

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Humanbiologie

Optische Messung der Nervenaktivität im humanen myenterischen Plexus

Nadine Bernadette Peter

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Klingenspor

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann
2. Univ.-Prof. Dr. H. Luksch

Die Dissertation wurde am 04.03.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.04.2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das enterische Nervensystem	1
1.1.1 Gastrointestinale Funktionen	1
1.1.2 Der myenterische Plexus	2
1.1.3 Neuronale Diversität	3
1.1.4 Neurotransmitter	7
1.2 Elektrophysiologie humaner enterischer Nervenzellen	12
1.3 Spannungssensitive Farbstoffe	14
1.4 Multisite Optical Recording Technique	15
1.5 Ziel der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Vorversuche im myenterischen Plexus des Meerschweinchens	19
2.1.1 Präparation des myenterischen Plexus	19
2.1.2 Ermittlung eines Farbstoffes zur Visualisierung von myenterischen Ganglien	21
2.1.3 Ermittlung eines spannungssensitiven Farbstoffes zum Aufzeichnen von myenterischen Ganglien	21
2.2 Experimente im humanen myenterischen Plexus	23

2.2.1	Präparation des humanen myenterischen Plexus	23
2.2.2	Primärkultur des humanen myenterischen Plexus	25
2.3	Pharmakologie	28
2.4	Neuro-Imaging Methode mit spannungssensitiven Farbstoffen	30
2.5	Immunhistochemie	32
2.6	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Visualisierung des humanen myenterischen Plexus	35
3.2	Geeigneter spannungssensitiver Farbstoff für die Aufzeichnung von humanen myenterischen Nervenzellen	38
3.3	Nachweis des neuronalen Ursprungs der elektrisch induzierten Signale	40
3.4	Signale von humanen myenterischen Nervenzellen in Primärkultur	42
3.4.1	Nachweis des neuronalen Ursprungs	43
3.4.2	Identifizierung von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren	44
3.4.3	Identifizierung von Serotonin-Rezeptoren	46
3.4.4	Identifizierung von purinergen Rezeptoren	48
3.4.5	Elektrische Stimulation	49
4	Diskussion	51
5	Zusammenfassung	61

6 Summary	63
7 Literaturverzeichnis	64
Anhang Abkürzungsverzeichnis	83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	4-Di-2-ASP ist ein geeigneter Farbstoff für die Visualisierung des humanen myenterischen Plexus.....	36
Abb. 2	Humanes myenterisches Ganglion nach Vorfärbung mit 4-Di-2-ASP und nach anschließender Mikroinjektion von Di-8-ANEPPS.....	37
Abb. 3	Erfassung der Aktivität humaner myenterischer Nervenzellen aufgrund unzureichender Färbung durch Di-4-ANEPPDHQ beziehungsweise Di-8-ANEPPQ nicht möglich.....	38
Abb. 4	Nachweis des neuronalen Ursprungs der elektrisch induzierten Signale.....	40
Abb. 5	Aktivität in kultivierten humanen myenterischen Nervenzellen nach Applikation von Nikotin.....	43
Abb. 6	Nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren vermitteln nikotinerge Antwort.....	44
Abb. 7	Charakteristische Aktionspotentiale einer möglichen S- und AH-Nervenzelle.....	45
Abb. 8	Expression von funktionellen 5-HT ₃ Rezeptoren in Zellkultur.....	46
Abb. 9	Aktivität in kultivierten humanen myenterischen Nervenzellen nach Applikation von ATP.....	48
Abb. 10	Nachweis des neuronalen Ursprungs der elektrisch induzierten Signale in der Zellkultur.....	49

1 Einleitung

1.1 Das enterische Nervensystem

Der Begriff des enterischen Nervensystems (ENS) wurde 1921 von Langley geprägt, der in seinem Buch „*The Autonomic Nervous System*“ das vegetative Nervensystem in den Sympathikus, den Parasympathikus und in das ENS unterteilte (Langley, 1921). Das ENS existiert im Gegensatz zum Sympathikus und Parasympathikus anatomisch und funktionell unabhängig von Gehirn und Rückenmark, weshalb das ENS auch „kleines Gehirn des Darmes“ genannt wird. Lokalisiert ist das ENS in der Wand des Gastrointestinaltraktes, wo es sich vom oberen Ösophagus bis zum inneren Schließmuskel des Analkanals erstreckt. Etwa 100 Millionen Nervenzellkörper, welche in Ganglien organisiert und über Bündel von Nervenfasern miteinander verbunden sind, bilden die zwei Nervennetze des Verdauungstraktes: den submukösen und den myenterischen Plexus.

Der submuköse Plexus (Meissner, 1857) liegt zwischen der Zirkulärmuskulatur und der Mukosa in der Submukosa und kontrolliert vorwiegend die Sekretion des intestinalen Epithels. Der myenterische Plexus (Auerbach, 1862) ist zwischen der inneren Zirkulär- und der äußeren Longitudinalmuskulatur lokalisiert und ist für die Regulation der Darmmotilität verantwortlich (Schemann, 2005).

1.1.1 Gastrointestinale Funktionen

Zu den Aufgaben des ENS gehören die Regulation und Kontrolle der gastrointestinalen Funktionen, wie der Motilität (Bayliss und Starling, 1899), der Sekretion und Absorption (Kirkegaard et al., 1984; Greenwood und Davison, 1987; Diener und Rummel, 1990; Bijlsma et al., 1996; Meyer et al., 1997; Neunlist et al., 1998; Cooke, 2000), des Blutflusses (Neild et al., 1990; Vanner und Surprenant, 1996), sowie der Immunantwort (Wood, 1991; Frieling et al., 1994). Sympathikus und

Parasympathikus haben auf diese Funktionen im Darm lediglich eine modulierende Wirkung.

1.1.2 Der myenterische Plexus

Der myenterische Plexus erstreckt sich im Gegensatz zum submukösen Plexus, welcher nur im Dün- und Dickdarm prominent ist, über die gesamte Länge des Verdauungstraktes (Furness, 2000). Die myenterischen Ganglien variieren in ihrer Größe, Form und Orientierung nicht nur zwischen den verschiedenen Tierarten, sondern auch zwischen den unterschiedlichen Regionen des Darmes. Im Ileum des Meerschweinchens reicht die Größe der Ganglien zum Beispiel von 5 bis zu über 200 Nervenzellkörpern, während die Ganglien des submukösen Plexus generell kleiner als die des myenterischen Plexus sind (Furness, 2006). Submuköse Ganglien des humanen Rektums beinhalten im Schnitt 5 ± 1.2 Nervenzellkörper pro Ganglion (Schneider et al., 2001). Im Kolon von zwei Jahre alten Meerschweinchen wurden 1600 Nervenzellen pro mm^2 Ganglienfläche gezählt (Peck et al., 2009). Entsprechende Zählungen im humanen Kolon von Menschen im Alter zwischen 50 und 70 Jahren haben im Schnitt 844 Nervenzellen pro 1.41 mm^2 ergeben (Ippolito et al., 2009). Gabella (Gabella, 1972) untersuchte mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Struktur von myenterischen Ganglien im Ileum des Meerschweinchens. Er beschreibt die Ganglien des myenterischen Plexus als äußerst kompakte Strukturen, welche aus Nerven- und Gliazellen bestehen, die mit ihren Fortsätzen ein dichtes Neuropil bilden, welches einen Abstand von 20 nm zwischen benachbarten Membranen zulässt. Das Verhältnis von Gliazellen zu Nervenzellen liegt im myenterischen Plexus des Meerschweinchens bei 1.7 zu 1 und im humanen myenterischen Plexus zwischen 5.9 und 7.0 zu 1 (Hoff et al., 2008). Kompletzt umschlossen werden die Ganglien von einer Basallamina, welche wiederum von Bindegewebe und Blutgefäßen umgeben ist, die aber niemals ins Ganglion vordringen. Gliazellkörper sind kleiner als die der Nervenzellen und befinden sich im Gegensatz zu neuronalen Somata nicht nur in den Ganglien, sondern auch in den Nervenfaserbündeln, über welche die Ganglien miteinander in

Verbindung stehen. Manche Nervenzellen sind außerdem beinahe vollständig von Gliazellfortsätzen umhüllt.

1.1.3 Neuronale Diversität

Das ENS kann autonom wirken, da es aus verschiedenen neuronalen Populationen aufgebaut ist. Die Nervenzellen können je nach Morphologie, Transmittergehalt und elektrophysiologischen Eigenschaften in sensorische Nervenzellen, aufsteigende oder absteigende Interneurone und exzitatorische beziehungsweise inhibitorische Motorneurone eingeteilt werden (Grundy und Schemann, 2005).

Sensorische Nervenzellen

Spezielle intrinsische primäre afferente Nervenzellen (IPANs) stehen in den intrinsischen Reflexbögen, welche die gastrointestinalen Funktionen beeinflussen, an erster Stelle. Die Bezeichnung „sensorisch“ ist für diese Nervenzellen nicht ganz zutreffend, da zum einen eine Aktivierung der IPANs nicht zu einer klassischen Empfindung, also zu keiner bewussten Erkenntnis über das Befinden des Darmes führt, und zum anderen die ersten Nervenzellen in den intrinsischen Reflexbögen nicht zwingend durch einen Stimulus aktiviert werden, und deshalb nicht unmittelbar den chemischen oder mechanischen Stimulus in neuronale Erregung umwandeln (Furness et al., 1998). So werden zum Teil andere, nicht-neuronale Zelltypen durch den Stimulus aktiviert und geben anschließend Substanzen ab, welche die mukosalen Endigungen von IPANs aktivieren. Ein Beispiel hierfür sind die speziellen mukosalen Epithelzellen namens Enterochromaffinzellen, welche Serotonin beinhalten, das ein hoch wirksames Stimulans jener IPAN Nervenendigungen ist (Bertrand et al., 1997).

Des Weiteren können diese Nervenzellen aufgrund ihrer multipolaren Morphologie der Klasse der Dogiel Typ II Nervenzellen zugeordnet werden (Dogiel, 1899). Im myenterischen Plexus des Meerschweinchens sind zwischen 80 und 90% der Dogiel Typ II Neurone immunreaktiv für das calciumbindende Protein Calbindin (Furness et

al., 1988; Iyer et al., 1988; Song et al., 1991; Costa et al., 1996) und beinahe jedes dieser Neurone ist immunreaktiv für das Enzym Cholin Acetyltransferase (ChAT; Steele et al., 1991), welches für die Synthese von Acetylcholin (ACh) notwendig ist und aus diesem Grund auch als Nachweis für cholinerge Nervenzellen herangezogen wird.

Wird der Nervenfasersstrang einer Nervenzelle elektrisch stimuliert, so bewirkt dies die Freisetzung von Neurotransmittern aus der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt. Die Neurotransmitter diffundieren zur postsynaptischen Membran, binden an der nachgeschalteten Nervenzelle an die Rezeptoren und führen so zu deren Aktivierung. Erregende Neurotransmitter induzieren in der postsynaptischen Nervenzelle eine Depolarisation des Membranpotentials und verursachen dadurch die Entstehung eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSPs). Abhängig von den involvierten Rezeptoren liegt die Dauer der EPSPs entweder bei nur einigen Millisekunden (schnelle EPSPs) oder bei mehreren Sekunden bis Minuten (langsame EPSPs). Je nach Stärke der Depolarisation bleiben die EPSPs entweder unerschwellig oder führen als überschwellige EPSPs zur Auslösung eines oder mehrerer Aktionspotentiale. Diese werden dann entlang der Axone in orthodromer Richtung weitergeleitet, um anschließend an der Synapse wiederum zur Transmitterfreisetzung zu führen. Die bei der elektrischen Stimulation der interganglionären Nervenstränge aktivierten Axone können durch mehrere Ganglien projizieren. Abhängig von der angelegten Spannung entstehen Summenaktionspotentiale, die mit spannungssensitiven Farbstoffen detektiert werden können (Schemann et al., 2002).

IPANs werden elektrophysiologisch wegen der Nachhyperpolarisation infolge von Aktionspotentialentladungen den „*afterspike hyperpolarisation*“- (AH-) Nervenzellen zugeordnet (Hirst et al., 1974; Bornstein et al., 1994; Furness et al., 1998). Die AH-Nervenzellen werden einerseits durch phasische Entladungen von Aktionspotentialen charakterisiert. Die Aktionspotentiale werden dabei nicht nur durch spannungssensitive Natriumkanäle, sondern teilweise auch durch Calciumkanäle vermittelt, weshalb das Aktionspotential in diesen Nervenzellen während der Repolarisationsphase eine prominente Schulter aufweist (Hirst et al., 1974; North und

Tokimasa, 1987). Andererseits zeichnen sich AH-Nervenzellen durch eben jene langsamen Hyperpolarisationen aus, welche durch das Öffnen von calciumabhängigen Kaliumkanälen vermittelt werden und zwischen 1 und 20 Sekunden andauern können (Grafe et al., 1980; North und Tokimasa, 1987; Furness et al., 1998). Die verlängerte Aktionspotentialdauer und die lange Nachhyperpolarisation, welche die Entstehung weiterer Aktionspotentiale in AH-Nervenzellen verhindert, limitiert die Aktionspotentialfrequenz (Galligan et al., 2000). Elektrische Stimuli verursachen meist langsame EPSPs in AH-Nervenzellen (Kunze et al., 1993; Bornstein et al., 1994). IPANs kommunizieren untereinander über langsame EPSPs und werden nur selten mit schnellen EPSPs kontaktiert (Kunze und Furness, 1999). Mit Inter- und Motorneuronen kommunizieren IPANs jedoch über langsame und schnelle EPSPs (Kunze et al., 1993; Stebbing und Bornstein, 1996; Bertrand et al., 1997).

Interneurone

Eine weitere, im gesamten Darm existierende, neuronale Population des ENS sind die Interneurone. Diese können in auf- und absteigende Interneurone unterteilt werden (Costa et al., 1996; Furness, 2006). Durch retrogrades Tracing konnte gezeigt werden, dass myenterische Interneurone im humanen Kolon Projektionen von bis zu 68 mm Länge aufweisen (Wattchow et al., 1995). Auch Porter et al. (Porter et al., 2002) stellten fest, dass beinahe alle myenterischen Nervenzellen im humanen Kolon mit Projektionen in longitudinaler Richtung, die länger als 10 mm sind, wahrscheinlich Interneurone darstellen.

Im humanen Kolon wurde bereits die cholinerge Transmission, welche sowohl in aufsteigende als auch in absteigende Signalwege involviert ist, nachgewiesen (Brookes et al., 1987; Grider, 1989). In aufsteigenden Signalwegen korreliert die Vorherrschaft der ChAT Immunreaktivität (Porter et al., 2002) sehr gut mit den Erkenntnissen, dass die aufsteigende Erregung, vermittelt durch das Dehnen des humanen Darms, durch Hexamethonium verhindert werden kann (Grider, 1989). Auch, dass die absteigende inhibitorische Komponente des peristaltischen Reflexes

im humanen Darm durch Hexamethonium blockiert werden kann, weist darauf hin, dass in diesen Signalweg ebenfalls cholinerge Interneurone involviert sind (Grider, 1989).

Elektrophysiologisch werden Interneurone den synaptischen (S-) Nervenzellen zugeordnet (Hirst et al., 1974; Bornstein et al., 1994; Costa et al., 1996). Diese generieren schnelle EPSPs und werden durch tonische Aktionspotentialentladungen charakterisiert, wobei die Aktionspotentiale durch Tetrodotoxin (TTX) sensitive Natriumkanäle vermittelt werden (Galligan et al., 2000).

Motorneurone

Die Projektionen von Motorneuronen sind mit einer maximalen Distanz von 16 mm deutlich kürzer als die der Interneurone (Wattchow et al., 1995). Beinahe alle Motorneurone in der Zirkulärmuskulatur haben eine Dogiel Typ I Morphologie (Dogiel, 1899; Wattchow et al., 1995; Wattchow et al., 1997). In einer Studie von Wattchow et al. (Wattchow et al., 1997) wurde mittels retrogradem Tracing dargelegt, dass Motorneurone in der Zirkulärmuskulatur des humanen Kolons sowohl nach oral, als auch nach anal projizieren. Diese sind entweder immunreaktiv für ChAT, einem Marker für exzitatorische Motorneurone, oder für Stickoxidsynthase, einem Marker für inhibitorische Motorneurone (Porter et al., 1997). Inhibitorische Motorneurone ziehen im humanen Kolon überwiegend nach anal, während die Mehrheit der ChAT immunreaktiven Motorneurone nach oral projiziert (Porter et al., 1997). Somit löst eine lokale Dehnung oral eine Kontraktion und anal eine Relaxation aus, was zu einem Weitertransport des Darminhaltes nach aboral führt, wodurch eine sich nach anal fortpflanzende peristaltische Kontraktion verursacht wird. Die Polarität der Projektionen der inhibitorischen und exzitatorischen Motorneurone ist im Meerschweinchen ähnlich wie im humanen Kolon (Brookes und Costa, 1990; Brookes et al., 1991; Brookes et al., 1994; Brookes et al., 1996). Wie im humanen Kolon haben auch im Meerschweinchen inhibitorische Motorneurone längere Fortsätze und größere Zellkörper als exzitatorische Motorneurone (Brookes et al., 1991; Brookes et al., 1994; Brookes et al., 1996), was damit zu tun haben kann, dass

die relative Größe des Gebietes der Innervation von enterischen inhibitorischen Motorneuronen größer ist, als jenes von enterischen exzitatorischen Motorneuronen (Porter et al., 1997).

Elektrophysiologisch werden die Motorneurone, wie die Interneurone, den S-Nervenzellen zugeordnet (Hirst et al., 1974; Bornstein et al., 1994; Costa et al., 1996).

1.1.4 Neurotransmitter

An den Synapsen enterischer Nervenzellen kommt es zu einer plurichemischen Übertragung von Transmittern (Burnstock, 1976; Furness et al., 1989). Neben dem Haupttransmitter existieren in den Nervenzellen noch so genannte Kotransmitter, welche eine vergleichbare Wirkung wie der Haupttransmitter haben, oder als Neuromodulatoren die Intensität und Dauer der Wirkung des Haupttransmitters beeinflussen (Wood, 1982). Bisher wurden schon mehr als 50 Substanzen identifiziert, welche vermeintlich als Transmitter oder Neuromodulatoren fungieren (Schemann, 2005). Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten erregenden Haupttransmitter besprochen.

Acetylcholin

Der vorherrschende exzitatorische Transmitter im enterischen Nervensystem für die Vermittlung schneller EPSPs ist ACh, welches postsynaptisch nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren aktiviert, woraufhin diese dann unspezifisch für Kationen durchlässig werden (Fieber und Adams, 1991; Trouslard et al., 1993). Synthetisiert wird ACh durch das Enzym ChAT. Die Wirkung von ACh am nikotineren Rezeptor kann durch Nikotin nachgeahmt werden. Nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren sind auf Interneuronen und Motorneuronen somatodendritisch lokalisiert, wo diese die Erregung der Nervenzellen vermitteln (Töröscik et al., 1991; Kunze und Furness, 1999). Die von enterischen Nervenzellen exprimierten nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren sind üblicherweise aus $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2$, $\beta 4$ und $\alpha 7$ Untereinheiten

zusammengesetzt (Grundy und Schemann, 2006). Hexamethonium ist ein Antagonist von nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren (Harvery und Luetje, 1996). Im ENS werden alle in S- und AH-Nervenzellen evozierten schnellen EPSPs komplett oder zumindest teilweise durch Antagonisten von nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren blockiert (Nishi und North, 1973; Hirst et al., 1974; Galligan und Bertrand, 1994; Cornelissen et al., 2001). Im submukösen Plexus werden schnelle EPSPs komplett durch Antagonisten des nikotineren Acetylcholin-Rezeptors blockiert (Hirst und McKirdy, 1975; Surprenant, 1984). Im myenterischen Plexus werden jedoch nur in circa 25% der untersuchten Nervenzellen die schnellen EPSPs komplett durch Antagonisten der nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren geblockt. Es konnte gezeigt werden, dass Nervenbahnen im myenterischen Plexus, welche ACh als alleinigen schnellen erregenden synaptischen Transmitter nutzen, nach oral projizieren (LePard und Galligan, 1999). In den übrigen 75% der Nervenzellen werden die evozierten schnellen EPSPs durch die nikotineren Acetylcholin-Rezeptor Antagonisten nur teilweise reduziert, was bedeutet, dass in diesen Nervenzellen noch andere Transmitter zur schnellen synaptischen Erregung beitragen (Galligan und Bertrand, 1994).

Adenosintriophosphat

Adenosin 5`-Triphosphat (ATP) ist ein weiterer wichtiger Neurotransmitter im ENS (Galligan et al., 2000). Die Wirkung von ATP wird über purinerge P2-Rezeptoren vermittelt (Burnstock und Kennedy, 1985). In der Familie der P2-Rezeptoren wird unterschieden zwischen Liganden-gesteuerten Ionenkanälen (P2X; Benham und Tsien, 1987) und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (P2Y; Dubyak, 1991; Abbracchio und Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1994), welche häufig die Aktivierung der Phospholipase C einleiten (Barnard et al., 1994). Bisher wurden sieben P2X-Rezeptoren (P2X₁₋₇) geklont. Diese P2X-Rezeptoren sind Ionenkanäle, welche nach der Bindung von ATP eine schnelle und selektive Permeabilität für Kationen entwickeln, was eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration und eine Depolarisation zur Folge hat (Bean, 1992; Dubyak und el-Moatassim, 1993; North,

1996). Es existieren kaum Agonisten oder Antagonisten, die ausreichend zwischen P2X- und P2Y-Rezeptoren oder gar zwischen den Subtypen dieser Rezeptoren unterscheiden können. Ein Agonist von P2X-Rezeptoren, speziell von P2X₁ und P2X₃ Subtypen, ist das stabile ATP-Analog α,β -Methylen ATP, welches gewöhnlich an P2Y-Rezeptoren inaktiv ist (Ralevic und Burnstock, 1998). Suramin und Pyridoxal Phosphat 6-Azophenyl-2',4'-Disulfonsäure (PPADS) sind zwei Antagonisten, welche die Aktivität einiger P2X-Rezeptoren blockieren können (Surprenant et al., 1995; Evans et al., 1995), die jedoch nicht zwischen P2X- und P2Y-Rezeptoren unterscheiden können (Ralevic und Burnstock, 1998). Ungefähr 67% der schnellen EPSPs in myenterischen Nervenzellen des Meerschweinchen Ileums sind sensitiv gegenüber P2X-Rezeptor Antagonisten (Galligan und Bertrand, 1994; LePard und Galligan, 1999; Galligan et al., 2000). Das bedeutet, dass die meisten der myenterischen Nervenzellen einen gemischten schnellen erregenden Eingang erhalten und zwar überwiegend vermittelt durch nikotinerge Acetylcholin- und P2X-Rezeptoren. Auch in anderen Teilen des Darms haben die schnellen EPSPs von myenterischen Nervenzellen eine purinerge Komponente, wobei die purinerge Komponente im Ileum am markantesten ist (Galligan et al., 2000). Purinerge enterische Nervenzellen haben eine anale Projektion (LePard und Galligan, 1999).

Serotonin

Etwa 95% (circa 10 mg) des gesamten Serotonins (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) in unserem Körper befindet sich im Gastrointestinaltrakt. Davon sind 90% in mukosalen Enterochromaffinzellen (Racke und Schworer, 1991) und 10% in serotinerger Nervenzellen, speziell in Interneuronen (Young und Furness, 1995; Costa et al., 1996), des myenterischen Plexus zu finden (Gershon et al., 1965). Im myenterischen Plexus machen Serotonin exprimierende Nervenzellen jedoch nur etwa 1% der Gesamtzahl myenterischer Nervenzellen aus (Costa et al., 1996). Das Enzym Tryptophan Hydroxylase synthetisiert Serotonin aus der essenziellen Aminosäure Tryptophan. Serotonin kann als parakrines Signalmolekül (Zhu et al., 2001; Gershon, 2004), als Überlebens- und Proliferationsfaktor (Fiorica-Howells et al., 2000; Nebigil

et al., 2003) und als Neurotransmitter (Kim und Camilleri, 2000) agieren. Freigesetzt von Enterochromaffinzellen oder Nervenzellen kann Serotonin Auswirkungen auf die glatte Muskulatur, die mukosalen Epithelzellen oder die Nervenzellen des Gastrointestinaltraktes haben. Die Wirkung von Serotonin tritt durch Bindung an einen Serotonin-Rezeptor (5-HT_{1-7}) ein, wobei $5\text{-HT}_{1,2,3,4}$ und 7 die Serotonin-Rezeptoren sind, welche die Motorik des Darms beeinflussen (Sikander et al., 2009). Die exzitatorischen, neuronalen 5-HT_4 -Rezeptoren sind auf den Nerven terminalen von myenterischen Nervenzellen lokalisiert, wo diese die Freisetzung von Transmittern und somit die Neurotransmission erhöhen (Gershon, 2004; Sikander et al., 2009). 5-HT_4 -Rezeptoren und 5-HT_7 -Rezeptoren auf glatten Muskelzellen vermitteln eine Relaxation (Sikander et al., 2009). Ein weiterer Serotonin-Rezeptor ist der 5-HT_{1P} -Rezeptor. Das „P“ steht für peripher (Branchek et al., 1988), da die Aktivität dieses Rezeptors bisher nicht im zentralen Nervensystem verzeichnet worden ist (Gershon, 2004). Der 5-HT_{1P} -Rezeptor spielt eine zentrale Rolle bei der Initiierung von peristaltischen und sekretorischen Reflexen. Denn wird Serotonin aus den Enterochromaffinzellen freigesetzt, so bindet es an eben jene 5-HT_{1P} -Rezeptoren und stimuliert somit die submukösen IPANs, die dann wiederum die Reflexe einleiten (Gershon, 2004). Die Aktivierung des 5-HT_{1P} -Rezeptors vermittelt eine langsame Depolarisation in den enterischen Nervenzellen (Mawe et al., 1986). Auch auf den Zellkörpern von enterischen S- und AH-Nervenzellen ist der 5-HT_{1P} -Rezeptor exprimiert, wo dieser schnelle beziehungsweise langsame Depolarisationen vermittelt (Galligan, 1996). Im Gastrointestinaltrakt wird die Wirkung von Serotonin mittels des Serotonin-Wiederaufnahme-Transporters, welcher sowohl in der Mukosa, als auch in den enterischen Nervenzellen vorhanden ist, beendet (Wade et al., 1996). Der für diese Arbeit relevante 5-HT_3 -Rezeptor ist ein Ligandengesteuerter Kationenkanal (Derkach et al., 1989; Fletcher und Barnes, 1998), welcher im Gastrointestinaltrakt auf enterischen sensorischen Nervenendigungen in der Mukosa lokalisiert ist (Foxy-Orenstein et al., 1996; Bertrand et al., 2000). Bindet nun Serotonin, welches infolge einer mukosalen Stimulation von Enterochromaffinzellen freigesetzt wird, an diesen 5-HT_3 -Rezeptor, so werden dadurch motorische Reflexe initiiert (Foxy-Orenstein et al., 1996). 11% der

myenterischen S- und AH-Nervenzellen indes erhalten schnelle synaptische Eingänge, welche über somale 5-HT₃-Rezeptoren vermittelt werden (Mawe et al., 1986; Galligan et al., 2000), was zu einer sich schnell entwickelnden und schnell desensibilisierenden Depolarisation führt (Galligan, 1996), und wiederum eine erhöhte Freisetzung von ACh aus cholinergen Nervenzellen zur Folge hat (Sikander et al., 2009). Im myenterischen Plexus des Meerschweinchendünndarms fungiert Serotonin an manchen Synapsen über 5-HT₃-Rezeptoren als Transmitter für schnelle EPSPs (Zhou und Galligan, 1999). Kenntnisse über die Rolle von Serotonin bei der Kontrolle der humanen gastrointestinalen Funktionen sind aufgrund der Vielzahl an vorhandenen Serotonin-Rezeptoren und dem Mangel an adäquaten und selektiven Antagonisten unvollständig. Obwohl Michel et al. (Michel et al., 2005) bereits die Existenz von funktionellen 5-HT₃-Rezeptoren auf den Nervenzellen des humanen submukösen Plexus nachgewiesen haben, so bleibt deren funktionelle Relevanz dennoch unklar (Wouters et al., 2007). So führte einerseits die direkte lokale Applikation von Serotonin auf die Nervenzellen in humanen submukösen Ganglien zu einer transienten Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz. Diese schnelle, erregende Serotoninantwort konnte auch durch den 5-HT₃-Rezeptor Agonisten 2-methyl-5-HT nachgeahmt und durch den 5-HT₃-Rezeptor Antagonisten Tropisetron blockiert werden. Jedoch verursachte andererseits der 5-HT₃-Rezeptor Agonist 2-methyl-5-HT keine Sekretion in humanen Mukosa-Submukosa Präparationen (Michel et al., 2005). Auch scheinen 5-HT₃-Rezeptoren, anders als im Meerschweinchendarm, nicht ausschlaggebend für den peristaltischen Reflex im humanen Kolon zu sein (Foxy-Orenstein et al., 1996; Bjornsson et al., 2002). Der Anteil an serotoninsensitiven submukösen Nervenzellen pro Ganglion reichte von 25.5% ± 18.4% im humanen Duodenum bis zu 54.2% ± 46.9% im humanen Kolon (Michel et al., 2005). Buhner et al. (Buhner et al., 2009) haben des Weiteren dargelegt, dass die durch Überstände von mukosalen Biopsien von Reizdarmpatienten hervorgerufene Aktivierung von humanen submukösen Nervenzellen unter anderem durch 5-HT₃-Rezeptor Antagonisten inhibiert werden kann. Somit können Antagonisten von 5-HT₃-Rezeptoren durchaus auch klinische Relevanz haben, da diese für die Behandlung vom Reizdarmsyndrom eingesetzt werden.

1.2 Elektrophysiologie humaner enterischer Nervenzellen

Die elektrophysiologischen Eigenschaften von myenterischen Nervenzellen wurden bisher konventionell mit extrazellulären (Wood, 1970 und 1973; Ohkawa und Prosser, 1972) und intrazellulären (Nishi und North, 1973; Hirst et al., 1974; Furukawa et al., 1986; Brookes et al., 1988; Browning und Lees, 1996; Cornelissen et al., 2001) Mikroelektroden in kleinen Versuchstieren untersucht. Diese Untersuchungen haben unsere Kenntnisse über die grundlegenden Funktionen des ENS im Meerschweinchen, in der Katze, in der Maus, in der Ratte und im Schwein erweitert, aber auch die Spezies spezifischen ENS Funktionen hervorgehoben. Die klassische Methode mit Mikroelektroden liefert jedoch nur auf Einzelzellebene Informationen. Die Analyse von synaptischen Interaktionen zwischen vielen Nervenzellen ist mit dieser Technik nicht möglich. Außerdem existieren bislang nur wenige Publikationen über Ableitungen von Nervenzellen des humanen myenterischen Plexus. Maruyama (Maruyama, 1981) untersuchte mittels intrazellulärer Ableitungen die Aktionspotential-Charakteristiken von kultivierten myenterischen Zellen, welche vom humanen Dünndarm stammten. Auch Brookes et al. (Brookes et al., 1987) führten intrazelluläre Ableitungen an Nervenzellen des myenterischen Plexus durch, jedoch in frisch präpariertem humanen Kolongewebe. In beiden Studien war die Anzahl der untersuchten Nervenzellen mit 2 beziehungsweise 43 Nervenzellen eher gering. Die vielen Jahre, die benötigt wurden, um von einer so geringen Anzahl von Nervenzellen ableiten zu können, ist ein Grund, warum solche Untersuchungen nicht weiter verfolgt wurden. Zusätzlich hat Maruyama (Maruyama, 1981) kultivierte fötale myenterische Nervenzellen untersucht, deren Verhalten wohl nicht mit dem von adulten enterischen Nervenzellen vergleichbar ist. Beim Vergleich der neurophysiologischen Daten, welche bereits vom humanen myenterischen Plexus bekannt sind, mit denen vom Meerschweinchen, werden gewisse Unterschiede zwischen diesen beiden Spezies deutlich. So weist die große Mehrheit der Nervenzellen im humanen ENS Eigenschaften auf, die denen von S-Nervenzellen ähneln. AH-Nervenzellen wurden bei Untersuchungen an humanen myenterischen Nervenzellen hingegen nur selten

und bei Experimenten mit humanen submukösen Nervenzellen gar nicht detektiert (Brookes et al., 1987; Schemann et al., 2002). Auch wenn Dogiel Typ II Nervenzellen im humanen ENS identifiziert worden sind (Wattchow et al., 1995; Hens et al., 2001), so existiert im humanen ENS nicht die starke Korrelation zwischen Dogiel Typ II Morphologie und AH-Elektrophysiologie wie im Ileum des Meerschweinchens (Hirst et al. 1974; Furness, 2000). Nikotinerge schnelle EPSPs sind im humanen ENS zahlreich, während langsame EPSPs nur selten aufgezeichnet werden (Brookes et al., 1987; Schemann et al., 2002).

Im humanen submukösen Plexus ist es bereits möglich mit der Kombination aus „*Multisite optical recording technique*“ (MSORT) und spannungssensitiven Farbstoffen routinemäßig die Aktivität von Nervenzellen aufzuzeichnen. Mit dieser nicht invasiven Methode ist eine simultane Messung der elektrischen Aktivität einer großen Population von Nervenzellen möglich, wodurch die Ausbreitung der Erregung nachvollzogen werden kann. Dabei ist die räumliche und zeitliche Auflösung so hoch, dass sowohl schnelle Veränderungen im Membranpotential, wie zum Beispiel Aktionspotentiale, als auch schnelle EPSPs detektiert werden können (Schemann et al., 2002; Schemann et al., 2005; Michel et al., 2005; Breunig et al., 2007; Buhner et al., 2009). Jedoch blieben bisher die Ableitungen von Nervenzellen des humanen myenterischen Plexus mit der Kombination aus MSORT und spannungssensitiven Farbstoffen eine Herausforderung. Nicht zuletzt aufgrund der Schwierigkeiten, dass die Ganglien des humanen myenterischen Plexus zum einen nicht wie jene des Meerschweinchens mittels Durchlicht unter dem Mikroskop sichtbar sind, und zum anderen, dass diese für spannungssensitive Farbstoffe nur begrenzt zugänglich sind. Die Grundlage für diese Arbeit hat die Publikation von Schemann et al. (Schemann et al., 2002) gelegt, in welcher gezeigt wird, dass es grundsätzlich möglich ist von Nervenzellen des humanen myenterischen Plexus mittels MSORT in Kombination mit spannungssensitiven Farbstoffen zu messen. Die elektrische Stimulation eines Nervenstranges im humanen myenterischen Plexus führte zur Ableitung von Signalen in einer humanen myenterischen Nervenzelle und einem Nervenstrang. Die Signale der ganglionären Nervenzelle konnten mittels Hexamethonium geblockt werden, was eine cholinerg vermittelte Antwort vermuten lässt. Jedoch waren

Schemann et al. (Schemann et al., 2002) damit nur in einem Gewebe erfolgreich, weshalb das zuverlässige und reproduzierbare Aufzeichnen von Signalen von humanen myenterischen Nervenzellen weiterhin eine Herausforderung blieb.

1.3 Spannungssensitive Farbstoffe

Zur Detektion transienter Spannungsänderungen in den Nervenzellen des myenterischen Plexus wurden spannungssensitive Farbstoffe eingesetzt, die nur dann stark fluoreszieren, wenn sie einseitig in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran integriert sind. Nach der Eingliederung in die Zellmembran der Nervenzellen führen Änderungen im elektrischen Feld der Membranspannung zu elektrochromen Ladungsverschiebungen im farbgebenden Teil des Farbstoffes, dem Chromophor. Diese Änderungen finden im Nanosekundenbereich statt und verursachen eine Frequenzverschiebung des Absorptions- beziehungsweise Emissionsspektrums um nur wenige Nanometer, was aber für die biologische Fragestellung ausreichend ist (Loew et al., 1979; Loew und Simpson, 1981; Loew, 1996). Die optische Antwort ist folglich schnell genug um transiente Spannungsänderungen im Millisekundenbereich, wie zum Beispiel Aktionspotentiale von Nervenzellen, zu detektieren (Wu et al., 1998; Obaid et al., 1999; Neunlist et al., 1999; Schemann et al., 2005; Michel et al., 2005; Breunig et al., 2007; Buhner et al., 2009; Mazzuoli und Schemann, 2009). Die in dieser Arbeit verwendeten spannungssensitiven Farbstoffe gehören zur Klasse der schnell antwortenden Farbstoffe, was bedeutet, dass sie innerhalb von Mikrosekunden auf Membranpotentialänderungen reagieren. Die resultierenden potentialabhängigen Fluoreszenzänderungen sind in dieser Farbstoffklasse mit nur maximal 8% Abnahme der Fluoreszenzintensität auf 100 mV Potentialänderung allerdings gering (Waggoner, 1979; Fluhler et al., 1985; Loew, 1996). Die spannungssensitiven Farbstoffe transformieren somit Änderungen des Membranpotentials in optische Signale.

In dieser Arbeit wurden folgende spannungssensitive Aminonaphthylethylenylpyridinium (ANEP) Farbstoffe verwendet: Di-8-ANEPPS, Di-4-ANEPPDHQ und Di-8-ANEPPQ. Die ANEP Farbstoffe wurden von Fluhler et al. (Fluhler et al., 1985) und Loew (Loew, 1996) entwickelt. Di-8-ANEPPS besitzt lange Kohlenwasserstoffketten, weshalb sich dieser Farbstoff fest in der Membran verankern kann. Dies ist auch der Grund weshalb Di-8-ANEPPS nicht so schnell internalisiert wird (Loew, 1996). Di-8-ANEPPS ist ein Naphthylstyrylfarbstoff und schlecht wasserlöslich, weshalb zum Anfärben der Zellen das Tensid Pluronic F-127 benötigt wird (Fluhler et al., 1985; Fromherz und Lambacher, 1991; Bedlack et al., 1992; Loew, 1996). Di-8-ANEPPS hat eine hohe Photostabilität bei gleichzeitig geringer Phototoxizität. Ein Analog von Di-8-ANEPPS ist Di-8-ANEPPQ. Dieser Farbstoff ist wegen seiner sehr langen Kohlenwasserstoffketten noch hydrophober als Di-8-ANEPPS und deshalb wasserunlöslich. Zusätzlich zu den sehr langen Kohlenwasserstoffketten beinhaltet das Di-8-ANEPPQ Molekül eine zweifach positive Ladung, was die einseitige Membranbindung verstärkt und das Internalisieren des Farbstoffes verhindert (Loew, 1996; Tsau et al., 1996). Das Di-4-ANEPPDHQ und das Di-8-ANEPPS Molekül stimmen im Bereich des Chromophors überein. Jedoch verleiht der nicht übereinstimmende Teil dem Di-4-ANEPPDHQ Molekül eine geringe Phototoxizität, sowie eine höhere Stabilität in der Membran und führt zudem zu einem guten Signal-Rausch Verhältnis (Obaid et al., 2004).

1.4 Multisite Optical Recording Technique

Um die neuronale Aktivität von enterischen Nervenzellen im Meerschweinchen analysieren zu können, haben Obaid et al. (Obaid et al., 1999) und kurz darauf Neunlist et al. (Neunlist et al., 1999) die MSORT Methode entwickelt. Dieses schnelle Neuro-Bildgebungsverfahren, kombiniert mit dem Einsatz von spannungssensitiven Farbstoffen, ermöglicht eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung, welche das simultane Erkennen von schnellen Potentialänderungen, wie zum Beispiel das Erkennen von Aktionspotentialen in den Nervenzellen eines Ganglions im ENS

möglich macht (Neunlist et al., 1999; Schemann et al., 2005; Michel et al., 2005; Breunig et al., 2007; Buhner et al., 2009; Mazzuoli und Schemann, 2009). Weiterhin ist die MSORT Methode nicht invasiv, womit Aufnahmen von Nervenzellen gemacht werden können, die zu klein sind, um mit Mikroelektroden die elektrischen und synaptischen Eigenschaften zu untersuchen. Wichtig für das optische Bildgebungsverfahren ist das Signal-Rausch Verhältnis, welches ausschlaggebend für die Auflösung der elektrischen Aktivität ist. Da die Amplituden der optischen Signale der Membranpotentiale von unterschiedlichen Messpunkten nicht quantitativ vergleichbar sind, ist es schwierig quantitative Messungen durchzuführen, weshalb relative Veränderungen in den Amplituden der Signale errechnet werden (Neunlist et al., 1999).

Neunlist et al. (Neunlist et al., 1999) zeichneten die neuronale Aktivität im ENS des Meerschweinchens simultan mit der MSORT Methode und einer intrazellulären Mikroelektrode auf. Diese Untersuchungen zeigten, dass sowohl die anhand von depolarisierenden Strompulsen evozierten intrazellulär gemessenen Potentiale, als auch die synaptische Aktivierung immer auch zu zeitlich synchronen optischen Signalen führten. Die intrazellulären Aufzeichnungen von Aktionspotentialen vor und nach dem Anfärben des Ganglions mit dem spannungssensitiven Farbstoff Di-8-ANEPPS durch lokale Mikroinjektion zeigten keine erkennbaren Veränderungen in der Erregbarkeit oder in den Charaktermerkmalen der Aktionspotentiale. Weiter verglichen Neunlist et al. (Neunlist et al., 1999) die Amplituden der optischen mit denen der synchron aufgezeichneten intrazellulären Signale und legten somit dar, dass die verwendeten Färbe- und Aufnahmebedingungen mit der optischen Methode zu einem Signal-Rausch Verhältnis führten, welches auch die Detektion von unter-schwelligem schnellen EPSPs mit Amplituden von 10 mV möglich machte. Jedes durch einen depolarisierenden Strompuls oder durch synaptische Aktivierung hervorgerufene und intrazellulär aufgezeichnete Aktionspotential hatte sein optisches Korrelat. Somit lässt sich sagen, dass optische Signale von spannungssensitiven Farbstoffen mit hoher Genauigkeit die elektrische Aktivität von Nervenzellen widerspiegeln. Weiter muss erwähnt werden, dass sehr wohl Unterschiede in der Form der schnellen EPSPs und der Aktionspotentiale zwischen intrazellulären und

optischen Aufnahmen existieren, und zwar in der Art, dass meist die optischen Signale einen schnelleren zeitlichen Verlauf haben. Dies kann zum einen daran liegen, dass schnelle optische Farbstoffe Membranpotentialänderungen mit einer höheren zeitlichen Auflösung aufzeichnen können, als dies mit Mikroelektroden möglich ist (Müller et al., 1986). Zum anderen repräsentieren optische Aufnahmen aus dendritischen, axonalen und somalen Potentialänderungen zusammengesetzte Signale (Grinvald et al., 1988), während intrazelluläre Mikroelektroden nur regionale Potentialänderungen aufzeichnen. Dies steht im Einvernehmen mit der regionalen Heterogenität der Aktionspotentialeigenschaften, wie sie in Ganglien der oberen Speiseröhre der Seepocke vorkommen (Krauthamer und Ross, 1984). Des Weiteren hängt die Amplitude der optischen Signale von den Ausmaßen der aufgezeichneten Fläche, von der Belichtungsintensität und von der Inkorporation des Farbstoffes in die Membran ab (Grinvald et al., 1988).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es ein Protokoll zu etablieren, welches die erfolgreiche Messung von reproduzierbaren optischen Signalen mittels MSORT in Kombination mit spannungssensitiven Farbstoffen in humanen myenterischen Nervenzellen ermöglicht. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich die Notwendigkeit Untersuchungen an Primärzellkulturen humaner myenterischer Nervenzellen durchzuführen, weshalb ein zusätzliches Ziel dieser Arbeit die Etablierung einer solchen Primärkultur war. Die unterschiedlichen Protokolle wurden somit sowohl in frisch präpariertem Gewebe, als auch in Primärkulturen von humanen myenterischen Nervenzellen getestet. Die Verwendbarkeit von verschiedenen spannungssensitiven Farbstoffen wurde im myenterischen Plexus des Meerschweinchens und des Menschen untersucht. Da die humanen myenterischen Ganglien nur limitiert sichtbar sind, wurden zur Anfärbung der Ganglien zwei unterschiedliche Vitalfarbstoffe ausprobiert. Um feststellen zu können, ob diese Farbstoffe die elektrophysiologischen Eigenschaften von myenterischen Nervenzellen verändern,

was deren Verwendung im Humangewebe ausschließen würde, wurden die Vitalfarbstoffe zunächst im myenterischen Plexus des Meerschweinchens getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Vorversuche im myenterischen Plexus des Meerschweinchens

2.1.1 Präparation des myenterischen Plexus

Für die Experimente wurden männliche Dunkin Hartley Meerschweinchen (Charles River, Kisslegg, Deutschland; Harlan, Borcheln, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in artgerechten Käfigen mit je zwei bis drei Tieren in einem Luftstromschrank (Uni Protect; Ehret, Emmendingen, Deutschland) gehalten. Dabei standen den Meerschweinchen Standardtrockenfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Trinkwasser ad libitum zur Verfügung und es wurde stets ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 14:10 Stunden eingehalten. Bevor die Tiere für Versuche verwendet wurden, hatten sie mindestens eine Woche Zeit, um sich nach dem Transport zu unserem Institut zu akklimatisieren. Erst kurz vor der Tötung durch Genickbruch, gefolgt von einem Schnitt durch die Kehle zum Ausbluten, wurden die Meerschweinchen von der Gruppe isoliert, um den Stress für das Versuchstier so gering wie möglich zu halten. Die Haltung und Tötung der Tiere entsprach den ethischen Richtlinien für Tierversuche in Deutschland.

Nach Tötung der Meerschweinchen wurde das Abdomen mit Hilfe einer chirurgischen Schere (14001-13; Fine Science Tools (FST), Heidelberg, Deutschland) und Gewebe-Pinzetten (11023-10; FST) geöffnet, wobei Standard-Pinzetten (11000-14; FST) benutzt wurden, um die Abdominalwand zu halten. Anschließend wurden Dünn- und Dickdarm mittels zweier Scheren (14010-15; FST), rasch entnommen und in eine Petrischale (633161; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit Sylgardboden (Sylgard® 184; Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Daraufhin wurde ein ca. 3 cm langes Darmstück abgetrennt, entlang des Mesenterialansatzes geöffnet und mit feinen Nadeln (26002-10; FST) im Sylgardboden fixiert. Das Gewebe wurde mehrmals mit einer mit Carbogen (5% CO₂,

95% O₂; Andelfinger, Freising, Deutschland) begasten und auf pH 7.4 equilibrierten Präparationskrebslösung gewaschen und in der darauf folgenden Präparation auch fortwährend mit 500 ml eiskalter Präparationskrebslösung mittels einer Zirkulationspumpe (Reglo; Ismatec, Zürich, Schweiz) und einem Schlauchsystem (Tygon® R-3603; Saint Gobain, Akron, OH, USA) perfundiert. Die Präparationskrebslösung enthielt in mM: 117 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl₂ 6 H₂O, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂ 2 H₂O und 11 Glucose. Durch behutsames Entfernen von Mukosa, Submukosa und Zirkulärmuskulatur erhielt man ein Präparat, welches nur noch aus Longitudinalmuskulatur mit anheftendem myenterischen Plexus bestand. Zur Präparation wurden Mikroscheren (14028-10, 15013-12, 15005-08; FST) und Pinzetten (Dumostar™ 10576 und 10577; Dumont, Schweiz) verwendet. Das fertige 2 x 1 cm große Präparat wurde auf einem Silikonring (Dow Corning) fixiert und in eine Messkammer mit einem Glasboden überführt, welcher einen Durchmesser von 42 mm und eine Dicke von 130 - 170 µm hatte (Sauer, Reutlingen, Deutschland). In der Versuchsanordnung wurde das Gewebe konstant mit Carbogen begasteter Versuchskrebslösung (37 °C, pH 7.4) perfundiert. Die Versuchskrebslösung enthielt in mM: 117 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl₂ 6 H₂O, 1.2 NaH₂PO₄, 20 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂ 2 H₂O und 11 Glucose und in manchen Experimenten auch 1 µM Nifedipin, um die Aktivität der glatten Muskulatur zu minimieren. Die Versuchskrebslösung zirkulierte mittels einer Mini-Puls-Pumpe (Minipuls® 3; Gilson, Villiers, Frankreich) mit einer Geschwindigkeit von 19 U/min, was einer Durchflussrate von 10 ml/min entsprach, vom Vorratsbehälter, welcher sich in einem Umwälzwasserbad (WiseCircu®; Witeg, Wertheim, Deutschland) befand, über ein Schlauchsystem zur Messkammer und zurück. Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) erworben.

2.1.2 Ermittlung eines Farbstoffes zur Visualisierung von myenterischen Ganglien

Um zu Ermitteln, ob die Farbstoffe zum Anfärben des humanen myenterischen Plexus toxische Auswirkungen auf das elektrophysiologische Verhalten haben, wurden diese zunächst im myenterischen Plexus des Meerschweinchens getestet.

Nach dem Anfärben der Ganglien mit 20 μM des spannungssensitiven Farbstoffes Di-8-ANEPPS (Bedlack et al., 1992), gelöst in Versuchskrebslösung und 0.135% Dimethyl Sulfoxid (DMSO; Acros Organics, Geel, Belgien), sowie 0.0135% Pluronic F-127 (20% Lösung in DMSO; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), wurde ein Ganglion mittels einer Teflon beschichteten Platinelektrode (101R-1T; Science Products, Hofheim, Deutschland), welche einen Durchmesser von 25 μM hatte, elektrisch stimuliert. Dies geschah indem die Elektrode auf einen interganglionären Fasertrakt platziert wurde und mit Hilfe eines Stimulators (Typ 215/I; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) eine elektrische Stimulation mit 1.5 – 4 V für 400 μs erzeugt wurde. Anschließend wurden die Gewebe entweder mit 50 μM des Vitalfarbstoffes Methyleneblau, der Nervenzellen und Nervenfasern blau anfärbt (Polyak, 1941) oder mit 2.5 μM 4-Di-2-ASP, einem kationischen, mitochondrialen Farbstoff, welcher Nerventerminalen anfärbt (Magrassi et al., 1987), inkubiert. Die Inkubationszeit währte im Falle von Methyleneblau 15 min und bei 4-Di-2-ASP 10 min. Auf die Inkubation mit dem jeweiligen Farbstoff folgte eine erneute elektrische Stimulation des Ganglions, um die Amplituden der Summenaktionspotentiale und der schnellen EPSPs vor und nach der Inkubation miteinander vergleichen zu können.

2.1.3 Ermittlung eines spannungssensitiven Farbstoffes zum Aufzeichnen von myenterischen Ganglien

Um Aufnahmen im myenterischen Plexus des Meerschweinchens und im submukösen Plexus des Meerschweinchens und des Menschen zu machen, verwendet unsere Arbeitsgruppe erfolgreich die intraganglionäre Mikroinjektion des spannungssensitiven Farbstoffes Di-8-ANEPPS in einer Konzentration von 20 μM

(Neunlist et al., 1999; Schemann et al., 2002). Da die Membraneigenschaften von verschiedenen Zelltypen die Tauglichkeit von spannungssensitiven Farbstoffen bestimmen (Cohen und Salzberg, 1978; Waggoner, 1979; Fluhler et al., 1985; Loew et al., 1992; Loew, 1996; Wu et al., 1998; Zochowski et al., 2000), wurden für die Versuche im humanen myenterischen Plexus auch andere spannungssensitive Farbstoffe getestet, um den Farbstoff mit der besten Zugänglichkeit zu humanen myenterischen Nervenzellen und dem größten Signal-Rausch Verhältnis zu ermitteln. Alle Farbstoffe wurden zunächst im myenterischen Plexus des Meerschweinchens getestet, um deren Gewebezugänglichkeit und Tauglichkeit für das Aufzeichnen von Signalen bewerten zu können.

In den Meerschweinchen Präparaten wurde Di-4-ANEPPDHQ in den Konzentrationen 7.5 – 75 μM und Di-8-ANEPPQ beziehungsweise Di-8-ANEPPS jeweils in einer Konzentration von 20 μM durch lokale Druckapplikation in die Ganglien eingespritzt.

Di-4-ANEPPDHQ wurde des Weiteren in den Konzentrationen 30, 45 und 75 μM für jeweils 30 min in der Versuchskammer inkubiert. Auch wurde dieser Farbstoff in der Konzentration von 75 μM lokal auf das Ganglion appliziert. Anschließend ließ man den lokal applizierten Farbstoff für 5 min einwirken.

Im Falle von Di-4-ANEPPDHQ wurden Pluronic F-127 Konzentrationen von 0.00675 – 0.03375% getestet.

Außer Methylenblau, welches von der Firma Sigma-Aldrich bezogen wurde, stammten alle Farbstoffe von der Firma Invitrogen.

Für die lokale Druckapplikation der spannungssensitiven Farbstoffe wurden diese in eine Mikropipette (GB100F-10; Science Products, Hofheim, Deutschland) gefüllt, welche anschließend zur Adjustierung über dem Ganglion in einen Mikroinjektionsmanipulator (M-3333; Narishige, Tokio, Japan) eingebracht wurde. Im Durchlicht wurden die Glasspipetten dann am Übergang vom Fasertrakt zum Ganglion behutsam innerhalb des interganglionären Fasertraktes positioniert, woraufhin der Farbstoff mittels einer 800 ms währenden lokalen Druckapplikation von etwa 0.8 – 1 bar durch einen Picospritzer (PDES-2L; NPI, Tamm, Deutschland) in das Ganglion eingespritzt wurde. Die Glaspipetten wurden mit einem Flaming/Brown

Mikropipetten Puller (Model P-87; Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) gezogen. Nach einer 5 - 10 minütigen Inkubation, währenddessen sich der Farbstoff in die Zellmembranen einlagerte, wurde mit den Experimenten begonnen. Neunlist et al. (Neunlist et al., 1999) haben gezeigt, dass das Anfärben mit spannungssensitiven Farbstoffen die elektrophysiologischen Eigenschaften der Nervenzellen nicht verändert.

2.2 Experimente im humanen myenterischen Plexus

Die Studien an humanen enterischen Nervenzellen wurden an Darmpräparaten vorgenommen, welche wir infolge einer abdominalen Operation von der Chirurgie des Klinikums Freising, vom Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München oder von der chirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München erhalten haben. Nach der Inspektion durch den Pathologen wurden die makroskopisch gesunden Bereiche der Darmproben in sterile Flaschen, gefüllt mit steriler, eiskalter und mit Carbogen gesättigter Präparationskrebslösung (siehe 2.1.1), überführt, und anschließend auf Eis gelagert in das Labor des Lehrstuhls für Humanbiologie geliefert. Dieses Protokoll wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt (# Projektgenehmigung: 1746/07). Des Weiteren unterliegen die von der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung „*Human Tissue and Cell Research*“ (HTCR) erhaltenen Gewebeproben der Zustimmung des Patienten und wurden entsprechend den Richtlinien der Stiftung verwendet.

2.2.1 Präparation des humanen myenterischen Plexus

Die Präparation des humanen myenterischen Plexus stimmt weitestgehend, auch was die verwendeten Materialien und Lösungen betrifft, mit der beim Meerschweinchen überein (siehe 2.1.1). Zunächst wurden die gelieferten Präparate drei Mal mit steriler, eiskalter und mit Carbogen begaster Präparationskrebslösung

gewaschen und in eine Glaspetrischale (100 x 20 mm; Schott Glas, Mainz, Deutschland) mit Sylgardboden überführt. Falls noch nicht durch den Pathologen geschehen, wurde das Darmpräparat mit einer Schere aufgeschnitten. Handelte es sich bei dem Präparat um ein Stück Dickdarm, wurde dieses, wenn möglich, entlang einer Tänie, einer Verstärkung der Längsmuskelschicht in der Wand des Dickdarms, geöffnet und mit Hilfe von feinen Nadeln im Sylgardboden befestigt. Durch behutsames Entfernen der Mukosa, Submukosa und der Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur wurde der myenterische Plexus im humanen Darmpräparat freigelegt. Im Gegensatz zur Meerschweinchen Präparation wurden menschliche Präparate während der Präparation ständig mit frischer, eiskalter, Carbogen begaster Präparationskrebslösung (pH 7.4) perfundiert. Nach beendeter Präparation wurde das Gewebe auf einem Silikonring fixiert und in eine Versuchskammer überführt, wo es fortwährend mit 37 °C warmer, Carbogen begaster Versuchskrebslösung (pH 7.4) versorgt wurde.

In humanen myenterischen Plexus Präparaten wurden für die Injektion in den interganglionären Fasertrakt folgende Konzentrationen der spannungssensitiven Farbstoffe verwendet: 75 µM Di-4-ANEPPDHQ, 20 µM Di-8-ANEPPQ und 20 beziehungsweise 30 µM Di-8-ANEPPS.

Di-4-ANEPPDHQ wurde des Weiteren in den Konzentrationen 45 und 75 µM für 30 - 45 min in der Versuchskammer inkubiert. Auch wurde dieser Farbstoff in der Konzentration von 75 µM lokal auf das Ganglion appliziert. Anschließend ließ man den lokal applizierten Farbstoff für 5 min einwirken.

Di-8-ANEPPQ und Di-8-ANEPPS wurden außerdem in einer Konzentration von 20 µM inkubiert. Dazu wurde das präparierte Humangewebe vorab auf einen Silikonring gepinnt. Um das Gewebe für den Farbstoff zugänglicher zu machen, folgte zunächst eine 30 – 60 minütige enzymatische Verdauung mit 0.5 mg mL⁻¹ einer Protease Typ IX vom *Bazillus polymyxa* und 0.03 mg mL⁻¹ einer Collagenase Typ VII von *Clostridium histolyticum* (beide von Sigma-Aldrich). Die enzymatische Aktivität der Protease betrug dabei 1 unit/mg und die der Collagenase 50 U/mL. Anschließend wurde der Silikonring mit dem Gewebe in eine Glaspetrischale mit 20 ml der

Färbelösung überführt und schüttelnd im CO₂ Inkubator (CB 210; Binder, Tuttlingen, Deutschland) inkubiert.

Im Falle der lokalen Druckapplikation von Di-4-ANEPPDHQ (0.0135 – 0.027%), sowie bei der Inkubation mit Di-4-ANEPPDHQ (0.00675 – 0.027%) und Di-8-ANEPPS (0.027 - 0.0675%) wurden verschiedene Konzentrationen von Pluronic F-127 ausprobiert.

Nachdem eine Teflon ummantelte Platinfilament Elektrode mit einem Durchmesser von 75 µm (101R-3T; Science Products) auf einen interganglionären Faserstrang platziert worden war, wurden einzelne Ganglien mit 1.5 - 10 V für 600 µs elektrisch stimuliert, um durch Auslösen von Signalen deren Vitalität zu überprüfen. Die elektrische Stimulation wurde stets mit einer geringen Spannung begonnen, welche dann Aufnahme für Aufnahme um 0.5 oder 1 V erhöht wurde. Somit wurde vermieden, dass antidrom verlaufende Aktionspotentiale fälschlicherweise als Summenaktionspotentiale interpretiert wurden. Summenaktionspotentiale variieren nämlich im Gegensatz zu antidrom verlaufenden Aktionspotentialen, welche dem Alles-oder-nichts-Gesetz folgen, abhängig von der angelegten Spannung in ihrer Amplitude. Für die weiteren Experimente wurde dann stets die Spannung verwendet, mit der die größte Signalamplitude erreicht werden konnte.

2.2.2 Primärkultur des humanen myenterischen Plexus

Die Primärkulturen des humanen myenterischen Plexus wurden, ausgenommen von wenigen Modifikationen, entsprechend einem Protokoll für die Herstellung einer Primärkultur von myenterischen Nervenzellen des adulten Meerschweinchen Dünndarms, beschrieben durch Vanden Berghe et al. (Vanden Berghe et al., 2000), angefertigt.

Der myenterische Plexus wurde, wie unter 2.2.1 bereits beschrieben, unter sterilen Bedingungen, d.h. unter Verwendung steriler Instrumente und steril filtrierter Lösungen, isoliert. Das Präparationsbesteck wurde hierfür entweder mit 3%igem Bomix[®] (Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) oder im 180 °C Trockenschrank (MMM, Gräfelfing, Deutschland) sterilisiert. Weiterhin wurden alle

verwendeten Gefäße und Materialien autoklaviert (Model 3150EL; Systec, Wetzlar, Deutschland) und ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien und Handschuhe verwendet. Für Arbeitsschritte, die nicht unter der sterilen Werkbank (Holten LaminAir; Heto-Holten, Allerød, Dänemark) durchgeführt werden konnten, wurden die Arbeitsflächen mit 80%igem Ethanol und Descosept AF (Dr. Schumacher, Melsungen, Deutschland) gereinigt.

Die sterile, eiskalte, mit Carbogen angereicherte Präparationskrebslösung (pH 7.4) in der Präparationspetrischale wurde alle 10 min ausgetauscht und enthielt in mM: 120.9 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 MgCl₂ 6 H₂O, 1.2 NaH₂PO₄, 14.4 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂ 2 H₂O und 11.5 Glucose. Nach der Präparation wurde der freigelegte myenterische Plexus drei Mal mit steriler, eiskalter und mit Carbogen angereicherter Präparationskrebslösung gewaschen und anschließend mit einer Schere zerkleinert. Die resultierenden Stücke, welche eine Fläche von circa 2 mm² hatten, wurden daraufhin in 4.5 ml Präparationskrebslösung überführt. Anschließend wurden Stammlösungen einer Protease Typ I aus dem Rinderpankreas (250 µl), einer Typ II Collagenase von *Clostridium histolyticum* (250 µl) (beide von Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und 400 µl Rinder Serum Albumin (Bovine Serum Albumin, BSA; Serva, Heidelberg, Deutschland) in den Konzentration 20 mg mL⁻¹, 25 mg mL⁻¹ beziehungsweise 5% zugegeben. Dies führte zu folgenden Endkonzentrationen: 0.9 mg mL⁻¹ Protease, 1.2 mg mL⁻¹ Collagenase und 0.37% BSA. Die enzymatische Aktivität der Protease betrug dabei 6.9 units/mg und die der Collagenase 555 units/mg. Die Stammlösungen beider Enzyme und von BSA wurden mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS; in mM: 150.6 NaCl, 21.7 NaH₂PO₄, 121.9 Na₂HPO₄) hergestellt und bei -20 °C gelagert. Nach 25 - 55 min schüttelnd bei 30 - 35 °C im Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) wurde der nun trübe und an den Gewebstücken Schlieren bildende enzymatische Ansatz in ein 15 ml PP-Schraubverschluss Röhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt. Durch Hinzufügen von steriler, eiskalter Präparationskrebslösung auf ein Volumen von 10 ml wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation der Suspension bei 4° C mit 500 g (Tischkühlzentrifuge Z 513K; Hermle, Wehingen, Deutschland) wurde der Überstand mittels einer sterilen

Glaspasteurpipette (Brand, Wertheim, Deutschland) und einer Vakuumpumpe (NKF Neuberger, Freiburg, Deutschland) abgesaugt. Anschließend wurde erneut mit steriler, eiskalter Krebslösung auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und durch Schütteln und Vortexen (Vortex Mixer; Neolab, Heidelberg, Deutschland) abermals eine Suspension hergestellt. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten, gefolgt vom Absaugen des Überstandes und dem erneuten Auffüllen mit Präparationskrebslösung, wurde das Pellet in jeweils 5 ml eiskaltem Kulturmedium und Medium M199 + GlutaMAX™ (Gibco) resuspendiert und für das Sammeln der Ganglien in eine Glaspetrischale überführt.

Das Kulturmedium setzte sich zusammen aus Medium M199 + GlutaMAX™, 100 U mL⁻¹ Penicillin und 100 µg mL⁻¹ Streptomycin, 10% fetalem Rinderserum (FBS; alle von Gibco), einer erhöhten Glucose Konzentration (30 mM) und 50 oder 100 ng mL⁻¹ mouse nerve growth factor 7s (Alomone labs, Jerusalem, Israel). Nach Zugabe von FBS wurde das Kulturmedium für maximal eine Woche verwendet.

Das Sammeln der Ganglien wurde unter einem Lichtmikroskop (DMIL; Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einer 1000 µl Pipette (Gilson, Middleton, USA) durchgeführt. Jeweils 300 µl Suspension mit darin enthaltenen Ganglien wurden gesammelt und in eine Kulturschale (µ-dish^{35 mm, high}; Ibidi, Martinsried, Deutschland) überführt. Die Ganglien waren dadurch zu Erkennen, dass sie im Phasenkontrast einen bräunlichen Schimmer aufwiesen, was sie von den weißlich erscheinenden Muskulatur- und Bindegewebsüberresten unterschied.

Die angeimpften Kulturschalen wurden nach dem Sammeln in einem CO₂ Inkubator unter einem konstanten CO₂ Gehalt von 5%, bei 100% Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C aufbewahrt, damit sich die Ganglien am Boden der Kulturschale anhaften konnten. Nach einer Stunde wurde jeder Schale 1 ml 37 °C warmes Kulturmedium zugegeben, welches alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Dafür wurde pro Kulturschale eine frische, sterile Glaspasteurpipette, welche vor Gebrauch kurz abgeflammt wurde, verwendet, um die Verschleppung einer eventuellen Infektion zu vermeiden. Mittels einer Vakuumpumpe wurde seitlich und unter leichtem Kippen der Schale das Kulturmedium abgesaugt und anschließend durch 1 ml frisches 37° C warmes Kulturmedium ersetzt. Um die Proliferation der

Gliazellen und Fibroblasten einzudämmen wurde das Kulturmedium ab dem ersten Mediumwechsel zusätzlich mit 2 μM Cytosin β -D-Arabinofuranosid (Sigma-Aldrich) versetzt, welches die Zellteilung der Gliazellen und Fibroblasten hemmt und somit die Überwucherung der Kulturschale mit diesen Zelltypen verzögert.

Die Versuche mit den humanen myenterischen Primärkulturen wurden mit einer zirkulierenden, 37 °C warmen, modifizierten Versuchskrebslösung durchgeführt. Diese Versuchskrebslösung enthielt in mM: 150 NaCl, 5 KCl, 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 2 $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 10 Glucose und 10 HEPES (Sigma-Aldrich). Der pH der Lösung wurde mit NaOH auf 7.4 eingestellt. Zum Anfärben der kultivierten myenterischen Nervenzellen wurde zunächst die Perfusion gestoppt, dann mittels einer Pasteurpipette die verbliebene Lösung aus der Versuchskammer entfernt und anschließend mit Di-8-ANEPPS angefärbt. Nachdem der überschüssige Farbstoff durch 15 minütiges Auswaschen entfernt worden war, wurde die Krebslösung wieder perfundiert.

In der Zellkultur wurde entweder mittels einer Teflon ummantelten Platinfilament Elektrode, mit einem Durchmesser von 25 oder 75 μM , mittels elektrischer Feldstimulation (Eigenbau) oder mittels einer bipolaren Elektrode, hergestellt aus einem Nickel-Chrom Draht mit einem Durchmesser von 51 μM (Science Products), stimuliert. Dazu wurden die Elektroden jeweils unmittelbar über den Zellclustern platziert, und anschließend wurde in 0.5 oder 1 V Schritten mit 1.5 - 10 V für 600 μs elektrisch stimuliert. Für die weiteren Experimente wurde dann stets die Spannung verwendet, mit der die größte Signalamplitude erreicht werden konnte.

2.3 Pharmakologie

Alle verwendeten Agonisten wurden in eine Mikropipette gefüllt, welche anschließend zur Adjustierung über dem Ganglion beziehungsweise dem Zellcluster in einen Mikroinjektionsmanipulator eingebracht wurde. Im Durchlicht wurden die Glaspipetten dann im Gewebe beziehungsweise am Boden der Kulturschale minimal abgebrochen, so dass eine Öffnung von etwa 15 – 20 μm Durchmesser entstand. Mittels lokaler Druckapplikation durch einen Picospritze wurden die Agonisten mit

einem Druck von 0.8 - 1 bar im Gewebe und 0.25 bar in der Kultur und einer Auswurfgeschwindigkeit von $55 \pm 27 \text{ nl s}^{-1}$ auf die Ganglien beziehungsweise Zellcluster appliziert. Bei allen Messungen wurde versucht sowohl den Durchmesser der Mikropipettenöffnung, als auch den Abstand von etwa 200 μm zu den Ganglien beziehungsweise Zellclustern konstant zu halten, um die Vergleichbarkeit der Messdaten sicher zu stellen. Diese Einstellungen stimmen mit denen von Breunig et al. (Breunig et al., 2007) überein, die beschrieben haben, dass bei einem Abstand von 200 μm zwischen Pipette und Ganglion jede Substanz, welche über Druckauswurf mit einer Impulslänge von 400 ms appliziert wird, bis zum Erreichen des Ganglions 1:8 verdünnt wird.

Da bisher im Darm nur in Nervenzellen nikotinerge Rezeptoren nachgewiesen worden sind (Trouslard et al., 1993), wurde Nikotin als Standardstimulus verwendet, um die Nervenzellen in den Zellclustern der Primärkultur identifizieren zu können. Nikotin (Sigma-Aldrich) wurde als 10 mM Stammlösung in Versuchskrebslösung angesetzt und bis zum Gebrauch bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Auf die Ganglien appliziert wurde dieser Agonist von nikotinergeren Acetylcholin-Rezeptoren in einer Konzentration von 100 μM für 200 ms.

Serotonin (Sigma-Aldrich) wurde ebenfalls als 10 mM Stammlösung in Versuchskrebslösung angesetzt und bis zum Gebrauch maximal für eine Woche bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Serotonin wurde in einer Konzentration von 1 mM für 600 ms appliziert. Zur Detektion von etwaigen späten Serotoninsignalen, wurde nach 5 s erneut eine Aufnahme vom Zellcluster gemacht, in diesem Fall jedoch ohne Stimulus. α,β -Methylen ATP wurde als 17.5 mM Stammlösung in Versuchskrebslösung angesetzt. Appliziert wurden Konzentrationen von 300 bis 1200 μM .

ATP (Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 500 μM in Versuchskrebslösung angesetzt und für 600 ms auf die Zellcluster appliziert. Zur Detektion von etwaigen späten ATP-Signalen, wurde nach 3 s und wie im Falle von Serotonin ohne erneuten Stimulus, wiederum eine Aufnahme vom Zellcluster gemacht.

Die verwendeten Antagonisten wurden in 100 ml Versuchskrebslösung auf ihre Gebrauchskonzentration verdünnt und anschließend für 20 min perfundiert. Nach der

Behandlung mit Antagonisten wurde für mindestens eine Stunde ausgewaschen, bevor die Zirkulation der Versuchskrebslösung wieder hergestellt wurde. Die Stammlösungen wurden, falls nicht anders erwähnt, bis zu deren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Hexamethonium (Sigma-Aldrich) wurde mit bidestilliertem Wasser in einer Stammlösung von 100 mM angesetzt und bei 4 °C gelagert. Zum Blockieren der nikotinergeren Acetylcholin-Rezeptoren wurden 200 µM Hexamethonium perfundiert.

TTX (Tocris, Bristol, UK) wurde als Stammlösung in bidestilliertem Wasser in einer Konzentration von 1 mM hergestellt. Zur Inhibition der spannungssensitiven Natriumkanäle wurden 0.5 µM TTX eingesetzt.

Cilansetron (Solvay, Hannover, Deutschland), ein 5-HT₃ Rezeptor Antagonist, wurde als 100 µM Stammlösung angesetzt. Die Konzentration der Gebrauchslösung betrug 0.1 µM.

N-acetyl-hydroxytryptophyl-5-hydroxytryptophanamid (5-HTP-DP; Kali-Chemie, Hannover, Deutschland) ist ein Antagonist von 5-HT_{1P}-Rezeptoren. Die, mit 70%igem Ethanol angesetzte, 10 mM Stammlösung von 5-HTP-DP wurde vor Gebrauch auf 10 µM verdünnt.

Piboserod (SB 207266 A), ein 5-HT₄-Rezeptor Antagonist, und Clozaprid (SB 269970 A; beide von Biocair, Cambridge, United Kingdom), ein 5-HT₇-Rezeptor Antagonist, wurden beide als 10 mM Stammlösung in Versuchskrebslösung angesetzt. Perfundiert wurden 10 µM Piboserod und 1 µM Clozaprid.

Suramin und PPADS (beide von Sigma-Aldrich) blockieren P2-Rezeptoren. Suramin wurde als 0.1 M und PPADS als 10 mM Stammlösung in Wasser angesetzt. Vor Gebrauch wurden die Antagonisten auf 100 beziehungsweise 10 µM verdünnt.

2.4 Neuro-Imaging Methode mit spannungssensitiven Farbstoffen

Die Versuchskammer mitsamt der Präparation beziehungsweise der Kulturschale, wurde auf einem inversen Zeiss Axio Observer.A1 Mikroskop (München,

Deutschland), welches zur Anregung des spannungssensitiven Farbstoffes mit einer Leuchtdiode (Projection true green; Osram, München, Deutschland) mit selbst gebautem Netzteil, und einem 40x Ölimmersionsobjektiv (UApo/340, NA = 1.35; Olympus, Hamburg, Deutschland) ausgestattet war, befestigt. Die gefärbten Präparate beziehungsweise Zellkulturen sollten, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes („*Bleaching*“) und um die Radikalbildung während der Anregung des Farbstoffes (Phototoxizität) zu begrenzen, nur während der eigentlichen Messung belichtet werden. Eine kontrollierte Belichtungszeit wurde deshalb durch einen elektronischen Verschlussmechanismus (Shutter) mit entsprechender Software (Uniblitz D122; Vincent Associates, New York, USA) erreicht. Jedoch haben Schemann et al. (Schemann et al., 2002) gezeigt, dass bei kurzen Aufnahmeperioden von bis zu 3 s bis zu 30 Aufnahmen vom gleichen Ganglion beziehungsweise von der gleichen Nervenzelle, ohne ein Anzeichen von „*Bleaching*“ oder Phototoxizität, möglich sind. Um Störungen durch Vibrationen während der Messung zu verringern, befand sich das Mikroskop auf einem vibrationsgedämpften Tisch (Technical Manufacturing Corporation, Peabody, MA, USA). Der Strahlengang des Lichtes zur Anregung des Farbstoffes beziehungsweise zur Detektion des emittierten Lichtes, setzte sich wie folgt zusammen. Das Licht der Leuchtdiode strahlte durch den während der Messung geöffneten Shutter in einen Fluoreszenz Filterblock (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland), welcher für alle verwendeten Farbstoffe mit einem 545 ± 15 nm Bandpassfilter für das anregende Licht, einem 565 nm dichromatischen Spiegel und einem 580 nm Langpassfilter für das emittierte Licht ausgestattet war. Der Bandpassfilter für das anregende Licht war nur für die Wellenlängen 545 ± 15 nm durchlässig. Nur Licht dieser Wellenlängen traf somit auf den dichromatischen Spiegel. Der dichromatische Spiegel reflektierte das Licht mit einer Wellenlänge kleiner als 565 nm durch das Objektiv auf das mit dem spannungssensitiven Farbstoff gefärbte Präparat beziehungsweise die Zellkultur. Das emittierte Fluoreszenzlicht, welches eine höhere Wellenlänge als das anregende Licht hatte, wurde vom Objektiv gesammelt und erneut auf den dichromatischen Spiegel geleitet. Dieser ließ nur Licht mit einer Wellenlänge höher als 565 nm passieren. Der darauf folgende Langpassfilter ließ nur das Licht mit Wellenlängen

größer als 580 nm durch. Dieses Fluoreszenzlicht wurde anschließend mit einer aus 80 x 80 Pixel bestehenden, gekühlten „*charge-coupled device*“ (CCD) Kamera (Redshirt Imaging, Decatur, GA, USA) erfasst und mit der Neuroplex 9.1.0 Software (Redshirt Imaging) am Computer dargestellt. Dieser Versuchsaufbau erlaubte die Darstellung der Zellaktivität als relative Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F =$ Verhältnis der Veränderung der Fluoreszenzintensität zur Ausgangsfluoreszenzintensität), welche linear zur Veränderung des Membranpotentials war (Neunlist et al., 1999). Optische Signale wurden mit einer Abtastrate von 1 kHz aufgenommen, was die Detektion von Aktionspotentialen zulässt. Mit dem 40x Objektiv betrug die räumliche Auflösung des CCD Systems etwa $24 \mu\text{m}^2$ pro Pixel, was einer Auflösung auf Einzelzellebene entspricht. Des Weiteren konnten mit dem 40x Objektiv relative Änderungen in der Fluoreszenzintensität im Bereich von 0.1 - 3% detektiert werden. Die Dauer der einzelnen Aufnahmen lag entweder bei 1.5 oder 2.5 Sekunden.

2.5 Immunhistochemie

Um die Anzahl der enterischen Nervenzellen in den Geweben beziehungsweise in den Zellkulturen feststellen zu können, wurden jeweils immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Alle nicht anders gekennzeichneten Substanzen wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Sowohl die Gewebe, als auch die Kulturschalen wurden über Nacht bei Raumtemperatur in einer 37%igen Phosphat gepufferten Formalinlösung fixiert. Die fixierten Proben wurden anschließend drei Mal für 10 min mit Phosphat Puffer (21.7 mM, pH 7.4, 121.9 mM Na_2HPO_4 in bidestilliertem Wasser) gewaschen. Dann wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in der so genannten Präinkubationslösung, bestehend aus PBS, Triton X-100 (0.5%), PBS/ NaN_3 Lösung (0.1%) und normalem Pferdeserum (4%), inkubiert. Triton X-100 dient dazu die Zellmembran für die Antikörper permeabel zu machen und das Pferdeserum dient dem Absättigen der nicht spezifischen Bindungen in den Proben. Nach weiteren drei Waschschritten à 10

min in Phosphat Puffer wurden die primären Antikörper, verdünnt in der Präinkubationslösung, auf die Proben gegeben. Folgende primäre Antikörper zur Visualisierung enterischer Nervenzellen wurden verwendet: Schaf anti-P-Glykoprotein 9.5 (PGP 9.5, PH164; The Binding Site, Birmingham, UK) in der Verdünnung 1:5000 und Kaninchen anti-neuronspezifische Enolase (NSE, 16625; Polysciences, Eppenheim, Deutschland) in der Verdünnung 1:2000. Inkubiert wurde im Falle der Gewebe für 40 Stunden und im Falle der Kulturschalen für 12 – 16 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben drei Mal für 10 min mit PBS Puffer (pH 7.0, 21.7 mM NaH₂PO₄, 121.9 mM Na₂HPO₄, 150.6 mM NaCl gelöst in bidestilliertem Wasser) gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Proben den Spezies spezifischen sekundären Antikörpern ausgesetzt, welche ebenfalls vorher in der Präinkubationslösung verdünnt wurden. Folgende sekundären Antikörper wurden verwendet: Carbocyanin (Cy2) markierter Affe anti-Kaninchen Antikörper (711225152) und Indodicarbocyanin (Cy5) markierter Affe anti-Schaf Antikörper (713175147; beide von Dianova, Hamburg, Deutschland). Die Inkubation bei Raumtemperatur währte 3.5 Stunden für die Gewebe und 1.5 – 2 Stunden für die Zellkulturen. Zuletzt folgten weitere drei Waschschriffe in PBS Puffer à 10 min. Eingebettet wurde mit dem Einbettmedium Citifluor AF 1 (Citifluor, London, UK) beziehungsweise im Falle vom Cy2 markiertem sekundären Antiserum mit NaN₃ (0.1%) und Glycerol (80%) verdünnt in PBS Puffer. Bis zur Auswertung wurden die Proben bei 4 °C gelagert. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen geschah an einem Fluoreszenz Mikroskop (BX61WI; Olympus, Tokio, Japan), welches mit entsprechenden Fluoreszenzfilterblöcken (Olympus) ausgestattet war. Für Cy2 markierte immunhistochemische Proben wurde ein Cy2/DTAF Typ U-MNIBA (Fluoreszenz im grünen Bereich) Filterblock mit einem Bandpass Anregungsfilter von 470 – 490 nm, einem dichromatischen Spiegel mit 505 nm und einem Emissionsfilter von 520 ± 20 nm verwendet. Für Cy5 markierte immunhistochemische Proben wurde ein Cy5 Typ U-M41008 (Fluoreszenz im infraroten Bereich) Filterblock mit einem Anregungsfilter von 620 ± 60 nm, einem dichromatischen Spiegel mit 660 nm und einem Emissionsfilter von 700 ± 75 nm verwendet. Das Mikroskop war mit einer

Kamera (F-View) und einer Software (analySIS; beide von Soft Imaging System, Münster, Deutschland) zur Erfassung, Bearbeitung und Auswertung der immunhistochemischen Daten ausgerüstet.

2.6 Statistische Auswertung

Das Identifizieren einzelner Nervenzellen war möglich, sobald sich der spannungssensitive Farbstoff in die Zellmembran eingebaut hatte und somit die Umrisse der einzelnen Zellkörper sichtbar machte. Durch Überlagerung der Signale der CCD Kamera mit dem Bild des Ganglions beziehungsweise des Zellclusters konnten die Antworten einzelner Nervenzellen im Gesichtsfeld identifiziert und analysiert werden (Michel et al., 2005). Untersucht wurde sowohl die Anzahl der Zellen pro Ganglion beziehungsweise Zellcluster insgesamt, als auch die Anzahl der antwortenden Zellen pro Ganglion beziehungsweise Zellcluster. Auch wurden die Amplituden der Summenaktionspotentiale und der schnellen EPSPs ermittelt.

Für die Erfassung, Darstellung und Auswertung der optischen Daten wurden die Programme Neuroplex 9.1.0 (RedShirt Imaging), Igor Pro 6.04 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA), Microsoft Excel und Power Point 2002 (Microsoft, Redmont, WA, USA) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SigmaStat 3.1 und SigmaPlot 9.0 (beide von Systat Software, Erkrath, Deutschland). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung oder, falls die Daten nicht normal verteilt waren, als Median, zusammen mit der 25% und 75% Quartile, dargestellt. Zur Überprüfung der Unterschiede in den Amplituden der Summenaktionspotentiale und der schnellen EPSPs, sowie in der Aktionspotentialfrequenz nach Applikation des Antagonisten, wurde ein gepaarter Students t-Test oder, insofern die Daten nicht normal verteilt waren, ein Rank sum Test angewendet. Für alle Untersuchungen gilt, dass ein Unterschied zwischen zwei Datensätzen als signifikant gilt, wenn der P-Wert < 0.05 ist.

3 Ergebnisse

3.1 Visualisierung des humanen myenterischen Plexus

Im Gegensatz zum myenterischen Plexus des Meerschweinchens sind myenterische Ganglien im menschlichen Gewebe nicht im Durchlicht des Lichtmikroskops erkennbar. Dies ist jedoch für das Beladen der Ganglien mit spannungssensitivem Farbstoff mittels intraganglionärer Druckapplikation entscheidend. In anfänglichen Experimenten wurde deshalb versucht die humanen Ganglien durch länger währende Inkubation mit dem spannungssensitiven Farbstoff Di-8-ANEPPQ (3 – 10 Stunden; 9 Gewebe) beziehungsweise Di-8-ANEPPS (1 – 12 Stunden; 5 Gewebe) zu beladen. Dies führte, höchstwahrscheinlich aufgrund der limitierten Eindringtiefe des Farbstoffes und der begrenzten Zugänglichkeit der Nervenzellen, zu keiner spezifischen Färbung der myenterischen Ganglien, sondern nur zu einer starken Hintergrundfluoreszenz der verbliebenen Muskulatur. Auch die enzymatische Verdauung des Präparates, welche das Gewebe zugänglicher für die nachfolgende Farbstoffbehandlung machen sollte, führte zu keiner Verbesserung des Färbeergebnisses (7 Gewebe). Im Gegenteil, das Gewebe verlor stark an Spannkraft und Versuche dieses erneut auf dem Silikonring zu fixieren, endeten meist mit dem vollständigen Zerreißen des Präparates. Deshalb musste zunächst ein Farbstoff gefunden werden, welcher humane Ganglien ohne Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der myenterischen Nervenzellen anfärbt.

Die Vitalfarbstoffe Methylenblau und 4-Di-2-ASP haben gemeinsam, dass sie das ganglionäre Netzwerk sichtbar machen können. Daher wurden im myenterischen Plexus des Meerschweinchens die Auswirkungen dieser Farbstoffe auf die Elektrophysiologie der Di-8-ANEPPS gefärbten Ganglien untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 1 dargestellt. Da Methylenblau (n = 3 Gewebe und 60 Nervenzellen) die Amplituden der Summenaktionspotentiale und schnellen EPSPs signifikant verringerte ($p < 0.001$), ist dieser Farbstoff zur Vorfärbung des humanen myenterischen Plexus nicht geeignet. Im Gegensatz dazu veränderte

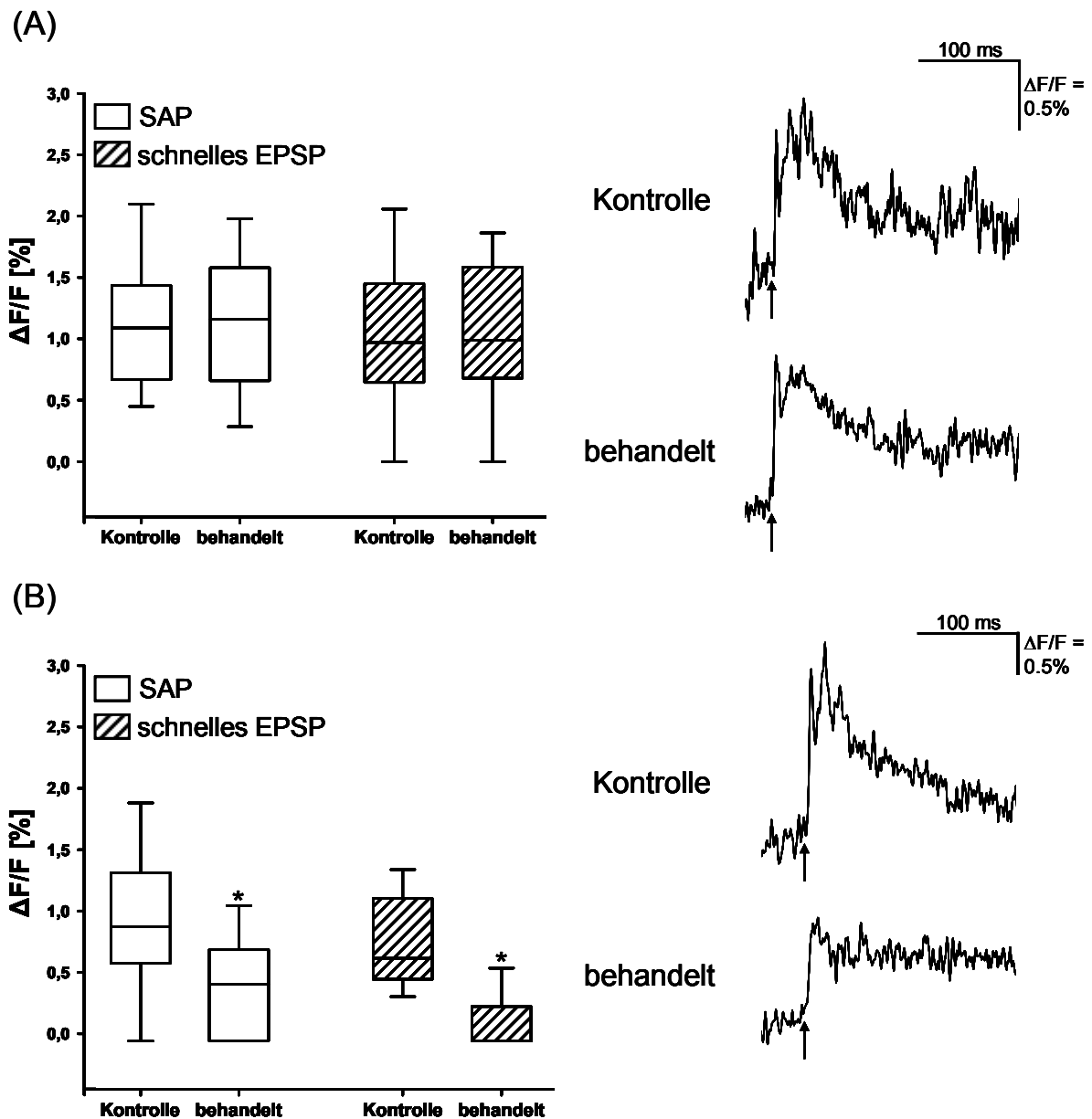


Abb. 1 4-Di-2-ASP ist ein geeigneter Farbstoff für die Visualisierung des humanen myenterischen Plexus. (A) Die statistische Auswertung legt dar, dass die Vorfärbung mit 4-Di-2-ASP weder die Amplituden der Summenaktionspotentiale, noch die der schnellen EPSPs veränderte. Die repräsentativen Traces zeigen, dass die elektrische Stimulation sowohl vor, als auch nach der Färbung des Gewebes mit 4-Di-2-ASP ein Aktionspotential gefolgt von einem schnellen EPSP hervorrief. (B) Nach der Vorfärbung mit Methylenblau waren die Amplituden der durch die elektrische Stimulation verursachten Summenaktionspotentiale und schnellen EPSPs signifikant reduziert. Die entsprechenden, durch elektrische Stimulation hervorgerufenen repräsentativen Traces zeigen nach der Inkubation mit Methylenblau im Vergleich zu vorher eine signifikante Reduktion der Summenaktionspotential und schnellen EPSP Amplituden. Summenaktionspotential (SAP). * $p < 0.001$. Pfeile: elektrische Stimulation eines interganglionären Nervenfasernetzes mit

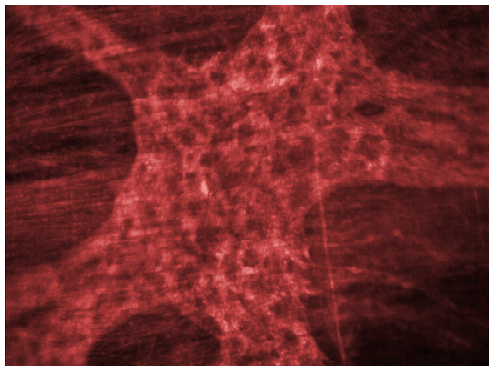
einer Spannung von 2 V für die Dauer von 400 μ s. Die Traces wurden jeweils mit einem Butterworth Lowpass Filter bei 200 Hz gefiltert.

4-Di-2-ASP (n = 4 Gewebe und 81 Nervenzellen) die Amplituden der Signale nicht ($p = 0.870$ für Summenaktionspotentiale und $p = 0.622$ für schnelle EPSPs). Daraus wurde geschlossen, dass 4-Di-2-ASP ein geeigneter Farbstoff für die Visualisierung der humanen myenterischen Ganglien ist.

Um die Ganglien des humanen myenterischen Plexus sichtbar zu machen, wurde die Perfusion gestoppt, die verbliebene Lösung aus der Versuchskammer entfernt und anschließend für 10 min mit 500 μ l 4-Di-2-ASP (2.5 μ M) angefärbt. Nachdem der überschüssige Farbstoff durch 15 minütiges Auswaschen entfernt worden war, wurde die Perfusion der Krebslösung wieder aufgenommen. Die nun unter Fluoreszenzlicht sichtbaren Ganglien konnten dann unter visueller Kontrolle durch intraganglionäre Injektion mit spannungssensitivem Farbstoff beladen werden.

Ein repräsentatives humanes myenterisches Ganglion vorgefärbt mit 4-Di-2-ASP ist in Abbildung 2A gezeigt. Die Struktur des Ganglions ist deutlich auszumachen, weshalb auch die Färbung dieses Ganglions mit dem spannungssensitiven Farbstoff Di-8-ANEPPS (Abb. 2B) unter visueller Kontrolle möglich war. Aufgrund der fortwährenden Perfusion des Gewebes mit Krebslösung, wurde der Vitalfarbstoff 4-Di-2-ASP, abhängig von der Dicke des Gewebes und der Menge an verbliebener Muskulatur, innerhalb einer Stunde wieder ausgewaschen (Magrassi et al., 1987).

(A)



(B)

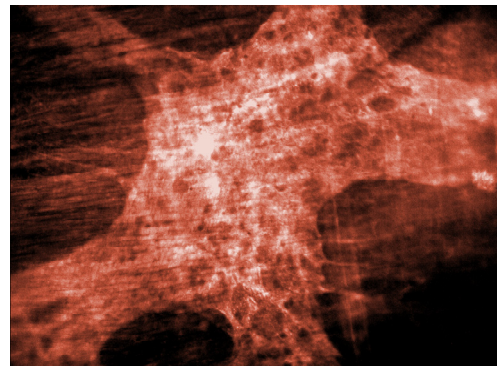


Abb. 2 Humanes myenterisches Ganglion nach Vorfärbung mit 4-Di-2-ASP und nach anschließender Mikroinjektion von Di-8-ANEPPS. (A) 4-Di-2-ASP. (B) Di-8-ANEPPS.

3.2 Geeigneter spannungssensitiver Farbstoff für die Aufzeichnung von humanen myenterischen Nervenzellen

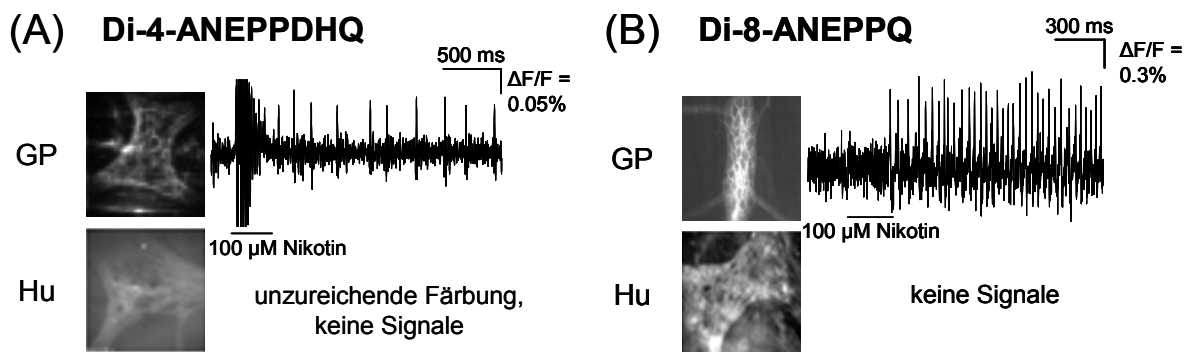


Abb. 3 Erfassung der Aktivität humaner myenterischer Nervenzellen aufgrund unzureichender Färbung durch Di-4-ANEPPDHQ beziehungsweise Di-8-ANEPPQ nicht möglich. (A) Eine zur Detektion von Signalen nach Nikotinapplikation ausreichende Di-4-ANEPPDHQ Färbung wurde nur im Meerschweinchen erreicht. (B) Nur in Di-8-ANEPPQ gefärbten Nervenzellen des Meerschweinchens konnten nach der Stimulation mit Nikotin Aktionspotentiale gemessen werden. „Guinea pig“ (GP), englisch für Meerschweinchen. (Hu) Human. Der Di-4-ANEPPDHQ Trace wurde mit einem Butterworth Lowpass Filter bei 70 Hz und einem Highpass Filter bei 45 Hz gefiltert, während der Di-8-ANEPPQ Trace bei 199 Hz beziehungsweise bei 6 Hz gefiltert wurde.

In Meerschweinchen- und Humanpräparaten wurden verschiedene spannungssensitive Farbstoffe getestet, um zu ermitteln, mit welchem Farbstoff Ableitungen von myenterischen Nervenzellen erreicht werden können. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst.

Im Falle von Di-4-ANEPPDHQ war eine Pluronic F-127 Konzentration von 0.0135% im Farbstoff nötig, um ein annehmbares Färbeergebnis im myenterischen Plexus des Meerschweinchens zu erreichen. Dennoch konnten nach der intraganglionären Druckapplikation von Di-4-ANEPPDHQ von den myenterischen Nervenzellen des Meerschweinchens keine Signale aufgezeichnet werden (9 Meerschweinchengewebe). Antworten auf einen Stimulus konnten mit Di-4-

ANEPPDHQ im Meerschweinchen nur verzeichnet werden, nachdem das Gewebe entweder mit dem Farbstoff inkubiert (9 Meerschweinchengewebe), oder Di-4-ANEPPDHQ lokal auf individuelle Ganglien appliziert worden war (2 Meerschweinchengewebe; Abb. 3A: Beispiel für Signale nach Inkubation mit Di-4-ANEPPDHQ). Im humanen myenterischen Plexus führte keine der drei verwendeten Methoden zu einer ausreichenden Färbung, so dass das Aufzeichnen von Signalen mit diesem Farbstoff im Menschen erfolglos blieb (intraganglionäre Druckapplikation: 3, Inkubation: 6 und lokale Applikation: 3 Humangewebe).

Des Weiteren wurde der spannungssensitive Farbstoff Di-8-ANEPPQ im Meerschweinchen und im humanen myenterischen Plexus getestet. Mit diesem Farbstoff konnten routinemäßig die Signale von myenterischen Nervenzellen des Meerschweinchens aufgezeichnet werden (Abb. 3B). Jedoch konnten keine Antworten von humanen myenterischen Nervenzellen aufgenommen werden (17 Meerschweinchengewebe; 5 Humangewebe).

Um die neuronale Aktivität von enterischen Nervenzellen im Meerschweinchen und im submukösen Plexus des Menschen analysieren zu können, verwendet unser Labor seit Jahren erfolgreich Di-8-ANEPPS als spannungssensitiven Farbstoff (Neunlist et al., 1999; Schemann et al., 2002; Schemann et al., 2005; Michel et al., 2005; Breunig et al., 2007; Buhner et al., 2009; Mazzuoli und Schemann, 2009). Somit ist nahe liegend, dass auch Di-8-ANEPPS auf dessen Verwendbarkeit in humanem myenterischen Gewebe geprüft wurde. Die Verwendung von Di-8-ANEPPS nach dem im myenterischen Plexus des Meerschweinchens üblichen Protokoll führte jedoch in humanen myenterischen Präparationen zu keinen Signalen (6 Humangewebe). Deshalb wurde die Di-8-ANEPPS Konzentration von 20 auf 30 μM erhöht. Dies ermöglichte die Anfärbung individueller humaner myenterischer Ganglien mit einem Signal-Rausch Verhältnis, was das Aufzeichnen von Signalen von humanen myenterischen Nervenzellen gestattete. Dies zeigt auch Abbildung 4, in der die elektrisch induzierten Signale im humanen myenterischen Plexus dargestellt sind, deren Aufzeichnung bisher nur mit Di-8-ANEPPS möglich war. Somit ist Di-8-ANEPPS von den getesteten spannungssensitiven Farbstoffen derjenige,

welcher für Aufnahmen von humanen myenterischen Nervenzellen am ehesten geeignet ist.

3.3 Nachweis des neuronalen Ursprungs der elektrisch induzierten Signale

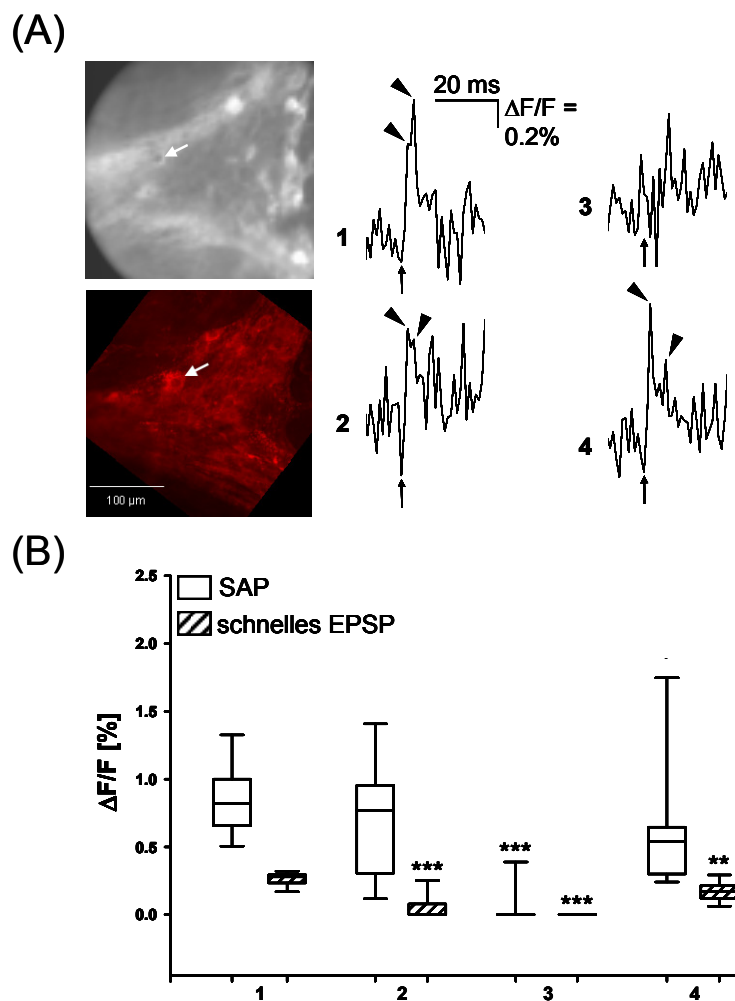


Abb. 4 Nachweis des neuronalen Ursprungs der elektrisch induzierten Signale. (A) Di-8-ANEPPS (oberes Bild) beziehungsweise PGP 9.5 (unteres Bild) gefärbtes humanes myenterisches Ganglion. Die weißen Pfeile markieren die Nervenzelle, von welcher die repräsentativen, gemittelten und vergrößerten Traces zur rechten stammen. Die schwarzen Pfeile unterhalb der Traces markieren den Zeitpunkt der elektrischen Stimulation des interganglionären Nervenfasernetzes mit einer Spannung von 1.5 V für die Dauer von 600 μ s. Die Pfeilköpfe markieren den ersten und zweiten Peak. Die Traces wurden jeweils mit einem Butterworth Highpass Filter bei 10 Hz gefiltert. (B) Statistische Auswertung der

Signale für $n = 2$ Gewebe, 2 Ganglien und 13 Nervenzellen. (1) Kontrolle. (2) 20 minütige Perfusion von $200 \mu\text{M}$ Hexamethonium. (3) 20 minütige Perfusion von $0.5 \mu\text{M}$ TTX. (4) 45 minütige Auswaschphase. ** $p = 0.004$. *** $p < 0.001$.

Wurde ein humanes myenterisches Ganglion durch intraganglionäre Mikroinjektion von $30 \mu\text{M}$ Di-8-ANEPPS angefärbt und wurde anschließend ein interganglionärer Nervenfaserverstrang dieses Ganglions elektrisch stimuliert, so konnten Signale von humanen myenterischen Nervenzellen erfasst werden (12 Gewebe). Allerdings erinnern diese Signale eher an Aktionspotentiale, als an unterschwellige schnelle EPSPs. Sowohl immunhistochemisch, als auch pharmakologisch konnte nachgewiesen werden, dass die elektrisch induzierten Signale im humanen myenterischen Plexus neuronalen Ursprungs waren (Abb. 4). Die immunhistochemische Detektion von PGP 9.5, einem Marker für neuronale Zellkörper, zeigt, dass die detektierten Signale womöglich in der Tat von myenterischen Nervensomata stammten (Abb. 4A; 2 Gewebe). In Abbildung 4A ist außerdem zu erkennen, dass die Nervenzellen in humanen myenterischen Ganglien, im Gegensatz zu deren gleichmäßigen Verteilung in den Ganglien des Meerschweinchens (vergleiche mit GP Bildern in Abb. 3), in Clustern organisiert sind. Diese Cluster befanden sich meist in den Randbereichen der Ganglien an den Übergängen zu interganglionären Nervenfaservertrakten. Außerdem können im PGP 9.5 gefärbten humanen Ganglion die einzelnen Nervenzellen „spiegeleicher charakteristisch“ ausgemacht werden, während die Lokalisation der Nervenzellen im Di-8-ANEPPS gefärbten Ganglion nicht bestimmt werden kann (Abb. 4A). In 12 von 37 Humangeweben führte die elektrische Stimulation der interganglionären Nervenfaserverstränge des humanen myenterischen Plexus zur Aufzeichnung von Signalen. Jedoch in nur zwei Geweben wurden zwei aufeinander folgende Peaks identifiziert, wie sie in Abbildung 4A dargestellt sind. Abbildung 4 zeigt des Weiteren, dass die 20 minütige Perfusion von $0.5 \mu\text{M}$ TTX, welches die neuronale Weiterleitung blockiert, die Antworten der Nervenzellen vollends aufhob ($n = 2$ Gewebe, 2 Ganglien und 13 Nervenzellen). Beide Peaks kehrten nach einer 45 minütigen Auswaschphase zurück. Somit zeigt auch die pharmakologische Untersuchung, dass die Signale neuronal vermittelt waren. Da die Amplitude des ersten Peaks je nach angelegter Spannung variierte, stellt dieser Peak womöglich ein Summenaktionspotential dar,

welches durch axonale Spikes verursacht wurde (Schemann et al., 2002). So hatte beispielsweise der erste Peak aus Abbildung 4A bei einer angelegten Spannung von 1 V eine circa 45%ige geringe Amplitude als bei den dargestellten 1.5 V. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem zweiten Peak um ein Aktionspotential handelte, welches durch ein schnelles EPSP ausgelöst worden war, wurde das Gewebe für 20 min mit 200 μ M Hexamethonium, einem nikotineren Acetylcholin-Rezeptor Antagonisten, perfundiert. Während das Summenaktionspotential in seiner Amplitude unverändert blieb, reduzierte Hexamethonium die Amplitude des zweiten Peaks (Abb. 4). Im Meerschweinchen allerdings führte die Stimulation interganglionärer Nervenstränge in myenterischen Nervenzellen immer initial zur Entladung von Aktionspotentialen, gefolgt von einem unterschwelligen schnellen EPSP (vergleiche Kontrolltraces Abb. 1). Im humanen myenterischen Plexus konnten bisher jedoch weder solch eindeutige postsynaptischen Potentiale wie im Meerschweinchen, noch eine Reaktion auf die Applikation von Nikotin detektiert werden (37 Humangewebe). Aufgrund der niedrigen Erfolgsrate, mit der elektrisch induzierte Signale im intakten humanen Gewebe detektiert wurden, und auch um die Zugänglichkeit der humanen myenterischen Ganglien sowohl für spannungssensitive Farbstoffe, als auch für Nikotin zu verbessern, wurde eine Primärkultur humaner myenterischer Nervenzellen etabliert.

3.4 Signale von humanen myenterischen Nervenzellen in Primärkultur

In 42 Kulturansätzen wurden 227 Kulturschalen mit Ganglien bestückt. Insgesamt wurden 597 erfolgreich festgesetzte und angewachsene Zellcluster gezählt. Das bedeutet, dass pro Kulturansatz im Schnitt 14.2 und pro Kulturschale im Schnitt 2.6 Zellcluster gewachsen waren.

Die Messungen fanden an insgesamt 31 unterschiedlichen Kulturtagen statt. An 26 dieser 31 Kulturtage konnten zumindest Nikotin induzierte Aktionspotentiale detektiert werden. Die jüngste Zellkultur wurde an Kulturtag 6 und die älteste

Zellkultur an Kulturtag 50 gemessen. Die jüngste Kultur in der Signale detektiert wurden, war 10 Tage alt (2 Zellkulturen) und die älteste Kultur mit Signalen war 50 Tage alt (1 Zellkultur). Dabei konnten sowohl am Tag 10, als auch am Tag 50 ausgeprägte Signale mit einer Amplitude von circa 2% $\Delta F/F$ verzeichnet werden. Das Signal-Rausch Verhältnis der myenterischen Nervenzellen in der humanen Zellkultur lag mit 5.57 ± 2.92 höher, als das Signal-Rausch Verhältnis myenterischer Nervenzellen im intakten Gewebe des Meerschweinchens (2.66 ± 1.18).

3.4.1 Nachweis des neuronalen Ursprungs

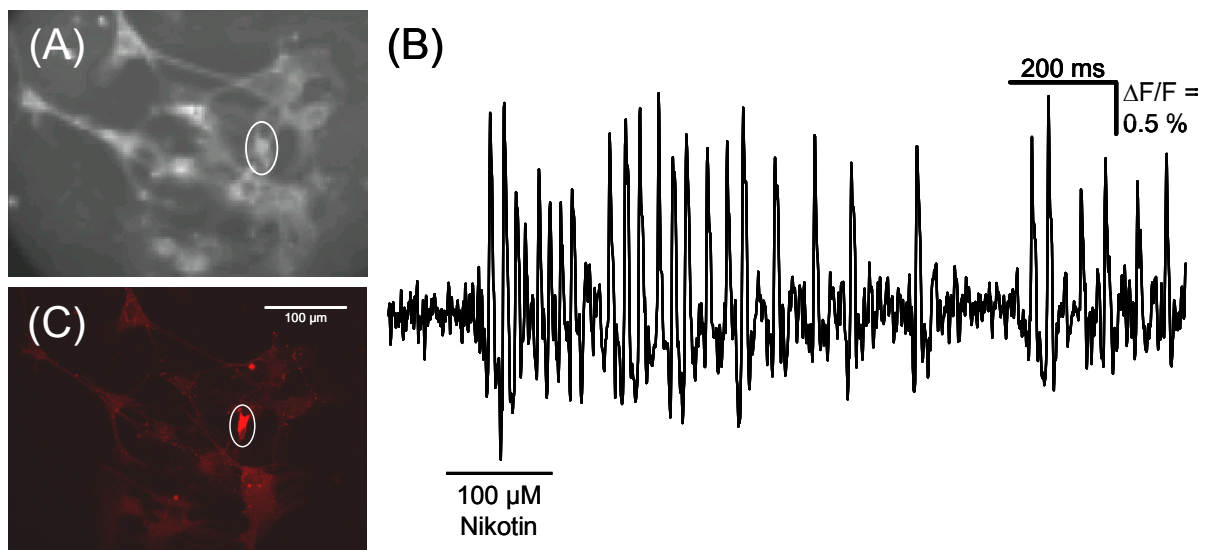


Abb. 5 Aktivität in kultivierten humanen myenterischen Nervenzellen nach Applikation von Nikotin. (A) Primärkultur humaner myenterischer Nervenzellen nach der Färbung mit Di-8-ANEPPS. (B) Gemittelter und vergrößerter repräsentativer Trace des umrissenen Bereiches in (A) nach der 200 ms währenden Applikation von Nikotin. Der Trace wurde mit einem Butterworth Lowpass Filter bei 200 Hz und einem Butterworth Highpass Filter bei 20 Hz gefiltert. (C) Immunhistochemische Färbung der Kultur mit dem neuronalen Marker PGP 9.5. Der umrissene Bereich entspricht dem in (A).

In Abbildung 5 ist eine 14 Tage alte Primärkultur von humanen myenterischen Nervenzellen gezeigt. Die Färbung der kultivierten myenterischen Nervenzellen durch eine 10 minütige Inkubation mit 10 μM des spannungssensitiven Farbstoffes Di-8-ANEPPS (Abb. 5A) reichte aus, um anschließend nach einer 200 ms währenden lokalen Druckapplikation von 100 μM Nikotin eine Salve von Aktionspotentialen

registrieren zu können (Abb. 5B). Die immunhistochemische Färbung der Kultur mit dem neuronalen Marker PGP 9.5 (Abb. 5C) lässt PGP 9.5-Immunreaktivität im selben Bereich erkennen, von welchem auch der Trace in Abbildung 5B stammte, wodurch der neuronale Ursprung der Signale bestätigt wurde.

44 Nervenzellen aus 12 Zellkulturen, welche auf die Applikation von Agonisten nicht mit einer Entladung von Aktionspotentialen antworteten, wurden auf die Existenz unterschwelliger Depolarisationen untersucht. Allerdings wurden die unterschwelligen Depolarisationen, falls vorhanden, durch die bei der lokalen Applikation der Substanzen entstandenen Spitz- und Bewegungsartefakte überdeckt.

3.4.2 Identifizierung von nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren

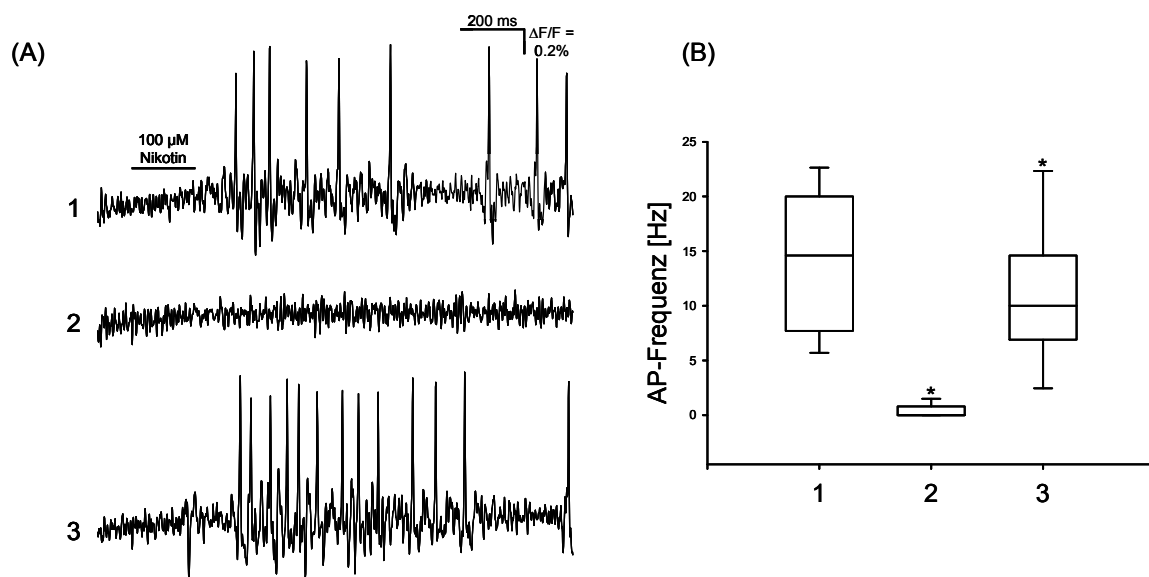


Abb. 6 Nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren vermitteln nikotinerger Antwort. (1) Die 200 ms währende Applikation von 100 μM Nikotin führte zur Entstehung einer Salve von ausgeprägten Aktionspotentialen. (2) Die nikotinerger Signale wurden durch die 20 minütige Perfusion von 200 μM Hexamethonium blockiert. (3) Dieser Effekt war reversibel. (A) Repräsentative Traces. (B) Statistische Auswertung der Aktionspotentialfrequenz für $n = 6$ Zellkulturen und 11 Nervenzellen. Aktionspotential (AP). * $p < 0.001$. Die Traces wurden jeweils mit einem Butterworth Lowpass Filter bei 130 Hz und einem Butterworth Highpass Filter bei 19 Hz gefiltert.

Zur Identifizierung des Rezeptors, welcher die nikotinerger Antwort vermittelte, wurde der nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor Antagonist Hexamethonium perfundiert. In

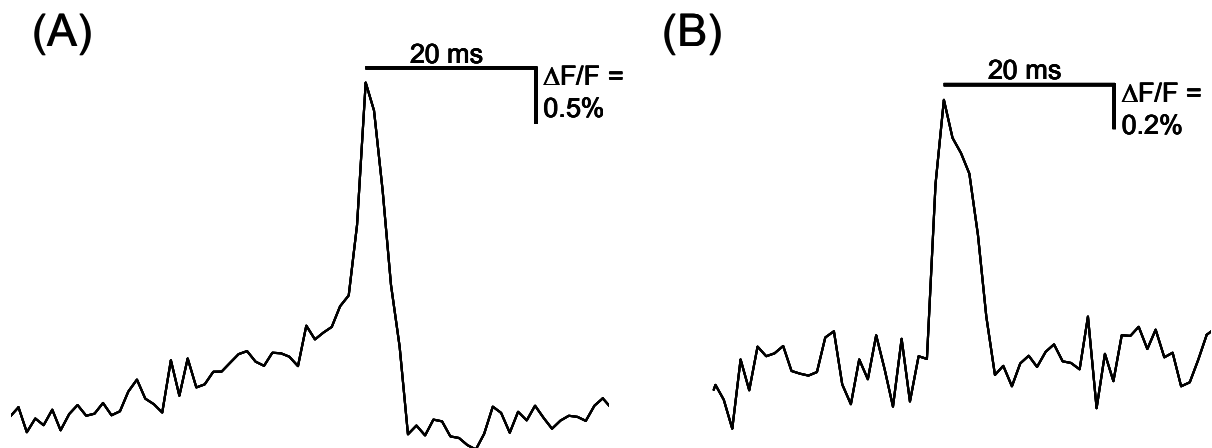


Abb. 7 Charakteristische Aktionspotentiale einer möglichen S- und AH-Nervenzelle. Das Aktionspotential der S-Nervenzelle (A) wies im Gegensatz zum Aktionspotential der AH-Nervenzelle (B) keine prominente Schulter auf.

Abbildung 6A sind die Signale einer 16 Tage alten Kultur gezeigt. Die Nikotin induzierte Salve von Aktionspotentialen wurde reversibel durch die 20 minütige Perfusion von 200 μM Hexamethonium geblockt. Wie in der statistischen Analyse veranschaulicht, wurde durch Hexamethonium die Aktionspotentialfrequenz hoch signifikant reduziert und kehrte nach dem vollständigen Auswaschen der Substanz auch wieder hoch signifikant zurück (Abb. 6B; $n = 6$ Zellkulturen und 11 Nervenzellen). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Primärkulturen humaner myenterischer Nervenzellen funktionelle nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren exprimierten.

Von 249 immunhistochemisch verifizierten Nervenzellen antworteten 98 auf die Applikation von Nikotin mit der Entstehung von Aktionspotentialen. Das sind circa 39%. In keiner dieser 249 Nervenzellen wurden spontane Aktionspotentiale registriert. Die Dauer der nikotinerger Antworten lag bei 1059.40 ± 144.75 ms und die Aktionspotentialfrequenz bei 14.27 ± 6.23 Hz ($n = 6$ Zellkulturen und 11 Nervenzellen).

In 40 der 98 antwortenden Nervenzellen wiesen die Aktionspotentiale eine für AH-Nervenzellen charakteristische prominente Schulter auf (Abb. 7B). Dies entspricht einem Prozentsatz von circa 41%. Die übrigen 58 Nervenzellen beziehungsweise 59% zeichneten sich durch Aktionspotentiale aus, welche ohne diese prominente

Schulter repolarisierten, wie dies für S-Nervenzellen typisch ist (Abb.7A). Die Dauer der Aktionspotentiale bei 50% der Amplitude war in den AH-Nervenzellen mit 6.79 ± 2.31 ms länger als in S-Nervenzellen mit 4.02 ± 2.15 ms. Die schnelle Nachhyperpolarisation währte in AH-Nervenzellen 6.31 ± 4.23 ms und in S-Nervenzellen 7.35 ± 8.44 ms. Eine über mehrere hundert Millisekunden andauernde langsame Nachhyperpolarisation wurde nicht beobachtet.

3.4.3 Identifizierung von Serotonin-Rezeptoren

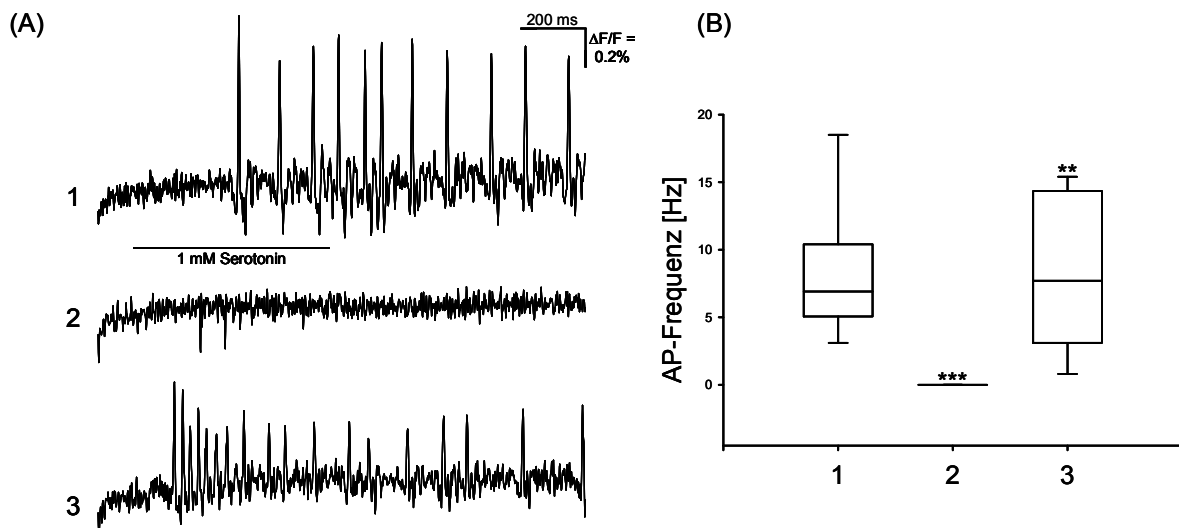


Abb. 8 Expression von funktionellen 5-HT₃ Rezeptoren in Zellkultur. (1) Die 600 ms währende Applikation von 1 mM Serotonin führte zur Entstehung einer Salve von ausgeprägten Aktionspotentialen. (2) Die Serotonin-Signale wurden durch die 20 minütige Perfusion von 0.1 μM Cilansetron blockiert. (3) Dieser Effekt war reversibel. (A) Repräsentative Traces. (B) Statistische Auswertung der Aktionspotentialfrequenz für n = 6 Zellkulturen und 9 Nervenzellen. *** p < 0.001. ** p = 0.002. Die Traces wurden jeweils mit einem Butterworth Lowpass Filter bei 180 Hz und einem Butterworth Highpass Filter bei 18 Hz gefiltert.

Um auch die Existenz von Serotonin-Rezeptoren in der humanen Primärkultur des myenterischen Plexus zu überprüfen, wurde des Weiteren Serotonin auf die Zellcluster appliziert. In Abbildung 8A ist die Reaktion einer 15 Tage kultivierten myenterischen Nervenzelle auf die 600 ms währende lokale Druckapplikation von 1 mM Serotonin dargestellt. Die repräsentativen Traces zeigen, dass Serotonin in der

Nervenzelle eine Salve von Aktionspotentialen auslöste (11 Zellkulturen). Von insgesamt 139 immunhistochemisch verifizierten Nervenzellen reagierten 25 auf die Applikation von Serotonin. Das sind etwa 18%. Die Dauer der serotinerger Antworten lag bei 1095.51 ± 532.76 ms und die Aktionspotentialfrequenz bei 9.26 ± 4.19 Hz ($n = 6$ Zellkulturen und 9 Nervenzellen). Die 20 minütige Perfusion der Kultur mit $0.1 \mu\text{M}$ Cilansetron, einem selektiven Blocker von 5-HT_3 Rezeptoren, hob die Wirkung von Serotonin völlig auf. Dieser Effekt war reversibel, so dass nach dem vollständigen Auswaschen von Cilansetron die Aktionspotentiale als Antwort auf die Serotonin-Applikation zurückkehrten ($n = 6$ Zellkulturen und 9 Nervenzellen). Wie in der statistischen Analyse veranschaulicht, wurde als Folge von Cilansetron die Entstehung von Aktionspotentialen vollständig verhindert. Nach dem vollständigen Auswaschen von Cilansetron kehrte die Aktionspotentialfrequenz jedoch auch wieder hoch signifikant zurück (Abb. 8B). Somit ist gezeigt, dass humane myenterische Nervenzellen in Primärkultur auch funktionelle 5-HT_3 Rezeptoren exprimierten.

Der Fokus dieser Arbeit lag zwar auf den frühen Serotoninsignalen, jedoch wurden in 18 von 24 untersuchten Nervenzellen auch späte Signale auf Serotonin registriert. Das entspricht 75%. Erste pharmakologische Experimente bezüglich dieser Signale haben jedoch gezeigt, dass die 20 minütige Perfusion von Cilansetron auch die späten Signale reversibel blockierte ($n = 2$ Zellkultur und 4 Nervenzellen). Die kumulative Perfusion der 5-HT_{1P} -, 5-HT_4 - und 5-HT_7 -Rezeptor Antagonisten 5-HTP-DP, Piboserod und Clozaprid verringerte hingegen die Aktionspotentialfrequenz bei den späten Serotoninantworten nicht ($n = 2$ Zellkulturen und 7 Nervenzellen). Um jedoch eine definitive Aussage bezüglich der späten Serotoninsignale treffen zu können, sollten diese in weiteren Experimenten pharmakologisch näher untersucht werden.

25 von 57 untersuchten Nervenzellen reagierten sowohl auf die Applikation von Nikotin, als auch auf die Applikation von Serotonin. Dies entspricht circa 44%.

3.4.4 Identifizierung von purinergen Rezeptoren

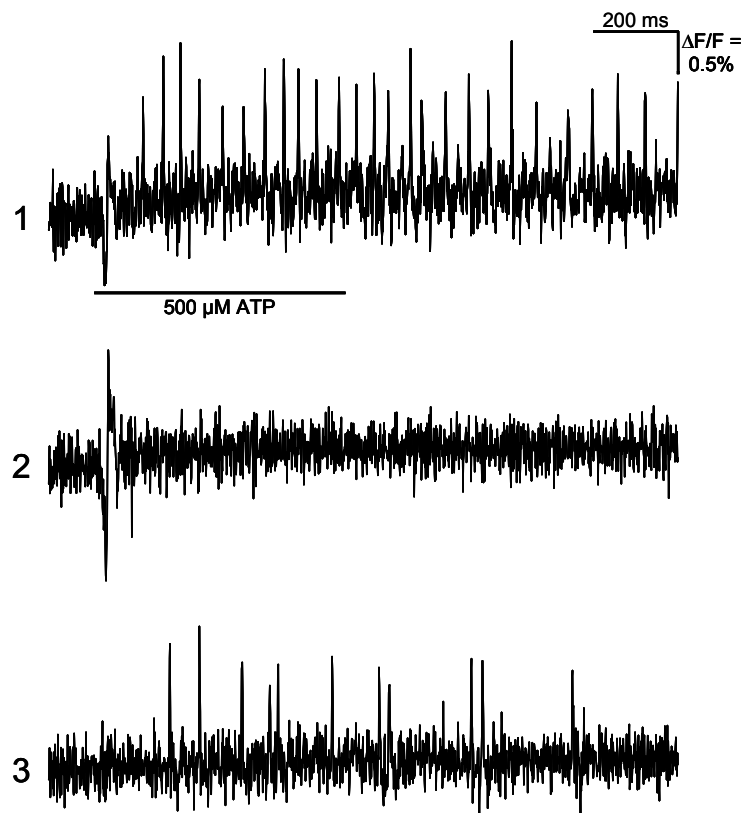


Abb. 9 Aktivität in kultivierten humanen myenterischen Nervenzellen nach Applikation von ATP. (1) Die 600 ms währende Applikation von 500 μM ATP führte zur Entstehung einer Salve von Aktionspotentialen. (2) Die purinergen Signale wurden durch die 20 minütige Perfusion von 10 μM PPADS blockiert. (3) Dieser Effekt war reversibel. Die Traces wurden jeweils mit einem Butterworth Highpass Filter bei 20 Hz gefiltert.

Erste Versuche haben gezeigt, dass myenterische Nervenzellen in Primärkultur auch funktionelle purinerge Rezeptoren exprimierten (5 Zellkulturen). Von 30 untersuchten Nervenzellen reagierten 23 auf die Applikation von ATP mit der Entstehung von Aktionspotentialen. Das sind circa 77%.

12 Nervenzellen reagierten sowohl auf ATP, als auch auf Nikotin. Das sind 40%. 15 Nervenzellen wurden sowohl der Applikation von Nikotin, als auch von Serotonin und ATP ausgesetzt. 4 dieser 15 Nervenzellen reagierten auf alle 3 Substanzen. Das sind circa 27%.

Während Suramin die ATP induzierten Signale nicht zu blockieren vermochte (2 Zellkulturen), hat PPADS indes die ATP-Signale vollständig und reversibel blockiert

(Abb. 9; $n = 2$ Zellkulturen und 3 Nervenzellen). Die Dauer der purinergen Antworten lag bei 1052.76 ± 295.06 ms und die Aktionspotentialfrequenz bei 15.23 ± 6.87 Hz ($n = 2$ Zellkulturen und 3 Nervenzellen). Abbildung 9 zeigt, wie eine 600 ms währende Applikation von 500 μ M ATP in einer Nervenzelle einer 22 Tage alten Zellkultur eine Entladung von Aktionspotentialen bewirkte, welche durch die 20 minütige Perfusion von 10 μ M PPADS, einem P2X-Rezeptor Antagonisten, reversibel blockiert wurde. In 14 der 30 Nervenzellen konnten auch späte Antworten von ATP detektiert werden, was einem Prozentsatz von circa 47% entspricht. Jedoch liegen bezüglich der Sensitivität der späten Antworten gegenüber PPADS bislang noch keine Daten vor. Die Applikation von α,β -Methylen ATP in den Konzentrationen 300, 600, 900 und 1200 μ M (3 Zellkulturen), führte zu keiner Entstehung von Aktionspotentialen.

3.4.5 Elektrische Stimulation

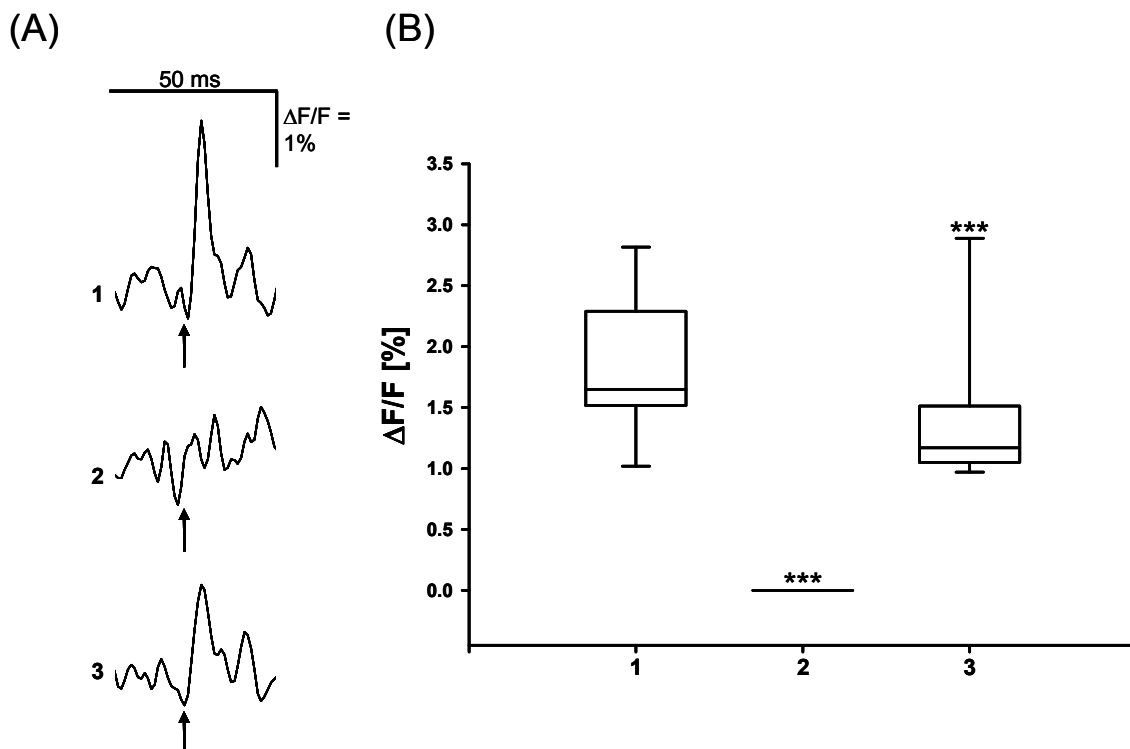


Abb. 10 Nachweis des neuronalen Ursprungs der elektrisch induzierten Signale in der Zellkultur. (A) Repräsentative, gemittelte und vergrößerte Traces einer humanen myenterischen Nervenzelle in einer 19 Tage alten Zellkultur. Pfeile: elektrische Stimulation des Zellclusters mit einer Spannung von 3 V für die Dauer von 600 μ s. Die Traces wurden

jeweils mit einem Butterworth Lowpass Filter bei 145 Hz und einem Highpass Filter bei 10 Hz gefiltert. **(B)** Statistische Auswertung der Signale für $n = 3$ Zellkulturen und 12 Nervenzellen. (1) Kontrolle. (2) 20 minütige Perfusion von $0.5 \mu\text{M}$ TTX. (3) 45 minütige Auswaschphase. *** $p < 0.001$.

In 17 Zellkulturen wurden Zellcluster elektrisch stimuliert, wobei in einigen Zellkulturen mehr als eine Art der elektrischen Stimulation ausgetestet wurde. Dabei kam die Teflon ummantelte Platinfilament Elektrode mit einem Durchmesser von $25 \mu\text{M}$ in 8 Zellkulturen, die Elektrode mit einem Durchmesser von $75 \mu\text{M}$ in 6 Zellkulturen, die elektrische Feldstimulation in 7 Zellkulturen und die bipolare Elektrode in 1 Zellkultur zum Einsatz. In 12 der 17 Zellkulturen konnten zumindest elektrisch induzierte Signale detektiert werden. In drei Zellkulturen wurde die neuronale Herkunft der Signale mittels Perfusion von TTX verifiziert. Die elektrisch induzierten Signale wurden statistisch signifikant und reversibel durch TTX blockiert (Abbildung 10; $n = 3$ Zellkulturen und 12 Nervenzellen). Jedoch konnte in der Zellkultur mittels elektrischer Stimulation bisher immer nur ein Peak induziert werden (Abbildung 10A). Ein zweiter, womöglich postsynaptisch vermittelter Peak wie im intakten humanen Gewebe (vergleiche Abbildung 4A) wurde in der Zellkultur nicht registriert.

4 Diskussion

Bislang existieren nur einige wenige intrazelluläre Ableitungen, die Einblick in die Elektrophysiologie der humanen myenterischen Nervenzellen geben können (Maruyama, 1981; Brookes et al., 1987). Aufnahmen von humanen myenterischen Nervenzellen mittels der Kombination aus MSORT und spannungssensitiven Farbstoffen wurden bisher nur einmal durch Schemann et al. (Schemann et al., 2002) veröffentlicht. Jedoch gelang dies auch nur in einem myenterischen Ganglion. Diese Arbeit hat jedoch gezeigt, dass die reproduzierbare Aufzeichnung von Signalen humaner myenterischer Nervenzellen, mittels der MSORT Methode in Kombination mit spannungssensitiven Farbstoffen, durchaus möglich ist.

Ableitungen im intakten myenterischen Plexus des Humandarms wurden durch eine Vorfärbung mit dem Vitalfarbstoff 4-Di-2-ASP möglich, da dieser Farbstoff die Ganglien sichtbar machte und somit eine gezielte intraganglionäre Applikation des spannungssensitiven Farbstoffes ermöglichte. Alle Farbstoffe wurden zunächst im myenterischen Plexus des Meerschweinchens getestet, bei dem die optische Messung neuraler Aktivität mittels spannungssensitivem Farbstoff bereits etabliert ist (Obaid et al., 1999; Neunlist et al., 1999; Schemann et al., 2002; Schemann et al., 2005; Mazzuoli und Schemann, 2009). Von den getesteten Vitalfarbstoffen war 4-Di-2-ASP derjenige, der keine negativen Auswirkungen auf das elektrophysiologische Verhalten der myenterischen Nervenzellen im Meerschweinchen hatte. Diese Beobachtungen stimmen mit den Erkenntnissen von Hanani (Hanani, 1992) und Hanani et al. (Hanani et al., 1993) überein, die besagen, dass 4-Di-2-ASP die Fähigkeit hat das Nervennetzwerk im Darm des Meerschweinchens und des Menschen anzufärben. Intrazelluläre Aufzeichnungen von myenterischen Nervenzellen des Meerschweinchen Ileums zeigten entsprechend unseren Daten, dass die zellulären Eigenschaften nach der Inkubation mit der Farbstofflösung nicht signifikant verändert waren (Hanani, 1992). Methylenblau hingegen verursachte eine signifikante Reduktion der Summenaktionspotential und schnellen EPSP Amplituden. Eine Ursache hierfür könnte möglicherweise die von Purves und Lichtman (Purves

und Lichtman, 1987) beschriebenen toxischen Effekte sein. Sie stellten fest, dass innerhalb von wenigen Minuten nach dem Anfärben von autonomen Ganglien lebender Mäuse mit Methylenblau die Nerventerminalen anschwellen, und dass die intrazellulär aufgezeichneten postsynaptischen Potentiale während dem Färbeprozess verschwanden. Somit ist 4-Di-2-ASP derjenige der getesteten Vitalfarbstoffe, der für die Vorfärbung des humanen myenterischen Plexus geeignet ist. Auch wenn mit diesem Farbstoff im humanen myenterischen Plexus keine individuellen Nervenzellen sichtbar gemacht werden konnten, so ließ die Vorfärbung mit 4-Di-2-ASP doch deutlich das ganglionäre Netzwerk des myenterischen Plexus erkennen.

Dieser Umstand wiederum ermöglichte die gezielte intraganglionäre Applikation des spannungssensitiven Farbstoffes Di-8-ANEPPS. Mit diesem Protokoll konnten nach der elektrischen Stimulation von interganglionären Nervenfasern, TTX sensitive und somit neuronal vermittelte, Signale aufgezeichnet werden. In zwei Geweben folgte unmittelbar auf den ersten Peak ein zweiter. Der erste Peak stellt womöglich ein Summenaktionspotential von Nervenfasern dar. Denn wie bereits beschrieben, wurde die elektrische Stimulation stets mit einer niedrigen Spannung begonnen, die dann pro Aufnahme erhöht wurde. Entsprechend den Beobachtungen von Schemann et al. (Schemann et al., 2002), nahm mit steigender Spannung auch die Amplitude des ersten Peaks zu, und die Spannung, welche die größte Signalamplitude verursachte, wurde für weitere Aufnahmen verwendet. Auch wenn kein wie im Meerschweinchen typisches EPSP registriert werden konnte (Schemann et al., 2002), so könnte der zweite Peak dennoch ein durch ein EPSP ausgelöstes Aktionspotential darstellen. Denn der zweite Peak konnte, im Gegensatz zum ersten, durch Hexamethonium in seiner Amplitude reduziert werden. Da der zweite Peak jedoch durch Hexamethonium nicht vollständig blockiert werden konnte, waren womöglich neben dem nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor noch andere Transmitter und Rezeptoren an dessen Entstehung beteiligt. So werden die schnellen EPSPs im myenterischen Plexus des Meerschweinchens im distalen Kolon in 62% und im Ileum sogar in nur circa 25% der untersuchten Nervenzellen vollständig durch Blocker von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren inhibiert (Galligan und Bertrand, 1994; Nurgali

et al., 2003). In den restlichen Nervenzellen werden die schnellen EPSPs nur teilweise durch Antagonisten von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren blockiert, was bedeutet, dass in diesen Nervenzellen noch andere Transmitter bei der schnellen synaptischen Erregung eine Rolle spielen (Galligan und Bertrand, 1994). In etwa 67% der Nervenzellen im Meerschweinchen Ileum und in 20% der Nervenzellen im distalen Kolon des Meerschweinchens werden, die gegen Blocker von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren resistenten, schnellen EPSPs durch Antagonisten von P2X-Rezeptoren reduziert. Folglich erhalten die meisten myenterischen Nervenzellen einen gemischten schnellen exzitatorischen synaptischen Eingang, welcher überwiegend über nikotinerge Acetylcholin- und purinerge P2X-Rezeptoren vermittelt wird (Galligan und Bertrand, 1994; LePard und Galligan, 1999; Galligan et al., 2000; Nurgali et al., 2003). Im Meerschweinchen Ileum wird in ungefähr 11% der myenterischen Nervenzellen die gegenüber Blockern von Acetylcholin-Rezeptoren insensitive Komponente des schnellen EPSPs durch Antagonisten von 5-HT₃-Rezeptoren reduziert (Galligan et al., 2000). Im distalen Kolon des Meerschweinchens war dies bei nur einem aus 15 myenterischen Nervenzellen der Fall (Nurgali et al., 2003). Auch humane myenterische Nervenzellen exprimieren neben nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren ebenso funktionelle P2X- und 5-HT₃-Rezeptoren. Das zeigen die pharmakologischen Untersuchungen dieser Rezeptoren in der humanen Primärkultur. Der P2-Rezeptor Blocker PPADS hat die durch ATP evozierte Aktionspotentialentladung in der humanen Primärkultur reversibel geblockt. Auch der 5-HT₃-Rezeptor Antagonist Cilansetron hat die durch Serotonin hervorgerufenen Aktionspotentialentladungen signifikant und reversibel inhibiert. Deshalb sollten in weiteren Versuchen am intakten humanen myenterischen Plexus noch andere Antagonisten zur Inhibition des elektrisch hervorgerufenen zweiten Peaks ausgetestet werden.

In der humanen myenterischen Zellkultur liegt jedoch der Prozentsatz an nikotinergen und purinergen Nervenzellen mit 40% zwischen und der Prozentsatz an nikotinergen und serotinerger Nervenzellen weit über den Werten im Meerschweinchen. Die Differenzen können jedoch daraus resultieren, dass die Meerschweinchen Daten nicht aus Zellkulturen, sondern aus Geweben stammen. Auf

die Vergleichbarkeit von Zellkulturen zu intaktem Gewebe und von Spezies zu Spezies wird später im Text noch näher eingegangen. In den Meerschweinchenstudien wurden noch dazu die Amplituden der mittels elektrischer Stimulation hervorgerufenen schnellen EPSPs untersucht, während in der humanen Zellkultur die durch direkte ATP Applikation hervorgerufene Aktionspotentialfrequenz detektiert wurde.

Mit Serotonin und ATP wurden auch späte Aktionspotentiale detektiert. Diese waren jedoch im Falle von Serotonin ebenfalls Cilansetron sensitiv. Für den humanen Darm ist bereits bekannt, dass 5-HT_{1P}-, 5-HT₄- und 5-HT₇-Rezeptoren in die Induktion von Reflexen und in die Relaxation der Zirkulärmuskulatur involviert sind (Prins et al., 1999; Schemann und Neunlist, 2004). Dennoch hatte die Perfusion der 5-HT_{1P}-, 5-HT₄- und 5-HT₇-Rezeptor Antagonisten 5-HTP-DP, Piboserod und Clozaprid keine Wirkung auf die späten Serotonin induzierten Aktionspotentiale. Das bedeutet, dass humane myenterische Nervenzellen in Zellkultur zwar funktionelle 5-HT₃-Rezeptoren exprimieren, jedoch keine 5-HT_{1P}-, 5-HT₄- und 5-HT₇-Rezeptoren. Mittels einer immunhistochemischen Studie könnte nachvollzogen werden, ob diese Rezeptoren in der Zellkultur nur nicht funktionell sind, oder überhaupt nicht exprimiert werden. Ebenfalls könnte auf diese Weise überprüft werden, ob der 5-HT₃-Rezeptor wie im humanen submukösen Plexus aus 5-HT_{3A}- und 5-HT_{3B}-Rezeptor Subtypen besteht (Michel et al., 2005).

Bezüglich der späten ATP-Signale stehen die Experimente zu deren Pharmakologie in der humanen Primärkultur myenterischer Nervenzellen noch aus. Jedoch konnten in 77% der untersuchten Nervenzellen mit Hilfe von ATP Aktionspotentiale hervorgerufen werden. Im Meerschweinchen Dünndarm wurden mit 90% etwas mehr Nervenzellen durch die Applikation von ATP depolarisiert (Burnstock, 2008). In der Primärkultur von myenterischen Nervenzellen des Meerschweinchen Dünndarms reagierten jedoch nur 10% der Nervenzellen auf ATP. Jedoch konnten diese ATP-Signale durch den P2X Agonisten α,β -Methylen ATP nachgeahmt werden (Zhou und Galligan, 1996). Dass dieser Agonist, der üblicherweise am P2Y-Rezeptor keine Wirkung hat, jedoch keine Aktionspotentiale in der humanen myenterischen Zellkultur ausgelöst hat, lässt vermuten, dass es sich bei den durch ATP stimulierten

purinergen Rezeptoren um P2Y-Rezeptoren handelt (Ralevic und Burnstock, 1998). Da Suramin die ATP induzierten Aktionspotentiale nicht zu blockieren vermochte, ist der P2Y₄-Rezeptor möglicherweise ein Kandidat für die Vermittlung der purinergen Signale. Von humanen P2Y₄-Rezeptoren ist bekannt, dass ATP ein Agonist dieses Subtyps darstellt (Ralevic und Burnstock, 1998), und dass dieser nicht durch Suramin, jedoch aber durch PPADS blockiert werden kann (Communi et al., 1996). Dieser Rezeptorsubtyp wurde des Weiteren auch schon in einer humanen Kolonkrebszelllinie nachgewiesen (Delbro et al., 2005). Falls es sich beim aktivierten Rezeptor vielleicht dennoch um einen P2X-Rezeptor handelt, so können auch hier die Subtypen etwas eingegrenzt werden. So kommen zum Beispiel der P2X₂- und der P2X₅-Rezeptor in Frage, da diese Subtypen nicht durch α,β -Methylen ATP aktiviert werden, PPADS jedoch die Aktivität dieser Rezeptoren inhibiert (Zhou und Galligan, 1996). Bertrand und Bornstein (Bertrand und Bornstein, 2002) haben ähnliche Beobachtungen bezüglich der α,β -Methylen ATP und Suramin Insensitivität im Dünndarm des Meerschweinchens gemacht. Sie stellten fest, dass ein P2X-Rezeptor auf dem Zellkörper von sensorischen Nervenzellen für die ATP Signale verantwortlich ist. In murinen S-Nervenzellen vermittelt der P2X₂-Rezeptor die schnellen EPSPs (Ren et al., 2003), während in AH-Nervenzellen der P2X₃-Rezeptor vorherrscht (Bian et al., 2003). Außerdem werden P2X₂-Rezeptoren auch von myenterischen Nervenzellen des Meerschweinchens Dünndarms exprimiert (Zhou und Galligan, 1996). Wie in der Maus sind auch im ENS des Meerschweinchens P2X₃-Rezeptoren vorhanden (Xiang und Burnstock, 2005). Um welchen Subtyp es sich bei dem purinergen Rezeptor in der Primärkultur des humanen myenterischen Plexus tatsächlich handelt, kann aber hier nicht geklärt werden. Dazu wären beispielsweise immunhistochemische Antikörperfärbungen oder Antagonisten, welche speziell eine bestimmte Untereinheit inhibieren, nötig.

Die Erfolgsquote, im Gewebe des humanen myenterischen Plexus elektrisch induzierte Signale zu evozieren, war mit 12 von 37 Humangeweben äußerst gering. Noch dazu konnte in nur zwei dieser Gewebe ein zweiter Peak detektiert werden. Auch konnten in keinem der 37 Präparationen Nikotin induzierte Aktionspotentiale aufgezeichnet werden. Eine Erklärung hierfür kann eventuell die Basallamina liefern,

welche die Ganglien umgibt, und somit als Barriere verhindert, dass die applizierten Substanzen schnell die Nervenzellen innerhalb der Ganglien erreichen (Gabella, 1972).

Ein weiterer Grund für die Schwierigkeiten beim Ableiten von Signalen von myenterischen Nervenzellen liegt möglicherweise im Alter der Patienten begründet, von denen die Gewebeproben stammten. Dies sind nämlich meist ältere Menschen, und es existiert eine Vielzahl an Studien in Mäusen, Meerschweinchen und Ratten, die belegen, dass die Anzahl der myenterischen Nervenzellen mit dem Alter abnimmt (Gabella, 1989; El-Salhy et al., 1999; Phillips und Powley, 2001; Phillips et al., 2003; Peck et al., 2009). Entsprechende Untersuchungen am myenterischen Plexus des Menschen zeigen ebenfalls eine Reduktion der neuronalen Dichte im Dünn- und Dickdarm (de Souza et al., 1993; Gomes et al., 1997), sowie die Abnahme der Anzahl myenterischer Nervenzellen pro Millimeter Kolon und pro Ganglion (Bernard et al., 2009). Auch Hanani et al. (Hanani et al., 2004) haben herausgefunden, dass die humanen myenterischen Ganglien im Kolon von alten Patienten nur wenige Nervenzellen enthalten, welche noch dazu in Clustern organisiert sind. Obwohl die humanen myenterischen Ganglien durch die intraganglionäre Mikroinjektion eindeutig mit spannungssensitivem Farbstoff angefärbt waren, so war es dennoch nicht möglich die neuronalen Zellkörper zu identifizieren beziehungsweise zu lokalisieren. Somit führte womöglich Nikotin teilweise nur deshalb nicht zu einer Aktionspotentialentladung, weil das ganglionäre Areal, auf welches Nikotin appliziert wurde, keine neuronalen Zellkörper aufwies.

Momentan wird in unserem Labor eine viel versprechende neue Art der Beladung der Ganglien mit spannungssensitivem Farbstoff etabliert. Dabei wird der spannungssensitive Farbstoff Di-8-ANEPPS über einen Injektor mit einer Geschwindigkeit von 1000 nl/s für die Dauer von 10 s in das Ganglion injiziert, was in einem finalen Farbstoffvolumen von 10 µl resultiert. Dieser Ansatz führte in ersten Versuchen zu einer spezifischen Färbung des humanen Ganglions und somit zu einem verbesserten Signal-Rausch Verhältnis (persönliche Mitteilung Dr. Sheila Vignali).

Durch das Etablieren einer humanen myenterischen Primärkultur konnte nicht nur das Problem bezüglich der Applikation von Substanzen gelöst, sondern auch das Signal-Rausch Verhältnis verbessert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden in der Primärkultur humaner myenterischer Nervenzellen reproduzierbar Aktionspotentialentladungen nach der Applikation von Nikotin, Serotonin oder von ATP registriert. Das Signal-Rausch Verhältnis ist dabei in der humanen Primärkultur deutlich höher als im Gewebe des Meerschweinchens.

Die Entwicklung von myenterischen Ganglien in Kultur wurde schon mehrfach untersucht und beschrieben. Dabei bilden die Ganglien und Nervenfaservertrakte direkt nach dem Bestücken der Kulturschalen zunächst kontrahierte, kompakte Strukturen. Nach circa vier Tagen in Kultur beginnen sich rundum Fortsätze von Gliazellen und Nervenzellen aus dem Explantat herauszubilden. Während in den darauf folgenden Kulturtagen die Gliazellen ein dichtes Netzwerk um das Explantat herum bilden, verbleiben die Nervenzellen innerhalb des Explantates (Jessen et al., 1983; Hanani et al., 1994). Eine durch Jessen et al. (Jessen et al., 1983) und Hanani et al. (Hanani et al., 1994) beschriebene Überwucherung der Kultur durch Gliazellen und Fibroblasten wurde mittels Gabe von Cytosin β -D-Arabinofuranosid, welches die Proliferation dieser Zellen hemmt (Vanden Berghe et al., 2000), verhindert.

Jedoch war auch in der Zellkultur die Erfolgsrate, was das Aufzeichnen von Signalen nach elektrischer Stimulation angeht, gering. Zwar konnten in 12 von 17 getesteten Zellkulturen elektrisch induzierte Signale detektiert werden, deren neuronaler Ursprung mittels TTX in drei Zellkulturen auch verifiziert wurde, aber auch hier konnten keine EPSPs aufgezeichnet werden. Da auch in der humanen Primärkultur des myenterischen Plexus, wie im intakten Gewebe, die Nervenzellen weder im Durchlicht noch nach Färbung mit dem spannungssensitiven Farbstoff Di-8-ANEPPS zu erkennen waren, musste die Elektrode somit „blind“ auf dem Zellcluster platziert werden. Denn erst die immunhistochemische Färbung mit neuronalen Markern, welche zur Verifizierung des neuronalen Ursprungs der zuvor im Versuch gemessenen Signale durchgeführt wurde, offenbarte die neuronalen Zellkörper und Fortsätze. Da aber wie bereits erwähnt das verwendete Gewebe größtenteils von älteren Patienten stammt und die Anzahl der myenterischen Nervenzellen mit dem

Alter abnimmt (Gabella, 1989; de Souza et al., 1993; Gomes et al., 1997; El-Salhy et al., 1999; Phillips and Powley, 2001; Phillips et al., 2003; Hanani et al., 2004), waren pro Zellcluster im Schnitt auch nur zwei Nervenzellen vorhanden. Somit ist es verständlicherweise aufgrund der geringen Anzahl an Nervenzellen pro Zellcluster schwierig bei der zufälligen Platzierung der Elektrode einen Nervenstrang zu treffen und zu stimulieren, der dann auch noch eine Synapse mit der abgeleiteten Nervenzelle bildet. Dabei gilt es noch zu erwähnen, dass die Anzahl der Nervenzellen erst nach den elektrophysiologischen Untersuchungen immunhistochemisch bestimmt wurde. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass womöglich zwar mehr Nervenzellen bei der Herstellung der Kultur gesammelt wurden, sich die Nervenzellen aber dann vielleicht nicht alle am Boden der Kulturschale festgesetzt haben oder gar während der Kultivierungsphase gestorben sind. Als nächster Schritt wurden die kompletten Zellcluster mittels elektrischer Feldstimulation angeregt. Doch auch diese Methode führte zu keiner registrierbaren postsynaptischen Antwort. Prinzipiell ist es jedoch möglich kultivierte Nervenzellen mit einer Elektrode, welche auf den verbindenden Nervenfasern platziert wird, elektrisch zu stimulieren. So haben Vanden Berghe et al. (Vanden Berghe et al., 2000) mittels intrazellulärem Calcium-Imaging gezeigt, dass in kultivierten myenterischen Nervenzellen des Meerschweinchens, ausgelöst durch die elektrische Stimulation von verbindenden Nervenfasern, Veränderungen in der Calciumkonzentration auftreten. In Zellkulturen des Meerschweinchens sind die interganglionären Nervenstränge allerdings wesentlich leichter zu identifizieren, da sich ein Netzwerk zwischen den Zellclustern ausbildet.

Immer wieder werden Kultursysteme aus verschiedenen Regionen des Gastrointestinaltraktes von unterschiedlichen Tierarten genutzt, um die myenterischen Nervenzellen näher untersuchen zu können (Hanani et al., 1982; Jessen et al., 1983; Baluk et al., 1983; Jessen et al., 1983a; Hanani et al., 1994; Vanden Berghe et al., 2000). Auch haben bereits mehrere Untersuchungen gezeigt, dass diese Zellkulturen aus verschiedenen morphologischen und elektrophysiologischen Klassen von Nervenzellen bestehen, welche die Vielfältigkeit von myenterischen Nervenzellen im Gewebe widerspiegeln (Willard und Nishi, 1985;

Hanani und Burnstock, 1985; Nishi und Willard, 1985; Hanani et al., 1994). Die Ganglien in Zellkultur sind jedoch in vielerlei Hinsicht nicht mit den Ganglien in intaktem Gewebe vergleichbar. So haben Ganglien in Zellkultur ihre Integrität eingebüßt, und statt gut organisierter neuronaler Verbindungen, wie im myenterischen Plexus üblich, existiert nur noch eine Ansammlung von Nervenzellen auf einer Schicht von Gliazellen. Die Ganglien werden bei der Herstellung der Zellkultur nicht nur von den extrinsischen Nerven, sondern auch intrinsisch voneinander isoliert. Obwohl sich in Zellkultur wieder neue synaptische Verbindungen entwickeln, ist das Ausmaß der synaptischen Verschaltungen unklar, was jedoch eine immunhistochemische Untersuchung mit synaptischen Markern klären könnte. Unter Umständen kann dieser Erneuerungsprozess auch zu einer veränderten Rezeptorexpression in den myenterischen Nervenzellen führen, wodurch deren Phänotyp in Zellkultur nicht die Situation im intakten Gewebe widerspiegeln würde.

Obwohl die Primärkultur myenterischer Nervenzellen momentan die einzig zuverlässige Methode darstellt humane myenterische Nervenzellen pharmakologisch zu untersuchen, bleibt es letztlich immer noch eine Herausforderung die Ergebnisse auch im intakten myenterischen Plexus zu bestätigen. Denn auch im Dünndarm der Ratte werden Unterschiede verzeichnet, je nachdem, ob die Aktivität der myenterischen Nervenzellen im intakten Gewebe oder in Zellkultur gemessen werden (Nishi und Willard, 1985; Willard und Nishi, 1985; Willard und Nishi, 1985a). Des Weiteren detektierten Brookes et al. (Brookes et al., 1987) einen Mangel an AH-Zellaktivität und an langsamen EPSPs im humanen Gewebe und schlossen daraus, dass sich die Neurophysiologie des humanen myenterischen Plexus signifikant von der im Meerschweinchen unterscheidet. Auch im humanen submukösen Plexus konnten keine AH-Nervenzellen detektiert werden (Schemann et al., 2002). In der humanen myenterischen Zellkultur zeigten nun aber die Aktionspotentiale von 41% der untersuchten Nervenzellen, die für AH-Nervenzellen charakteristische prominente Schulter. Dieser Prozentsatz an AH-Nervenzellen entspricht dem, den Browning und Lees (Browning und Lees, 1996) im myenterischen Plexus des Rattenkolons bestimmt haben. Somit existieren jedoch Unterschiede zwischen der

Primärkultur der humanen myenterischen Nervenzellen und dem intakten Humangewebe. Deshalb ist unklar, ob die Kulturdaten in unserem Fall wirklich von der Zellkultur auf frisch präpariertes Gewebe übertragen werden können. Der hohe Prozentsatz an AH-Nervenzellen könnte ein weiterer Grund sein, weshalb die elektrische Stimulation keine schnellen EPSPs hervorgerufen hat. Denn einzelne elektrische Stimuli verursachen nur in manchen AH-Nervenzellen ein schnelles EPSP, während hochfrequente Stimuli in allen AH-Nervenzellen langsame EPSPs auslösen (Mawe et al., 1986; Kunze et al., 1993; Bornstein et al., 1994). Allerdings zeigte sich in der Zellkultur humaner myenterischer Nervenzellen nicht die für AH-Nervenzellen typische langsame und lang anhaltende (≥ 2 s) Nachhyperpolarisation (Hirst et al., 1974; Bornstein et al., 1994) wie im Meerschweinchen. Aber auch im Dünndarm der Maus und im Dünndarm des Schweins weisen die AH-Nervenzellen nicht immer eine langsame Nachhyperpolarisation auf (Cornelissen et al., 2000; Nurgali et al., 2004; Mao et al., 2006). Jedoch wurde in der Zellkultur humaner myenterischer Nervenzellen wie im Ileum des Schweins (Cornelissen et al., 2000) eine schnelle Nachhyperpolarisation detektiert.

In dieser Arbeit wurden somit Protokolle beschrieben, wie spannungssensitive Farbstoffe eingesetzt werden müssen, um Signale von humanen myenterischen Nervenzellen aufzeichnen zu können. Auch wenn es noch genügend Raum für Verbesserungen gibt, so kann aber dennoch festgehalten werden, dass die Methoden die Aufnahme von neuronal vermittelten Signalen im intakten Gewebe und von synaptisch vermittelten Aktionspotentialen in der Primärkultur myenterischer Nervenzellen ermöglichen. Dies sind wichtige Schritte in der Erforschung der Neurobiologie humaner myenterischer Nervenzellen, bei der es letztlich darum geht, neue Angriffspunkte für Arzneimittel zu finden. Die Untersuchungen in diesem Bereich werden momentan darauf fokussiert die Aufzeichnungen im intakten Gewebe zu verbessern und die neuropharmakologischen Experimente auszudehnen.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Protokoll zu etablieren, welches die erfolgreiche Aufzeichnung von reproduzierbaren optischen Signalen mittels der „*Multisite optical recording technique*“ in Kombination mit spannungssensitiven Farbstoffen in humanen myenterischen Nervenzellen ermöglicht.

Da die humanen myenterischen Ganglien nur limitiert sichtbar sind, wurden zur Anfärbung der Ganglien die Vitalfarbstoffe 4-Di-2-ASP und Methylenblau, welche das ganglionäre Netzwerk sichtbar machen, getestet. Im Gegensatz zu Methylenblau hatte 4-Di-2-ASP keine Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der myenterischen Nervenzellen im Meerschweinchen, weshalb dieser Farbstoff zur Visualisierung humaner myenterischer Ganglien herangezogen wurde.

Um zu ermitteln, mit welchem Farbstoff Ableitungen von myenterischen Nervenzellen erreicht werden können, wurden die spannungssensitiven Farbstoffe Di-4-ANEPPDHQ, Di-8-ANEPPQ und Di-8-ANEPPS ausprobiert. Mit jedem dieser Farbstoffe konnten zwar Signale im myenterischen Plexus des Meerschweinchens, jedoch nicht im humanen myenterischen Plexus aufgezeichnet werden. Erst die Erhöhung der Di-8-ANEPPS Farbstoffkonzentration von normalerweise im Meerschweinchen üblichen 20 auf 30 μM ermöglichte auch im humanen myenterischen Plexus die Aufzeichnung von neuronal vermittelten Signalen.

Aufgrund der niedrigen Erfolgsrate, mit der elektrisch induzierte Signale im intakten humanen Gewebe detektiert wurden, und auch um die Zugänglichkeit der humanen myenterischen Ganglien sowohl für spannungssensitive Farbstoffe, als auch für Nikotin zu verbessern, wurde eine Primärkultur humaner myenterischer Nervenzellen etabliert. Bezüglich der elektrisch induzierten Signale konnten auch in der humanen Primärkultur keine exzitatorischen postsynaptischen Potentiale aufgezeichnet werden. Jedoch konnten in der Primärkultur des humanen myenterischen Plexus funktionelle nikotinerge Acetylcholin-, 5-HT₃- und purinerge Rezeptoren nachgewiesen werden.

Diese Studie etablierte Techniken, die erstmals verlässliche Ableitungen von humanen myenterischen Nervenzellen ermöglichten. Die elektrische Stimulation interganglionärer Nervenstränge führte im intakten Gewebe zu Aktionspotentialentladungen. Das Signal-Rausch Verhältnis und die Zuverlässigkeit der Signalableitungen konnten durch die Etablierung einer humanen myenterischen Nervenzellkultur wesentlich verbessert werden. Die kultivierten myenterischen Nervenzellen entluden Aktionspotentiale nach Applikation der exzitatorischen Transmitter Acetylcholin, Serotonin und ATP.

6 Summary

The aim of this work was to establish a protocol making it possible to routinely record from human myenteric neurons with the multisite optical recording technique in combination with voltage-sensitive dyes.

Because of the limited visibility of human myenteric ganglia, the vital dyes 4-Di-2-ASP and methylene blue, both having the ability to visualize the nerve plexus, were tested in guinea pig preparations to check if these dyes have any negative effect on the electrophysiological behaviour of myenteric neurons. In contrast to methylene blue, 4-Di-2-ASP had no impact on the electrophysiological behaviour, and was therefore used for the pre-staining of the human myenteric ganglia.

The voltage-sensitive dyes Di-4-ANEPPDHQ, Di-8-ANEPPQ and Di-8-ANEPPS were tested in order to check the most suitable dye to record from myenteric neurons. With each of those dyes it was possible to record from the myenteric plexus of the guinea pig, but none of these dyes revealed signals from the human myenteric plexus. However, the increase of the Di-8-ANEPPS concentration from the normally used 20 to 30 μM enabled the recording of neuronally mediated signals from human myenteric plexus preparations.

Due to the low success rate to record electrically induced, synaptically mediated signals in human tissue and to increase the accessibility of the human myenteric ganglia both for voltage-sensitive dyes and for nicotine, a primary culture of human myenteric neurons was established. But also in the human primary culture no excitatory postsynaptic potentials could be recorded after electrical stimulation. However the functional expression of nicotinic acetylcholine, 5-HT₃ and purinergic receptors has been demonstrated in the primary culture of human myenteric neurons. In conclusion, this study revealed for the first time a reliable technique to record from human myenteric neurons in intact, freshly dissected tissue and, more importantly, from human cultured myenteric neurons. The functional relevance was demonstrated by recordings of neural responses to application of the excitatory transmitters acetylcholine, serotonin and ATP.

7 Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.*, 1994; 64:445–75.

Auerbach L. Über einen Plexus gangliosis myogastricus. 39er Jahr-Bericht u. Abh. der Schlesischen Gesellschaft für Vaterländ. Cult., 1862; 103-4.

Bałuk P, Jessen KR, Saffrey MJ, Burnstock G. The enteric nervous system in tissue culture. II. Ultrastructural studies of cell types and their relationships. *Brain Res.*, 1983; 262:37-47.

Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci.*, 1994; 15:67-70.

Bayliss WM, Starling EH. The movement and innervation of the small intestine. *J Physiol.*, 1899; 24:99-143.

Bean BP. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci.*, 1992; 13:87–90.

Bedlack RS Jr, Wie M, Loew LM. Localized membrane depolarizations and localized calcium influx during electric field-guided neurite growth. *Neuron.*, 1992; 9:393-403.

Benham CD, Tsien RW. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature.*, 1987; 238:275–8.

Bernard CE, Gibbons SJ, Gomez-Pinilla PJ, Lurken MS, Schmalz PF, Roeder JL, Linden D, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Camilleri M, Zinsmeister AR, Pozo MJ,

Hicks GA, Farrugia G. Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol Motil.*, 2009; 21:746-e46.

Bertrand PP, Bornstein JC. ATP as a putative sensory mediator: activation of intrinsic sensory neurons of the myenteric plexus via P2X receptors. *J Neurosci.*, 2002; 22:4767-75.

Bertrand PP, Kunze WA, Bornstein JC, Furness JB, Smith ML. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am J Physiol.*, 1997; 273:G422-35.

Bertrand PP, Kunze WA, Furness JB, Bornstein JC. The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. *Neuroscience.*, 2000; 101:459-69.

Bian X, Ren J, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP, Galligan JJ. Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *J Physiol.*, 2003; 551:309-22.

Bijlsma PB, Kiliaan AJ, Scholten G, Heyman M, Groot JA, Taminiou JA. Carbachol, but not forskolin, increases mucosal-to-serosal transport of intact protein in rat ileum in vitro. *Am J Physiol.*, 1996; 271:G147-55.

Bjornsson ES, Chey WD, Hooper F, Woods ML, Owyang C, Hasler WL. Impaired gastrocolonic response and peristaltic reflex in slow-transit constipation: role of 5-HT(3) pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2002; 283:G400-7.

Bornstein JC, Furness JB, Kunze WAA. Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate? *J. Auton. Nerv. Syst.*, 1994; 48:1-15.

Branchek TA, Mawe GM, Gershon MD. Characterization and localization of a peripheral neural 5-hydroxytryptamine receptor subtype (5-HT_{1P}) with a selective agonist, 3H-5-hydroxyindalpine. *J Neurosci.*, 1988; 8:2582-95.

Breunig E, Michel K, Zeller F, Seidl S, von Weyhern CWH, Schemann M. Histamine excites neurons in the human submucous plexus through activation of H₁, H₂, H₃ and H₄ receptors. *J Physiol.*, 2007; 583:731-42.

Brookes SJ, Chen BN, Hodgson WM, Costa M. Characterization of excitatory and inhibitory motor neurons to the guinea pig lower esophageal sphincter. *Gastroenterology.*, 1996; 111:108-17.

Brookes SJ, Costa M. Identification of enteric motor neurons which innervate the circular muscle of the guinea pig small intestine. *Neurosci Lett.*, 1990; 118:227-30.

Brookes SJ, Ewart WR, Wingate DL. Intracellular recordings from myenteric neurons in the human colon. *J Physiol.*, 1987; 390:305-18.

Brookes SJH, Ewart WR, Wingate DL. Intracellular recordings from cells in the myenteric plexus of the rat duodenum. *Neuroscience.*, 1988; 24:297-307.

Brookes SH, Schemann M, Hennig GW. Distribution and characterization of circular muscle motor neurons in the guinea-pig corpus (Abstract). *J Gastroenterol Hepatol.*, 1994; 9:A75.

Brookes SJ, Steele PA, Costa M. Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience.*, 1991; 42:863-78.

Browning KN, Lees GM. Myenteric neurons of the rat descending colon: electrophysiological and correlated morphological properties. *Neuroscience.*, 1996; 73:1029–47.

Buhner S, Li Q, Vignali S, Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Zeller F, Langer R, Daniel H, Michel K, Schemann M. Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.*, 2009; 137:1425-34.

Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience.*, 1976; 1: 239-48.

Burnstock G. The journey to establish purinergic signalling in the gut. *Neurogastroenterol Motil.*, 2008; 20:8–19.

Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol.*, 1985; 16:433–40.

Cohen LB, Salzberg BM. Optical measurement of membrane potential. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, 1978; 83:35-88.

Communi D, Motte S, Boeynaems J-M, Pirotton S. Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol.*, 1996; 317:383–9.

Cooke HJ. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann N Y Acad Sci.*, 2000; 915:77-80.

Cornelissen W, De Laet A, Kroese AB, Van Bogaert PP, Scheuermann DW, Timmermans JP. Electrophysiological features of morphological Dogiel type II neurons in the myenteric plexus of pig small intestine. *J Neurophysiol.*, 2000; 84:102-11.

Cornelissen W, De Laet A, Kroese AB, van Bogaert PP, Scheuermann DW, Timmermans JP. Excitatory synaptic inputs on myenteric Dogiel type II neurons of the pig ileum. *J Comp Neurol.*, 2001; 432:137-54.

Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burner E, Kandiah CJ. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience.*, 1996; 75:949-67.

Delbro DS, Nylund G, Nordgren S. Demonstration of P2Y4 purinergic receptors in the HT-29 human colon cancer cell line. *Auton Autacoid Pharmacol.*, 2005; 25:163-6.

Derkach V, Surprenant A, North RA. 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature.*, 1989; 339:706–9.

de Souza RR, Moratelli HB, Borges N, Liberti EA. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. *Gerontology.*, 1993; 39:183-8.

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

Dogiel AS. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch Anat Physiol Leipzig Anat Abt Jg.*, 1899; 130-58.

Dubyak GR. Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 1991; 4:295–300.

Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol.*, 1993; 265:C577–606.

EI-Salhy M, Sandström O, Holmlund F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. *Mech Ageing Dev.*, 1999; 107:93-103.

Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2X purinoceptors). *Mol. Pharmacol.*, 1995; 48:178-83.

Fieber LA, Adams DJ. Acetylcholine evoked currents in cultured neurons dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia. *J Physiol.*, 1991; 434:215–37.

Fiorica-Howells E, Maroteaux L, Gershon MD. Serotonin and the 5-HT(2B) receptor in the development of enteric neurons. *J Neurosci.*, 2000; 20:294–305.

Fletcher S, Barnes NM. Desparately seeking subunits: Are native 5-HT₃ receptors really homomeric complexes? *Trends Pharmacol Sci.*, 1998; 19:212–5.

Fluhler E, Burnham VG, Loew LM. Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry.*, 1985; 24:5749-55.

Foxx-Orenstein AE, Kuemmerle JF, Grider JR. Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea pig intestine. *Gastroenterology.*, 1996; 111:1281–90.

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden KT, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev.*, 1994; 46:143–56.

Frieling T, Cooke HJ, Wood JD. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after sensitization to milk antigen. *Am J Physiol.*, 1994; 267:G1087-93.

Fromherz P, Lambacher A. Spectra of voltage-sensitive fluorescence of styryl-dye in neuron membrane. *Biochim Biophys Acta.*, 1991; 1068:149-56.

Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.*, 2000; 81:87-96.

Furness JB. *The enteric nervous system.* Blackwell Publishing: Malden, 2006.

Furness JB, Keast JR, Pompolo S, Bornstein JC, Costa M, Emson PC, Lawson DE. Immunohistochemical evidence for the presence of calcium-binding proteins in enteric neurons. *Cell Tissue Res.*, 1988; 252:79-87.

Furness JB, Kunze WAA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol.*, 1998; 54:1-18.

Furness JB, Morris JL, Gibbins IL, Costa M. Chemical coding of neurons and plurichemical transmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 1989; 29:289-306.

Furukawa K, Taylor GS, Bywater RAR. An intracellular study of myenteric neurons in the mouse colon. *J Neurophysiol.*, 1986; 55:1395-406.

Gabella G. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat.*, 1972; 111:69-97.

Gabella G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology.*, 1989; 96:1487-93.

Galligan JJ. Electrophysiological studies of 5-hydroxytryptamine receptors on enteric neurons. *Behav Brain Res.*, 1996; 73:199-201.

Galligan JJ, Bertrand PP. ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *J Neuroscience.*, 1994; 14:7563–71.

Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.*, 2000; 81:97–103.

Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters – roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2004; 20:3–14.

Gershon MD, Drakontides AB, Ross LL. Serotonin: synthesis and release from the myenteric plexus of the mouse intestine. *Science.*, 1965;149:197–9.

Gomes OA, de Souza RR, Liberti EA. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontology.*, 1997; 43:210-7.

Grafe P, Mayer CJ, Wood JD. Synaptic modulation of calcium dependent potassium conductance in myenteric neurones in the guinea pig. *J. Physiol.*, 1980; 305:235–48.

Greenwood B, Davison. The relationship between gastrointestinal motility and secretion. *Am J Physiol.*, 1987; 252:G1-7.

Grider J. Identification of neurotransmitters regulating intestinal peristaltic reflex in humans. *Gastroenterology.*, 1989; 97:1414–9.

Grinvald A, Frostig RD, Lieke E, Hildesheim R. Optical imaging of neuronal activity. *Physiol Rev.*, 1988; 68:1285-366.

Grundy D, Schemann M. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol.*, 2005; 21:176-82.

Grundy D, Schemann M. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol.*, 2006; 22:102-10.

Hanani M. Visualization of enteric and gallbladder ganglia with a vital fluorescent dye. *J Auton Nerv Syst.*, 1992; 38:77-84.

Hanani M, Baluk P, Burnstock G. Myenteric neurons express electrophysiological and morphological diversity in tissue culture. *J Auton Nerv Syst.*, 1982; 5:155-64.

Hanani M, Burnstock G. Synaptic activity of myenteric neurons in tissue culture. *J Auton Nerv Syst.*, 1985; 14:49-60.

Hanani M, Fellig Y, Udassin R, Freund HR. Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon. *Auton Neurosci.*, 2004; 113:71-8.

Hanani M, Udassin R, Ariel I, Freund HR. A simple and rapid method for staining the enteric ganglia: application for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.*, 1993; 28:939-41.

Hanani M, Xia Y, Wood JD. Myenteric ganglia from the adult guinea-pig small intestine in tissue culture. *Neurogastroenterol Mot.*, 1994; 6:103-18.

Harvery SC, Luetje CW. Determinants of competitive antagonist sensitivity on neuronal nicotinic receptor subunits. *J Neurosci.*, 1996; 16:3798-806.

Hens J, Vanderwinden JM, De Laet MH, Scheuermann DW, Timmermans JP. Morphological and neurochemical identification of enteric neurons with mucosal projections in the human small intestine. *J Neurochem.*, 2001; 76:464-71.

Hirst GDS, Holman ME, Spence I. Two types of neurons in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J Physiol.*, 1974; 236:303-26.

Hirst GDS, McKirdy HC. Synaptic potentials recorded from neurons of the submucous plexus of guinea-pig small intestine. *J Physiol.*, 1975; 249:309–88.

Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, Wegner M, Schemann M, Michel K, Rühl A. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol.*, 2008; 509:356-71.

Ippolito C, Segnani C, De Giorgio R, Blandizzi C, Mattii L, Castagna M, Moscato S, Dolfi A, Bernardini N. Quantitative evaluation of myenteric ganglion cells in normal human left colon: implications for histopathological analysis. *Cell Tissue Res.*, 2009; 336:191-201.

Iyer V, Bornstein JC, Costa M, Furness JB, Takahashi Y, Iwanaga T. Electrophysiology of guinea-pig myenteric neurons correlated with immunoreactivity for calcium binding proteins. *J Auton Nerv Syst.*, 1988; 22:141-50.

Jessen KR, Saffrey MJ, Bałuk P, Hanani M, Burnstock G. The enteric nervous system in tissue culture. III. Studies on neuronal survival and the retention of biochemical and morphological differentiation. *Brain Res.*, 1983a; 262:49-62.

Jessen KR, Saffrey MJ, Burnstock G. The enteric nervous system in tissue culture. I. Cell types and their interactions in explants of the myenteric and submucous plexuses from guinea pig, rabbit and rat. *Brain Res.*, 1983; 262:17-35.

Kim D-Y, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol.*, 2000; 95:2698–709.

Kirkegaard P, Olsen PS, Nexø E, Holst JJ, Poulsen SS. Effect of vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin on secretion of epidermal growth factor and bicarbonate from Brunner's glands. *Gut.*, 1984; 25:1225-9.

Krauthamer V, Ross WN. Regional variations in excitability of barnacle neurons. *J Neurosci.*, 1984; 4:673-82.

Kunze WAA, Furness JB, Bornstein JC. Simultaneous intracellular recordings from enteric neurons reveal that myenteric AH neurons transmit via slow excitatory postsynaptic potentials. *Neuroscience.*, 1993; 55:685-94.

Kunze WAA, Furness JB. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Ann Rev Physiol.*, 1999; 61:117-42.

Langley JN. *The Autonomic Nervous System*. Heffer: Cambridge, 1921.

LePard KJ, Galligan JJ. Analysis of fast synaptic pathways in myenteric plexus of the guinea pig ileum. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276:G529–38.

Loew LM. Potentiometric dyes: Imaging electrical activity of cell membranes. *Pure Appl Chem.*, 1996; 68:1405-9.

Loew LM, Cohen LB, Dix J, Fluhrer EN, Montana V, Salama G, Wu JY. A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. *J Membr Biol.*, 1992; 130:1-10.

Loew LM, Scully S, Simpson L, Waggoner AS. Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential. *Nature.*, 1979; 281:497-9.

Loew LM, Simpson LL. Charge-shift probes of membrane potential: a probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophys J.*, 1981; 34:353-65.

Magrassi L, Purves D, Lichtman JW. Fluorescent probes that stain living nerve terminals. *J Neurosci.*, 1987; 7:1207-14.

Mao Y, Wang B, Kunze W. Characterization of myenteric sensory neurons in the mouse small intestine. *J Neurophysiol.*, 2006; 96:998-1010.

Maruyama T. Two types of spike generation of human Auerbach's plexus cells in culture. *Neurosci Lett.*, 1981; 25:143-8.

Mawe GM, Branchek T, Gershon MD. Peripheral neural serotonin receptors: identification and characterization with specific antagonists and agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986; 83:9799-803.

Mazzuoli G, Schemann M. Multifunctional rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN) in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *J Physiol.*, 2009; 587:4681-94.

Meissner G. Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med N F.*, 1857; 8:364-6.

Meyer G, Botta G, Cremaschi D. Stimulation by enkephalins of D-glucose absorption in rabbit ileum. *Cell Mol Life Sci.*, 1997; 53:769-75.

Michel K, Zeller F, Langer R, Nekarda H, Kruger D, Dover TJ, Brady CA, Barnes NM, Schemann M. Serotonin excites neurons in the human submucous plexus via 5-HT₃ receptors. *Gastroenterology*, 2005; 128:1317-26.

Müller W, Windisch H, Tritthart HA. Fluorescent styryl dyes applied as fast optical probes of cardiac action potential. *Eur Biophys J.*, 1986; 14:103-11.

Nebigil CG, Etienne N, Messaddeq N, Maroteaux L. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. *FASEB J.*, 2003; 17:1373–5.

Neild TO, Shen KZ, Surprenant A. Vasodilatation of arterioles by acetylcholine released from single neurons in the guinea-pig submucosal plexus. *J Physiol.*, 1990; 420:247-65.

Neunlist M, Frieling T, Rupprecht, Schemann M. Polarized enteric submucosal circuits involved in secretory responses of the guinea-pig proximal colon. *J Physiol.*, 1998; 506:539-50.

Neunlist M, Peters S, Schemann M. Multisite optical recording of excitability in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.*, 1999; 11:393-402.

Nishi S, North RA. Intracellular recordings from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *J Physiol.*, 1973; 231:471-91.

Nishi R, Willard AL. Neurons dissociated from rat myenteric plexus retain differentiated properties when grown in cell culture. I. Morphological properties and immunocytochemical localization of transmitter candidates. *Neuroscience.*, 1985; 16:187-99.

North RA. P_{2X} purinoceptor plethora. *Semin Neurosci.*, 1996; 8:187–94.

North RA, Tokimasa T. Persistent calcium-sensitive potassium current and the resting properties of myenteric neurones. *J. Physiol.*, 1987; 386:333–53.

Nurgali K, Furness JB, Stebbing MJ. Analysis of purinergic and cholinergic fast synaptic transmission to identified myenteric neurons. *Neuroscience.*, 2003; 116:335-47.

Nurgali K, Stebbing MJ, Furness JB. Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of enteric neurons in the mouse colon. *J Comp Neurol.*, 2004; 468:112-24.

Obaid AL, Koyano T, Lindstrom J, Sakai T, Salzberg BM. Spatiotemporal patterns of activity in an intact mammalian network with single-cell resolution: Optical studies of nicotinic activity in an enteric plexus. *J Neurosci.*, 1999; 19:3073-93.

Obaid AL, Loew LM, Wuskell JP, Salzberg BM. Novel naphthylstyryl-pyridinium potentiometric dyes offer advantages for neural network analysis. *J Neurosci Methods.*, 2004; 134:179-90.

Ohkawa H, Prosser CL. Functions of neurons in enteric plexuses of cat intestine. *Am J Physiol.*, 1972; 222:1420-6.

Peck CJ, Samsuria SD, Harrington AM, King SK, Hutson JM, Southwell BR. Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing. *Neurogastroenterol Motil.*, 2009; 21:1075-e90.

Phillips RJ, Kieffer EJ, Powley TL. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton Neurosci.*, 2003; 106:69-83.

Phillips RJ, Powley TL. As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J Comp Neurol.*, 2001; 434:358-77.

Polyak SL. *The Retina*. University of Chicago Press: Chicago, 1941.

Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. *Gastroenterology.*, 1997; 113:1916-23.

Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. Cholinergic and nitrenergic Interneurons in the myenteric plexus of the human colon. *Gut.*, 2002; 51:70–5.

Prins NH, Briejer MR, Van Bergen PJE, Akkermans LMA, Schuurkes JAJ. Evidence for 5-HT₇ receptors mediating relaxation of human colonic circular smooth muscle. *Br J Pharmacol.*, 1999; 128:849-52.

Purves D, Lichtman JW. Synaptic sites on reinnervated nerve cells visualized at two different times in living mice. *J Neurosci.*, 1987; 7:1492-7.

Racke K, Schworer H. Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. *Pharmacol Res.*, 1991; 23:13–25.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.*, 1998; 50:413-92.

Ren J, Bian X, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP, Galligan JJ. P2X₂ subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *J Physiol.*, 2003; 552:809-21.

Schemann M. Control of Gastrointestinal Motility by the “Gut Brain” – The Enteric Nervous System. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 2005; 41:S4-6.

Schemann M, Michel K, Ceregrzyn M, Zeller F, Seidl S, Bischoff SC. Human mast cell mediator cocktail excites neurons in human and guinea-pig enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.*, 2005; 17:281-9.

Schemann M, Michel K, Peters S, Bischoff SC, Neunlist M. Cutting-Edge Technology III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2002; 282:G919-25.

Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.*, 2004; 16:55-9.

Schneider J, Jehle EC, Starlinger MJ, Neunlist M, Michel K, Hoppe S, Schemann M. Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil.*, 2001; 13:255-64.

Sikander A, Rana SV, Prasad KK. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin Chim Acta.*, 2009; 403:47-55.

Song ZM, Brookes SJH, Costa M. Identification of myenteric neurons which project to the mucosa of the guinea pig small intestine. *Neurosci Lett.*, 1991; 129:294-8.

Steele PA, Brookes SJ, Costa M. Immunohistochemical identification of cholinergic neurons in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. *Neuroscience.*, 1991; 45:227-39.

Stebbing MJ, Bornstein JC. Electrophysiological mapping of fast excitatory synaptic inputs to morphologically and chemically characterised myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *Neuroscience.*, 1996; 73:1017-28.

Surprenant A. Slow excitatory synaptic potentials recorded from neurons of guinea-pig submucous plexus. *J Physiol.*, 1984; 351:343-61.

Surprenant A, Buell G, North RA. P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci.*, 1995; 18:224-9.

Töröscik A, Oberfrank F, Sershen H, Lajtha A, Nemesy K, Vizi ES. Characterization of somatodendritic neuronal nicotinic receptors located on the myenteric plexus. *Eur J Pharmacol.*, 1991; 202:297-302.

Trouslard J, Marsh SJ, Brown DA. Calcium entry through nicotinic receptor channels and calcium channels in cultured rat superior cervical ganglion cells. *J Physiol.*, 1993; 468: 53–71.

Tsau Y, Wenner P, O'Donovan MJ, Cohen LB, Loew LM, Wuskell JP. Dye screening and signal-to-noise ratio for retrogradely transported voltage-sensitive dyes. *J Neurosci Methods.*, 1996; 70:121-9.

Vanden Berghe P, Tack J, Coulie B, Andrioli A, Bellon E, Janssens J. Synaptic transmission induces transient Ca^{2+} concentration changes in cultured myenteric neurons. *Neurogastroenterol Mot.*, 2000; 12:117-24.

Vanner S, Surprenant A. Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am J Physiol.*, 1996; 271:G223-30.

Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci.*, 1996; 16:2352–64.

Waggoner AS. Dye indicators of membrane potential. *Annu Rev Biophys Bioeng.*, 1979; 8:47-68.

Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. The morphology and projections of retrogradely labeled myenteric neurons in the human intestine. *Gastroenterology.*, 1995; 109:866-75.

Wattchow DA, Porter AJ, Brookes SJ, Costa M. The polarity of neurochemically defined myenteric neurons in the human colon. *Gastroenterology.*, 1997; 113:497–506.

Willard AL, Nishi R. Neurons dissociated from rat myenteric plexus retain differentiated properties when grown in cell culture. II. Electrophysiological properties and responses to neurotransmitter candidates. *Neuroscience.*, 1985; 16:201-11.

Willard AL, Nishi R. Neurons dissociated from rat myenteric plexus retain differentiated properties when grown in cell culture. III. Synaptic interactions and modulatory effects of neurotransmitter candidates. *Neuroscience.*, 1985a; 16:213-21.

Wood JD. Electrical activity from single neurons in Auerbach`s plexus. *Am J Physiol.*, 1970; 219:159-69.

Wood JD. Electrical discharge of single enteric neurons in guinea pig small intestine. *Am J Physiol.*, 1973; 225:1107-13.

Wood JD. Neuromodulation in the enteric nervous system. In Bloom SR, Polak JM, Lindenlaub E. Systematic role of regulatory peptides. FK Schattauer Verlag: New York , 1982; 131-42.

Wood JD. Communication between minibrain in gut and enteric immune system. *NIPS.*, 1991; 6:64-9.

Wouters MM, Farrugia G, Schemann M. 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. *Neurogastroenterol Motil.*, 2007; 19:5-12.

Wu JY, Lam YW, Falk CX, Cohen LB, Fang J, Loew L, Prechtl JC, Kleinfeld D, Tsau Y. Voltage-sensitive dyes for monitoring multineuronal activity in the intact central nervous system. *Histochem J.*, 1998; 30:169-87.

Xiang Z, Burnstock G. Distribution of P2Y(2) receptors in the guinea pig enteric nervous system and its coexistence with P2X(2) and P2X(3) receptors, neuropeptide Y, nitric oxide synthase and calretinin. *Histochem Cell Biol.*, 2005; 1–12.

Young HM, Furness JB. Ultrastructural examination of the targets of serotonin-immunoreactive descending interneurons in the guinea pig small intestine. *J Comp Neurol.*, 1995; 356:101–14.

Zhou X, Galligan JJ. P2X purinoceptors in cultured myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *J Physiol.*, 1996; 496:719-29.

Zhou X, Galligan JJ. Synaptic activation and properties of 5-hydroxytryptamine₃ receptors in myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1999; 290:803-10.

Zhu JX, Wu XY, Owyang C, Li Y. Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat. *J Physiol.*, 2001; 530:431–42.

Zochowski M, Wachowiak M, Falk CX, Cohen LB, Lam YW, Antic S, Zecevic D. Imaging membrane potential with voltage-sensitive dyes. *Biol Bull.*, 2000; 198:1-21.

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AH	<i>afterspike hyperpolarisation</i>
ANEP	Aminonaphthylethenylpyridinium
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
BSA	Rinder Serum Albumin
CCD	<i>charge-coupled device</i>
ChAT	Cholin Acetyltransferase
Cy	Carbocyanin
Di-4-ANEPPDHQ	1-[2-Hydroxy-3-(N,N-di-methyl-N-hydroxyethyl)ammoniopropyl]-4-[β -[2-(di-n-butylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium Dibromid
Di-8-ANEPPQ	1-(3-Trimethylammoniopropyl)-4-[β -[2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium Dibromid
Di-8-ANEPPS	4-[2-[6-(dioctylamino)-2-naphthalenyl]ethenyl]-1-(3-sulfopropyl)-Pyridinium
4-Di-2-ASP	4-(4-dimethylaminostyryl)-methylpyridinium Iodid
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
ENS	enterisches Nervensystem
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
$\Delta F/F$	Verhältnis der Veränderung der Fluoreszenzintensität zur Ausgangsfluoreszenzintensität
FBS	fetales Rinderserum
GP	<i>guinea pig</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin Creatinin Sulfat Complex
5-HTP-DP	N-acetyl-hydroxytryptophyl-5-hydroxytryptophanamid
Hu	human
IPAN	intrinsische primäre afferente Nervenzelle
MSORT	<i>Multisite optical recording technique</i>

NSE	anti-neuronspezifische Enolase
P	peripher
P	purinerg
PBS	Phosphat gepufferter Salinelösung
PGP 9.5	anti-P-Glykoprotein 9.5
PPADS	Pyridoxal Phosphat 6-Azophenyl-2',4'-Disulfonsäure
S	synaptisch
SAP	Summenaktionspotential
TTX	Tetrodotoxin

Danksagung

Ich liebe meinen Ehemann Daniel!

Ihm bin ich zu ganz großem Dank verpflichtet, da er immer der ruhige Pol an meiner Seite ist. Nur in seiner Gegenwart fühle ich mich komplett und zu 100% glücklich. Danke, dass Du mir stets verständnisvoll, unterstützend und beruhigend zur Seite stehst. Ich liebe Dich!

Auch wenn ich meine Familie in den letzten Jahren aufgrund der Distanz nicht so oft gesehen habe, so möchte ich Euch dennoch für die Unterstützung und den Zuspruch aus der Ferne danken. Ich bin stolz, glücklich und dankbar ein Teil von Euch zu sein! Bei Professor Schemann möchte ich mich dafür bedanken, dass ich meine Dissertation in seinem Lehrstuhl absolvieren durfte. Ich habe in seinem Labor beruflich und privat viel dazugelernt. Danke dafür!

Mein persönlicher Held ist Dr. Klaus Michel. Dieser Mann weiß alles! Er hatte auf jede meiner VIELEN Fragen immer eine Antwort. Ich weiß, dass Du immer sehr viel zu tun hast, aber dennoch hast Du mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden, wenn ich nicht weiter wusste. VIELEN DANK!

Dr. Sheila Vignali danke ich vor allem für die Einführung in die Präparations- und Setuptechnik, wodurch ich zügig mit meinen Experimenten loslegen konnte.

Danke an Birgit Kuch für all die immunhistochemischen Färbungen, die Du für mich gemacht hast und für die Einführung in das Fluoreszenzmikroskop.

Christa Heilmeier danke ich für das Ansetzen und Sterilfiltrieren meiner Versuchskrebslösung und für das Waschen meiner Kulturschalen.

Marlene Redl möchte ich für die vielen netten Gespräche danken, und dass sie immer Verständnis für einen zeigt. Auch bedanke ich mich noch mal ganz herzlich für meinen Kater, den ich ohne deine Vermittlung ja nicht hätte.

Auch bei allen anderen Kollegen möchte ich mich für das Zusammenarbeiten bedanken, mich hiermit von Euch verabschieden und Euch noch alles Gute für Eure weitere private und berufliche Zukunft wünschen. Machts gut!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadine Bernadette Peter
Anschrift: Schloßstrasse 3
85354 Freising/Haindlfing
geboren: 19. November 1982
in Kusel/ Rheinland-Pfalz
Familienstand: verheiratet, keine Kinder

Schulbildung

1989 – 1993 Grundschule in Sankt Julian
1993 – 1995 Realschule in Kusel
1995 – 2002 Gymnasium in Kusel
Abschluss: 12. März 2002/ Abitur

Hochschulausbildung

2002 - 2007 Studium der Biologie an der Technischen Universität
Kaiserslautern
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Tierphysiologie
Studienabschluss: 27. März 2007/ Diplom

2007 - 2010 Promotion an der Technischen Universität München
am Lehrstuhl für Humanbiologie
Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.
voraussichtlich bis zum 30. April 2010