mit gleichem Abstand wurden als rhythmisch definiert und die Anzahl der rhythmischen Kontraktionen pro Minute bestimmt. Bei allen Parametern wurden pro Versuchstier Triplikate ausgewertet und daraus der Mittelwert gebildet.

Beim distalen Colon, das im Gegensatz zum Ileum nur geringe, unregelmäßigere spontane Kontraktionen aufweist, wurde die Reaktion der Präparate auf EFS ausgewertet (n=6 bis 7 Tiere pro Genotyp), eine exemplarische Spur ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Als on-Antwort, dies bezeichnet die Reaktion während der Stimulation, wurde bei allen Messungen, eine geringe Relaxation festgestellt, unabhängig vom Genotyp der Versuchstiere. Nach der Stimulation (off-Antwort) reagierten alle Colonpräparate jeweils mit einer Kontraktion deren Stärke ausgewertet wurde. Für jedes Tier wurde aus drei im Abstand von 7 Minuten erfolgten EFS der Mittelwert gebildet. Sowohl die on- als auch die off-Antwort setzte bei allen Stimulationen ein bis zwei Sekunden nach Beginn bzw. Ende der Stimulation ein (siehe Abbildung 2.6 b), so dass für die Auswertung dieser Zeitversatz berücksichtigt wurde.

2.6 Elektrophysiologe – intrazelluläre Ableitungen

Die elektrophysiologischen Untersuchungen zur Analyse der *slow waves* und der Junktionspotentiale in den Muskelzellen der zirkulären Muskelschicht wurden von Herrn PD Dr. Andrei Sibaev (LMU, München) nach der von ihm etablierten Methode an Ileum und proximalem Colon durchgeführt (Sibaev et al., 2003; Storr et al., 2004; Sibaev et al., 2009). Nifedipin (1 mM), ein Calciumantagonist welcher die *slow waves* nicht beeinflusst (Ward et al., 1994), sowie die elektrischen Eigenschaften der neuromuskulären Transmission nicht wesentlich verändert, war während einiger Experimente zugegen um eine Überlagerung der Messungen durch Spontanbewegungen herabzusetzen (Sanders & Smith, 1986; De Ponti et al., 1989). Die Anregung der Neuronen erfolgte mit einem Einzelpuls (15 V für 0,3 ms) über Platinelektroden, die mit einem Stimulator (Grass S11, Grass, Instruments) und einer Stimulationseinheit (Grass SIU59, Grass Instruments) verbunden waren und sich senkrecht zur Zirkulärmuskelschicht befanden. Diese elektrische Feldstimulation (EFS) der Neuronen

löste Veränderungen im Ruhemembranpotential (RMP) der Muskelzellen aus, die gegen eine in der Krebslösung platzierten Ag-AgCl Erdungselektrode gemessen wurden. Der gesamte Versuchsaufbau, wie das Einbringen der Platinelektroden und nach der Äquilibrationsphase (90 bis 120 Minuten) das Einstechen der Glaskapillare, fanden in einem Faradayschen Käfig (Dr. Sibaev) statt. Aufbau des Setups siehe Abbildung 2.7.



Abbildung 2.7: Aufbau der Messapparatur für die Elektrophysiologie Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Durchführung der Elektophysiologiemessungen von Herrn Dr. Sibaev. (PD Dr. Andrei Sibaev, LMU, München)

Kapillarglasmikroelektroden (Borosilikat Glas Kapillare, 1.0 mm OD x 0.58 mm ID Clark Electromedical Instruments) wurden von Dr. Sibaev mit einem Mikroelektrodenpuller (Model P-97, 3 mm Heizfaden; Sutter Instrument Co) gezogen und mit KCL (3 M) angefüllt, sodass sie einen Widerstand im Bereich von 100-150 mΩ hatten. Die ausgelösten elektrischen Veränderungen wurden verstärkt (DUO733 *microelectrode amplifier*, World Precision Instruments) und mit einem digital/analog Konverter (SCB 68 interface, National Instruments) aufgezeichnet. Die ständige Aufzeichnung des Membranpotentials erfolgte mit der Software LABVIEW 5.0 (National Instruments) (Sibaev, 2003). Für Messungen unter NANC-Bedingungen wurde der Krebslösung Atropin (1 mM) und Guanethidin (1 mM, beides Sigma-Aldrich) zugesetzt. Bei einigen Versuchen wurde zudem der NOS-Inhibitor L-NG-nitroarginin

(L-NNA, Sigma-Aldrich) mit einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. In allen Experimenten erfolgte die Messung an Muskelzellen von 3 Tieren pro Genotyp.

2.7 Bestrahlung und Knochenmarktransplantation

Für Transplantationsexperimente wurden Mäuse des Depletionsmodells (*c-Kit^{CreERT2};R26^{DTA}*) sowie mit Tamoxifen behandelte Tiere mit Fluoreszenzreporter (*c-Kit^{CreERT2};R26^{mT-mG}*) einer Ganzkörperbestrahlung mit Hochenergiestrahlung von 9 Gray für 3 Minuten ausgesetzt (6 MeV Röntgenstahlungseinheit, Siemens). Innerhalb von drei Stunden nach Bestrahlung erhielten die Empfängertiere Knochenmark von WT Spendertieren. Diesen wurden zur Gewinnung des Knochenmarks die beiden Oberschenkelknochen (Femur) entnommen und von Muskelresten befreit. Die Öffnung der Knochen zur Knochenmarksisolation erfolgte durch Abschneiden der beiden Knochenenden. Dann wurde das Knochenmark unter Verwendung einer mit sterilem PBS gefüllten Spritze herausgespült. Nach Filtration um eventuell enthaltene Knochensplitter zu entfernen und Zentrifugation wurden die Zellen eines Tiers in 100 μl DMEM Medium welches 10% FCS enthielt aufgenommen. Jeweils ein bestrahltes Tier erhielt mittels Schwanzveneninjektion die Zellen eines Spendertieres.

Vier Wochen nach der Knochenmarkstransplantation wurden die Tiere des Depletionsmodells mit Tamoxifen behandelt und ihre Gesamttransitzeit wie zuvor beschrieben mit Karminrot bestimmt (siehe 2.4.1) bzw. die Mastzellen der Haut analysiert (siehe 2.3.5).

2.8 Statistik

Statistische Analysen und Vergleiche der Datensets wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5 Software (La Jolla, USA) durchgeführt. Die Anzahl der Versuchstiere (n), die zur Ermittlung der Daten ist jeweils angegeben, die Daten sind stets als Mittelwert und Standartabweichungen (Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student t-Test (*unpaired two-tailed Student's t-test*) berechnet und ein p-Wert von 0,05 oder geringer als statistisch signifikant angesehen. Die erhaltenen p-Werte (p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***)) wurden in den Abbildungen angegeben. Bei multiplen Tests innerhalb eines Datensatzes wurde eine ANOVA (*Analysis of variance*) mit Bonferroni-Korrektur angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Zeitspezifische genetische Manipulation von ICC in adulten Mäusen

Um die Hypothese, dass interstitielle Zellen von Cajal essentiell für die Signalweiterleitung von enterischen Neuronen zu den Zellen der glatten Muskulatur sind zu testen, waren Untersuchungen der Darmwand *in vivo* und *ex vivo* der adulten Versuchstiere nötig. Damit genetische Manipulationen spezifisch in den c-Kit-positiven ICC herbeigeführt und analysiert werden konnten, wurde das Cre/*lox*P System verwendet und in der Arbeitsgruppe die *c*-*Kit*^{CreERT2} Maus generiert, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde (Klein et al., 2013).

In den Versuchstieren wird die Cre-Rekombinase spezifisch in c-Kit exprimierenden Zellen durch Behandlung der Mäuse mit Tamoxifen aktiviert. Dies hatte bei den behandelten Tieren einen Gewichtsverlust zur Folge, der bei Scheinbehandlung nicht auftrat (siehe Abbildung 3.1). Diese Nebenwirkung wird auf das Tamoxifen und dessen systemische Wirkung zurückzuführen sein, da der Befund unabhängig vom Genotyp der Tiere und ebenso bei WT Tieren auftrat. Die Gewichtsveränderung von etwa zwei Gramm hatte keine weiteren Auswirkungen auf die durchgeführten Versuche. Wurden die Tiere nicht direkt im Anschluss an die Tamoxifenbehandlung zur Durchführung eines Versuchs euthanasiert, normalisierte sich das Körpergewicht wieder (Daten nicht gezeigt). Tiere mit zu gravierendem Gewichtsverlust wurden gemäß den Vorgaben der Ethikkommission euthanasiert.



Abbildung 3.1: Gewichtsverlust der Versuchstiere bei Tamoxifenbehandlung

Tamoxifenbehandlung führt bei allen Versuchstieren zu einer Reduktion des Körpergewichts. Dargestellt ist die Veränderung des Körpergewichts an letzten Tag einer fünftägigen Behandlung im Verhältnis zum jeweiligen Körpergicht eines Tieres vor Beginn der Behandlung mit Tamoxifen (+ TAM) bzw. Vehikel (+ Veh.). Der Gewichtsverlust trat bei Tieren mit allen untersuchten Genotypen auf, abgebildet sind hier nur die Messwerte für Tiere der ICC-Depletionsversuche (siehe hierzu 3.2). Nur bei scheinbehandelten Mäusen trat kein derartiger Gewichtsverlust auf. (n=20 für *c-Kit*^{CreERT2/+};*R26*^{DTA/+} + TAM; n=5 bis 8 für die anderen Gruppen; ***: p<0,001, Student t-Test).

Kreuzt man *c-Kit^{CreERT2}* Tiere mit einer Mauslinie die den doppelten Fluoreszenzreporter *R26^{mT-mG}* enthält (Kreuzungsschema siehe Abbildung 3.2 a), erfolgt nach Tamoxifengabe ein Umschalten von der Expression des Fluoreszenzproteins tdTomato zu EGFP, so dass die c-Kit-positiven Cajalzellen dann eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Anhand von

mikroskopischen Aufnahmen waren somit die ICC zwischen den nicht rekombinierten anderen Zellpopulationen des Darms in Darmquerschnitten erkennbar (Abbildung 3.2 b). Insbesondere bei *Whole Mount* Präparaten der Darmmuskulatur wurde das Netzwerk der Cajalzellen sehr gut sichtbar (Abbildung 3.2 c bis e).



Abbildung 3.2: Zeitspezifische genetische Manipulation von ICC

a: Kreuzungsschema um in ICC das Reportergen EGFP (*enhanced* Variante des GFP) zu exprimieren. **b**: Durch Tamoxifen-Behandlung der Tiere wird die Cre^{ERT2}-vermittelte Expression von EGFP induziert. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von TAM-behandelten (+TAM) und Scheinbehandelten (-TAM) Tieren, Colonlängsschnitte. **c**: Visualisierung des ICC-Netzwerks mittels repräsentativen konfokalmikroskopischen Aufnahmen von *Whole Mount* Präparaten (oben: Ileum, unten: Colon, myentierischer Plexus). **d** und **e**: Mit dem *c-Kit*^{CreERT2/+}-Allel wurden die verschiedenen Klassen von ICC manipuliert, alle ICC exprimieren *c-Kit*. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *Whole Mouts* des Ileums (**d**) und Colons (**e**) zeigen EGFP-positive Zellen in der Region des myenterischen Plexus (ICC-MY), innerhalb der Muskulatur zwischen den Glattmusklezellen (ICC-IM) sowie im Bereich des submukosalen Plexus (ICC-SMP bzw. ICC-DMP). Grün: Expression von EGFP in rekombinierten Zellen, Rot: Expression von tdTomato in nichtrekombinierten Zellen, Blau: Kernfärbung (ToPro-3). Maßstab: 50µm. (nach Klein et al., 2013).

Um die Rekombinationseffizienz des Reporterkonstrukts bei dieser Mauslinie zu untersuchen wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die sowohl EGFP-positiv als auch c-Kit-IF-positiv (Antikörper gegen c-Kit) waren (siehe Abbildung 1.5 und Abbildung 3.3). Die Quantifizierung der doppeltpositiven Zellen ergab sowohl für Dünndarm (Ileum) als auch für Colon eine

Rekombinationseffizienz von über 90% (Abbildung 3.3). Dies zeigte, dass die *c-Kit^{CreERT2}* Maus ein geeignetes Modell für die Untersuchung von die Cajalzellen betreffenden Fragestellungen ist.



Abbildung 3.3: Rekombinationseffizienz der *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{mT-mG/+}* Maus

a: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von murinen Colonschnitten zeigen eine Kofärbung (gelb) der ICC durch c-Kit-Immunfluoreszenz (IF) (rot) und TAM-induzierte EGFP Expression (grün). Die Zellkerne wurden mit ToPro-3 gegengefärbt (blau). Maßstab: 50 µm bzw. 25 um bei den Vergrößerungen. b: Quantifizierung der TAM-induzierten Rekombination des R26^m Allels. Sowohl im Dünndarm (links) als auch im Colon (rechts) wiesen c-Kit-IF positive ICC eine Rekombinationsfrequenz von über 90% auf (Dünndarm 92,8%, Dickdarm 94,7%). rek: EGFP und c-Kit-IF doppeltpositive Zellen; nicht-rek: c-Kit-IF einfachpositive Zellen; Scheinbehandelte Tiere (-TAM) wiesen keine rekombinierten Zellen auf. (Mittelwerte ± SEM, n = 3 pro Gruppe, 30 repräsentative Gesichtsfelder pro Tier). (nach Klein et al., 2013)

3.2 ICC Depletionsmodell *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}*

Zur Untersuchung der Rolle der ICC in der Neurotransmission wurde die *c-Kit^{CreERT2}* Maus mit *LSL-R26^{DTA/+}* Tieren gekreuzt. Durch die bei dieser Mauslinie im *Rosa26*-Lokus enthaltene konditional aktivierbare DTA-Expressionskassette wird das latent vorhandene Diphtherietoxin A (DTA) erst durch Tamoxifengabe aktiviert (Abbildung 3.4 a und siehe 2.2.2). Nachdem diese Tiere für drei Tage mit Tamoxifen behandelt wurden, konnte anhand von c-Kit-Immunfluoreszenzfärbungen eine Depletion der ICC im Magen, Dünn- und Dickdarm festgestellt werden (Abbildung 3.4 b und c). Die Quantifizierung ergab eine signifikante Depletion von über 50% des ICC-Netzwerks (Abbildung 3.4 d). Mit Immunfluoreszenzfärbung gegen Ano1 (Anoctamin 1), ein weiteres in Cajalzellen exprimiertes Protein und somit ein weiterer Marker für Cajalzellen (Gomez-Pinilla et al., 2009) wurde die Depletion der ICC verifiziert. So konnte die verminderte Zellzahl unabhängig von c-Kit nachgewiesen werden (Abbildung 3.4 e und f).



Abbildung 3.4: *c-Kit*^{CreERT2/+};*R*26^{DTA/+}: Depletion der ICC

a: Kreuzungsschema um ICC durch konditionale Expression von Diphtherietoxin A (DTA) in adulten Mäusen zu depletieren. **b** und **c**: c-Kit-IF-Färbung (rot) und Kerngegenfärbung mit ToPro-3 (blau). **b**: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten des Magens, Dünn- und Dickdarms von Tieren mit depletierten ICC (*c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* + TAM), scheininduzierten Tieren des selben Genotyps und weiteren Kontrollen. **c**: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von *Whole Mount* Präparaten von Tieren mit depletierten ICC (+TAM) und scheininduzierten Tieren des selben Genotyps (-TAM). Die Aufnahmen zeigen myenterischen Plexus des Colons. **d**: Quantifizierung der Cajalzellen mittels c-Kit-IF im Magen, Dünn- und Dickdarm nach TAM- oder Scheinbehandlung für 3 Tage bei Tieren der angegebenen Genotypen. (Mittelwerte ± SEM; n=3 pro Gruppe; 30 repräsentative Gesichtsfelder pro Tier; ***: p<0,001, Student T-Test) **e** und **f**: Ano1-Immunfluoreszenz. **e**: c-Kit und Ano1 Doppelfärbung zeigt eine Kolokalisation der beiden Antikörper. **f**:

Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von Ano1-IF-Färbungen an Gefrierschnitten des Dünn- und Dickdarms von Tieren mit depletierten ICC (*c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* + TAM), scheininduzierten Tieren desselben Genotyps und weiteren Kontrollen. Rot: c-Kit-IF, Grün: Ano1-IF, Blau: Kerngegenfärbung mit ToPro-3. Maßstab: 50 µm. (teilweise nach Klein et al., 2013)



Abbildung 3.5: Depletion der ICC führt zu Störung der Motilität

a: Verlängerung der gastrointestinalen Transitzeit nachdem die Tiere der angegebenen Genotypen für 3 Tage mit Tamoxifen (+TAM) oder zum Schein (+Veh.) behandelt wurden. (n=5-7; ***: p>0,001; Student T-Test) **b**: Verlängerung der gastrointestinalen Transitzeit nach Rekonstitution des Knochenmarks durch Transplantation von WT-Knochenmark (KMT) bei *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Mäusen und Kontrolltieren, die mit Tamoxifen (+TAM) behandelt wurden (n=4-7; n.s.: nicht signifikant; **: p<0,01, Student T-Test). **c-e**: Messung der Magenentleerung und des Dünndarmtransits mit Indozyaningrünfluoreszenz. **c**: Magenentleerung der Tiere entsprechend angegebenem Genotyp (n=3-4; *: p<0,05, Student T-Test). **d**: Repräsentative Abbildung des Indozyaningrüntrasits bei TAM-und scheinbehandelten (Veh.) Tieren der angegebenen Genotypen. **e**: Dünndarmtransit (n=3-4; *: p<0,05, Student T-Test). **f**: *in-vivo* Messung des Dickdarmtransits. Dargestellt ist die Veränderung der Colonexpulsionszeit nach Tamoxifenbehandlung (+TAM) bei Tieren der angegebenen Genotypen (n=10-11; *: p<0,05, Student T-Test). Alle Graphen zeigen Mittelwerte ± SEM. (nach Klein et al., 2013)

3.3 Akute Depletion der ICC beeinträchtigt die gastrointestinale Motilität

Bei Tieren mit ICC-Depletion wurde die Auswirkung dieser Beeinträchtigung des ICC-Netzwerks auf die gastrointestinale Transitzeit analysiert. Die *in vivo* Messungen der gastrointestinalen Gesamttransitzeit zeigten, dass ein partieller Verlust der ICC eine sehr stark beeinträchtige Motilität zur Folge hatte. So wiesen bei der Transitzeitmessung mit dem oral verabreichten Farbstoff Karminrot die Depletionstiere (mit Tamoxifen behandelten *c*-*Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Mäuse) eine um mehr als fünf Stunden verzögerte Gesamttransitzeit auf. Bei den Kontrollgruppen war nur eine sehr geringe Transitverzögerung festzustellen, die vermutlich auf stressbedingten Reaktionen und Schwankungen basiert (Abbildung 3.5 a). Des Weiteren wurde der Transit in verschiedenen funktionellen Regionen des GI-Trakts bestimmt, um zu klären, ob die Depletion der Cajalzellen unterschiedliche Auswirkungen auf die einzelnen Abschnitte hat. Dazu wurden Magenentleerung und Dünndarmpassage gemessen, indem den Tieren ein Fluoreszenzfarbstoff oral verabreicht wurde. *Ex vivo* erfolgte die Bestimmung der Verteilung der Fluoreszenz in Magen und Dünndarm. Zur *in vivo* Bestimmung des Colontransits wurde der Kugelexpulsionstest eingesetzt (siehe 2.4.3). Abbildung 3.5 c bis f zeigt, dass in allen untersuchten Regionen des GI-Trakts eine signifikante Transitverzögerung auftrat.

Diese Befunde stimmen mit Untersuchungen an W/W^v Tieren (siehe 1.3.2) überein, die ebenfalls sowohl eine reduzierte Anzahl an Cajalzellen als auch eine schwerwiegende Störung der gastrointestinalen Motilität aufweisen (Huizinga et al., 1995; Sanders & Ward, 2007).

3.4 Effektive Depletion von Mastzellen *in vivo*

Da adulte Mastzellen ebenso wie ICC *c-Kit* exprimieren (Kitamura et al., 1978; Horie et al., 1993) werden auch diese bei Verwendung des *c-Kit*^{CreERT2/+}; $R26^{DTA/+}$ Mausmodells depletiert. So führte eine Tamoxifenbehandlung bei diesen Tieren ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der in der Haut vorkommenden Mastzellen (Abbildung 3.6 a und b).

In der Literatur wird ein Einfluss von Mastzellen auf den gastrointestinalen Transit diskutiert (Trapero-Marugan et al., 2011). Um eine Rolle der Mastzellen in dem vorliegenden Depletionsmodell auszuschließen, wurden die vorhandenen manipulierbaren Mastzellen durch Bestrahlung der Mäuse entfernt (Abbildung 3.6 c) und das Knochenmark dieser durch Transplantation von WT-Knochenmark rekonstituiert. Im Anschluss an die Repopulation der Mastzellen wurde untersucht, ob dies eine Auswirkung auf die Gesamttransitverzögerung hatte. Drei Tage nach Depletion der ICC durch TAM-Behandlung zeigten *c*-*Kit*^{CreERT2/+};*R26*^{DTA/+} Tiere mit rekonstituierten Mastzellen eine ähnlich verzögerte Passagezeit, wie sie in Mäusen ohne Knochenmarkstransfer beobachtet wurde (Abbildung 3.6 b). Somit konnte nachgewiesen werden, dass Mastzellen im vorliegenden Versuchsmodell keine Auswirkung auf die gemessene Transitverzögerung haben.

3.5 Depletion der ICC führt zu einem Verlust der *slow wave*-Aktivität im lleum und dysrhythmischen Muskelkontraktionen

Um zu untersuchen, ob die verzögerte gastrointestinale Motilität in TAM-behandelten *c-Kit*^{CreERT2/+};*R26*^{DTA/+} Mäusen auf beeinträchtigte *slow wave*-Aktivität zurückzuführen ist, wurden die Kontraktionen der Dünndarmmuskulatur und die elektrische Aktivität des Dünndarms untersucht (Abbildung 3.7). Bei der Messung der Kontraktionskraft der zirkulären Muskulatur im Organbad wiesen Dünndarmpräparate von Kontrolltieren die typischen, konstant fortlaufenden Kontraktionen auf, die auf regelmäßige Veränderungen des Membranpotentials, die sogenannten *slow waves* (Abbildung 3.7 a und e, schwarze Spuren) zurückzuführen sind. Im Gegensatz dazu waren bei Präparaten der Tiere mit ICC-Depletion die spontanen Kontraktionen dysrhythmisch (Abbildung 3.7 a rote Spuren und b – d, hochsignifikant weniger rhythmische Kontraktionen, Amplitude und Frequenz der vorkommenden Kontraktionen waren signifikant verstärkt). Diese unkoordinierte Aktivität der



Abbildung 3.6: *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}*: Depletion der Mastzellen

a: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von *Whole Mounts* der Haut. Mastzellfärbung mit Avidin-Texasrot (rot) und Kerngegenfärbung mit ToPro-3 (blau). Maßstab: 50 µm. **b**: Quantifizierung der Mastzellanzahl in Tieren der beschriebenen Genotypen nach Tamoxifen- (TAM) oder Scheinbehandlung (Veh.). (Mittelwert ± SEM; n=3 pro Genotyp; 15 repräsentative Gesichtsfelder pro Tier wurden analysiert; *** p<0,001, Student T-Test). **c**: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Haut von Tamoxifen (TAM)-behandelten *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{mT-mG/+}* Tieren. Links: TAM-induzierte Rekombination in Mastzellen führte zu Expression von EGFP (grün). Rechts: Tiere, die nach TAM-Behandlung bestrahlt und deren Mastzellen mit WT-Knochenmark rekonstituiert wurden, wiesen keine EGFP-positiven Mastzellen auf. Kerngegenfärbung mit ToPro-3 (blau); Maßstab: 50 µm. (nach Klein et al., 2013)

Glattmuskulatur ließ sich mit einem Verlust bzw. einer sehr starken Reduktion der *slow waves* bei diesen Tieren in Verbindung bringen (Abbildung 3.7 e und i, rote Spuren). So war insbesondere die Amplitude der Potentialschwankungen extrem verringert (Abbildung 3.7 g; c-*Kit*^{CreERT2/+};*R26*^{DTA/+}: 3,58 ± 0,45 mV, Kontrollen: 22,02 ± 2,73 mV, n=3), während die Depletion der ICC keinen Einfluss auf die Frequenz der Schwankungen hatte (Abbildung 3.7 e; c-*Kit*^{CreERT2/+};*R26*^{DTA/+}: 29,83 ± 2,83 *slow waves* pro Minute, Kontrollen: 31,47 ± *slow waves* pro Minute; n=3 bzw. 2).



Abbildung 3.7: ICC vermitteln slow wave Aktivität im Dünndarm

a: *Ex vivo* Messung der spontanen mechanischen Aktivität der Zirkulärmuskulatur des lleums von TAM-behandelten Kontroll- (oben, schwarze Spur) und *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Tieren (repräsentative Aufzeichnungen, mittlere und untere, rote Spuren). **b**: Quantifizierung der in **a** gezeigten Kontraktionen. Als rhythmisch wurden Kontraktionen mit einem gleichmäßigen Abstand der Kontraktionen gewertet (Auswertung von 1 Min der aufgezeichneten Spur, n=11 pro Genotyp, ***: p<0,001, Student T-Test.) **c** und **d**: Frequenz (**c**) und berechnete Standardabweichung der Amplitude (**d**) der aufgezeichneten Kontraktionen des lleums (Auswertung von 1 Min, n=8-9, *: p<0,05, Student T-Test.) **e**: Repräsentative elektrophysiologische Aufzeichnungen der intrazellulären spontanen *slow wave* Aktivität bei lleumpräparaten von TAM-behandelten Kontroll- (oben) und Depletionstieren (unten). Bei *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Mäusen zeigte sich ein Verlust der *slow waves* (n=3 pro Genotyp, Aufzeichnungen. Frequenz (**f**) und Amplitude (**g**) der ilealen Potentialschwankungen (Auswertung von 1 Min der aufgezeichneten Messkurve, n=3 bzw. 2 (bei dem dritten Versuchstier war keine sinnvolle Auswertung der Messkurve möglich), **: p<0,01, Student T-Test.) Alle Graphen zeigen Mittelwerte ± SEM. (nach Klein et al., 2013; Die intrazellulären elektrophysiologischen Messungen (**e**) wurden von PD Dr. Sibaev, LMU durchgeführt.)

3.6 Depletion der ICC führt zu einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials

Neuronal induzierte Antworten der Darmmuskelzellen können im Versuch durch elektrische Feldstimulation (EFS) ausgelöst werden, die zugeführten elektrischen Impulse stimulieren die enterischen Neuronen, die daraufhin endogene Neurotransmitter freisetzen. In der Zirkulärmuskulatur des Dünndarms maskieren typischerweise die rhythmisch ablaufenden slow waves, Membranpotentialveränderungen mit einer Frequenz von ca. 25-35 Zyklen pro Minute (Abbildung 3.7 e und f), die neuronal vermittelten Antworten (Abbildung 3.8 a, links). Bei Tieren mit depletierten ICC war dies aufgrund des Verlusts der slow waves nicht der Fall. Als Antwort auf die Stimulation konnten EFS-induzierte Veränderungen am Membranpotential gemessen werden. Diese fielen aber nur geringfügig aus und eine deutliche klassische Antwort bestehend aus exzitatorischen inhibitorischen und



Abbildung 3.8: Elektrophysiologische Aktivität im Dünn- und Dickdarm

a: Beim Dünndarm von Kontrolltieren (links) maskierten die als *slow waves* bezeichneten Membranpotentialveränderungen Antworten die anhand von elektrischer Feldstimulation (EFS) hervorgerufen wurden. In Muskelzellen des lleums der TAM-behandelten *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Mäuse kommt es durch ein depolarisiertes RMP sowie dem Verlust der elektrischen Aktivität zu einer geringen Reaktion auf EFS. (n=3 pro Genotyp, Aufzeichnung von 15 Zellen pro Tier, Darstellung einer repräsentativen Ableitung). **b**: Repräsentative intrazelluläre Ableitungen der Zirkulärmuskulatur des Colons von Tieren der angegeben Genotypen. Im Colon tritt keine typische *slow wave* Aktivität auf (n=3 pro Genotyp, Aufzeichnung von 15 Zellen pro Tier). **c** und **d**: Intrazelluäre Ableitung des Ruhemembranpotentials (RMP) in Muskelzellen des lleums (**c**) und Colons (**d**) bei Tieren des angegebenen Genotyps (n=3 pro Genotyp,*: p<0,05, Student T-Test, Aufzeichnung von 15 Zellen pro Tier). Alle Graphen zeigen Mittelwerte ± SEM. (nach Klein et al., 2013; Die intrazellulären elektrophysiologischen Messungen wurden von PD Dr. Sibaev, LMU durchgeführt.)

Junktionspotentialen (EJP und IJP) wurde nicht festgestellt (Abbildung 3.8 a, rechts). Somit verursacht eine partielle Zerstörung des ICC-Netzwerks nicht nur einen Verlust der *slow waves* sondern auch eine Störung der muskulären Antwort auf neuronale Signale.

Zudem wiesen bei diesen Tieren die Muskelzellen des Dünndarms interessanterweise ein depolarisiertes Ruhemembranpotential (RMP) auf (Abbildung 3.7 e sowie Abbildung 3.8 a und c; Depletionstiere: $-53,95 \pm 2,86$ mV, Kontrolltiere: $-64,75 \pm 1,11$ mV, n=3, p=0,018, Students T-Test). Im Dickdarm der *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Tiere hingegen ist das RMP nicht verändert (Abbildung 3.8 d; Depletionstiere: $-57,58 \pm 0,65$ mV, Kontrolltiere: $-58,72 \pm 1,59$ mV, n=3, nicht signifikant, Students T-Test).

Im Gegensatz zum Dünndarm wurden im Dickdarm in Übereinstimmung mit der Literatur (Ward et al., 1997; Spencer et al., 2005) keine *slow waves* oder rhythmische Kontraktionen der Zirkulärmuskulatur gemessen (Abbildung 3.8 b sowie Abbildung 3.9 a). Daher konnten intrazelluläre Messungen an Muskelzellen des Colons für Untersuchungen der EFS-induzierten Neurotransmission genutzt werden.

3.7 Depletion der ICC blockiert die exzitatorische Neurotransmission

Seit langer Zeit wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob die Cajalzellen neben dem Generieren von *slow waves* bei der Regulierung der exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmission eine Rolle spielen (Sanders, 1996; Sanders et al., 2002; Ordog, 2008; Goyal & Chaudhury, 2010).

Im Organbadversuch trat bei Tieren mit ICC-Depletion eine starke Reduktion der kontraktilen Antwort auf EFS auf (Abbildung 3.9 a und b). Diese annähernd komplette Blockade der exzitatorischen Neurotransmission zeigte sich ebenso bei der intrazellulären Potentialableitung an Zellen der Zirkulärmuskulatur des Colons. Hier wurde bei ICCdepletierten Tieren ein praktisch vollständiger Verlust der exzitatorischen Komponente der Reaktion auf elektrische Stimulation, des exzitatorischen Junktionspotentials (EJP) festgestellt. Die inhibitorische Reaktion auf die Stimulation (inhibitorisches Junktionspotential (IJP)), hingegen war nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung 3.9 c und d). Allerdings wies die schnelle Komponente (flJP, fast) eine leichte, aber signifikante Verstärkung auf (Depletionstiere: -18,64 \pm 1,71 Δ mV, Kontrolltiere: -11,93 \pm 1,86 Δ mV, n=3, nicht signifikant, Students T-Test). Die langsame, großteils auf den Neurotransmitter NO zurückzuführende Komponente des IJP (sIJP) (He & Goyal, 1993; De Man et al., 2007) war höchstens Minimal verändert (Depletionstiere: -8,64 \pm 0,82 Δ mV, Kontrolltiere: -6,97 \pm 0,51 Δ mV, n=3, nicht signifikant, Student T-Test).



Abbildung 3.9: Verlust der exzitatorischen Neurotansmission bei Tieren mit ICC-Depletion a und c: Repräsentative Aufzeichnungen der kontraktilen Antwort der Zirkulärmuskulatur des Colons TAM-behandelten Kontrolltieren (links, schwarze Spur) TAM-behandelten von und c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+} Tieren (rechts, rote Spur). EFS: elektrische Feldstimulation. a: Kontraktionsmessung im Organbad. b: Kontraktionskraft als Reaktion auf EFS relativ zur jeweiligen Basislinie vor Stimulation (n=6-7, ***: p<0,001; Student T-Test). c: Repräsentative intrazelluäre Ableitungen der Zirkulärmuskulatur des Colons von Tieren der angegebenen Genotypen. Bei *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Mäusen trat kein EJP auf, während die Depletion der ICC auf fIJP und sIJP keine signifikante Auswirkung hatte. d: Quantitative Auswertung der Junktionspotentiale. (n=3, pro Genotyp, Aufzeichnung von 15 Zellen pro Tier ***: p<0,001, Student T-Test). EJP: exzitatorisches Junktionspotential, fIJP: schnelles (fast) inhibitorisches Junktionspotential, sIJP: langsames (slow) inhibitorisches Junktionspotential. Alle Graphen zeigen Mittelwerte ± SEM. (nach Klein et al., 2013; Die intrazellulären elektrophysiologischen Messungen wurden von PD Dr. Sibaev, LMU durchgeführt.)

Insgesamt bestätigten so die vorliegenden Ergebnisse zur mechanischen und elektrischen Aktivität und zum RMP, die mit Beobachtungen an W/W^v Tieren übereinstimmen (Huizinga et al., 1995; Ward et al., 1997), in adulten Tieren mit akuter ICC-Depletion eine essentielle Rolle der Cajalzellen sowohl bei der Generation der *slow waves* als auch in der exzitatorischen Neurotransmission.

3.8 ICC-Depletion hat keine Auswirkung auf PDGFRα⁺ interstitielle Zellen

ICC sind nicht die einzigen interstitiellen Zellen im GI Trakt, die eine Rolle in der Neurotransmission spielen könnten. Eine weitere Art von Zellen, die zwar bezüglich Morphologie und Lokalisation in der Darmwand Ähnlichkeiten mit ICC aufweisen, sich aber z.B. bezüglich ihres Expressionsprofils von diesen unterscheidet, wurde von lino et al. (2009)

beschrieben. Da diese Zellen negativ für den Rezeptor c-Kit sind, dafür aber den *plateletderived growth factor receptor* α (PDGFR α) exprimieren, wird diese Population inzwischen als PDGFR α^+ Zellen bezeichnet (lino et al., 2009a; Sanders, 2014). Um zu untersuchen, ob der durch das *c-Kit*^{CreERT2/+};*R26*^{DTA/+} Modell hervorgerufene Verlust von ICC eine Auswirkung auf PDGFR α^+ Zellen hat, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen PDGFR α durchgeführt. Abbildung 3.10 zeigt, dass sowohl direkt nach Behandlung mit Tamoxifen (*Whole Mount* Präparate, c) als auch einige Wochen nach Induktion (Gefrierschnitte und Quantifizierung, a und b) keine offensichtliche morphologische und anzahlmäßige Veränderung dieser Zellen bei Tieren mit ICC-Depletion festgestellt wurden.



Abbildung 3.10: ICC-Depletion hat keine Auswirkung auf PDGFRα⁺ Zellen

a und **c**: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von PDGFR α -IF-Färbungen an Gefrierschnitten des Dünn- und Dickdarms (**a**) sowie *Whole Mount* Präparaten (**c**) des Colons von Tieren mit depletierten ICC (*c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* + TAM) und Kontrolltieren. **b**: Quantifizierung der PDGFR α^+ Zellen im Colon von Tieren mit ICC-Depletion sowie Kontrollen (n=3 pro Genotyp, 30 repräsentative Gesichtsfelder pro Tier). Der Graph zeigt Mittelwerte ± SEM. Rot: PDGFR α -IF Blau: Kerngegenfärbung mit ToPro-3. Maßstab: 50 µm.

3.9 Deletion von *Prkg1* in ICC beeinträchtigt die gastrointestinale Motilität

Die gastrointestinale Motilität wird nicht nur anhand exzitatorischer sondern auch über inhibitorische Signale gesteuert (Murphy & Walker, 1998). cGMP-abhängige Proteinkinase 1 (PKG1) ist ein zentrales Enzym im Signalweg der nicht-adrenerg, nicht-cholinergen (NANC) Neurotransmission, welcher über die Neurotransmittern NO und CO vermittelt wird.



Abbildung 3.11: Expression von cGMP-abhängiger Proteinkinase 1 (Prkg1) im Colon

a und **c**: Konfokalmikroskopischer Nachweis der cGMP-abhängigen Proteinkinase 1 (PKG1 β , *Prkg1\beta*) im Darm. Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von c-Kit (rot) und PKG1 β (grün) im Colon eines WT Tieres. Kerngegenfärbung mit ToPro-3. Skala 50 µm, bei den Vergrößerungen 25 µm. **b**: Die Quantifizierung der PKG1 β -positiven ICC in unbehandelten *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{t/f}*, *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{t/+}* und WT Mäusen (n=3 pro Genotyp, 30 repräsentative Gesichtsfelder pro Tier) wies ähnlich viele doppeltpositive Cajalzellen und somit die Expression von *Prkg1* in ICC nach. **c**: Oben: Konfokalmikroskopische Aufnahme des Colon einer Maus mit globalem *Prkg1*-KO zum Nachweis der Spezifität des PKG1 β Antikörpers. ICC sind mit c-Kit (rot) angefärbt. Unten: Aufnahmen des Colons einer WT Maus. Sowohl ICC als auch Muskelzellen sind PKG1 β -positiv (grün), während nur ICC mit c-Kit Antikörper (rot) angefärbt sind. **d**: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahme eines *Whole Mount* Präparats der Haut einer *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{t/f}* Maus. Die Mastzellen (rot, Färbung mit dem Mastzellmarker Avidin-Texasrot) wiesen keine PKG1-Immunfluoreszenz (PKG1 β , grün) auf. Kerngegenfärbung mit ToPro-3. Skala 50 µm. Der Graph zeigt Mittelwerte ± SEM. (teilweise nach Klein et al., 2013; Versuche wurde von A. Kettenberger durchgeführt.)

Diese werden unter anderem in enterischen Neuronen von neuronaler NO-Synthase (nNOS) und Hämoxygenase gebildet. Über Aktivierung des NO-cGMP-PKG1 Signalwegs (siehe Abbildung 1.2) wird eine Relaxation der enterischen Muskulatur induziert (Pfeifer et al., 1998; Xue et al., 2000; Hofmann, 2005). Versuchstiere mit einem globalen Verlust von Prkg1 (Prkg1 knock-out (KO)) weisen einen Verlust der NO-abhängigen Muskelrelaxation sowie eine gravierende Funktionsstörung im GI Trakt auf (Pfeifer et al., 1998). Interessanterweise zeigen adulte Tiere mit einer Deletion von Prkg1 spezifisch in Zellen der glatten Muskulatur des GI Trakts nicht diesen Phänotyp (Schlossmann et al., 2005). Dies ist ein Hinweis, dass neben den Muskelzellen mindestens ein weiterer Zelltyp bei der neuronal induzierten Relaxation eine Rolle spielen könnte. Da Cajalzellen im Darm Prkg1 exprimieren (Abbildung 3.11 a bis c), wurde die Rolle dieser Zellen in der vorliegenden Arbeit untersucht und dazu ein Mausmodell gewählt, in dem die cGMP-abhängige Proteinkinase 1 (Prkg1) spezifisch in ICC deletiert wurde. Entsprechende Versuchstiere erhält man durch Kreuzung von c-*Kit^{CreERT2/+}* Tieren mit Mäusen, die ein *Prkg1* Gen besitzen, bei dem der für die Funktion des Proteins essentielle Bereich von *lox*P Stellen flankiert ist (*Prkg1^{f/f}*) und somit in Zellen mit Cre-Expression deletiert werden kann (Wegener et al., 2002) (Abbildung 3.12 a). Behandelt man *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{f/f}* Tiere mit Tamoxifen findet in den Cajalzellen eine Rekombination des Prkg1-Lokus statt und es konnte ein Verlust der Prkg1 Expression in ~40% aller ICC beobachtet werden (Abbildung 3.12 b und c). Trotz der relativ geringen Rekombinationseffizienz wiesen Tiere mit dieser partiellen Deletion von Prkg1 im ICC-Netzwerk eine gravierende Störung der GI Motiliät auf, die in einer um ca. 2 h verzögerten gastrointestinalen Gesamttransitzeit sichtbar wurde (Abbildung 3.12 d). Diese Beeinträchtigung des Transits trat nicht nur bei Mäusen mit homozygoter Prkg1 Deletion (*Prkg1^{f/f}*) auf, auch heterozygote Versuchstiere (*Prkg1^{f/+}*) mit nur einem gefloxten *Prkg1* Allel wiesen eine leichte Transitverzögerung auf.

Da in Mastzellen kein Prkg1 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.11 d), durfte bei diesem Mausmodell die Auswirkung einer Mastzellbeteiligung auf die Passagezeit außer Acht gelassen werden.

3.10 ICC-spezifische Deletion von *Prkg1* blockiert die inhibitorische Neurotransmission

Neben der exzitatorischen Neurotransmission (Abbildung 3.9) wurde untersucht, inwiefern die nitrerge inhibitorische Neurotransmission über den NO/PKG1-Signalweg von der Integrität des ICC-Netzwerks abhängt.

Im Organbad hat die Deletion von *Prkg1* kaum Auswirkungen auf die gemessenen Kontraktionen der Muskulatur. Amplitude und Rhythmizität wiesen bei TAM-behandelten *c-Kit*^{CreERT2/+};*Prkg1*^{f/f} Tieren keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 3.13 a – d). Allerdings konnte eine geringe aber signifikante Veränderung der Kontraktionsfrequenz gemessen werden (Abbildung 3.13 c). Intrazelluäre elektrophysiologische Ableitungen in Zirkulärmuskelzellen des Colons zeigen, dass unter NANC-Bedingungen die ICC-spezifische *Prkg1*-Deletion spezifisch die NO-abhängige langsame Komponente des inhibitorischen Junktionspotentials (*slow inhibitory junction potential*, sIJP) verloren geht (Abbildung 3.13 e). Dieses Ergebnis konnte dadurch validiert werden, dass bei heterozygoten Kontrolltieren (*c-Kit*^{CreERT2/+};*Prkg1*^{f/+}) erst bei Zugabe des NOS-Inhibitors L-N^G-Nitroarginig (L-NNA) ebenfalls einen solchen Effekt gemessen wurde (Abbildung 3.13 f). Im Gegensatz dazu hatte die *Prkg1*-Deletion in ICC keine Auswirkung auf die purinerg vermittelte inhibitorische Neurotransmission, die ursächlich für die schnelle Komponente des IJP (*fast,* fIJP) ist (Abbildung 3.13 e und f).



Abbildung 3.12: Deletion von *Prkg1* in ICC des Darms verursacht eine Verzögerung des GI-Transits

a: Genetische Strategie um in ICC *Prkg1* zu deletieren. **b**: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufmahmen von murinem Colon zeigen den Verlust der Expression von Prkg1 (grün) in c-Kit-positiven ICC (rot) nach Tamoxifenbehandlung. Skala: 50 µm, bei den Vergrößerungen 25 µm. **c**: Quantifizierung der Expression von PKG1 (*Prkg1* β) in Tieren der angegebene Genotypen nach 3 Tagen Tamoxifenbehandlung. Bei *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{t/f}* Tieren konnte die Deletion von PKG1 β in ~40% aller ICC beobachtet werden (n=3 pro Genotyp, 30 repräsentative Gesichtsfelder pro Tier). **d**: Verzögerung der Gesamttransitzeit nach 3 Tagen Tamoxifen-(TAM) oder Scheinbehandlung (Veh.) bei Tieren der angegebenen Genotypen. (***: p<0.001; Student T-Test). Alle Graphen zeigen Mittelwerte ± SEM. (nach Kein et al., 2013; Teile der Versuche wurden von A. Kettenberger durchgeführt.)



Abbildung 3.13: ICC vermitteln die NO-abhängige inhibitorische Neurotransmission

a: *Ex vivo* Messung der spontanen mechanischen Aktivität der Zirkulärmuskulatur des lleums von TAM-behandelten Kontrolltieren (oben, schwarze Spur) und TAM-behandelten *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{tif}* Tieren (unten, orange Spur). **b-d**: Quantifizierung der in **a** gezeigten rhythmischen Kontraktionen. Als rhythmisch wurden Kontraktionen mit einem gleichmäßigen Abstand zwischen den *Peaks* der Kontraktionen gewertet (Auswertung von 1 Min der aufgezeichneten Spur, n=6 oder 11 pro Genotyp, n.s.: nicht signifikant, Student T-Test.) **c** und **d**: Frequenz (**c**) und berechnete Standardabweichung der Amplitude (**d**) der aufgezeichneten Kontraktionen des lleums (Auswertung von 1 Min, n=6-11, *: p<0,05, Student T-Test.) **e** und **f**: Repräsentative intrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen. Antworten der Zirkulärmuskulatur des Colons von Tieren der angegebenen Genotypen unter NANC-Bedingungen nach elektrischer Stimulation (EFS) (n=3 pro Genotyp, 15 Zellen pro Tier). Bei TAM-behandelten *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{tif}* Tieren (unten, orange Spur) fehlte das sIJP während das fIJP unverändert blieb. fIJP: schnelles (*fast*) inhibitorisches Junktionspotential, sIJP: langsames (*slow*) inhibitorisches Junktionspotential. Alle Graphen zeigen Mittelwerte ± SEM. (nach Klein et al., 2013. Die intrazellulären elektrophysiologischen Messungen wurden von PD Dr. Sibaev, LMU durchgeführt.)

Zusammenfassend konnte somit in dieser Arbeit mit dem *c-Kit^{CreERT2/+}* Mausmodell gezeigt werden, dass ein intaktes Netzwerk sowie intakte Signalwege in den Cajalzellen essentiell für sowohl exzitatorische als auch nitrerge inhibitorische Neurotransmission von den enterischen Neuronen zu den Zellen der glatten Muskulatur im Darm sind (Klein et al., 2013).

4 Diskussion

Die Frage, mittels welcher Mechanismen die enterischen Neuronen ihre Signale weiterleiten, die zur Steuerung der Muskelzellen im GI-Trakt und somit der Motilität führen, ist sowohl für die wissenschaftliche Grundlagenforschung als auch für die Übertragung in die Klinik von außerordentlicher Relevanz. Nach klassischer Betrachtungsweise produzieren die enterischen Neuronen exzitatorische und inhibitorische Neutrotransmitter, welche ausschließlich an Rezeptoren auf der Zelloberfläche der glatten Muskulatur im GI-Trakt binden und somit direkt in den Effektorzellen eine Kontraktion oder Relaxation auslösen (Hirst & Ward, 2003). Neben diesem Konzept gewinnt aber die Hypothese, dass weitere Zellpopulationen, insbesondere die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC), eine Rolle in der Signalweiterleitung spielen zunehmend an Bedeutung. Vor einigen Jahren hat die Erforschung der Funktion der ICC zu entscheidenden Erkenntnissen bezüglich deren Rolle als Schnittmacherzellen bzw. in der Generierung der slow wave Aktivität geführt (Huizinga et al., 1995; Thomsen et al., 1998; Sanders, 2006; Huizinga et al., 2009; Sanders et al., 2012). Allein die Morphologie, die Lage der Cajalzellen in der Darmwand und die elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Kontakte dieser Zellen zu sowohl enterischen Neuronen als auch Muskelzellen lässt eine Rolle der ICC in der Neurotransmission vermuten (Cajal, 1911; Ward & Sanders, 2006; Faussone-Pellegrini et al., 2013). Nichtsdestotrotz galt eine Beteiligung der Cajalzellen in der Neurotransmission lange Zeit als sehr umstritten und wird auch weiterhin kontrovers diskutiert (Ordog, 2008; Sarna, 2008; Goyal & Chaudhury, 2010; Chaudhury, 2013; Blair et al., 2014; Sanders, 2014).

Untersuchungen Dies hauptsächlich darauf zurückführen, lässt sich dass an Versuchsmodellen, die spezifisch die ICC oder Signalwege in diesen Zellen in adulten Tieren zum Ziel haben, bisher nicht vorhanden waren. So kamen in einer Großzahl der existierenden Studien Tiermodelle mit Keimbahnmutationen im c-Kit Lokus zum Einsatz, wie das W/W^v Mausmodell (Ordog, 2008; Goyal & Chaudhury, 2010; Sanders et al., 2010). Haben diese ein hypomorphes c-Kit Allel mit beeinträchtigter Funktion der Rezeptortyrosinkinase c-Kit zur Folge, wie bei es z.B. bei den W/W^v Tieren der Fall ist, führt dies zu einer reduzierten Anzahl oder dem vollständigen Verlust von spezifischen ICC-Subpopulationen (Sanders & Ward, 2007). Diesen Modellen ist der Nachteil gemein, dass die Beeinträchtigung des c-Kit Signalwegs bereits in der Embryonal- und postnatalen Entwicklung existiert. Somit muss der bei diesen Tiermodellen festgestellte Phänotyp nicht zwingend auf eine Funktionsstörung der ICC zurückgeführt werden. Ebenso könnten sich systemische oder Entwicklungsdefekte sowie kompensatorische Mechanismen auf die Neurotransmission und Funktion der glatten Muskelzellen auswirken. Weiterhin erlauben die bisher vorhandenen Modelle auch keine selektive genetische Manipulation dieser Zellen zu

spezifischen Zeitpunkten (adultes Tier oder ausgewählter Zeitpunkt in der Entwicklung) oder einzelner Signalwege spezifisch in den ICC. Die c-Kit-Mutationen in W/W^V Mäusen und ähnlichen Modellen mögen verschiedenste Auswirkungen auch auf die Neurotransmission haben. Das schließt gegensätzliche Signalwege nicht aus, was es schwierig macht, aus den Befunden Rückschlüsse auf die ursächlichen Zusammenhänge und einzelnen Wege zu ziehen. Im Gegensatz dazu wird in dieser Arbeit ein neues Mausmodell vorgestellt und analysiert, welches es erstmals ermöglicht die ICC spezifisch in adulten Tieren *in vivo* zu manipulieren (Klein et al., 2013).

4.1 Die *c-Kit^{CreERT2/+}*-Maus als Modell zur Manipulation der ICC in adulten Tieren

4.1.1 Zweckmäßigkeit und Effizienz des *c-Kit*^{CreERT2/+} Modells

Das in der Gruppe von Prof. Saur generierte c-Kit^{CreERT2/+} Mausmodell nutzt einen knock-in der Cre-Rekombinase in den endogenen c-Kit-Lokus (Klein et al., 2013). Dabei wird Cre ausschließlich in *c-Kit* exprimierenden Zellen und zudem aufgrund der ER^{T2} Mutation erst nach Behandlung der Tiere mit Tamoxifen aktiviert, so dass Gene zelltyp- und zeitspezifisch an- oder ausgeschaltet werden können (Feil et al., 1997). Mit dem *c-Kit*^{CreERT2/+} Modell ist es nun erstmals möglich, im adulten Tier c-Kit-positive ICC auf genetischer Ebene zu manipulieren und beispielsweise Beeinträchtigungen des ICC-Netzwerks zu induzieren. Dies stellt eine deutlich verbesserte Möglichkeit zur Übertragung der unter Verwendung eines Tiermodells Erkenntnisse auf die bei humanen gewonnenen gastrointestinalen Erkrankungen beschriebenen Transitstörungen bzw. Effekte dar. Denn neben Krankheitsbildern mit geringer Inzidenz wie Morbus Hirschsprung oder neonatale Pseudoobstruktion (Streutker et al., 2007) sind es vor allem erst im Erwachsenenalter auftretende Erkrankungen, die mit einer verminderten Anzahl und/oder einer Strukturveränderung der ICC assoziiert werden. So gibt es Hinweise auf eine Veränderung der ICC-Integrität bei diabetischer Gastropathie, idiopathischen Obstipationen wie slow transit constipation und ebenso bei dem weit verbreiteten Reizdarmsyndrom (Streutker et al., 2007; Mostafa et al., 2010; Eshraghian & Eshraghian, 2011; Bashashati & McCallum, 2015).

Die Möglichkeit Gene mittels Cre/loxP System und zudem mit dem mutierten Östrogenrezeptor ER^{T2} konditional zu manipulieren wird seit einiger Zeit effektiv genutzt (Orban et al., 1992; Feil et al., 1997; Vooijs et al., 2001). Bei transgenen Tieren ist aber die Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors von diesem abhängig. Daher wurde zuerst die Effektivität der *c-Kit*^{CreERT2/+} Maus charakterisiert, indem diese Tiere mit einer Reporterlinie gekreuzt wurden, die im ubiquitär exprimierten *Rosa26*-Lokus das *R26*^{*mT-mG*} Reporterkonstrukt enthält (Muzumdar et al., 2007). Es ergab sich sowohl für Dünn- als auch

Dickdarm eine Rekombinationsfrequenz des $R26^{mT-mG}$ Allels von über 90%. Somit konnte eine sehr hohe Effizienz dieses Mausmodells für das Reporterallel nachgewiesen werden. Bei unbehandelten Tieren waren keine EGFP-positiven Zellen zu sehen, was zeigte, dass die *c-Kit*^{CreERT2/+} Maus nicht *leaky* ist (Daten nicht gezeigt).

Bei der Depletion der ICC durch Cre-gesteuerte Aktivierung eines sich ebenfalls im R26-Lokus befindenden DTA, wurde eine Verminderung der Cajalzellen um nur etwa 50% festgestellt. Dies kann auf unterschiedliche Gründe zurückzuführen sein. Ein Einfluss des Promotors scheidet in diesem Fall aus, so wurde bei beiden Linien die *c-Kit^{CreERT2/+}* Maus mit endogenem *c-Kit*-Promotor verwendet. Die Effizienz der Cre-Rekombinase ist aber ebenso abhängig von den verschiedenen Schritten, die nach Behandlung der Tiere mit Tamoxifen ablaufen müssen, damit das Cre/loxP System funktioniert. Zuerst wird Tamoxifen zu 4-Hydroxytamoxifen metabolisiert. Dieses bindet als den Ligand an mutierten Östrogenrezeptor des CreER^{T2}-Fusionsproteins. Um hier mögliche Einflüsse möglichst gering zu halten wurden sowohl die *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{mT-mG}* als auch die *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA}* Tiere nach demselben Schema induziert. Die Bindung des Liganden Tamoxifen an den mutierten Östrogenrezeptor hat eine Aktivierung der Rekombinase zur Folge, die im Anschluss an den Eintritt in den Zellkern an den loxP Stellen des Zielgens ihre Funktion ausübt (Nagy, 2000). Erst im Anschluss daran kann die Expression und Synthese des Reportergens erfolgen. Obwohl sich beide Zielkonstrukte im R26-Lokus befinden, könnte es trotzdem einen Unterschied in der Zeit geben, die es nach der Exzision der vorgelagerten Sequenzen dauert, bis der Effekt (GFP-Fluoreszenz bzw. DTA-induzierter Zelltod) sichtbar wird. Bei dem Depletionsmodell kommt hinzu, dass außerdem noch der DTA-vermittelte Zelltod stattfinden muss. Verschiedene Gruppen beschreiben die Zeit, die es dauert bis nach Induktion der Tier die Rekombination der Zielgene auf Genomebene sichtbar wird mit 6 bis 30 Stunden (Hayashi & McMahon, 2002; Cox et al., 2012). Daher diskutieren Hayashi und McMahon (2002), dass die meisten Labore zwischen der Behandlung und der Analyse der Tiere 5 bis 10 Tage abwarten. In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Zellzahlen sowohl bei dem Reporter- als auch bei dem Depletionsmodell nach 3 Tagen Tamoxifeninduktion durchgeführt. Insgesamt wurden einige der Tiere aber 5 Tage in Folge induziert. Ein Vorversuch als Überblick über die Rekombinationsfrequenz des Fluoreszenzreporters in verschiedenen Organen zeigte keinen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten (Daten nicht gezeigt), so dass für die weiteren Analysen das Protokoll mit dreitägiger Induktion gewählt wurde. Möglicherweise dauert es bei dem DTA-Depletionsmodell aber etwas länger bis die Zielzellen abgestorben sind, so dass zu dem gewählten Zeitpunkt noch nicht alle Effekte sichtbar waren und eine Auszählung nach fünftägiger Tamoxifenbehandlung vielleicht eine höhere Depletionsfrequenz ergeben hätte. Dagegen spricht, dass Ivanova et al. (2008) eine Zeit von weniger als 24 Stunden zwischen

Diskussion

dem Beginn der Cre-Expression und dem DTA-vermittelten Zelltod für zwei unterschiedliche Cre-Linien veranschlagen. Allerdings wurden diese Untersuchungen an Embryos durchgeführt, so dass dies nicht zwingend auf adulte Tiere übertragbar sein mus. Weitere Faktoren für die von Vooijs et al. (2001) ein Einfluss auf die Rekombinationsfrequenz des Ziellokus diskutiert wird, scheinen im vorliegenden Fall eher nicht ausschlaggebend zu sein. So unterscheidet sich der Abstand der *lox*P-Stellen zueinander in den beiden Konstrukten nicht so gravierend, als dass dies einen großen Einfluss haben sollte. Auch ein unterschiedliches Expressionslevel des Zielgens oder die lokale Chromatinstruktur scheint im vorliegenden Fall weniger eine Rolle zu spielen, beide Konstrukte befanden sich im *Rosa26*-Lokus (Vooijs et al., 2001; Ivanova et al., 2005; Muzumdar et al., 2007).

Bei dem Modell des konditionalen PKG1 *knock-outs*, bei dem ebenfalls etwa jede zweite Cajalzelle einen Verlust der *Prkg1*-Expression aufweist, könnten diese Einflüsse neben den bereits zuvor aufgeführten eine Rolle spielen. Eine weitere Validierung diesbezüglich fand aber nicht statt. Insgesamt zeigt die Effizienzvariabilität sowie die Anzahl an möglichen Faktoren, die einen Einfluss darauf ausüben können, die Erforderlichkeit der Validierung eines neuen Mausmodells, bevor damit gezielte Versuche beispielsweise zur Physiologie der Tiere gemacht werden.

Eine weitere Auswirkung, die bei der Verwendung von induzierbaren Cre-Linien bedacht werden sollte, sind die für die Cre-Rekombinase beschriebenen toxischen und antiproliferativen Effekte (Loonstra et al., 2001; Baba et al., 2005). Allerdings ist für die hier verwendete Cre^{ERT2} Variante im Vergleich mit anderen Cre^{ER} Proteinen eine sehr geringe Toxizität nachgewiesen (Hameyer et al., 2007). Ebenso sprechen die für das ICC-Depletionsmodell gezeigten Daten der Zellzahlbestimmungen (siehe Abbildung 3.4) für eine Vernachlässigbarkeit dieses Aspekts: Die Anzahl der ICC bei WT und *c-Kit^{CreERT2/+}* Tieren unterscheidet sich nicht wesentlich. Für die Kontrollgenotypen zeigte diese Bestimmung zudem auch keinen Einfluss des Tamoxifens auf die Anzahl der ICC. Sowohl bei Tamoxifenbehandelten Kontrollen als auch bei scheinbehandelten *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Mäusen konnte ebenfalls eine recht ähnliche Zellzahl bestimmt werden. Nur bei Depletion über TAMinduzierte Expression von DTA war eine hochsignifikante Reduktion der Zellzahl feststellbar. Dies unterstreicht, dass alleine die TAM-Behandlung keine Auswirkungen auf die ICC-Anzahl hatte. Dass das Östrogenanalogon Tamoxifen aber durchaus Wirkungen auf die behandelten Tiere hatte, verdeutlichte der Gewichtsverlust der Tiere, der unabhängig des Genotyps während der Behandlung festzustellen war (siehe Abbildung 3.1). Weitere Auswirkungen des Tamoxifens auf den Gesamtorganismus der Tiere oder einzelne Zelltypen, auch im GI-Trakt, wurden nicht näher untersucht, sind aber nicht auszuschließen. So wurde kürzlich publiziert, dass Tamoxifenbehandlung bei WT Mäusen zu einem akuten Verlust von 90% der

57

Parietalzellen im Magen führt, sowohl bei oraler als auch intraperitonealer Tamoxifengabe (Huh et al., 2012). Nichtsdestotrotz zeigten die in dieser Arbeit vorgestellten Daten signifikante Unterschiede zwischen Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren und Versuchstieren mit ICC-Depletion.

4.1.2 c-Kit-positive Mastzellen in der GI-Motilität und im Mausmodell

Die ICC sind nicht der einzige Zelltyp, für den im adulten Zustand ein aktiver c-Kit-Signalweg essentiell ist. Dies stellt einen Nachteil bei der Verwendung des *c-Kit*^{CreERT2/+} Modells dar. So ist beispielsweise auch bei Mastzellen die Expression von c-Kit nicht nur für die Entstehung sondern auch für die Aufrechterhaltung deren Funktion im adulten Zustand nötig (Kitamura et al., 1978). Den Mastzellen wird ebenfalls eine Rolle bei der Motilität zugesprochen (Trapero-Marugan et al., 2011). In dieser Arbeit konnte anhand von Knochenmarkstransplantationen gezeigt werden, dass Mastzellen im verwendeten Depletionsmodell keine ausschlaggebende Rolle spielten. So wiesen Tiere, deren ursprüngliche Mastzellen durch WT-Mastzellen rekonstituiert wurden ebenfalls eine signifikant verzögerte gastrointestinale Gesamttransitzeit auf. Im Gegensatz zum humanen Darm, für den das Vorhandensein und vermehrte Auftreten von Mastzellen bei Motilitätserkrankungen beschrieben ist (Bassotti et al., 2012; De Winter et al., 2012; Schaeffer et al., 2012), konnten zudem bei mikroskopischer Betrachtung der Darmschnitte von Tieren des Fluoreszenzreportermodells kaum Mastzellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung für diesen Befund würde auch eine geringere Rekombinationseffizienz in den Mastzellen im Vergleich zu ICC bieten. Dagegen spricht aber, dass andere, in dieser Arbeit nicht näher charakterisierte Zelltypen in verschiedenen Organen der Reportertiere ebenfalls eine deutlich sichtbare Rekombination aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Einen weiteren Nachweis, dass zumindest in der Maus die Rolle der Mastzellen bei der GI-Motilität vernachlässigbar ist, zeigt eine kürzlich erschienene Publikation, die sich mit postoperativem Ileus befasst (Gomez-Pinilla et al., 2014). Postoperativer Ileus, eine transiente lokale Entzündungsreaktion in der Darmmuskulatur nach einem operativen Eingriff, kann bei den betroffenen Patienten zu einer gravierenden Beeinträchtigung der GI-Motilität führen (Boeckxstaens & de Jonge, 2009). In der Studie von Gomez-Pinilla et al. (2014) wird ein mastzellspezifisches *Cpa3^{Cre}* Mausmodell verwendet, welches ein intaktes ICC-Netzwerk aber einen Verlust der intestinalen Mastzellen aufweist. Diese Tiere entwickeln erst durch Behandlung mittels Operation und intestinaler Manipulation eine induzierte Entzündungsreaktionen und eine verzögerte Transitzeit. Hingegen zeigen bei *Kit^{Wsh/W-sh* Mäusen, die aufgrund der *c-Kit* Mutation sowohl eine Beeinträchtigung des ICC-Netzwerks als auch der Mastzellen haben, schon die Kontrolltiere (nur operativer Eingriff}
ohne manuelle Manipulation des Darms) eine erhöhte Transitzeit (Gomez-Pinilla et al., 2014).

4.1.3 Weitere Zelltypen weisen *c-Kit* Expression auf

Bei anderen c-Kit-positiven Zelltypen, wie den Melanozyten, wirkt sich eine Depletion zwar nicht auf die Motilität sondern im Fall der Melanozyten nur auf die Haarfarbe der Tiere aus. Bei c57Bl/6 Tieren mit schwarzer Fellfarbe ist eine Depigmentierung nach Behandlung mit Antikörpern gegen c-Kit beschrieben, den Tieren wachsen in den behandelten Bereichen weiße Haare nach (Botchkareva et al., 2001; Yoshida et al., 2001). Auch bei den *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Mäusen trat einige Wochen nach Behandlung mit Tamoxifen ein Verlust der Pigmentierung auf, so dass diese Tiere dann ergrauten (Daten nicht gezeigt). Dieser Phänotyp erwies sich zwar als interessant, aber unwesentlich bezüglich des GI-Phänotyps, der Gegenstand der Untersuchungen war. Ebenso konnten *c-Kit*-positive Zellen beispielsweise in anderen Organen wie Leber, Niere oder Lunge der adulten Tiere oder auch in der Mukosa nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). All diese *c-Kit*-positive Zellen wurden aber in der vorliegenden Arbeit nicht näher charakterisiert.

4.1.4 Limitation des *c-Kit^{CreERT2/+}* Modells: Alle ICC-Subpopulationen exprimieren c-Kit

Ein weiterer Nachteil des hier verwendeten c-Kit^{CreERT2/+} Mausmodells ist, dass alle Subpopulationen der interstitiellen Zellen von Cajal c-Kit exprimieren, gemäß der gängigen Definition: ICC sind positiv für diese Rezeptortyrosinkinase (Maeda et al., 1992). Somit erfolgt die auf genetischer Ebene stattfindende Manipulation aber auch in allen Subklassen. Und es lässt sich bei Versuchen mit den *c-Kit^{CreERT2/+}* Tieren keine genaue Aussage darüber treffen, ob eine spezielle Klasse spezifische Funktionalitäten aufweist, wie alleine deren unterschiedliche Lage und Morphologie vermuten lässt. In der Literatur werden die ICC-IM als diejenigen Cajalzellen angesehen, die hauptsächlich als Mediatoren der enterischen Neurotransmission fungieren (Burns et al., 1996; Ward et al., 2000; Blair et al., 2014). Dazu lieferte das hier verwendete Depletionsmodell (Klein et al., 2013) keine Ergebnisse, da das Diphtherietoxin in allen c-Kit-positiven Zellen exprimiert wird und somit auch alle Subpopulationen gleichermaßen betroffen waren. Bei der Bestimmung der entsprechenden Zellzahlen (Abbildung 3.4, Abbildung 3.12) wurde zudem weder bei dem Reportermodell, noch bei *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* noch bei *c-Kit^{CreERT2/+};Prkg1^{f/f}* Mäusen eine Unterscheidung der ICC-Subklassen durchgeführt, es wurden stattdessen alle c-Kit-IF-positiven Zellen gezählt. Bei einem weiterführenden Experiment wurde inzwischen, unter Verwendung eines anderen Depletionsmodells mit induzierbarem Diphtherietoxinrezeptor (siehe Ausblick, 4.4), eine weitere Zellzahlbestimmung durchgeführt. Die dabei vorgenommene Unterscheidung der ICC-Subpopulationen (ICC-MY, ICC-IM und ICC-SMP bzw. ICC-DMP) ergab ein ähnliches Reduktionslevel für die einzelnen Subpopulationen (Daten nicht gezeigt). Wenn man aber die vorhandene Literatur als Grundlage nimmt, die sowohl die ICC-IM als die Neurotransmission vermittelnde Population ansieht (Burns et al., 1996), als auch beschreibt, dass ICC-IM im Magen und Colon zahlreicher als im Dünndarm vorhanden sind (Komuro, 2006), könnte dies auf regionenspezifische Unterschiede in der Beteiligung einzelner Subklassen schließen lassen. Um aber definierte Aussagen bezüglich der Beteiligung der spezifischen ICC-Populationen treffen zu können, wären weitere Untersuchungen nötig. Der effizienteste Weg für derartige Studien wäre das Vorhandensein von subklassenspezifischen Markern. Dann könnten diese zur Generierung von entsprechenden Cre-Linien und damit spezifischen KO-Mausmodellen hergenommen werden.

4.2 ICC spielen eine essentielle Rolle in der enterischen Neurotransmission

Unter Verwendung der *c-Kit^{CreERT2}* Maus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl eine akute Depletion der Cajalzellen als auch die Deletion von PKG1, eines Enzyms des NO/cGMP-Signalwegs, in diesen Zellen die enterische Neurotransmission beeinträchtigt. Mit konditionaler Expression von Diphtherietoxin (DTA) in den c-Kit-positiven Zellen konnten diese zeitspezifisch in adulten Tieren depletiert werden. Diese Beeinträchtigung des ICC-Netzwerks resultiert in einer Störung der exzitatorischen Neurotransmission, wie anhand des Verlusts des EJP im Dickdarm und einer reduzierten Kontraktionskraft der glatten Muskulatur des Colon im Organbadversuch gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zur diesem gravierenden Effekt auf die exzitatiorische Neurotransmission wirkte sich der partielle Verlust der Cajalzellen auf die inhibitorische Neurotransmission nicht signifikant aus. Beide Komponenten des IJP, sowohl der purinerg vermittelte schnelle (fIJP) als auch der NO/CO-vermittelte langsame Anteil (sIJP), wurden in den mit diesem Depletionsmodell durchgeführten Versuchen nicht signifikant beeinflusst. Allerdings konnte bei einer konditionalen Deletion von Prkg1 in den ICC eine selektive Blockade des fIJP festgestellt werden.

Diese Befunde stimmen mit Daten überein, die mit dem W/W^v Mausmodell oder Tieren mit generellem *knock-out* der neuronalen NO-Synthase (nNOS^{-/-}) generiert wurden (Sivarao et al., 2001; Sivarao et al., 2008; lino et al., 2011). Beim W/W^v Modell, bei dem die Tiere im Colon keine intramuskulären ICC aufweisen, ist die nitrerg vermittelte Relaxation normal (keine Beeinträchtigung des IJP) während selektiv der exzitatorische, cholinerg vermittelte

Input fehlt (Verlust des EJP). Zudem sind sowohl der untere Ösophagussphinkter als auch der Pylorussphinkter hypotonisch. Im Gegensatz dazu sind bei nNOS^{-/-} Mäusen, die einen Verlust der NO-abhängigen inhibitorischen Innervation aufweisen, die Sphinkter hypertonisch (Sivarao et al., 2001; Sivarao et al., 2008). Zu den Sphinktern der ICC-Depletionstiere liegen keine Daten vor, aber für das Colon konnten mit dem hier eingesetzten *c-Kit^{CreERT2}* Mausmodell entsprechende Befunde nachgewiesen werden. Somit grenzt das hier verwendetet Modell den Phänotyp der W/W^v Maus als auch den von Versuchstieren mit beeinträchtigtem NO-cGMP-Signalweg eindeutig auf die ICC ein (siehe Abbildung 3.13). Folglich konnte erstmals mit einem endogenen Mausmodell spezifisch nachgewiesen werden, dass die Cajalzellen tatsächlich eine bedeutende und sogar essentielle Rolle sowohl in der exzitatorischen als auch NO-abhängigen inhibitorischen Neurotransmission spielen.

4.2.1 Rolle der ICC bei der Vermittlung von *slow wave* Aktivität und exzitatorischer Neurotransmission

Als gravierendes Merkmal trat bei dem ICC-Depletionsmodell eine verzögerte Gesamttransitzeit auf (siehe Abbildung 3.5). Ein Phänotyp, der ebenso für W/W^{ν} Tiere beschrieben ist (Huizinga et al., 1995; Sanders & Ward, 2007). Betrachtet man die Befunde zur elektrischen Aktivität im Dünndarm bei beiden Modellen, so stimmen diese ebenfalls überein. Im Dünndarm der Tiere konnte in beiden Fällen ein nahezu kompletter Verlust der als slow waves bezeichneten rhythmischen Potentialschwankungen festgestellt werden. Dies tritt in entsprechender Weise auch bei Messungen an Muskelzellen von SI/SI^d Mäusen auf. deren Kit-Signalweg durch den mutierten Liganden beeinträchtigt ist (Ward et al., 1994; Ward et al., 1995). Zudem war bei *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Tieren das Ruhemembranpotential (RMP) im lleum signifikant depolarisiert. Dies ist ebenso für W/W^v Mäuse beschrieben (Huizinga et al., 1995). Diese Veränderung des Membranpotentials könnte der Hintergrund für die unkoordinierten Spontankontraktionen des lleums sein, die bei den in dieser Arbeit untersuchten Tieren auftraten. Im Gegensatz zu Präparaten von Kontrolltieren, deren spontane Kontraktionen der Zirkulärmuskelschicht im Organbad gleichmäßig und rhythmisch abliefen, ergaben sich bei den Kontraktionsaufzeichnungen der ICC-Depletionstiere dysrhythmische Muster (Abbildung 3.7). Bei einigen Präparaten setzten die Kontraktionen streckenweise ganz aus, um dann wieder kurzzeitig ein relativ normales Muster zu zeigen. Bei anderen Messungen hingegen konnte eine Vielzahl von Kontraktionen unterschiedlichster Stärke aber größtenteils mit verringerter Dauer aufgezeichnet werden, so dass man insgesamt von einer äußerst variablen Verteilung von Frequenz und Amplitude sprechen muss. Interessanterweise wurde ein ähnlicher Befund bereits bei Untersuchungen an einem Diabetesmodell publiziert. Yamamoto et al. (2008) belegen dabei anhand von Untersuchungen an db/db Tieren, Mäuse die ein Modell für Diabetes mellitus Typ 2 darstellen, die Beteiligung der ICC an Diabetes mellitus. Neben einer reduzierten Menge an c-Kit-positiven Bereichen (ICC) und einer verzögerten GI-Transitzeit weisen adulte db/db Tiere eine Störung der phasischen Kontraktionen des Dünndarms auf, die ebenfalls als unregelmäßig und variabel beschrieben werden. Trotz großer Variabilität ist die Kontraktionsfrequenz bei den db/db Tieren insgesamt erhöht (Yamamoto et al., 2008), was tendenziell auch bei dem vorliegenden ICC-Depletionsmodell der Fall war (siehe Abbildung 3.7). Prof. Sarna spricht in einem Übersichtsartikel von 2008 ebenfalls von slow waves und phasischen Kontraktionen mit unregelmäßiger Frequenz und kleiner Amplitude und zitiert dazu mehrere Untersuchungen an W/W^v Mäusen, die größtenteils von Prof. Huizinga durchgeführt wurden. Diese Befunde aufgreifend wird in dem Übersichtsartikel die Hypothese aufgestellt, dass die ICC gar nicht der Zelltyp mit Schrittmacheraktivität sind, sondern ihre Aufgabe die Aufrechterhaltung des RMPs in den Muskelzellen sei. Das RMP wiederum würde demnach die slow waves nur stabilisieren, was nicht möglich ist wenn bereits das RMP so erhöht ist, dass keine weitere Depolarisation stattfinden kann (Sarna, 2008). Zu dieser Fragestellung lieferten die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten keine abschließende Antwort. Aber zum einen lagen die gemessenen RMP-Werte in einem Bereich, in dem noch eine weitere Depolarisation möglich sein sollte. So führte auch eine exogene elektrische Stimulation (EFS) des Gewebes zu einem messbaren Spannungspeak (siehe Abbildung 3.8). Zum anderen wurde bei Tieren, die erst einige Monate nach der ICC-Depletion untersucht wurden, ein zwar immer noch leicht depolarisiertes, aber im Vergleich zu den akut-depletierten Tieren signifikant negativeres RMP gemessen. Ebenso wie die Mäuse mit akuter Depletion konnte bei diesen Tieren trotzdem weiterhin ein signifikanter Verlust der slow waves und phasischen Kontraktionen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit sprechen die mit Tieren des *c-Kit^{CreERT2}*-Modells generierten Daten insgesamt für eine aktive Rolle der ICC als Schnittmacherzellen.

Im Allgemeinen sind unkoordinierte spontane Kontraktionen ein Hinweis auf eine reduzierte oder beeinträchtigte Innervation der glatten Muskulatur. Geht man von einem klassischen Neurotransmissionsweg aus, bei dem die neuronalen Signale ohne Beteiligung weiterer Zelltypen die Muskelzellen erreichen, sei es nun direkt über Zell-Zell-Kontakte oder über zwischenzeitliche Diffusion durch den extrazellulären Raum zu weiter entfernten Zellen (*volume transmission*) (Sarna, 2008; Goyal & Chaudhury, 2010), sollte eine Störung des ICC-Netzwerks keinen Einfluss auf die neuronalen Signale haben. Allerdings sprechen die Ergebnisse unserer Untersuchungen an adulten *c-Kit^{CreERT2}* Tieren mit Cajalzelldepletion deutlich für eine essentielle Rolle dieser Zellen in der exzitatorischen Neurotransmission. Bei diesen Mäusen konnte neben den abnormalen spontanen Kontraktionen auch eine

veränderte Reaktion durch endogene Neurotransmitter, freigesetzt mittels elektrischer Feldstimulation, gemessen werden. Die Kontraktionskraft war strak signifikant vermindert (siehe Abbildung 3.9). Zudem zeigte auf elektrophysiologischer Ebene der spezifische totale Verlust des EJP, dass bei diesem Mausmodell explizit die cholinerge Komponente der Neurotransmission beeinträchtigt ist.

Das fundamentale Element der elektrischen Aktivität sind Ionenkanäle sowie die Freisetzung und Aufnahme von Ionen, insbesondere Ca²⁺. Dieses wird im Laufe des Schrittmacherzyklus sowohl aus intrazellulären Speichern wie Endoplasmatisches Retikulum oder Mitochondrien als auch über Ionenkanäle in der Zellmembran freigesetzt oder aufgenommen, wodurch letztendlich die Schwankungen des Membranpotentials entstehen (Hirst & Ward, 2003; Sanders et al., 2006). Neben Ca²⁺-Kanälen spielen auch andere Ionenkanäle eine Rolle. So kam vor kurzem der Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanal Anoctamin 1 (Ano1, auch bekannt unter den Namen TMEM16A oder DOG1) in den Fokus. Ano1 wird bei Mensch und Maus in ICC exprimiert und findet nun als ein weiterer Marker für diese Zellen Verwendung (Gomez-Pinilla et al., 2009). So wurde auch hier eine Ano1-Färbung verwendet, um c-Kit-unabhängig die Depletion der Cajalzellen nachzuweisen (siehe Abbildung 3.4). Das Vorhandensein von Ano1 in ICC legt den Schluss nahe, dass dieser Ionenkanal eine wichtige Rolle bei der elektrischen Aktivität spielen könnte. Inzwischen gibt es Hinweise, dass dies auch tatsächlich der Fall ist: Mäuse mit einem generellen knock-out von Ano1 zeigen keine slow wave Aktivität, weder direkt nach der Geburt, noch als adulte Tiere (Hwang et al., 2009; Singh et al., 2014). Ebenso führt die pharmakologische Inhibition von Ano1 zu unrhythmischen und unkoordinierten Ca²⁺-Strömen innerhalb des ICC-Netzwerks am myenterischen Plexus, was dem Phänotyp der Ano1 knock-out Tiere entspricht (Singh et al., 2014). Bei Tieren mit generellem Ano1 knock-out ist die Physiologie, aber nicht die Entwicklung des ICC-Netzwerks beeinträchtigt (Hwang et al., 2009). Dies mag eine Erklärung dafür liefern, warum bei diesen Tieren zwar die Rhythmizität der im Organbad gemessenen Kontraktionen ähnlich denen der *c-Kit^{CreERT2/+}:R26^{DTA/+}* Mäuse ist, aber im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten die Amplitude der Kontraktion signifikant geringer ausfällt (Abbildung 3.7) (Singh et al., 2014). Insgesamt weisen all diese Daten daraufhin, dass mit dem Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanal Ano1 sicherlich ein wichtiger Bestandteil des die Kontraktionen im GI-Trakt koordinierenden Mechanismus gefunden wurde. Dass dieser Kanal auch beim Menschen von Relevanz ist belegt eine Studie, die bei unter Obstipation (slow transit constipation) leidenden Patienten eine signifikant verminderte Anzahl der Ano1-positiven ICC nachweist (Kashyap et al., 2011). Eine direkter Nachweis, dass die in ICC exprimierten Ano1-Kanäle wirklich essentiell sind, und nicht weitere Proteine der Anoctamin Familie, deren Funktion zur Zeit untersucht wird, und die eventuell auch in anderen Zelltypen der Darmwand exprimiert werden (Tian et al.,

2012; Singh et al., 2014) muss allerdings noch erbracht werden. Die Antwort auf diese Frage würde ein Cajalzell-spezifischer *knock-out* von Ano1 liefern.

4.2.2 ICC in der NO-abhängigen inhibitorischen Neurotransmission

Nicht nur die exzitatorische sondern auch die inhibitorische Neurotransmission war Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen. Dazu wurde das *c-Kit*^{CreERT2/+};*Prkg1^{trf}* Mausmodell verwendet. Dies zeigte, dass ICC, die eine starke Expression von Prkg1 aufweisen (Abbildung 3.11 und Salmhofer et al, 2001), Zielzellen des von den Neuronen freigesetzten NO sind und eine Blockade dieses Signalwegs in den ICC phänotypische Auswirkungen hat. Nichtsdestotrotz weisen die Zellen der glatten Muskulatur ebenso den Rezeptor für NO, die im Zytosol vorkommende lösliche NO-sensitive Guanylatcyclase (sGC, *soluble guanylyl cyclase*) auf, wobei das Expressionslevel der sGC in ICC höher ist als in den Muskelzellen (lino et al., 2008; Groneberg et al., 2011). Beide Zelltypen sind fähig auf den Neurotransmitter NO zu reagieren (Groneberg et al., 2013). Die Gruppe von Prof. Friebe zeigt mit einen konditionellen *knock-out* von sGC (sGC-KO) in ICC und glatten Muskelzellen im Magen von Versuchsmäusen, dass beide Zelltypen die Relaxation vermitteln aber nur bei einem doppelten sGC-KO in sowohl Muskelzellen als auch ICC eine signifikante Auswirkung auf die Motilität und Kontraktionskraft nachweisbar ist (Groneberg et al., 2013).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten hingegen weisen für das Colon die ICC als die primären Zielzellen des NO-Signalwegs und somit für diesen Abschnitt des GI-Trakts als essentielles Bindeglied zwischen den enterischen Neuronen und den glatten Muskelzellen im Rahmen der nitrergen inhibitorischen Neurotransmission auf (Klein et al., 2013). Als erster Hinweis für die Rolle der ICC als primäre Empfänger des NO-Signalings können Befunde, dass diese Zellen mit den Endungen der nitrergen Nervenzellen enge Kontakte bilden gesehen werden (Ward et al., 2004; Ward & Sanders, 2006; lino et al., 2008). Die Verbreitung des freigesetzten NOs ist räumlich begrenzt. So diffundiert dieses bevorzugter Weise zu Zellen, die sich in räumlicher Nähe zu den Neuronen befinden, welche für die Freisetzung dieses Neurotransmitters ursächlich sind. Möglicherweise agieren ICC im Normalfall *in vivo* als die Haupteffektorzellen. Dafür spricht, dass ICC im GI-Trakt eine koordinierende Aufgabe innehaben. Zumindest für das Colon konnte die hier vorgestellte Arbeit dies belegen, weitere Abschnitte es GI-Trakts wurden nicht näher untersucht.

Von Prof. Friebe wurde für den Magen ein dualer Mechanismus des NO-Signalwegs sowohl über ICC als auch über glatte Muskelzellen postuliert. Demnach scheint ein Zusammenspiel der Signalwege über beide Zelltypen für den basalen Tonus des unteren Ösophagussphinkter verantwortlich, während die durch Schlucken induzierte Relaxation dieses Ösophagussphinkters hauptsächlich über ICC reguliert wird (Groneberg et al., 2014). Inzwischen hat ebendiese Gruppe unter Verwendung des cGC-KO Modells auch murines Colon untersucht und stellt für den Dickdarm Resultate vor, die mit den hier vorliegenden gut in Verbindung gebracht werden können: Bei basal, unter physiologischen Bedingungen vorliegendem NO agiert dieser Neurotransmitter hauptsächlich über ICC. Tiere mit konditionellem sGC-KO in den Cajalzellen weisen für die Kontraktion der Longitudinalmuskulatur ähnliche Messergebnisse auf wie Mäuse mit generellem knock-out von sCG (Lies et al., 2015). Ebenso konnte bei den c-Kit^{CreERT2/+}:Prkg1^{f/f} Tieren mit ICCspezifischem Prkg1 knock-out eine signifikante Auswirkung auf die Motilität und die inhibitorische NANC-Neurotransmission (sIJP) festgestellt werden (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13). Zusammenfassend zeigen die beiden Versuchsmodelle mit ICCspezifischer Deletion jeweils eines Proteins des NO-Signalwegs (PKG1 bzw. sGC) eine essentielle Rolle der Cajalzellen in der nitergen Neurotransmission im Colon.

Neben dieser grundlegenden Rolle der ICC zeigen Lies et. al. (2015), bei ihren Versuchen am proximalen Colon, dass neben Cajalzellen auch die glatten Muskelzellen als Effektorzellen neuronales NOs fungieren, das nach externer Stimulation freigesetzt wird. Dieser NO-Signalweg über Muskelzellen könnte ein zusätzlicher Backup-Mechanismus für vermehrte Relaxation der GI-Muskulatur bei physiologisch hohen Konzentrationen von NO sein. Und bietet im Falle des c-Kit^{CreERT2/+}:R26^{DTA/+} ICC-Depletionsmodells bei dem keine signifikanten Veränderungen des sIJP gemessen wurden, eine Erklärung für die Nicht-Beeinträchtigung der nitrergen inhibitorischen Neurotransmission. Insgesamt weisen diese Daten auf einen Neurotransmissionsmechanismus hin, bei dem *in vivo* mehr als ein Zelltyp beteiligt ist. Dabei bleibt in dieser Arbeit die Frage nach der Beteiligung von weiteren Zelltypen im Rahmen der inhibitorischen Neurotransmission offen. So exprimieren PDGFRapositive, fibroblasten-ähnliche Zellen (siehe 4.3), die in der purinergen Neurotransmission eine Rolle spielen (Blair et al., 2014; Sanders, 2014) ebenfalls sCG (lino et al., 2008) und PKG1β (Daten nicht gezeigt). Diese PDGFRα⁺ Zellen werden von der Gruppe von Prof. Friebe ebenfalls als wichtig in der inhibitorischen Neurotransmission erachtet (Lies et al., 2014).

4.3 Weitere Spieler in der gastrointestinalen Neurotransmission

Cajalzellen sind nicht der einzige Typ von interstitiellen Zellen im Gastrointestinaltrakt. Iino et al. (2009) zeigen, dass Zellen existieren, die eine ähnliche Morphologie und Lokalisation im GI-Trakt wie ICC aufweisen, sich aber ansonsten von diesen unterscheiden. Diese schon zuvor von Morphologen als "fibroblastenähnlich" beschriebenen Zellen sind negativ für c-Kit, exprimieren aber eine andere Rezeptortyrosinkinase, den *platelet-derived growth factor*

receptor α , PDGFR α , so dass viele Gruppen inzwischen den Namen PDGFR α^{+} Zellen übernommen haben (lino et al., 2009a; Sanders, 2014). Verschiedene Studien zeigen ein Vorkommen dieser Zellen sowohl beim Menschen als auch in Versuchstieren (Primaten und Nagern). Sie kommen ebenfalls in anatomischer Nähe von, sowie mit Kontakten zu Neuronen, ICC und glatten Muskelzellen vor, und bilden Netzwerke in direkter Nachbarschaft der ICC beispielsweise im Bereich des myenterischen Plexus aus. Dies lässt für die PDGFRa⁺ Zellen auf eine analoge Rolle in der enterischen Neurotransmission schließen (Cobine et al., 2011; Kurahashi et al., 2011; Blair et al., 2012; Sanders, 2014). Kurahashi et al. (2011) zeigen zudem, dass PDGFRα⁺ Zellen SK3 Kanäle (smal conductance calciumactivated potassium channel 3, ein Kalzium-aktivierter Kalium-Kanal) und P2Y₁ Rezeptoren exprimieren. Dies sind Schlüsselelemente der purinergen inhibitorischen Komponente der gastrointestinalen Neurotransmission. Purine wie ATP, ADP oder β-NAD (B-Nikotinamidadenindinukleotid) binden an P2Y₁ Rezeptoren. Dadurch wird ein Signalweg angeschaltet, der zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt (Kurahashi et al., 2011; Gallego et al., 2012). Da Purine nur schwach auf die Zellen der glatten Muskulatur im GI-Trakt wirken (Koh et al., 1997) und anhand von Ergebnissen bei Untersuchungen an Reportermäusen wird nun angenommen, dass der durch Purine vermittelte Anteil der Hyperpolarisation über PDGFRa⁺ Zellen weitergeleitet wird (Kurahashi et al., 2011).

Sanders et al. (2012) haben inzwischen den Begriff eines SIP-Synzytium etabliert, wobei die Buchstaben für SMC (*smooth mucle cells*, glatte Muskelzellen), ICC und PDGFRa⁺ Zellen stehen (Sanders et al., 2012; Sanders, 2014). Dahinter verbirgt sich die Annahme, dass all diese Zelltypen elektrisch gekoppelt und im Zusammenspiel nötig für eine intakte enterische Neurotransmission sind. Bei einer Beeinträchtigung und/oder des Verlustes einer der Komponenten des SIP-Synzytiums oder der Kontakte dieser Zellen untereinander würde dies zu einer abnormalen Motilität führen. Diese Annahme wurde mit der vorliegenden Arbeit für ein beeinträchtigtes ICC-Netzwerk bestätigt (Klein et al., 2013). Weiterhin ist bekannt, dass ICC-defiziente W/W^v-Mäuse keine Veränderungen am Netzwerk der PDGFRa⁺ Zellen aufweisen (lino et al., 2009a). Dieser Befund konnte auch anhand des c-Kit^{CreERT2/+}:R26^{DTA/+} Modells mit Beeinträchtigung der Cajalzellen für die Anzahl der PDGFR α^+ Zellen bestätigt werden (Abbildung 3.10). Ebenso scheinen auf morphologischer Ebene nach akuter Depletion der ICC in adulten Tieren keine auffälligen Veränderungen aufzutreten. Tatsächliche Nachweise ob es trotzdem eine funktionelle Verschiebung in Richtung dieses Zelltyps gibt, stehen allerdings aus. Einen Hinweis, dass dies der Fall sein könnte, liefern die hier gezeigten Messungen des Junktionspotentials (fIJP) beim *c-Kit^{CreERT2/+}:R26^{DTA/+}* Modell. So konnte eine leichte, wenn auch in den vorliegenden Daten nicht signifikante

Vergrößerung der Relaxation gemessen werden die eventuell auf einen verstärkten funktionellen Einfluss der PDGFRα⁺ Zellen zurückzuführen sein könnte.



Abbildung 4.1: Innervation des Darms – Konzept des SIP-Synzytiums

Nach dem Konzept des SIP-Synzytiums (Sanders et al., 2012) existiert neben den ICC (gelb) mindestens ein weiterer Typ von interstitiellen Zellen, die PDGFRa⁺ Zellen (grün). Die von den Neuronen freigesetzten Neurotransmitter binden an entsprechende Rezeptoren an beiden Zelltypen wobei purinerge Signale hauptsächlich mittels PDGFRa⁺ Zellen weitergeleitet werden, während Stickstoffmonoxyd (NO) oder Acetylcholin (Ach) an den ICC wirkt. Beide Arten von interstitiellen Zellen stellen somit die Verbindung zwischen Neuronen und Muskulatur dar, wobei Muskelzellen, ICC und PDGFRa⁺ Zellen elektrisch gekoppelt sind.

Insgesamt macht es die elektrische Kopplung der verschiedenen Zelltypen des SIP-Synzytiums aber schwierig die spezifische Funktion eines der Zelltypen zu deduzieren. Die beste Lösung um Antworten auf die Frage der Beteiligung der PDGFR α^+ Zellen, insbesondere bei der exzitatorischen Neurotransmission zu erhalten, wäre ein entsprechendes zellspezifisches KO-Mausmodell. Ein existierendes Modell für eine induzierbare *PDGFR* α -*Cre*^{*ERTM*} Maus (Kang et al., 2010) wurde bereits mit dem *R26*^{*mT-mG*}-Reporter verkreuzt. Die Rekombinationseffizienz dieser Cre-Linie erwies sich allerdings als zu variabel, als dass mit diesen Tieren weitere funktionelle Versuche durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt).

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten wiesen erstmals in adulten Versuchstieren auf genetischer Ebene nach, dass interstitielle Zellen von Cajal in der gastrointestinalen Motilität eine ausschlaggebende Rolle spielen. Neben der Vermittlung der *slow wave* Aktivität ist ein

intaktes ICC-Netzwerk essentiell für exzitatorische Neurotransmission und es spielt ebenso eine wichtige Rolle in der Weiterleitung inhibitorischer Signale (Klein et al., 2013).

Interessanterweise normalisiert sich bei den Tieren die nach akuter Depletion der ICC die gravierende Verzögerung der gastroinstestinalen Transitzeit einige Wochen nach der Tamoxifenbehandlung wieder (Daten nicht gezeigt). Worauf diese Normalisierung zurückzuführen sein könnte, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen. Denkbar wäre eine Regernationsfähigkeit der verbleibenden Cajalzellen. Für enterische Neuronen ist Plastizität seit einiger Zeit beschrieben. Nicht nur während der Entwicklung und des Alterungsprozesses sondern auch als Reaktion auf unterschiedliche Umgebungsbedingungen beispielsweise durch Veränderung der Diät oder bedingt durch Erkrankungen kann sich das ENS anpassen (Giaroni et al., 1999; Schafer et al., 2009; Stenkamp-Strahm et al., 2015). Auch für ICC postulieren Sanders und Kollegen Plastizität: Laut dieser Hypothese entwickeln sich ICC und Muskelzellen aus einer gemeinsamen mesenchymalen Vorläuferzelle. Bleibt der c-Kit Signalweg aktiv, differenzieren die Zellen zu ICC während ohne c-Kit-Signal die Entwicklung von glatten Muskelzellen stattfindet. Für einen Verlust des c-Kit-Signalwegs in adulten Cajalzellen ist die Möglichkeit einer Transdifferenzierung hin zu Muskelzellen beschrieben (Torihashi et al., 1997; Sanders et al., 1999; Sanders & Ward, 2006; Mei et al., 2009). Ob bei dem in dieser Arbeit verwendeten ICC-Depletionsmodell möglicherweise eine Transdifferenzierung in die entgegengesetzte Richtung hin zu ICC stattfinden könnte, müssen weitere Untersuchungen an den c-KitCreERT2/+ Tieren zeigen. Ebenso ist eine Proliferation oder morphologische Veränderung der verbleibenden ICC denkbar. Um dies näher zu untersuchen sind aber die hier vorgestellten Mausmodelle eher ungünstig. Sowohl das DTA als auch der Fluoreszenzreporter sind Tamoxifen-abhängig aktivierbar, was eine Kreuzung dieser beiden Allele unvorteilhaft für weitere morphologische Untersuchungen macht. Eine elegantere Methode für weitere Versuche wäre die Cre-induzierbare Expression eines Diphtherietoxinrezeptors auf c-Kitpositiven Zellen (Buch et al., 2005). Mit diesem Mausmodell könnten die Cajalzellen zuerst durch Expression von GFP markiert werden. Nach einer anschließenden Depletion durch Diphtherietoxingabe hätte man die Möglichkeit dem Schicksal der noch vorhandenen GFPpositiven Zellen einfacher zu Folgen. Erste Versuche diesbezüglich wurden bereits durchgeführt.

Neben den erwähnten Untersuchungen um einen Einblick in den möglicherweise morphologischen Hintergrund der Transitzeitnormalisierung zu bekommen sind zudem physiologische Untersuchungen an *c-Kit^{CreERT2/+};R26^{DTA/+}* Tieren einige Zeit nach akuter ICC-Depletion nötig, um Erkenntnisse zu den Auswirkungen auf Muskelkontraktionsmuster und

Elektrophysiologie zu bekommen. Hier soll die Frage beantwortet werden, ob sich neben der Transitzeit auch die Kontraktions- und Junktionspotentialmuster normalisieren.

Zudem könnten all diese Versuche Hinweise darüber geben, ob neben den ICC weitere sich in der Darmwand befindliche Zelltypen wie Neuronen, Muskelzellen oder PDGFRα⁺-Zellen eine Rolle spielen bzw. zur Kompensation des Funktionsverlust des beeinträchtigten ICC-Netzwerks beitragen.

5 Literaturverzeichnis

- Baba, Y., Nakano, M., Yamada, Y., Saito, I., Kanegae, Y. (2005). Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells. *Microbiology and Immunology, 49*(6), 559-570.
- Bashashati, M., McCallum, R. W. (2015). Is Interstitial Cells of Cajal-opathy Present in Gastroparesis? *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, *21*(4), 486-493.
- Bassotti, G., Villanacci, V., Nascimbeni, R., Cadei, M., Manenti, S., Antonelli, E., Fanini, L., Salerni, B. (2012). Increase of colonic mast cells in obstructed defecation and their relationship with enteric glia. *Digestive Diseases and Sciences*, *57*(1), 65-71.
- Bayliss, W. M., Starling, E. H. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *The Journal of Physiology, 24*(2), 99-143.
- Beckett, E. A., Horiguchi, K., Khoyi, M., Sanders, K. M., Ward, S. M. (2002). Loss of enteric motor neurotransmission in the gastric fundus of SI/SI(d) mice. *The Journal of Physiology*, *543*(Pt 3), 871-887.
- Bergstresser, P. R., Tigelaar, R. E., Tharp, M. D. (1984). Conjugated avidin identifies cutaneous rodent and human mast cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, *83*(3), 214-218.
- Blair, P. J., Bayguinov, Y., Sanders, K. M., Ward, S. M. (2012). Relationship between enteric neurons and interstitial cells in the primate gastrointestinal tract. *Neurogastroenterology and Motility*, 24(9), e437-449.
- Blair, P. J., Rhee, P. L., Sanders, K. M., Ward, S. M. (2014). The Significance of Interstitial Cells in Neurogastroenterology. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 20(3), 294-317.
- Blume-Jensen, P., Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature, 411*(6835), 355-365.
- Boeckxstaens, G. E., de Jonge, W. J. (2009). Neuroimmune mechanisms in postoperative ileus. *Gut, 58*(9), 1300-1311.
- Botchkareva, N. V., Khlgatian, M., Longley, B. J., Botchkarev, V. A., Gilchrest, B. A. (2001). SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB Journal, 15*(3), 645-658.
- Broccardo, M., Improta, G., Tabacco, A. (1998). Central effect of SNC 80, a selective and systemically active delta-opioid receptor agonist, on gastrointestinal propulsion in the mouse. *European Journal of Pharmacology*, *342*(2-3), 247-251.
- Buch, T., Heppner, F. L., Tertilt, C., Heinen, T. J., Kremer, M., Wunderlich, F. T., Jung, S., Waisman, A. (2005). A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nature Methods*, 2(6), 419-426.
- Burns, A. J., Lomax, A. E. J., Torihashi, S., Sanders, K. M., Ward, S. M. (1996). Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(21), 12008-12013.
- Cajal, S. R. (1893). Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales (Paris)*(45), 217-223.

- Cajal, S.R. (1911). Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres. (Vol. 1, pp. 891-942). Paris: Maloine.
- Chabot, B., Stephenson, D. A., Chapman, V. M., Besmer, P., Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature*, *335*(6185), 88-89.
- Chaudhury, A. (2013). Evidence for dual pathway for nitrergic neuromuscular transmission in doubt: evidence favors lack of role of ICC. *Gastroenterology*, *145*(5), 1160-1161.
- Chen, Hui, Redelman, Doug, Ro, Seungil, Ward, Sean M., Ordog, Tamas, Sanders, Kenton M. (2007). Selective labeling and isolation of functional classes of interstitial cells of Cajal of human and murine small intestine. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C497-C507.
- Cobine, C. A., Hennig, G. W., Kurahashi, M., Sanders, K. M., Ward, S. M., Keef, K. D. (2011). Relationship between interstitial cells of Cajal, fibroblast-like cells and inhibitory motor nerves in the internal anal sphincter. *Cell and Tissue Research*, 344(1), 17-30.
- Collier, R. J. (2001). Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon, 39*(11), 1793-1803.
- Cousins, H. M., Edwards, F. R., Hickey, H., Hill, C. E., Hirst, G. D. S. (2003). Electrical coupling between the myenteric interstitial cells of Cajal and adjacent muscle layers in the guinea-pig gastric antrum. *Journal of Physiology-London*, *550*(3), 829-844.
- Cox, B. C., Liu, Z., Lagarde, M. M., Zuo, J. (2012). Conditional gene expression in the mouse inner ear using Cre-loxP. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, *13*(3), 295-322.
- Daniel, E. E., Posey-Daniel, V. (1984). Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. *American Journal of Physiology*, 246(3), G305-G315.
- De Man, J. G., De Winter, B. Y., Herman, A. G., Pelckmans, P. A. (2007). Study on the cyclic GMP-dependency of relaxations to endogenous and exogenous nitric oxide in the mouse gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology, 150*(1), 88-96.
- De Ponti, F., D'Angelo, L., Frigo, G. M., Crema, A. (1989). Inhibitory effects of calcium channel blockers on intestinal motility in the dog. *European Journal of Pharmacology*, *168*(2), 133-144.
- De Winter, B. Y., van den Wijngaard, R. M., de Jonge, W. J. (2012). Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochimica et Biophysica Acta, 1822*(1), 66-73.
- Der-Silaphet, T., Malysz, J., Hagel, S., Arsenault, A. L., Huizinga, J. D. (1998). Interstitial cells of Cajal direct normal propulsive contractile activity in the mouse small intestine. *Gastroenterology*, *114*(4), 724-736.
- Dubreuil, P., Rottapel, R., Reith, A. D., Forrester, L., Bernstein, A. (1990). The mouse W/c-kit locus. A mammalian gene that controls the development of three distinct cell lineages. *Annals of the New York Academy of Sciences, 599*, 58-65.

- Eshraghian, A., Eshraghian, H. (2011). Interstitial cells of Cajal: A novel hypothesis for the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 25(5), 277-279.
- Farrugia, G. (1999). Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal. *Annual Review of Physiology*, *61*, 45-84.
- Faussone-Pellegrini, M. S., Cortesini, C., Romagnoli, P. (2013). The ultrastructure of the muscle coat of human gastro-oesophageal junction, with special reference to "interstitial cells of Cajal". *Frontiers in Neuroscience*, 7, 49-49.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., Chambon, P. (1996). Ligandactivated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10887-10890.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3), 752-757.
- Frei, E., Huster, M., Smital, P., Schlossmann, J., Hofmann, F., Wegener, J. W. (2009). Calcium-dependent and calcium-independent inhibition of contraction by cGMP/cGKI in intestinal smooth muscle. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(4), G834-839.
- Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A., Koesling, D. (2007). Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7699-7704.
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 9(5), 286-294. doi: 10.1038/nrgastro.2012.32
- Gallego, D., Gil, V., Martinez-Cutillas, M., Mane, N., Martin, M. T., Jimenez, M. (2012). Purinergic neuromuscular transmission is absent in the colon of P2Y(1) knocked out mice. *The Journal of Physiology*, *590*(8), 1943-1956.
- Garcia-Lopez, P., Garcia-Marin, V., Martinez-Murillo, R., Freire, M. (2009). Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal. *Brain Research Reviews*, *61*(2), 154-169.
- Geissler, E. N., Ryan, M. A., Housman, D. E. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell*, *55*(1), 185-192.
- Giaroni, C., De Ponti, F., Cosentino, M., Lecchini, S., Frigo, G. (1999). Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology*, *117*(6), 1438-1458.
- Gomez-Pinilla, P. J., Farro, G., Di Giovangiulio, M., Stakenborg, N., Nemethova, A., de Vries, A., Liston, A., Feyerabend, T. B., Rodewald, H. R., Boeckxstaens, G. E., Matteoli, G. (2014). Mast cells play no role in the pathogenesis of postoperative ileus induced by intestinal manipulation. *PLoS One*, *9*(1), e85304.
- Gomez-Pinilla, P. J., Gibbons, S. J., Bardsley, M. R., Lorincz, A., Pozo, M. J., Pasricha, P. J., Van de Rijn, M., West, R. B., Sarr, M. G., Kendrick, M. L., Cima, R. R., Dozois, E. J., Larson, D. W., Ordog, T., Farrugia, G. (2009). Ano1 is a selective marker of interstitial

cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology, 296*(6), G1370-1381.

- Goyal, Raj K., Chaudhury, Arun. (2010). Mounting evidence against the role of ICC in neurotransmission to smooth muscle in the gut. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(1), G10-G13.
- Groneberg, D., Konig, P., Koesling, D., Friebe, A. (2011). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is dispensable for nitrergic signaling and gut motility in mouse intestinal smooth muscle. *Gastroenterology*, *140*(5), 1608-1617.
- Groneberg, D., Lies, B., Konig, P., Jager, R., Seidler, B., Klein, S., Saur, D., Friebe, A. (2013). Cell-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase reveals a dual pathway for nitrergic neuromuscular transmission in the murine fundus. *Gastroenterology*, *145*(1), 188-196.
- Groneberg, D., Zizer, E., Lies, B., Seidler, B., Saur, D., Wagner, M., Friebe, A. (2014). Dominant role of interstitial cells of Cajal in nitrergic relaxation of murine lower oesophageal sphincter. *The Journal of Physiology*, *593*(2), 403-414.
- Hameyer, D., Loonstra, A., Eshkind, L., Schmitt, S., Antunes, C., Groen, A., Bindels, E., Jonkers, J., Krimpenfort, P., Meuwissen, R., Rijswijk, L., Bex, A., Berns, A., Bockamp, E. (2007). Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. *Physiological Genomics*, *31*(1), 32-41.
- Hayashi, S., McMahon, A. P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology,* 244(2), 305-318.
- He, C. L., Soffer, E. E., Ferris, C. D., Walsh, R. M., Szurszewski, J. H., Farrugia, G. (2001). Loss of interstitial cells of Cajal and inhibitory innervation in insulin-dependent diabetes. *Gastroenterology*, 121(2), 427-434.
- He, X. D., Goyal, R. K. (1993). Nitric oxide involvement in the peptide VIP-associated inhibitory junction potential in the guinea-pig ileum. *The Journal of Physiology, 461*, 485-499.
- Heger, K., Seidler, B., Vahl, J. C., Schwartz, C., Kober, M., Klein, S., Voehringer, D., Saur, D., Schmidt-Supprian, M. (2013). CreER(T2) expression from within the c-Kit gene locus allows efficient inducible gene targeting in and ablation of mast cells. *European Jounal of Immunology*, 44(1), 296-306.
- Hirst, G. D. S., Ward, S. M. (2003). Interstitial cells: involvement control of gut smooth muscle. *Journal of Physiology-London, 550*(2), 337-346.
- Hirst, G. David S., Edwards, Frank R. (2006). Electrical events underlying organized myogenic contractions of the guinea pig stomach. *Journal of Physiology-London*, *576*(3), 659-665.
- Hofmann, F. (2005). The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 1-4.
- Hofmann, F., Ammendola, A., Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of Cell Science, 113 (Pt 10)*, 1671-1676.

- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiological Reviews*, *86*(1), 1-23.
- Horie, K., Fujita, J., Takakura, K., Kanzaki, H., Suginami, H., Iwai, M., Nakayama, H., Mori, T. (1993). The expression of c-kit protein in human adult and fetal tissues. *Human Reproduction*, 8(11), 1955-1962.
- Huh, W. J., Khurana, S. S., Geahlen, J. H., Kohli, K., Waller, R. A., Mills, J. C. (2012). Tamoxifen induces rapid, reversible atrophy, and metaplasia in mouse stomach. *Gastroenterology*, *142*(1), 21-24 e27.
- Huizinga, J. D., Chen, J. H., Mikkelsen, H. B., Wang, X. Y., Parsons, S. P., Zhu, Y. P. (2013). Interstitial cells of Cajal, from structure to function. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 43-43.
- Huizinga, J. D., Lammers, W. J. E. P. (2009). Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(1), G1-G8.
- Huizinga, J. D., Thuneberg, L., Kluppel, M., Malysz, J., Mikkelsen, H. B., Bernstein, A. (1995). W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*, 373(6512), 347-349.
- Huizinga, J. D., Zarate, N., Farrugia, G. (2009). Physiology, Injury, and Recovery of Interstitial Cells of Cajal: Basic and Clinical Science. *Gastroenterology*, 137(5), 1548-1556.
- Hwang, S. J., Blair, P. J., Britton, F. C., O'Driscoll, K. E., Hennig, G., Bayguinov, Y. R., Rock, J. R., Harfe, B. D., Sanders, K. M., Ward, S. M. (2009). Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *The Journal of Physiology*, *587*(Pt 20), 4887-4904.
- lino, S., Horiguchi, K., Horiguchi, S., Nojyo, Y. (2009a). c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor alpha in the murine gastrointestinal musculature. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(6), 691-702.
- lino, S., Horiguchi, K., Nojyo, Y. (2008). Interstitial cells of Cajal are innervated by nitrergic nerves and express nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience*, 152(2), 437-448.
- lino, S., Horiguchi, K., Nojyo, Y. (2009b). W(sh)/W(sh) c-Kit mutant mice possess interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus layer of the small intestine. *Neuroscience Letters*, 459(3), 123-126.
- lino, S., Horiguchi, K., Nojyo, Y., Ward, S. M., Sanders, K. M. (2009c). Interstitial cells of Cajal contain signalling molecules for transduction of nitrergic stimulation in guinea pig caecum. *Neurogastroenterology and Motility*, 21(5), 553-563.
- lino, S., Horiguchi, S., Horiguchi, K. (2011). Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal musculature of W(jic) c-kit mutant mice. *Journal of Smooth Muscle Research*, 47(3-4), 111-121.
- Ivanova, A., Signore, M., Caro, N., Greene, N. D. E., Copp, A. J., Martinez-Barbera, J. P. (2005). In vivo genetic ablation by Cre-mediated expression of diphtheria toxin fragment A. *Genesis*, 43(3), 129-135.

- Kang, S. H., Fukaya, M., Yang, J. K., Rothstein, J. D., Bergles, D. E. (2010). NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron*, 68(4), 668-681.
- Kashyap, P., Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., Cima, R. R., Dozois, E. J., Larson, D. W., Ordog, T., Gibbons, S. J., Farrugia, G. (2011). Immunoreactivity for Ano1 detects depletion of Kit-positive interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Neurogastroenterology and Motility*, 23(8), 760-765.
- Keilbach, A., Ruth, P., Hofmann, F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *European Journal of Biochemistry*, 208(2), 467-473.
- Keith, A. (1915). The Cabendish lecture on a new theory of the causation of enterostasis. *Lancet*, *2*, 371-375.
- Kitamura, Y., Go, S., Hatanaka, K. (1978). Decrease of mast cells in W/Wv mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*, *52*(2), 447-452.
- Klein, S., Seidler, B., Kettenberger, A., Sibaev, A., Rohn, M., Feil, R., Allescher, H. D., Vanderwinden, J. M., Hofmann, F., Schemann, M., Rad, R., Storr, M. A., Schmid, R. M., Schneider, G., Saur, D. (2013). Interstitial cells of Cajal integrate excitatory and inhibitory neurotransmission with intestinal slow-wave activity. *Nature Communications*, *4*, 1630.
- Klinke, R.; Pape, H.-C.; Kurtz, A.; Silbernagl S. (2005). *Physiologie* (Vol. 6. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Koh, S. D., Dick, G. M., Sanders, K. M. (1997). Small-conductance Ca(2+)-dependent K+ channels activated by ATP in murine colonic smooth muscle. *American Journal of Physiology*, 273(6 Pt 1), C2010-2021.
- Koh, S. D., Sanders, K. M., Ward, S. M. (1998). Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *Journal of Physiology-London*, *513*(1), 203-213.
- Komuro, T. (2006). Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Journal of Physiology-London, 576*(3), 653-658.
- Kurahashi, M., Zheng, H., Dwyer, L., Ward, S. M., Don Koh, S., Sanders, K. M. (2011). A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles. *The Journal of Physiology*, *589*(Pt 3), 697-710.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L., Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89*(14), 6232-6236.
- Lee, H. T., Hennig, G. W., Fleming, N. W., Keef, K. D., Spencer, N. J., Ward, S. M., Sanders, K. M., Smith, T. K. (2007). The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of Cajal in human small intestine. *Gastroenterology*, *132*(5), 1852-1865. doi: 10.1053/j.gastro.2007.02.049
- Leone, D. P., Genoud, S., Atanasoski, S., Grausenburger, R., Berger, P., Metzger, D., Macklin, W. B., Chambon, P., Suter, U. (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 22(4), 430-440.

- Lies, B., Beck, K., Keppler, J., Saur, D., Groneberg, D., Friebe, A. (2015). Nitrergic signalling via interstitial cells of Cajal regulates motor activity in murine colon. *The Journal of Physiology*, 593(20), 4589-4601.
- Lies, B., Groneberg, D., Friebe, A. (2014). Toward a better understanding of gastrointestinal nitrergic neuromuscular transmission. *Neurogastroenterology and Motility, 26*(7), 901-912.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(16), 9209-9214.
- Maeda, H., Yamagata, A., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Kobayashi, S., Nishi, K., Nishikawa, S. (1992). Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development*, *116*(2), 369-375.
- Maxwell, I. H., Maxwell, F., Glode, L. M. (1986). Regulated expression of a diphtheria toxin A-chain gene transfected into human cells: possible strategy for inducing cancer cell suicide. *Cancer Research*, *46*(9), 4660-4664.
- Mei, F., Han, J., Huang, Y., Jiang, Z. Y., Xiong, C. J., Zhou, D. S. (2009). Plasticity of interstitial cells of cajal: a study in the small intestine of adult Guinea pigs. *Anatomical Record*, 292(7), 985-993.
- Mostafa, R. M., Moustafa, Y. M., Hamdy, H. (2010). Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease. *World Journal of Gastroenterology*, *16*(26), 3239-3248.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51 Pt 1*, 263-273.
- Murphy, R. A., Walker, J. S. (1998). Inhibitory mechanisms for cross-bridge cycling: the nitric oxide-cGMP signal transduction pathway in smooth muscle relaxation. *Acta Physiologica Scandinavica*, *164*(4), 373-380.
- Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., Luo, L. (2007). A global double-fluorescent cre reporter mouse. *Genesis*, *45*(9), 593-605.
- Nagl, F., Schneider, G., Seidler, B., R.M., Schmid., Saur, D. (2007). Generierung und initiale Charakterisierung einer c-Kit Cre-ER^{T2} Mauslinie. Zeitschrift für Gastroenterorologie; 35. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V., 45, PP_50.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26(2), 99-109.
- Nocka, K., Tan, J. C., Chiu, E., Chu, T. Y., Ray, P., Traktman, P., Besmer, P. (1990). Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine ckit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *EMBO Journal*, 9(6), 1805-1813.
- Novak, A., Guo, C., Yang, W., Nagy, A., Lobe, C. G. (2000). Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis*, *28*(3-4), 147-155.
- Olsson, C., Holmgren, S. (2001). The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A Molecular and Integrative Physiology, 128*(3), 481-503.

- Orban, P. C., Chui, D., Marth, J. D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(15), 6861-6865.
- Ordog, T., Takayama, I., Cheung, W. K., Ward, S. M., Sanders, K. M. (2000). Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes*, *49*(10), 1731-1739.
- Ordog, Tamas. (2008). Do we need to revise the role of interstitial cells of Cajal in gastrointestinal motility? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(2), G368-G371.
- Pappenheimer, A. M., Jr. (1977). Diphtheria toxin. Annual Review of Biochemistry, 46, 69-94.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R., Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO Journal*, *17*(11), 3045-3051.
- Radzievsky, A. A., Cowan, A., Byrd, C., Radzievsky, A. A., Ziskin, M. C. (2002). Single millimeter wave treatment does not impair gastrointestinal transit in mice. *Life Sciences*, *71*(15), 1763-1770.
- Raffa, R. B., Mathiasen, J. R., Jacoby, H. I. (1987). Colonic bead expulsion time in normal and mu-opioid receptor deficient (CXBK) mice following central (ICV) administration of mu- and delta-opioid agonists. *Life Sciences, 41*(19), 2229-2234.
- Romert, P., Mikkelsen, H. B. (1998). c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in the human small and large intestine. *Histochemistry and Cell Biology, 109*(3), 195-202.
- Roskoski, R., Jr. (2005). Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1), 1-13.
- Salmhofer, H., Neuhuber, W. L., Ruth, P., Huber, A., Russwurm, M., Allescher, H. D. (2001). Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric oxide signaling pathway of rat small intestine - Morphological evidence. *Cell and Tissue Research*, *305*(3), 331-340.
- Sanders, K. M. (1996). A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, *111*(2), 492-515.
- Sanders, K. M. (2006). Interstitial cells of Cajal at the clinical and scientific interface. *Journal* of *Physiology-London*, *576*(3), 683-687.
- Sanders, K. M. (2008). Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterology and Motility, 20*, 39-53.
- Sanders, K. M., Hwang, S. J., Ward, S. M. (2010). Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *Journal of Physiology-London*, 588(23), 4621-4639.
- Sanders, K. M., Koh, S. D., Ro, S., Ward, S. M. (2012). Regulation of gastrointestinal motility - insights from smooth muscle biology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *9*(11), 633-645.
- Sanders, K. M., Koh, S. D., Ward, S. M. (2006). Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract *Annual Review of Physiology* (Vol. 68, pp. 307-343).

- Sanders, K. M., Ordog, T., Koh, S. D., Torihashi, S., Ward, S. M. (1999). Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterology and Motility*, 11(5), 311-338.
- Sanders, K. M., Smith, T. K. (1986). Enteric neural regulation of slow waves in circular muscle of the canine proximal colon. *The Journal of Physiology, 377*, 297-313.
- Sanders, K. M., Ward, S. M. (2006). Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *The Journal of Physiology*, 576(Pt 3), 721-726.
- Sanders, K. M., Ward, S. M. (2007). Kit mutants and gastrointestinal physiology. *Journal of Physiology-London, 578*(1), 33-42.
- Sanders, K. M., Ward, S. M., Daniel, E. E. (2002). ICC in neurotransmission: Hard to swallow a lack of involvement. *Gastroenterology*, *122*(4), 1185-1186.
- Sanders, K.M.; Ward, S.M.; Koh, S.D. (2014). Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiological Reviews*, *94*(3), 859-907.
- Sarna, S. K. (2008). Are interstitial cells of Cajal plurifunction cells in the gut? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(2), G372-G390.
- Schaeffer, D. F., Kirsch, R., Riddell, R. H. (2012). Mast cells and intestinal motility disorders (mastocytic enteritis/colitis). *Digestive Diseases and Sciences*, *57*(5), 1118-1121.
- Schafer, K. H., Van Ginneken, C., Copray, S. (2009). Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system. *Anatomical Record*, *292*(12), 1940-1952.
- Schlossmann, J., Feil, R., Hofmann, F. (2005). Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Frontiers in Bioscience, 10*, 1279-1289.
- Schmidt, R. F.; Unsicker, K.; Birnbaumer N. (2003). *Lehrbuch Vorklinik. Integrierte Darstellung in vier Teilen*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- Sibaev, A. (2003). Elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung der neuromuskulären Übertragung im Dickdarm der Maus. *Dissertation*.
- Sibaev, A., Franck, H., Vanderwinden, J. M., Allescher, H. D., Storr, M. (2003). Structural differences in the enteric neural network in murine colon: impact on electrophysiology. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *285*(6), G1325-G1334.
- Sibaev, A., Yuece, B., Kemmer, M., Van Nassauw, L., Broedl, U., Allescher, H. D., Goeke, B., Timmermans, J. P., Storr, M. (2009). Cannabinoid-1 (CB1) receptors regulate colonic propulsion by acting at motor neurons within the ascending motor pathways in mouse colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(1), G119-G128.
- Singh, R. D., Gibbons, S. J., Saravanaperumal, S. A., Du, P., Hennig, G. W., Eisenman, S. T., Mazzone, A., Hayashi, Y., Cao, C., Stoltz, G. J., Ordog, T., Rock, J. R., Harfe, B. D., Szurszewski, J. H., Farrugia, G. (2014). Ano1, a Ca2+-activated Cl- channel, coordinates contractility in mouse intestine by Ca2+ transient coordination between interstitial cells of Cajal. *The Journal of Physiology, 592*(18), 4051-4068.

- Sivarao, D. V., Mashimo, H., Goyal, R. K. (2008). Pyloric sphincter dysfunction in nNOS^(-/-) and W/W^v mutant mice: Animal models of gastroparesis and duodenogastric reflux. *Gastroenterology*, *135*(4), 1258-1266.
- Sivarao, D. V., Mashimo, H. L., Thatte, H. S., Goyal, R. K. (2001). Lower esophageal sphincter is achalasic in nNOS^(-/-) and hypotensive in W/W^V mutant mice. *Gastroenterology*, *121*(1), 34-42.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature Genetics*, *21*(1), 70-71.
- Spencer, N. J., Hennig, G. W., Dickson, E., Smith, T. K. (2005). Synchronization of enteric neuronal firing during the murine colonic MMC. *Journal of Physiology-London*, 564(3), 829-847.
- Stenkamp-Strahm, C. M., Nyavor, Y. E., Kappmeyer, A. J., Horton, S., Gericke, M., Balemba, O. B. (2015). Prolonged high fat diet ingestion, obesity, and type 2 diabetes symptoms correlate with phenotypic plasticity in myenteric neurons and nerve damage in the mouse duodenum. *Cell and Tissue Research*, 361(2), 411-426.
- Storr, M., Sibaev, A., Marsicano, G., Lutz, B., Schusdziarra, V., Timmermans, J. P., Allescher, H. D. (2004). Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(1), G110-G117.
- Streutker, C. J., Huizinga, J. D., Driman, D. K., Riddell, R. H. (2007). Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: Normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology*, *50*(2), 176-189.
- Takeda, M., Takayama, I., Terada, N., Baba, T., Ward, S. M., Ohno, S., Fujino, M. A. (2001). Immunoelectron-microscopic study of Kit-expressing cells in the jejunum of wildtype and Ws/Ws rats. *Cell and Tissue Research*, 304(1), 21-30.
- Thomsen, L., Robinson, T. L., Lee, J. C. F., Farraway, L. A., Hughes, M. J. G., Andrews, D. W., Huizinga, J. D. (1998). Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nature Medicine*, 4(7), 848-851.
- Thuneberg, L., Rumessen, J. J., Mikkelsen, H. B. (1982). Interstitial cells of Cajal an intestinal impulse generation and conduction system? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *71*, 143-144.
- Tian, Y., Schreiber, R., Kunzelmann, K. (2012). Anoctamins are a family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *Journal of Cell Science, 125*(Pt 21), 4991-4998.
- Tomita, T. (1981). Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscle. In B. E, B. A. F., J. A. W. & T. T. (Eds.), Smooth Muscle: An Assessment of Current Knowledge (pp. 127-156). Austin, TX, USA: University of Texas Press.
- Torihashi, S., Ward, S. M., Nishikawa, S. I., Nishi, K., Kobayashi, S., Sanders, K. M. (1995). c-kit-Dependent development of intertitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell and Tissue Research*, *280*(1), 97-111.
- Torihashi, S., Ward, S. M., Sanders, K. M. (1997). Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology*, *112*(1), 144-155.

- Trapero-Marugan, M., Moreno-Borque, R., Arberas, B., Santander-Vaquero, C. (2011). Colonic mast cells: a new target in chronic constipation? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *34*(5), 585-586.
- Tsujimura, T., Hirota, S., Nomura, S., Niwa, Y., Yamazaki, M., Tono, T., Morii, E., Kim, H. M., Kondo, K., Nishimune, Y. (1991). Characterization of Ws mutant allele of rats: a 12base deletion in tyrosine kinase domain of c-kit gene. *Blood*, 78(8), 1942-1946.
- Vooijs, M., Jonkers, J., Berns, A. (2001). A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Reports*, 2(4), 292-297.
- Ward, S. M., Beckett, E. A. H., Wang, X. Y., Baker, F., Khoyi, M., Sanders, K. M. (2000). Interstitial cells of cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *Journal of Neuroscience*, 20(4), 1393-1403.
- Ward, S. M., Burns, A. J., Torihashi, S., Harney, S. C., Sanders, K. M. (1995). Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants. *The American Journal of Physiology*, 269(6 Pt 1), C1577-1585.
- Ward, S. M., Burns, A. J., Torihashi, S., Sanders, K. M. (1994). Mutation of the protooncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *The Journal of Physiology*, 480 (Pt 1), 91-97.
- Ward, S. M., Harney, S. C., Bayguinov, J. R., McLaren, G. J., Sanders, K. M. (1997). Development of electrical rhythmicity in the murine gastrointestinal tract is specifically encoded in the tunica muscularis. *Journal of Physiology-London*, 505(1), 241-258.
- Ward, S. M., Sanders, K. M. (2006). Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract. *Journal of Physiology-London*, 576(3), 675-682.
- Ward, S. M., Sanders, K. M., Hirst, G. D. S. (2004). Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterology and Motility*, 16, 112-117.
- Wegener, J. W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F., Feil, R. (2002). cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circulation Research*, *90*(1), 18-20.
- Wood, J. D. (2011). *Enteric Nervous System (The Brain-In-The-Gut)*. Williston, USA: Morgan & Claypool Life Sience.
- Xue, L., Farrugia, G., Miller, S. M., Ferris, C. D., Snyder, S. H., Szurszewski, J. H. (2000).
 Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: Evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1851-1855.
- Yamamoto, T., Watabe, K., Nakahara, M., Ogiyama, H., Kiyohara, T., Tsutsui, S., Tamura, S., Shinomura, Y., Hayashi, N. (2008). Disturbed gastrointestinal motility and decreased interstitial cells of Cajal in diabetic db/db mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology, 23*(4), 660-667.
- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yangfeng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., Ullrich, A. (1987). Human proto-onkogene c-Kit - a new

cell-surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO Journal, 6*(11), 3341-3351.

Yoshida, H., Kunisada, T., Grimm, T., Nishimura, E. K., Nishioka, E., Nishikawa, S. I. (2001). Review: melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings,* 6(1), 1-5.

6 Eigene Veröffentlichungen

Anurag Kumar Singh, Beate Spießberger, Wen Zheng, Fang Xiao, Robert Lukowski, Jörg W. Wegener, Pascal Weinmeister, Dieter Saur, **Sabine Klein**, Michael Schemann, Dagmar Krueger, Ursula Seidler, Franz Hofmann (2012) Neuronal cGMP kinase I is essential for stimulation of duodenal bicarbonate secretion by luminal acid. FASEB J., 2012 Apr;26(4):1745-54. doi: 10.1096/fj.11-200394. Epub 2012 Jan 17

Stefan Eser, Nina Reiff, Marlena Messer, Barbara Seidler, Kathleen Gottschalk, Melanie Dobler, Maren Hieber, Andreas Arbeiter, **Sabine Klein**, Bo Kong, Christoph W. Michalski, Anna M. Schlitter, Irene Esposito, Alexander J. Kind, Lena Rad, Angelika E. Schnieke, Manuela Baccarini, Dario R. Alessi, Roland Rad, Roland M. Schmid, Günter Schneider, and Dieter Saur. (2013) Selective requirement of PI3K/PDK1 signalling for KRAS oncogenedriven pancreatic cell plasticity and cancer. Cancer Cell. 2013 Mar 18;23(3):406-20. doi: 10.1016/j.ccr.2013.01.023. Epub 2013 Feb 28.

Sabine Klein, Barbara Seidler, Anna Kettenberger, Andrei Sibaev, Michael Rohn, Robert Feil, Hans-Dieter Allescher, Jean-Marie Vanderwinden, Franz Hofmann, Michael Schemann, Roland Rad, Martin A. Storr, Roland M. Schmid, Günter Schneider, Dieter Saur. (2013) Interstitial cells of Cajal integrate excitatory and inhibitory neurotransmission with intestinal slow wave activity. Nat Commun. 2013;4:1630. doi: 10.1038/ncomms2626.

Dieter Gronreberg, Barbara Lies, Peter König, Ronald Jäger, Barbara Seidler, **Sabine Klein**, Dieter Saur, Andreas Friebe. (2013) Cell-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Reveals a Dual Pathway for Nitrergic Neuromuscular Transmission in the Murine Fundus Nitrergic Relaxation in Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Knockout Mice. Gastroenterology. 2013 Mar 22. doi:pii: S0016-5085(13)00420-4. 10.1053/j.gastro.2013.03.042. Epub 2013 Mar 22.

Hao Wang, Jose A. Gomez, **Sabine Klein**, Zhiping Zhang, Barbara Seidler, Yanqiang Yang, Jeffrey Shmeckpeper, Lunan Zhang, Garrett G. Muramoto, John Chute, Richard E. Pratt, Dieter Saur, Maria Mirotsou, and Victor J. Dzau. (2013) Adult renal mesenchymal stem cell-like cells contribute to juxtaglomerular cell recruitment. J Am Soc Nephrol. 2013 Jul;24(8):1263-73. doi: 10.1681/ASN.2012060596. Epub 2013 Jun 6.

Klaus Heger, Barbra Seidler, J. Christoph Vahl, Christian Schwartz, Maike Kober, **Sabine Klein**, David Voehringer, Dieter Saur, Marc Schmidt-Supprian. (2014) CreER^{T2} expression from within the c-Kit gene locus allows efficient inducible gene targeting in and ablation of mast cells. Eur J Immunol. 2014 Jan;44(1):296-306. doi: 10.1002/eji.201343731. Epub 2013 Oct 14.

Nina Schönhuber, Barbara Seidler, Kathleen Schuck, Christian Veltkamp, Christina Schachtler, Magdalena Zukowska, Stefan Eser, ThorstenB. Feyerabend, Mariel C. Paul, Philipp Eser, **Sabine Klein**, Andrew M. Lowry, Ruby Banerjee, Fangtang Yang, Chang-Lung Lee, Everett J. Moding, David G. Kirsch, Angelika Scheideler, Dario R. Alessi, Ignacio Varela, Allan Bradley, Alexander Kind, Angelika E. Schnieke, Hans-Reimer Rodewald, Roland Rad, Roland M. Schmid, Günter Schneider, and Dieter Saur. (2014) A next-generation dual-recombinase system for time and host specific targeting of pancreatic cancer. Nat Med. 2014 Nov;20(11):1340-7. doi: 10.1038/nm.3646. Epub 2014 Oct 19.

Angela Jurik, Eva Auffenberg, **Sabine Klein**, Jan M. Deussing, Roland M. Schmid, Carsten T. Wotjak, Christoph K. Thoeringer. (2015) Identifying the prefrontal cortex and paraventricular thalamus as essential brain centers of pancreatitis-related abdominal pain. Pain. 2015 Dec;156(12):2479-91. doi: 10.1097/j.pain.00000000000318.

Roman Maresch, Sebastian Mueller, Christian Veltkamp, Rupert Öllinger, Mathias Friedrich, Irina Heid, Katja Steiger, Julia Weber, Thomas Engleitner, Maxim Barenboim, **Sabine Klein**, Sandra Louzada, Ruby Banerjee, Alexander Strong, Teresa Stauber, Nina Gross, Ulf Geumann, Sebastian Lange, Marc Ringelhan, Ignacio Varela, Kristian Unger, Fengtang Yang, Roland M. Schmid, George S. Vassiliou, Rickmer Braren, Günter Schneider, Mathias Heikenwälder, Allan Bradley, Dieter Saur, Roland Rad. (2016) Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. Nat Commun. 2016 Feb 26;7:10770. doi: 10.1038/ncomms10770.

John Malysz, Simon J. Gibbons, Siva A. Saravanaperumal, Peng Du, Seth T. Eisenman, Chike Cao, Uhtaek Oh, Dieter Saur, **Sabine Klein**, Tamas Ordog, Gianrico Farrugia. (2017) Conditional genetic deletion of Ano1 in interstitial cells of Cajal impairs Ca²⁺ transients and slow waves in adult mouse small intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017 Mar 1;312(3):G228-G245. doi: 10.1152/ajpgi.00363.2016. Epub 2016 Dec 15.

7 Danksagung

Hiermit möchte ich allen Danke sagen, die mir diese Dissertation ermöglicht haben.

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Dieter Saur für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe des spannenden Themas sowie die motivierende und ideenreiche Betreuung bedanken.

Ebenso bei Prof. Dr. Roland Schmid für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation in der II. Medizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar in München.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Schemann für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit am Wissenschaftszentrum Weihenstephan und dafür, dass ich in seinem Labor am Lehrstuhl für Humanbiologie Organbadversuche ausführen durfte.

An PD Dr. Andrei Sibaev geht ein großes Danke für seine Durchführung der Elektrophysiologiemessungen, die essentiell zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Hans-Dieter Allescher, Prof. Dr. Jean-Marie Vanderwinden, Prof. Dr. Martin Storr, PD Dr. Günter Schneider sowie Dr. Maximilian Reichert und Dr. Christoph Thöringer möchte ich mich für konstruktive wissenschaftliche Gespräche und Beiträge bedanken.

Weiterhin geht ein herzlicher Dank an:

- Das Institut für Medizinische Mikrobiologie, deren konfokale Lasermikroskope ich ausgiebig nutzen durfte. Insbesondere an Susi Dürr, die mich in die Leica-Welt eingeführt hat und bei technischen Schwierigkeiten stets zur Stelle war.
- Prof. Dr. Franz Hofmann vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie für die Bereitstellung der *Prkg1^{lox}* Tiere sowie des Prkg1 Antikörpers.
- Anna Kettenberger, die im Rahmen ihrer Masterarbeit das Prkg1 Teilprojekt bestens vorangebracht hat.
- Karin Feldmann für die Durchsicht dieses Manuskripts.
- Die Tierpfleger für die Betreuung der Mäuse.
- Alle Mitarbeiter der II. Med. Klinik die mir im Laboralltag mit Rat und Tat zur Seite standen und somit auf unterschiedliche Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Alle Freunde und Bekannten vom Line Dance, im Besonderen von Get In Line, die mich stets freundlichst empfangen haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mich immer unterstützt hat.