

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
(Prof. Dr. med. D. Katschinski)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

*Direct optogenetic stimulation of smooth
muscle cells to control gastric contractility*

PUBLIKATIONSBASIERTE DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Markus Vogt

aus

Gotha

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Brüggemann

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. E. Heßmann

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Brüggemann

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Direct optogenetic stimulation of smooth muscle cells to control gastric contractility." eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 12.06.2022

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Vogt M, Schulz B, Wagdi A, Lebert J, van Belle GJ, Christoph J, Bruegmann T, Patejdl R (2021): Direct optogenetic stimulation of smooth muscle cells to control gastric contractility. *Theranostics* 11, 5569–5584

Wagdi A, Malan D, Sathyanarayanan U, Beauchamp JS, **Vogt M**, Zipf D, Beiert T, Mansuroglu B, Dusend V, Meininghaus M et al. (2022): Selective optogenetic control of G_q signaling using human Neuropsin. *Nat Commun* 13, 1765

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1.1 Funktion und Aufbau des Magens	1
1.1.2 Ablauf der Magenpassage.....	2
1.1.3 <i>Single-unit</i> -Typ der glatten Muskulatur des Magens	2
1.1.4 Aufbau und Kontraktion der glatten Muskelzelle.....	3
1.1.5 Koordination der Magenkontraktion durch ICC und ENS	6
1.1.6 Zentralnervöse Regulation der intrinsischen Magenmotorik	7
1.2 Gastroparese	8
1.2.1 Definition und Epidemiologie	8
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese	8
1.2.3 Derzeitige Therapieoptionen.....	10
1.3 Optogenetik.....	13
1.3.1 Einführung	13
1.3.2 Geschichte	13
1.3.3 Kanalrhodopsin-2: Ein Kation-permeabler, blaulicht-sensitiver Kanal	14
1.3.4 OPN5 (Neuropsin): Ein G-Protein gekoppelter, UV-Licht-sensitiver Transmembranrezeptor.....	16
1.3.5 Bisherige Anwendung optogenetischer Verfahren im Gastrointestinaltrakt.....	17
1.4 Adeno-assoziierte Viren (AAV) als Werkzeug des Gentransfers	19
2 Zusammenfassende Übersicht der angewandten Methoden.....	22
3 Ergebnisse.....	29
3.1 Histologische Analyse der Chr2/eYFP-Expression im Magen transgener Mäuse.....	29
3.2 Charakterisierung lichtinduzierter Ströme in isolierten Zellen	30
3.3 Isometrische Kraftmessung in glattnuskulären Streifen des Antrums	32
3.4 Analyse der elektrischen Kopplung durch <i>gap junctions</i>	34
3.5 Druckmessung und Propulsionsanalyse des intakten Magens	36
3.6 Druckmessung im Methylenblau-basierten Gastroparese-Modell des Magens.....	39
3.7 Lichtinduzierte Kontraktionen durch Aktivierung von OPN5 und Rekrutierung der G _q -Kaskade	40
3.8 Adeno-assoziierte Viren (AAV) zur effizienten Transduktion glatter Muskelzellen.....	44
4 Diskussion.....	46
4.1 Lichtinduzierte Kontraktionen durch Chr2 und OPN5 in der glatten Muskulatur	46
4.2 Unabhängigkeit der lichtinduzierten Kontraktionen vom enterischen Nervensystem.....	46
4.3 Erregungsausbreitung der Lichtstimulation durch <i>gap junctions</i>	47

4.4	Weiterentwicklung der optogenetischen Stimulation durch andere licht-sensitive Kanäle	48
4.5	GPCR mit Rekrutierung der G _q -Kaskade als alternative Lichtstimulation glatter Muskelzellen	48
4.6	Realisierung der optogenetischen Stimulation des Magens <i>in vivo</i>	50
4.7	Erreichen einer suffizienten Expression lichtsensitiver Proteine durch AAV-Transfer	50
5	Anhang der Publikationen	52
6	Literaturverzeichnis	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer SMC.	3
Abbildung 2: Kontraktion und Relaxation der glatten Muskelzelle.	5
Abbildung 3: Patch-Clamp Setup in whole-cell Konfiguration.	23
Abbildung 4: Histologische Analyse der ChR2/eYFP Expression im Magen transgener Mäuse.....	29
Abbildung 5: Charakterisierung lichtinduzierter Ströme in ChR2-exprimierenden SMC.....	30
Abbildung 6: Vergleich elektrophysiologischer Parameter zwischen ChR2 (schwarz) und CD-1 Wildtyp SMC (grau, wt).	31
Abbildung 7: Isometrische Kraftmessung in glattem Streifen des Magenantrums.....	33
Abbildung 8: Analyse der elektrischen Kopplung der SMC durch <i>gap junctions</i>	35
Abbildung 9: Intraluminale Druckmessung intakter Mägen.	37
Abbildung 10: Lichtinduzierte Propulsion des Chymus in intakten Mägen ChR2-transgener Mäuse.	38
Abbildung 11: Gastroparese Modell.....	40
Abbildung 12: Lichtinduzierte Kontraktionen im Dünndarm OPN5-transgener Mäuse.	42
Abbildung 13: Lichtinduzierte Kontraktionen in Uterus und Blase OPN5-transgener Mäuse.....	43
Abbildung 14: Transduktionseffizienz verschiedener AAV in kultivierten SMC.	45
Abbildung 15: ChR2 und OPN5 eröffnen neue Möglichkeiten der Stimulation glatter Muskelzellen mit Licht.	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Jeweilige AAV-Serotypen mit hohem Tropismus für die angegebenen Gewebe/Organe	21
Tabelle 2: Pipettierschema der AAV-Applikation auf SMC im 96-well.	27

Abkürzungsverzeichnis

(r)AAV	(Rekombinante) Adeno-assoziierte Viren
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CAG	Chicken- β -actin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBX	Carbenoxolone
CCh	Carbachol/Carbamoylcholin
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
ChR2	Kanalrhodopsin-2
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
EFS	Elektrische Feldstimulation
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eLI50	Halbmaximale Lichtintensität
ENS	Enterisches Nervensystem
eYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
GES	Gastrisch-elektrische Stimulation
GPCR	<i>G-protein coupled receptors</i>
H134R	Histidin \rightarrow Arginin Mutation an Position 134 von ChR2
HCN-Kanal	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-Kanal</i>
hOPN5	Humanes OPN5
LED	<i>light-emitting diode</i>
ICC	<i>interstitial cells of cajal</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
MLKK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
MLKP	Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase
NO	Stickstoffmonoxid
OPN5	Neuropsin
PEGASOS	<i>PEG-associated solvent system</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
ROI	<i>region of interest</i>
ROCC	<i>receptor-operated calcium channels</i>
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
SMC	<i>smooth muscle cells</i>
THS	<i>tyrod-hepes-solution</i>
TTX	Tetrodotoxin
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
VDCC	<i>voltage-dependent calcium channels</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1.1 Funktion und Aufbau des Magens

Der Magen ist ein Hohlorgan mit glatter Muskulatur und der erste Abschnitt des Gastro-Intestinaltraktes. Seine Aufgaben sind der Verdau und Transport der aufgenommenen Nahrung. Hierzu zählen drei zentrale Funktionen: Denaturierung und Verdauung zugeführter Nährstoffe, Inaktivierung aufgenommenener, potentiell pathogener Mikroorganismen und die mechanische Erzeugung eines homogenen Chymus mit peristaltischem Weitertransport in das nachfolgende Duodenum. Erstere beiden werden durch die Exozytose diverser Proteasen und Lipasen sowie der Bildung eines sauren Magenschleims durch die Mukosa bewerkstelligt. Letzteres ist die Aufgabe eines komplexen Zusammenspiels glatter Muskulatur und nervaler Regulation durch das enterische Nervensystem (ENS).

Makroskopisch lässt sich der Magen in funktionell spezialisierte Abschnitte untergliedern: Die Cardia schließt sich unmittelbar an den Ösophagus an und ist das Areal der initialen Nahrungsaufnahme. Das proximale Drittel des Magens wird durch den Fundus gebildet, ein drüsenreicher Wandabschnitt, der sich bei Nahrungsaufnahme flexibel ausdehnt und eine konstante Wandspannung aufbauen kann. Er eignet sich damit zur temporären Speicherung aufgenommenener Nahrung. Im mittleren Drittel befindet sich das Corpus, das in der großen Krümmung das Schrittmacherzentrum für die Initiation von Kontraktionswellen enthält. Dieses ist der Ursprung für repetitive motorische Aktivitäten, die für eine Vermischung der Nahrung mit dem enzymhaltigen Mucus essenziell sind. Der entstandene Chymus gelangt in das Antrum, das kraftvolle, peristaltische Kontraktionswellen mit hohen Scherkräften generiert. Dies führt zur Verkleinerung und Durchmischung der Nahrung mit anschließender pulsatiler Weiterleitung in das Duodenum (O'Grady und Abell 2015; Brandstaeter et al. 2019; Liu et al. 2021).

Die äußere Wandschicht des gesamten Magens wird durch glatte Muskulatur gebildet, der Tunica muscularis. Histologisch lässt sich die Tunica muscularis in zwei orthogonal zueinander verlaufende Muskelfaserschichten einteilen: Das dünne Stratum longitudinale ist außen gelegen und für die Kraftentwicklung in Längsrichtung verantwortlich. Das dicke Stratum circulare besteht aus ringförmig um das Hohlorgan angeordneten Muskelzellen und verkleinert somit bei Kontraktion den Durchmesser des Magens. Die Nahrungspassage wird durch koordinierte peristaltisch voranschreitende Wellen ringförmiger Kontraktionen ermöglicht.

1.1.2 Ablauf der Magenpassage

Peristaltisch voranschreitende Kontraktionen des Magens zeigen eine Frequenz von 3-4 pro Minute und gehen vom Schrittmacherzentrum des Corpus aus. Die Ausbreitung der Erregung erfolgt dabei pandirektional über den sogenannten Auerbach-Plexus, einem Teil des ENS. Jedoch erfolgt die Erregungsausbreitung entlang der zirkulären Achse um ein Vielfaches schneller als in longitudinaler Richtung. Hierdurch kommt es zur Ausbildung einer vollständig ringförmigen Kontraktion auf Höhe des Corpus, die sich anschließend durch die langsamere longitudinale Erregungsausbreitung peristaltisch über das Antrum in Richtung Pylorus fortbewegt (O'Grady und Abell 2015). Im Pylorus selbst liegen keine Schrittmacherzellen vor, wodurch peristaltische Wellen nicht erneut neural verstärkt und weitergeleitet werden. Durch diese elektrische Isolation können die verschiedenen Kontraktionsmuster von Magen und Duodenum gewährleistet werden (Wang et al. 2005). Der Pylorus selbst ist hingegen durch einen durchgehend hohen Sphinktertonus charakterisiert und verfügt über eine hohe Dichte an vagal modulierten, inhibitorischen Nervenfasern. Diese können durch Freisetzung von NO und VIP (vasoaktives intestinales Polypeptid) den Tonus des Pylorussphinkters im Zuge der Nahrungspassage vorübergehend herabsetzen (siehe Abbildung 2). Gelangt der Chymus in das Duodenum, erfolgt die Aktivierung dortiger mechano- und chemosensibler Rezeptoren, die über ein Feedback-Mechanismus den Sphinktertonus mittels Substanz P und Acetylcholin wieder erhöhen (Yuan et al. 2001). Durch dieses Zusammenspiel kann die Nahrungspassage vom Magen zum Duodenum präzise reguliert werden.

1.1.3 *Single-unit*-Typ der glatten Muskulatur des Magens

Die glatte Muskulatur kommt neben dem Gastrointestinaltrakt auch in anderen Geweben wie z.B. Bronchien, Harnblase, Uterus aber auch den Gefäßwänden vor. Generell wird sie in zwei Typen unterschieden, dem sogenannten *Single-Unit*- und *Multi-Unit*-Typ. Die glatten Muskelzellen des Magens gehören dabei zum *Single-unit*-Typ: Die einzelnen SMC sind durch eine hohe Zahl interzellulärer *gap junctions* untereinander elektrisch gekoppelt und bilden ein funktionelles Synzytium. Die Muskelzellbündel werden deshalb durch autonome Nervenfasern koordiniert aktiviert. Dies führt zu einer synchronen Aktivierung und phasischen Kontraktionswelle der Muskulatur und stellt die Grundlage einer gerichteten Peristaltik dar.

Der *Multi-unit*-Typ der glatten Muskulatur kommt beispielsweise in Blutgefäßen vor. Hier ist die elektrische Kopplung zwischen den SMC durch eine geringere Dichte an *gap junctions* weniger stark ausgeprägt. Die Muskelzellen können einzeln oder in kleinen Gruppen neural angesteuert werden, langstreckig koordinierte Kontraktionen spielen hier eine untergeordnete Rolle. Vielmehr ist die tonische Veränderung des Gefäßradius zur Kontrolle der Durchblutung nachgeschalteter Organe relevant (Elden und Bortoff 1984; Bauer und Sanders 1986).

1.1.4 Aufbau und Kontraktion der glatten Muskelzelle

Die glatte Muskulatur stellt neben der quergestreiften Skelett- und Herzmuskulatur die dritte grundsätzliche Muskelart dar. Die Grundlage der Kontraktion bildet die Interaktion zwischen Aktin und Myosin. Die Verankerung dieser intrazellulären Proteinfilamente erfolgt im glatten Muskel zwischen sogenannten *dense bodies*. Hierbei handelt es sich um aus α -Actinin und β -Aktin bestehende Verdichtungskörper (Aguilar und Mitchell 2010), die die Verankerung der kontraktile Fasern gewährleisten. Die *dense bodies* sind dabei untereinander sowie mit der Zellmembran mittels Intermediärfilamenten verbunden. Dies gewährleistet eine effiziente Kraftübertragung nach Initiation des klassischen Querbrückenzyklus zwischen Aktin und Myosin (Fitts 2008). Diese Aktin- und Myosinfilamente verbinden dabei die unregelmäßig angeordneten *dense bodies*, was zu einer pandirektionalen Verkürzung und Kraftentwicklung in glatten Muskelzellen führt (Abbildung 1). Dies steht im Kontrast zur quergestreiften Skelett- und Herzmuskulatur, deren Kontraktionsapparat auf in Reihe geschalteten Sarkomeren beruht und daher eine Kontraktion ausschließlich in Längsachse dieser Muskelzellen zulässt (Clark et al. 2002).

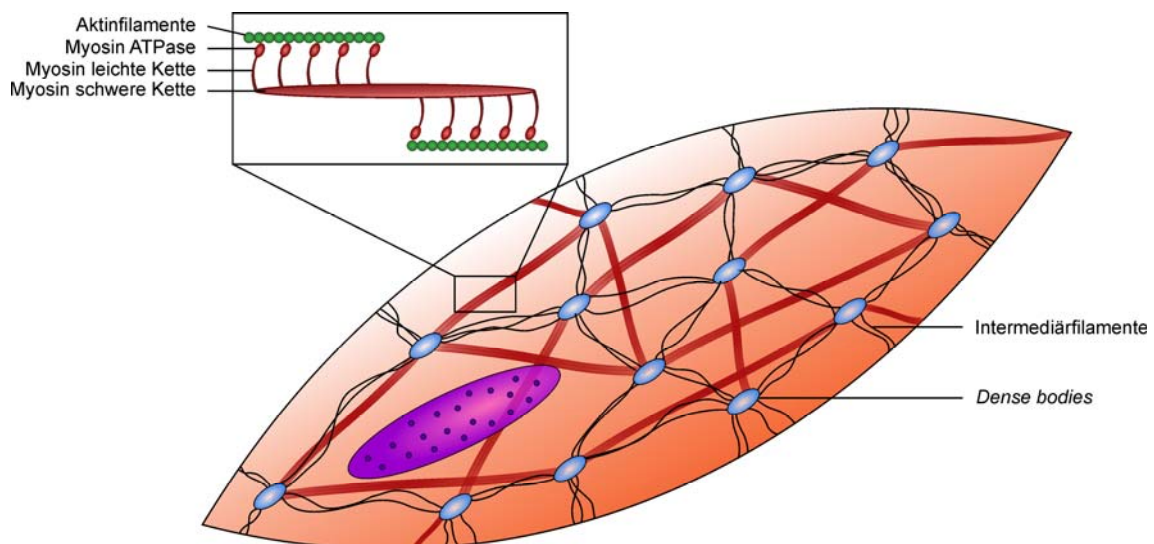


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer SMC. Dargestellt sind die sog. *dense bodies*, die untereinander sowie mit der Membran über Intermediärfilamente verankert sind. Durch die kontraktile Filamente Aktin und Myosin kann eine pandirektionale Verkürzung der Zelle und Kraftübertragung erreicht werden.

Die Kontraktion wird durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eingeleitet, die durch diverse Mechanismen erzielt werden kann (Abbildung 2): Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum über Transmembrankanäle stellt hierbei eine Möglichkeit dar. Diese Kanäle können wie im Fall der *voltage-dependent calcium channels (VDCC)* spannungssensibel sein und bei Aktionspotenzialen zu Ca^{2+} -Einstrom führen oder auch durch Bindung verschiedener Liganden geöffnet werden (sogenannte *receptor-operated calcium channels, ROCC*) (McFadzean und Gibson 2002).

Darüber hinaus kann durch Aktivierung sogenannter GPCR (*G-protein coupled receptors*) mit klassischer *second-messenger*-Kaskade die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht werden. Dies geschieht meist durch die Bindung von Liganden wie Neurotransmittern oder Hormonen. Hierbei ist vor allem die Freisetzung von Acetylcholin aus den Synapsen parasympathischer Nervenendigungen sowie enterischer Neurone wichtig. Im Magen-Darm-Trakt bindet Acetylcholin u.a. an den muskarinergen Acetylcholinrezeptor M_3 , einem GPCR auf der Oberfläche glatter Muskelzellen aber auch anderer Zelltypen. Die nachfolgende Rekrutierung des heterotrimeren G_q -Protein führt zur Aktivierung der Phospholipase C, die das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) umsetzt. DAG führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die neben proliferativen Einflüssen auf den Zellstoffwechsel ebenfalls zur erhöhten Expression und Phosphorylierung der L-Type VDCC führt. Dies steigert im Folgenden transmembrane Ca^{2+} -Einströme (Weiss et al. 2012; Raifman et al. 2017). IP_3 hingegen bindet an den IP_3 -Rezeptor auf der Oberfläche des glatten endoplasmatischen Retikulums, bei dem es sich um einen Liganden-gesteuerten Ca^{2+} -Kanal handelt. Dessen Öffnung bedingt ebenfalls eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.

In der gemeinsamen Endstrecke bildet das freigesetzte Ca^{2+} einen Komplex mit Calmodulin, der die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase aktiviert. Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins, wodurch die ATPase-Aktivität des Myosin-Kopfes stark erhöht wird und es abschließend durch Interaktion mit Aktin zur Einleitung des Querbrückenzyklus und nachfolgender Kontraktion kommt. Initiierte Kontraktionen können durch die Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosins schließlich zum Erliegen gebracht werden, was durch die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLKP) katalysiert wird. Dieses Enzym ist u.a. bei Anwesenheit von cAMP/Proteinkinase A oder cGMP/Proteinkinase G (z.B. durch NO induziert) aktiv (Webb 2003).

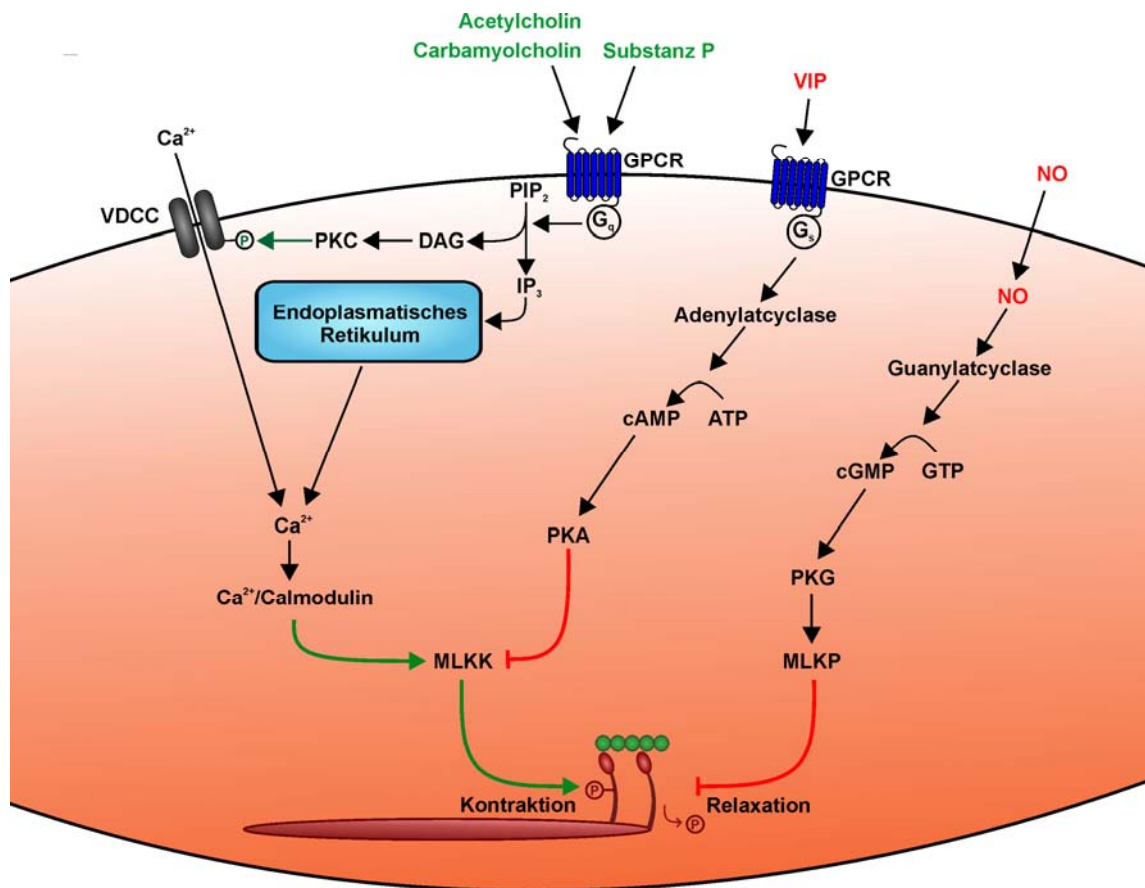


Abbildung 2: Kontraktion und Relaxation der glatten Muskelzelle. Die Kontraktion oder Relaxation einer SMC wird über den Phosphorylierungsstatus der Myosin-Leichte-Kette sowie der Anwesenheit von Ca^{2+} reguliert. Nach Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch z.B. VDCC oder G_q -gekoppelte Membranrezeptoren kommt es zur Aktivierung der MLKK, wodurch die Myosin-Leichte-Kette phosphoryliert und der Querbrückenzyklus eingeleitet wird. Eine Relaxation kann über die G_i -gekoppelte Inhibition der MLKK oder über eine z.B. NO-abhängige Aktivierung der MLKP erfolgen.

1.1.5 Koordination der Magenkontraktion durch ICC und ENS

Um die Kontraktion der glatten Muskulatur zu initiieren und koordiniert über den Magen weiterzuleiten, ist eine fein abgestimmte Innervation von Nöten. Diese komplexen Abläufe werden durch ein lokales Nervensystem, dem ENS, reguliert. Dieses eigenständige und autonom funktionale Nervensystem, das im gesamten Gastrointestinaltrakt vorkommt, wird in zwei Strukturen untergliedert: Dem in der Tela submucosa gelegenen Plexus submucosus (Meissner-Plexus), der die Innervation der Drüsenmuskulatur und Sekretion steuert. Der Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) hingegen liegt zwischen *Stratum circulare* und *longitudinale* und koordiniert die Erzeugung und Weiterleitung der Kontraktionen.

Die Schrittmacherfunktion selbst obliegt den *Interstitial cells of cajal* (ICC). Diese spezialisierten Zellen sind vornehmlich im Auerbach-Plexus des ENS zu finden und bilden in der äußeren Krümmung des Corpus das Schrittmacherzentrum des Magens. In diesem haben die peristaltischen Kontraktionen ihren Ursprung und werden durch das ENS koordiniert weitergeleitet. In den ICC kommt es zu spontanen Schrittmacherpotenzialen (sogenannten *slow waves*), die wahrscheinlich durch *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide*-Kanäle (HCN) hervorgerufen werden (Shahi et al. 2014). Die resultierende Depolarisation wird über *gap junctions* elektrotonisch an benachbarte SMC weitergegeben. Dies wiederum führt zur Depolarisation der Muskelzellen von ihrem Ruhemembranpotenzial von ca. -60 mV ausgehend (Kuriyama et al. 1970) auf ein Membranpotenzial zwischen -40 und -25 mV. Während das bereits in einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der VDCC resultiert, wird die Schwelle zur Ausbildung eines Aktionspotenzials in SMC häufig erst durch synergistische Effekte bestimmter Subpopulationen von enterischen Neuronen des ENS erreicht:

Die Erregung parasympathischer Efferenzen, die von präganglionären vagalen Motorneuronen ausgehen, sind primär cholinerg und aktivieren mittels Ausschüttung von Acetylcholin postganglionäre Nervenzellen des ENS über nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren. Hierzu zählen myenterische Neurone und die ICC selbst. Das ENS kann nachfolgend über zwei antagonistisch wirkende Innervationsachsen die gastrointestinale Motorik präzise steuern (Browning und Travagli 2014):

Über eine Population cholinergischer Motorneurone kann die Suszeptibilität der SMC mittels muskarinergischer M_3 -Acetylcholin-Rezeptoren erhöht werden: Wie oben beschrieben, führt die Aktivierung der G_q -Signalkaskade u.a. zur erhöhten Expression der VDCC, ihrer PKC-vermittelten Phosphorylierung und Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Hierdurch können vorbestehende Schrittmacherpotenziale der ICC überschwellig werden und Kontraktionen in SMC induzieren oder verstärken (Sanders et al. 2006; Tanahashi et al. 2021). Der M_3 -Acetylcholinrezeptor kann pharmakologisch mit Carbamoylcholin (CCh), einem Strukturanalogen des Acetylcholins, aktiviert werden.

Antagonistisch zu den cholinergen Motorneuronen des ENS findet sich dort ebenfalls die Population sogenannter nicht-adrenerger nicht-cholinerger (*NANC*) Neurone. Durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) oder VIP bewirken diese eine Relaxation der glatten Muskulatur.

1.1.6 Zentralnervöse Regulation der intrinsischen Magenmotorik

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass die Dehnung des proximalen Magens vago-vagale Reflexe auslöste, die zur Relaxation des Fundus führten (Cannon und Lieb 1911), peristaltische Kontraktionen des Antrums hervorriefen (Andrews et al. 1980) und die weitere Aufnahme von Nahrung inhibierte (Phillips und Powley 1998). Zur Kommunikation mit übergeschalteten, zentralnervösen Zentren konnten zwei Typen von afferenten vagalen Nervenendigungen im ENS identifiziert werden: Sogenannte *intramuscular arrays*, die vor allem in Nähe der ICC zu finden sind, sowie *intraganglionic laminar endings*, die eine räumliche Assoziation zu myenterischen Ganglien und Neuronen aufzeigen. Diese beiden Typen vagaler Afferenzen stellen vermutlich dehnungs-sensitive Mechanorezeptoren dar. Nach nahrungsinduzierter Wanddehnung des Magens lösen sie vago-vagale, zentralnervöse Reflexbögen aus, worüber sowohl das ENS als auch die ICC moduliert werden und reaktive peristaltische Kontraktionen des Magens einsetzen (Zagorodnyuk et al. 2001; Powley et al. 2008).

Es lässt sich zusammenfassen, dass die zielgerichtete peristaltische Motorik des Magens einem komplexen Zusammenspiel von zentralnervös-vagalen Nervenendigungen, exzitatorischen und inhibitorischen Nervenzellpopulationen des ENS sowie der endogenen Aktivität der ICC unterliegt. Sollte es in einem dieser Anteile zu Schäden oder Störungen kommen, kann dies zu insuffizienten oder gar ausbleibenden Kontraktionen führen.

1.2 Gastroparese

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Gastroparese ist definiert als die verzögerte Passage aufgenommener Mageninhalte, die sich nicht durch das Vorhandensein einer physischen Blockade erklären lässt. Es handelt sich demzufolge um eine endogene Pathologie des Magens, die durch die insuffiziente Entwicklung peristaltischer Kontraktionen charakterisiert ist. Dies bedingt nachfolgend einen verlangsamten Transit aufgenommener Nahrung und/oder dessen Rückstau (Camilleri et al. 2018). Die betroffenen Patienten leiden unter Oberbauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, früher Sättigung oder Gewichtsabnahme. Diese unspezifischen Symptome erschweren eine frühe Diagnosestellung und betroffene Patienten werden häufig mit allgemeinen ICD-10 Klassifikationen für Übelkeit und Erbrechen diagnostiziert. Das führt dazu, dass publizierte Angaben zur Inzidenz und Prävalenz die tatsächliche Häufigkeit wahrscheinlich stark unterrepräsentieren (Navas et al. 2017). Studien aus den USA haben für die Gastroparese eine Prävalenz von 37,8/100 000 bei Frauen und 9,6/100 000 bei Männern beschrieben (Jung et al. 2009). Unter anderem auf Basis epidemiologischer Daten des Diabetes mellitus, der häufigsten identifizierbaren Ursache der Gastroparese, wird geschätzt, dass allein in den Vereinigten Staaten circa 10 Millionen Patienten unter dieser Erkrankung leiden (Navas et al. 2017). Die Prävalenz des Diabetes mellitus hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen (Center for Disease Control 2017) und wird voraussichtlich weiter ansteigen (Lin et al. 2018). Zusammengefasst hat die Gastroparese bereits eine große Bedeutung, die perspektivisch weiterhin zunehmen wird.

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die idiopathische Form der Gastroparese stellt mit 36% das größte Patientenkollektiv dieser Erkrankung dar und lässt sich nicht auf spezifische Ursachen zurückführen. Eine Assoziation zu vorangegangenen viralen Infektionen ist beschrieben, die für Schäden im ENS oder der glatten Muskulatur verantwortlich gemacht werden.

Die häufigsten identifizierbaren Ursachen der Gastroparese sind Diabetes mellitus (29%), vorangegangene Operationen des Magens (13%), Morbus Parkinson (7,5%) und vaskuläre Erkrankungen (4,8%) (Soykan et al. 1998). Diabetes mellitus ist nicht nur durch seinen Stellenwert als Volkskrankheit und häufigster Ursache der Gastroparese von zentralem Interesse, sondern kann ebenfalls durch etablierte, Betazell-depletierende Tiermodelle gut untersucht werden (Li und Chen 2014). Dadurch ist die Pathogenese der Gastroparese bei diesem Krankheitsmodell bisher am besten untersucht und verstanden.

Hierbei sind Schäden innerhalb des ENS und daraus folgend eine mangelhafte vagale Innervation die Ursache, hervorgerufen durch eine ausgeprägte diabetische Neuropathie des autonomen Nervensystems im Spätstadium der Erkrankung. In Biopsien betroffener Patienten werden eine Minderung der Dichte und der Myelinisierung innervierender Axone

sowie strukturelle Veränderungen der umgebenden Schwann-Zellen festgestellt (Guy et al. 1984; Yarandi und Srinivasan 2014). Ebenso wurden -in idiopathischer und diabetischer Gastroparese- lymphozytäre Infiltrate im Plexus myentericus, eine verminderte Anzahl von Nervenzell-Ganglien des ENS sowie eine Depletion der ICC beobachtet (Harberson et al. 2010).

Aktuelle Forschungsergebnisse sehen in erhöhtem oxidativen Stress, der mit deutlichem Immuzellinfiltrat durch Makrophagen assoziiert ist, einen wichtigen Faktor für die Entstehung der Krankheit (Koch 2015): Der oxidative Stress führt zum Verlust der Rezeptortyrosinkinase cKit der ICC, was den Untergang dieser essenziellen Schrittmacherzellen zur Folge hat. Eine Hochregulation der Hämoxxygenase-1 in Makrophagen zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies führt zu einer Resistenz diabetischer Mäuse vor der Entwicklung einer Gastroparese und trägt zum Erhalt funktionaler ICC bei (Choi et al. 2008). Auch Mäuse mit knock-out des *Csf1* (*Colony stimulating factor-1*) und daraus resultierender Depletion gewebständiger Makrophagen zeigen einen Schutz vor Entwicklung der Gastroparese nach Induktion eines Diabetes mellitus (Cipriani et al. 2016).

Der durch diese Mechanismen hervorgerufene Untergang der ICC und des ENS führt zu Funktionsstörungen des in 1.1.5 beschriebenen Erregungsbildungs- und Leitungssystems des Magens. Um die Magenpassage zu gewährleisten, ist die im Schrittmacherzentrum initiierte Erregung mit rapidem Ringschluss auf Corpus-Höhe und der langsamen Weiterleitung in longitudinaler Ausrichtung mit einhergehender Peristaltik essenziell. Analysen der elektrischen Aktivität der Magenwand durch Messungen mit *multi-electrode arrays* konnten zwei pathologische Ursachen zur Entstehung gastrischer Arrhythmien aufzeigen. Beide können in Maximalausprägung eine Gastroparese bedingen (Cheng et al. 2013; O'Grady und Abell 2015):

Zum einen kann die Erregungsbildung in ektopen Arealen erfolgen, außerhalb des physiologischen Schrittmacherzentrums in der großen Krümmung des Magens. Diese Erregungen bilden zwar komplettierte Kontraktionsringe, die sich jedoch in anterograder und retrograder Richtung ausbreiten können. Ebenso kann es durch Schäden im ENS zur verlangsamten Erregungsleitung oder Blockade der rapid-zirkulären Erregungsausbreitung kommen. Hierdurch misslingt die Ausbildung eines komplettierten Kontraktionsrings, wodurch es zu abnormen Kontraktionen mit kreisförmiger Ausbreitung um das Blockadeareal mit potenziellem *re-entry* kommt. Beide Mechanismen lassen eine koordinierte Propulsion nicht zu.

Im Gegenteil zu den pathologischen Veränderungen der vagalen Innervation, der Integrität des ENS und der Funktionalität der ICC finden sich in der glatten Muskulatur kaum Veränderungen. Die SMC zeigen einen normalen Phänotyp oder nur milde fibrotisch-atrophische Veränderungen (Koch 2015), die jedoch auch Folge fehlender Innervation sein können. Funktionell konnte gezeigt werden, dass das Antwortverhalten der gastrischen

Muskulatur auf transmurale elektrische Stimulation des ENS in diabetischen Mäusen abgeschwächt ist. Die direkte Stimulation der Muskelzellen durch Acetylcholin bleibt jedoch unverändert wenn nicht sogar gar leicht verstärkt (Xue und Suzuki 1997). Dies demonstriert die erhaltene Funktion der gastroparetischen Muskulatur.

Therapeutische Maßnahmen, die die glatte Muskulatur direkt stimulieren und somit unabhängig vom geschädigten ENS agieren können, stellen daher einen vielversprechenden Ansatz neuer Behandlungsoptionen der Gastroparese dar.

1.2.3 Derzeitige Therapieoptionen

Die derzeitige Therapie der Gastroparese beginnt mit konservativen Verfahren wie einer Änderung der Ernährung, sowohl in Bezug auf die Nahrungsmittel selbst als auch deren Einnahmefrequenz. Viele Patienten in vor allem fortgeschrittenen Stadien sprechen jedoch ungenügend darauf an. Eine Pharmakotherapie kann versucht werden, wobei keine Wirkstoffe zur Verfügung stehen, die nebenwirkungsarm sind und über einen längeren Zeitraum verabreicht werden dürfen. Die ultima-ratio stellen chirurgische Interventionen dar, die mit dem Verlust der physiologischen Magenpassage einhergehen und zu weiteren Komplikationen wie Früh- und Spätdumping führen können. Die gastrisch-elektrische Stimulation wird derzeit nur zur vorübergehenden Symptombesserung verwendet, verbessert aber nicht die Magenpassage und schafft bei voranschreitendem Krankheitsbild keine langfristige Abhilfe.

1.2.3.1 Diätetische Therapieverfahren

Die Basistherapie betroffener Patienten stellen in frühen Krankheitsstadien diverse diätetische als auch Lifestyle-Änderungen dar (Krishnasamy und Abell 2018). Hierzu zählen Maßnahmen wie eine minimierte Aufnahme von Fetten und Ballaststoffen oder die Ernährung mittels flüssiger Speisen wie Suppen oder Smoothies. Mahlzeiten werden meist in kleinen Portionen eingenommen, dafür häufiger über den Tag verteilt. Bei der diabetischen Form der Gastroparese sind körperliche Bewegung und blutzuckersenkende Medikamente wichtige Instrumente zur Bekämpfung hoher Glukosespiegel. Die verlangsamte Magenpassage stellt behandelnde Ärzte jedoch vor Herausforderungen bei der Behandlung mit oralen Antidiabetika, da die Pharmakokinetik hierdurch stark verändert sind. Essenzielle Pharmaka wie Metformin, das den Goldstandard im Management von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 darstellt, sind bei vorliegender Gastroparese daher nicht empfohlen.

Während einem gewissen Anteil der Patienten hierdurch geholfen werden kann, stellt sich der Großteil therapierefraktär dar und bedarf intensivierter Maßnahmen.

1.2.3.2 Pharmakologische Therapien

Hierbei wird auf Medikamente mit prokinetischer Wirkung zurückgegriffen. In den Vereinigten Staaten ist Metoclopramid das einzige von der FDA zugelassene Pharmakon für die symptomatische Behandlung der Gastroparese (Navas et al. 2017). Andere Substanzen wie Domperidon müssen off-label verwendet werden und dürfen auch in Deutschland nur sieben konsecutive Tage zum Einsatz kommen (BfArM 2014b). Dies ist systemischen Nebenwirkungen geschuldet, da die stimulierten Rezeptoren auch in anderen Zellen außerhalb der glatten Muskulatur des Magens exprimiert sind. Diese unspezifische Wirkung resultiert in Effekten an diversen anderen Organen und kann schwere Nebenwirkungen zur Folge haben: Metoclopramid beispielsweise kann zur Ausprägung einer Gynäkomastie, Galaktorrhoe oder verlängerten QT-Intervall führen. Daher darf es in den USA nach einer im Jahr 2009 erfolgten *Black Box Warning* (Krishnasamy und Abell 2018) nur für maximal drei Monate zur Behandlung eingesetzt werden. In Deutschland ist die Zulassung für die Therapie der Gastroparese 2014 sogar gänzlich entzogen wurde (BfArM 2014a). Nicht nur wegen der fehlenden Spezifität der pharmakologischen Therapie, sondern auch aufgrund ihrer unzuverlässigen Wirkung bei refraktären Patienten, ist die aktuell verfügbare Medikation unzureichend.

1.2.3.3 Chirurgische Verfahren

Die Ultima-ratio derzeitiger Therapiemöglichkeiten stellen chirurgische Verfahren dar. Hierbei können Interventionen wie transpylorische Stents oder laparoskopische Pyloroplastien die Nahrungspassage erleichtern. Bei ausgeprägter Symptomatik kann ebenfalls eine komplette oder subtotale Gastrektomie erfolgen (Krishnasamy und Abell 2018). Derartige chirurgische Eingriffe gehen jedoch immer mit dem Verlust einer physiologischen Magenpassage einher: Bei unkontrolliert schneller Weiterleitung droht das hyperosmotisch bedingte Frühdumping mit starkem Flüssigkeitsverlust in den Dünndarm sowie das GLP-1 vermittelte Spätdumping mit postprandial hypoglykämischen Episoden. Operative Interventionen können daher nicht als optimale Behandlungsmöglichkeit der Gastroparese angesehen werden.

1.2.3.4 Gastrisch-elektrische Stimulation (GES)

Gastrisch-elektrische Stimulation (GES) nutzt die elektrische Feldstimulation (EFS), um im Idealfall Kontraktionen in der glatten Muskulatur des Magens zu triggern und wird bereits seit Jahrzehnten erprobt. Hierbei werden zwei grundlegend verschiedene Varianten der Stimulation unterschieden (Soffer 2012):

Bei dem Ansatz der hochenergetischen Stimulation werden lange, niedrigfrequente elektrische Pulse von mehreren hundert Millisekunden eingesetzt. Hierdurch kann eine direkte Erregung der glatten Muskelzellen erreicht und nachfolgend eine physiologische Kontraktionsfrequenz von 3-4 min⁻¹ erzwungen werden. Die Notwendigkeit hoher Energie bei dieser Methode ist durch die Öffnung spannungsgesteuerter L-Type Calciumkanäle

begründet, die erst bei einer Membranspannung von ca. - 20 mV öffnen (Kohda et al. 1997). Der anschließende Ca^{2+} -Einstrom gewährleistet die Einleitung der Kontraktion in diesen Muskelzellen. Dies steht im Kontrast zum niedrigen Schwellenpotential der in Neuronen oder Kardiomyozyten vorkommenden spannungsgesteuerten Natriumkanäle, die bereits bei einem Membranpotential von ca. - 55 mV offen wären (Bean 2007; Grant 2009).

Prinzipiell kann diese Art der GES eine Magenmotorik also bedingt wiederherstellen. Allerdings treten Komplikationen auf, die trotz jahrzehntelanger Bemühungen den Einzug in den klinischen Alltag verhindert haben: Durch den enormen Verbrauch elektrischer Energie bedarf es Akkumulatoren mit hoher Speicherkapazität und/oder regelmäßiger Aufladung. Beides erschwert die Implantation portabler Geräte mit einer Nutzungsdauer von vielen Jahren, wie es bei Herzschrittmachern der Standard ist. Dadurch, dass elektrische Felder alle Zelltypen in Reichweite depolarisieren, mangelt es der EFS zudem an Spezifität. So werden neben der glatten Muskulatur, die das Zielgewebe darstellt, auch afferente Nerven miterregt. Nozizeptive Neurone können Unbehagen oder Schmerzen verursachen. Außerdem kommt es zur Erregung der benachbarten Skelettmuskulatur wie dem Diaphragma. Zusätzlich führt die EFS zur Freisetzung toxischer Endprodukte wie reaktiver Sauerstoffspezies, Cl_2 , O_2 oder H_2 an den Elektroden, die bei langfristigem Einsatz zur irreversiblen Zellschädigung beitragen können (Merrill et al. 2005).

Demgegenüber steht der Ansatz der niedrig-energetischen Stimulation mittels mehrerer, ca. 330 μs kurzer Pulse in einer hochfrequenten Applikation von ca. 14 Hz, die alle 5 s verabreicht wird. Diese Stimulation führt zur Erregung freier afferenter Nervenendigungen in der Magenwand durch eine Depolarisation der Axone auf das Na_v -Schwellenpotential von ca. -55 mV. Im Gegensatz zur direkten Stimulation der SMC, bei der das oben beschriebene Schwellenpotential von circa. -20 mV erreicht werden muss, genügt hier das niedrig-energetische Stimulationsprotokoll. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass diese Modulation afferenter Nervenbahnen Symptome wie Übelkeit und Erbrechen verbessern kann. Ein solches Konzept findet bereits im Rahmen des gastrischen Neurostimulationssystems Enterra® der Firma Medtronic bei fortgeschrittenen Formen der Gastroparese klinische Anwendung (Yin et al. 2012). Jedoch ist dieses System durch die Applikation geringer elektrischer Energie nicht in der Lage, glatte Muskelzellen direkt zu stimulieren und hat keine signifikante Besserung der Magenpassage zur Folge. Diese Therapie kann daher als vorübergehend hilfreiche, symptomatisch orientierte Behandlungsoption angesehen werden, ohne kausal auf die zugrundeliegenden Ursachen und den Progress der Gastroparese einzuwirken. Generell liegen derzeit aber nur wenige klinische Studien mit kleinen Kohorten vor, die den Effekt der GES auf den Gastroparese-Patienten untersuchen. In diesen Studien wurden bisher keine großen Erfolge der GES festgestellt. Häufig wurde eine lediglich geringfügige, teils nicht-signifikante Besserung der Symptomatik beschreiben (Abell et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass aktuelle Therapiemöglichkeiten aufgrund ihrer Unspezifität, schwerwiegender Nebenwirkungen, häufiger Therapierefraktärität oder insuffizienter Wirksamkeit unzureichende Optionen darstellen. Es besteht ein Bedarf an grundlegend neuartigen Ansätzen zur Behandlung der Gastroparese.

1.3 Optogenetik

1.3.1 Einführung

Die Optogenetik ist eine neue Methode, bei der die genetische Veränderung von Zellen zur Expression lichtsensitiver Proteine führt. Diese ermöglichen durch Applikation von Licht die Manipulation des Membranpotentials, intrazellulärer Signalwege oder anderer zellulärer Prozesse wie der Genexpression.

Dies bringt signifikante Vorteile gegenüber der EFS mit sich: Zwar muss in erster Linie ein lichtsensitives Protein in den Zielzellen exprimiert werden. Jedoch kann durch die Verwendung Zelltyp-spezifischer Viren zur Transduktion oder Promotoren zur Expression des Gens eine selektive Lichtsensitivität des gewünschten Zelltyps erreicht werden. Hierdurch können die glatten Muskelzellen ohne Kostimulation nahegelegener, potenziell nozizeptiver Neurone oder anderer Zellen im intakten Magen stimuliert werden. Ein weiteres Vorteil ist die Möglichkeit der präzisen und räumlichen variablen Beleuchtung, die durch die Stimulation mit EFS nicht erreicht werden kann. So können gezielte Bereiche eines Gewebes oder Organs durch eine angepasste Belichtung stimuliert werden. Ebenso stellt die Reaktionsschnelligkeit lichtsensitiver Kanäle einen Vorteil dar: Die Latenz moderner Leuchtmittel wie LEDs liegt heutzutage bei wenigen Nanosekunden und ist somit für biologische Verhältnisse nahezu instantan. Dadurch ist die zeitliche Auflösung der optogenetischen Stimulation primär durch die Kinetik der verwendeten Proteine limitiert. Vor allem bei lichtsensitiven Kanälen liegt diese *on*- und *off*-Kinetik im Bereich weniger Millisekunden (Lin 2011), die aber auch erhalten bleibt, solange das Licht an ist (Bruegmann et al. 2010). Im Gegensatz zur EFS oder gar der pharmakologischen Stimulation ermöglicht die Optogenetik daher eine bisher unerreichte zeitliche Auflösung und Bandbreite.

1.3.2 Geschichte

Bereits im 19. Jahrhundert war bekannt, dass Algen der Art *Chlamydomonas reinhardtii* auf Licht reagieren und die lichtinduzierte Bewegung von der Intensität abhängig ist (Hegemann und Nagel 2013). Erst durch Studien Ende des 20. Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass derartige Reaktionen bereits wenige Millisekunden nach der Lichtstimulation erfolgen. Aufgrund der rapiden Kinetik war es naheliegend, dass diese Reaktionen durch

membranständige Ionenkanäle induziert werden, deren Leitfähigkeit mit der applizierten Photonenenergie in Zusammenhang steht (Braun und Hegemann 1999). Die anschließende Suche nach lichtsensitiven Kanälen im Genom dieser Algenart wurde durch Vergleiche in Sequenzhomologien der bereits bekannten lichtsensitiven Protonpumpe *Bacteriorhodopsin* erleichtert (Oesterhelt und Stoerkenius 1971; Herrmann und Rayfield 1976). 2002 und 2003 wurden schließlich zwei aus der cDNA Bibliothek von *Chlamydomonas reinhardtii* identifizierte Ionenkanäle beschrieben und charakterisiert: *Kanalrhodopsin-1*, ein lichtgesteuerter Protonenkanal (Nagel et al. 2002), und *Kanalrhodopsin-2* (ChR2), ein lichtgesteuerter, Kationen-selektiver Kanal (Nagel et al. 2003). Vor allem im Bereich der Neurowissenschaften zeigte sich schnell ein großes Interesse an der Nutzung von ChR2 zur Stimulation bestimmter Zelltypen: Die gezielte Erregung spezifischer Subpopulationen von Neuronen erlaubte erstmalig die exakte Analyse deren Verschaltungen und Verknüpfungen mit diversen Hirnarealen sowie ihren Einfluss auf das Verhalten der untersuchten Tiere (Lee et al. 2020). Nach der Entdeckung der Kanalrhodopsine kam es zur rapiden Weiterentwicklung der Optogenetik: Unzählige Mutationen, Entwicklungen und Entdeckungen anderer lichtsensitiver Proteine erweiterten die Palette optogenetischer Werkzeuge. Jedoch ist ChR2 aufgrund seiner guten Charakterisierung, einfachen Anwendung und verlässlichen Stimulierbarkeit das bis heute am meisten verwendete Protein zur optogenetischen Depolarisation von Zellen.

1.3.3 Kanalrhodopsin-2: Ein Kation-permeabler, blaublicht-sensitiver Kanal

ChR2 ist ein membranständiges Protein, das durch sieben Transmembranhelices und einen C-terminalen cytosolischen Appendix charakterisiert ist. Die Lichtsensitivität des Kanals ist durch ein Retinal-Molekül gewährleistet, das über eine Schiff'sche Base an einem Lysin der Helix 7 verankert ist. Dieses ist in der Lage, durch Absorption blauen Lichts mit einer maximaleffizienten Wellenlänge von 485 nm eine Isomerisierung der all-trans- in eine 11-cis-Form zu durchlaufen. Dies bedingt durch eine Neigung der Helix 2 eine Konformationsänderung des Proteins und führt zur Öffnung der Ionen-durchlässigen Pore (Kato et al. 2012).

Dieser Prozess der Konformationsänderung, von Absorption des Photons bis zur Öffnung der Ionen-durchlässigen Pore, findet äußerst schnell statt. Bei Verwendung supramaximaler Lichtintensitäten sind bereits nach wenigen Hundert Mikrosekunden lichtinduzierte Ströme messbar: Initial ist ein einwärtsgerichteter Maximalstrom, der sog. *Peak current*, zu beobachten, der nach wenigen Millisekunden zu einem gleichbleibenden, für die Dauer der Illumination stabilen Einwärtsstrom, dem sog. *Steady state current*, desensitiviert. Dieser *Steady state current* ist über Minuten hinweg stabil und stellt die treibende Kraft der lichtinduzierten Depolarisation bei repetitiven und dauerhaften Beleuchtungen dar (Nagel et al. 2003). Nach Ende der Beleuchtung schließt die Kanalpore und der lichtabhängige Strom sistiert mit einer Zeitkonstante τ_{off} von circa 10 ms (Mattis et al. 2012).

Seit der Entdeckung wurden verschiedene Mutationen vorgenommen und neue Varianten charakterisiert mit dem Ergebnis veränderter Lichtwellen- und Lichtintensitätssensitivitäten, Leitfähigkeiten und Kinetiken: Die *gain-of-function* Mutation H134R (Nagel et al. 2005) mit einem Austausch des Histidins zu Arginin an Stelle 134 des Proteins (ChR2 H134R) hat eine längere off-Kinetik (τ_{off} ca. 20 ms) und zeichnete sich zudem durch eine geringer ausgeprägte Desensitivierung aus. Hierdurch können größere *Steady state currents* erzielt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die halbmaximale Lichtintensität (eLI50) sowohl des *Peak current* als auch des *Steady state current* durch die H134R Mutation niedriger ausfiel, was eine höhere Lichtempfindlichkeit widerspiegelt (Mattis et al. 2012). Im Vergleich zur ChR2 Wildtyp Variante können somit schon bei geringeren Expressionsraten suffiziente Depolarisationsströme erreicht werden.

Die Ionen-durchlässige Pore des ChR2 ist unselektiv für einwertige als auch zweiwertige Kationen. Die Permeabilität für einzelne Ionen ist primär von deren Größe abhängig, sodass ChR2 eine physiologisch bedeutsame Durchlässigkeit für vor allem $\text{H}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$ bei einwertigen Ionen zeigt. Deutlich weniger durchlässig ist der Kanal für zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} . Aufgrund dieser unselektiven Permeabilität liegt das Umkehrpotential bei ca. 0 mV: Kommt es zur Öffnung des Kanals bei negativen Membranpotentialen, ist ein Netto-Einwärtsstrom zu beobachten, der das Membranpotential bis maximal auf das Umkehrpotential von 0 mV depolarisieren kann. Positive Membranpotentiale haben bei Öffnung Netto-Auswärtsströme zur Folge, die das Membranpotenzial auf bis zu 0 mV absenken können. Die Amplitude sowie die Ein- oder Auswärtsrichtung der lichtinduzierten Ströme ist daher unmittelbar von dem vorherrschenden Membranpotential abhängig. Ein interessantes Charakteristikum stellt zudem die sogenannte Einwärtsgleichrichtung von ChR2 dar: Hierbei lässt sich das Phänomen beobachten, dass Einwärtsströme bei negativen Membranspannungen (z.B. - 60 mV) stärker ausgeprägt sind als Auswärtsströme bei positiven Membranspannungen identischen Betrages (z.B. + 60 mV).

Die lichtinduzierte Stromstärke ist neben dem Membranpotential auch von der applizierten Lichtintensität abhängig: So können bei Lichtintensitäten weniger $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ bereits depolarisierende Ströme gemessen werden. Eine halbmaximale Ausprägung des *Steady state current* wird bei ca. 0,6 - 1 mW/mm^2 (sogenannte eLI50) erreicht. Bei höheren Lichtintensitäten strebt die erzielte Stromstärke schließlich eine Sättigung an (Bruegmann et al. 2010; Lin 2011; Mattis et al. 2012). Durch die hohe Lichtsensitivität und die Einwärtsgleichrichtung von ChR2 sind hohe Lichtintensitäten zur suffizienten Depolarisation nicht notwendig, die bei kontinuierlicher Beleuchtung potenziell zu Phototoxizitäten führen können (Gradinaru et al. 2007; Iyer et al. 2014; Richter und Bruegmann 2020). Des Weiteren hat sich die Überexpression von ChR2 in allen bisher getesteten Zell- und Gewebetypen als nebenwirkungsfrei erwiesen. Dies ist der Tatsache zu verdanken, dass ChR2 keinen Dunkelstrom (persistierende Membranströme trotz völliger Abwesenheit von Licht) aufweist und somit eine sichere optogenetische Stimulation gewährleistet.

Zusammenfassend ermöglicht der blaulichtsensitive, unselektive Kationenkanal ChR2 die selektive Depolarisation lebender Zellen. Hierbei kann eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung bei gleichzeitig nicht-cytotoxischen Expressionsniveaus und Lichtintensitäten erreicht werden.

1.3.4 OPN5 (Neuropsin): Ein G-Protein gekoppelter, UV-Licht-sensitiver Transmembranrezeptor

GPCR stellen die größte Rezeptorfamilie im menschlichen Genom dar und befinden sich klassisch in der Membran exprimierender Zellen. Dabei sind sie in der Lage, extrazelluläre Informationen wie beispielsweise die Signalfunktion von Hormonen oder anderen Botenstoffen in intrazelluläre Kaskaden umzusetzen. Als Membranrezeptoren teilen sich GPCR dabei einen gemeinsamen strukturellen Aufbau: Sie können eine unterschiedlich stark ausgeprägte N-terminale Extrazellulardomäne mit potenzieller Bindungsstelle für Liganden besitzen. Ebenso verfügen sie über 7 Transmembrandomänen in α -Helix-Struktur und eine C-terminale Intrazellulardomäne. Generell besitzt jeder GPCR eine Bindungsstelle für das zu rekrutierende G-Protein. Manche GPCR haben darüber hinaus die Möglichkeit, durch Licht aktiviert zu werden, indem sie -ähnlich zur in 1.3.3 beschriebenen Aktivierung von ChR2- z.B. über ein Photon-sensitives Retinal-Molekül verfügen. Im Gegensatz zur trans-cis-Isomerisierung bei ChR2 findet in Retinal-bindenden Proteinen der Säugetiere (und damit auch OPN5) eine cis-trans-Isomerisierung bei Absorption eines Photons statt. Diese Isomerisierung bedingt sekundär die Konformationsänderung des GPCR. Dieser hat nun die Möglichkeit zur Bindung und Aktivierung heterotrimerer G-Proteine (Katritch et al. 2013). Bei den rekrutierbaren G-Proteinen unterscheidet man vier Familien (G_s , G_i , G_q , $G_{12/13}$), welche durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden verschiedene intrazelluläre Effekte erzielen (Kamoto et al. 2016).

Mit lichtsensitiven GPCR können die Eigenschaften und das Verhalten von Zellen mit Licht manipuliert werden. Die Aktivierung des G_q -Proteins stellt somit eine Alternative zur Depolarisation mittels ChR2 zur Kontraktionstriggerung in glatten Muskelzellen dar. Hierbei würden sich grundlegende Unterschiede in den Mechanismen der Einleitung einer Kontraktion ergeben: Während ChR2 über eine Membrandepolarisation wirkt, führt die Aktivierung des G_q -Proteins über *second-messenger*-Kaskaden zur direkten Freisetzung intrazellulären Calciums (Mechanismus siehe Abbildung 2). Es folgten Bemühungen, lichtsensitive GPCR zu charakterisieren, die hochspezifisch eine der 4 G-Proteinklassen rekrutieren. Dies gestaltete sich teils schwierig, da viele lichtsensitive GPCR wie z.B. Melanopsin (OPN4) mehrere G-Proteinklassen rekrutieren und die jeweilige Kaskade einleiten können (Bailes und Lucas 2013; Spoida et al. 2016). Aufgrund dieser mangelnden Spezifität sind sie für viele experimentelle Anwendungen ungeeignet. Letztlich konnten einige spezifische, lichtsensitive GPCR identifiziert werden: Unter anderem das JellyfishOpsin, welches selektiv G_s -Proteine aktiviert (Bailes et al. 2012; Makowka et al. 2019). Weiterhin sind GPCR wie Rhodopsin und Coneopsin bekannt, die spezifisch $G_{i/o}$ -Proteine

rekrutieren (Masseck et al. 2014). Jedoch gibt es bisher keine Beschreibung eines lichtsensitiven GPCR, mithilfe dessen eine selektive, optogenetische Aktivierung der G_q -Kaskade möglich ist. Die Entdeckung und Charakterisierung eines solchen lichtsensitiven Rezeptors würde neue Möglichkeiten der optogenetischen Stimulation des glatten Muskels eröffnen.

Im Jahr 2003 wurde erstmals Neuropsin (OPN5) beschrieben (Tarttelin et al. 2003), das in Fischen, Vögeln, aber auch Mäusen und Menschen vorkommt. In Säugetieren konnte dabei die Expression von OPN5 u.a. in Gehirn, Auge und Haut nachgewiesen werden (Tarttelin et al. 2003; Kojima et al. 2011; Haltaufderhyde et al. 2015) und ist beispielsweise an der Regulation des zirkadianen Rhythmus des lokalen Gewebes beteiligt (Buhr et al. 2015). Die Charakterisierung des Opsins ergab, dass es sich um einen bistabilen, 11-cis-Retinal gebundenen GPCR handelt, der durch UV-Licht aktiviert und Licht längerer Wellenlänge (>470 nm) wieder deaktiviert werden kann (Yamashita et al. 2010). Jedoch ist bisher unklar, ob OPN5 seine Wirkung durch Rekrutierung von $G_{i/o}$ -Proteinen oder G_q -Proteinen erzielt: Beide Möglichkeiten sind in verschiedenen Arbeiten bereits diskutiert worden (Yamashita et al. 2010; Sugiyama et al. 2014). Eine Publikation mit abschließender, systematischer Analyse der Spezifität von OPN5 zu einem dieser G-Proteine steht jedoch aus und auch der Nachweis des Nutzens zur optogenetischen Stimulation fehlt bisher.

In kürzlich abgeschlossenen Experimenten konnte in unserer Arbeitsgruppe nun gezeigt werden, dass OPN5 in HEK293 Zellen und murinen Herzen selektiv G_q -Proteine, jedoch nicht G_i -Proteine, rekrutiert (Wagdi et al. 2022). In meiner Doktorarbeit habe ich im Rahmen dieser Publikation untersucht, ob und mit welchen Parametern lichtinduzierte Kontraktionen glattmuskulärer Organe von OPN5 exprimierenden Mäusen möglich sind.

1.3.5 Bisherige Anwendung optogenetischer Verfahren im Gastrointestinaltrakt

ChR2 wurde -außerhalb der Erregung von Nervenzellen- bisher u.a. für die direkte optogenetische Stimulation des Herzmuskels (Bruegmann et al. 2010), des Skelettmuskels (Bruegmann et al. 2015), der glatten Muskulatur der Harnblase (Jang et al. 2020) und der Gefäße (Wu et al. 2015) genutzt. Auch im Bereich der gastrointestinalen Motilitätsforschung gab es in den letzten Jahre Bestreben, mittels Lichtstimulation eine Verbesserung oder gar Kontrolle über die Kontraktilität des Darms zu erlangen. Jedoch folgten derartige Versuche einem anderen Konzept:

2018 demonstrierten Hibberd et al. in der Arbeitsgruppe um Nick J. Spencer erstmals erfolgreiche lichtinduzierte Kontraktionen im Kolon (Hibberd et al. 2018). Jedoch war ChR2 nicht direkt in der Membran glatter Muskelzellen exprimiert: Es wurden CAL-ChR2 transgene Mäuse generiert, in denen ChR2 in Zellen mit Aktivität des Calretinin(CAL)-Promotors exprimiert wird. Calretinin ist ein Calcium-bindendes Protein, das durch das Calbindin 2-Gen kodiert wird. Dieses ist typischerweise in bestimmten Subpopulationen myenterischer Neurone anzufinden, die in der Motilitätssteuerung des Gastrointestinaltrakts

involviert sind. Diese Neuronenpopulationen beinhalten cholinerge Motorneurone sowie diverse andere Interneurone, die an der Initiation der Kontraktion beteiligt sind. In diesen transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die ChR2-basierte, lichtinduzierte Aktivierung der cholinergen Motorneurone zu Kontraktionen im Kolon führt. Im Zuge dessen konnte eine gesteigerte Propulsion und Ausscheidung von Kot-Pellets *in vivo* und *in vitro* erreicht werden.

Ein Jahr später wurden von Perez-Medina et. al diese Ergebnisse bestätigt (Perez-Medina und Galligan 2019): Auch hier wurde das Kolon optogenetisch stimuliert, jedoch unter Verwendung von ChAT-ChR2-YFP transgenen Mäusen. Der ChAT-Promotor exprimiert die Cholin-Acetyl-Transferase und verfügt über eine hohe Aktivität in allen Zelltypen, die dieses Enzym physiologisch exprimieren. Da hierzu wieder die cholinergen Motorneurone des ENS zählen, konnte auch durch diesen Stimulationsansatz eine Aktivierung der Kolonkontraktion erfolgen. Beide Ansätze beruhen jedoch auf der Nutzung funktionaler neuronaler Strukturen.

Im Jahr 2020 erschien letztlich eine weitere Publikation der Arbeitsgruppe um Nick J. Spencer, in der untersucht wurde, ob analog zum Kolon auch im Ileum desselben Mausmodells (ChAT-ChR2 transgen) eine lichtinduzierte Kontraktion zur Steigerung der Darmpassage möglich ist (Spencer et al. 2020). Zwar konnten nach Applikation blauen Lichtes im Ileum lokal begrenzte und kurz andauernde Kontraktionen der zirkulären Muskelschicht induziert werden. Im Gegensatz zum Kolon wurden jedoch keine koordiniert voranschreitenden Motorkomplexe (sog. *migrating motor complexes*) der glatten Muskulatur erzeugt, die für die zielgerichtete Propulsion des Darminhaltes von Nöten sind. Dies wurde auf eine abweichende Rolle und Verschaltungen der Calretinin-positiven Motorneurone im Dünndarm im Vergleich zum Kolon zurückgeführt.

Während es sich beim Magen wiederum um einen gänzlich anderen Abschnitt des Gastrointestinaltrakts handelt, besteht bei oben genutztem Ansatz ein weiteres zentrales Problem – vor allem für die Therapie der Gastroparese: Ein derartiges Stimulationsprinzip benötigt ein intaktes ENS, um eine koordinierte Kontraktion zu erzeugen. Dieses ist im Fall der Gastroparese aufgrund verschiedener, in Kapitel 1.2.2 aufgeführten Ursachen geschädigt und stellt eine Limitation des neurogenen Stimulationsansatzes dar. Eine erfolgreiche optogenetische Stimulation wäre trotz eines kompromittierten ENS dabei nur unter zwei Voraussetzungen denkbar: Einerseits muss ChR2 direkt in der glatten Muskulatur exprimiert werden. Andererseits muss die lichtinduzierte Depolarisation effektiv genug sein, um das Membranpotenzial auf ca. -20 mV anzuheben und die Öffnung der L-Type VDCC gewährleisten zu können.

Neben der für mein Projekt interessanten Anwendung im Rahmen der Motilitätsforschung wird die Optogenetik darüber hinaus genutzt, auch andere Facetten des Gastrointestinaltrakts näher zu beleuchten: Eine Ende 2020 erschienene Publikation demonstrierte z. B. die optogenetische Kontrolle des Metabolismus genetisch veränderter *E.*

coli (Hartsough et al. 2020), wodurch nun auch das Mikrobiom des Darms gezielt manipuliert und dessen Einfluss untersucht werden kann.

Hieraus zeigt sich, dass die Optogenetik bereits in der gastrointestinalen Grundlagenforschung Einzug gehalten hat. Eine Methode zur gezielten Stimulation der glatten Muskulatur und nachfolgender Steigerung der Magenpassage im Rahmen der Gastroparese-Therapie ist bisher jedoch nicht erreicht worden. Die Etablierung dieses Ansatzes ist das Ziel meiner Arbeit.

1.4 Adeno-assoziierte Viren (AAV) als Werkzeug des Gentransfers

Die Expression von lichtsensitiven Proteinen stellt die Voraussetzung für die optogenetische Stimulation von Zielzellen dar. Hierfür bedarf es der Anwesenheit und der Expression des Gens, das für dieses Protein codiert. Da optogenetische Proteine wie ChR2 jedoch häufig aus nicht-humanen Lebewesen, wie in diesem Fall der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* stammen, bedarf es eines vorherigen Gentransfers in die Zielzellen. Zwar wird hOPN5 nativ in menschlichen Geweben exprimiert, jedoch ist ein Vorkommen in der glatten Muskulatur bisher nicht beschrieben worden. Um eine dortige Expression zu erreichen, ist ein erfolgreicher Gentransfer in dieses Gewebe somit ebenso essenziell.

Mit dem Aufkommen der DNA-Sequenzierung ist in den letzten Jahrzehnten die genetische Ursache vieler vererbbarer Krankheiten bekannt geworden. Seit jeher besteht das Bestreben, vor allem monogenetische Erbkrankheiten durch den Transfer der intakten Genvariante heilen zu können. Jedoch hinkte die Entwicklung von Methoden für den sicheren Gentransfer dem rapiden Aufstieg moderner DNA-Sequenzierungsverfahren lange Zeit hinterher. Eine der ersten Herangehensweisen für einen Gentransfer war schließlich die Nutzung von viralen Vektoren: Es bestand eine Auswahl an diversen Viren mit verschiedenen Vor- und Nachteilen in Bezug auf die Transduktion des gewünschten Gens in das jeweilige Zielgewebe (Ni et al. 2016). Jedoch zeigten viele der getesteten Viren ein ungünstiges Risikoprofil mit beispielsweise starker Induktion von Entzündungen oder eines onkogenen Potentials, wodurch ihr Nutzen in der klinischen Anwendung eingeschränkt war (Cotter und Muruve 2005). Auch künstliche Transferverfahren wie der Einsatz von Nanopartikeln wurden in (prä-)klinischen Studien untersucht, zeigten jedoch ebenso ungewollte Sicherheitsbedenken und -risiken, die zukünftig besser verstanden und kontrolliert werden müssen (Chen et al. 2016).

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind aktuell eine der am besten untersuchten und am häufigsten genutzten Gentransfer-Methoden. Ursprünglich sind AAV als Kontaminanten bei der Aufreinigung von Adenoviren aufgefallen, was die Namensgebung dieser Virenart erklärt (Rose et al. 1966). Bei AAV handelt es sich dabei um ein Protein-Hüllgerüst (Kapsid), das eine Einzelstrang-DNA von ungefähr 4,8 Kilobasen enthält. Dieser DNA-Strang verfügt über 3 Gene: *Rep*, das verschiedene Proteine für den Ablauf der Replikation codiert, *aap*, das

Helferproteine für die Faltung und den Einbau der Kapsidproteine exprimiert, und *Cap*, das die viralen Kapsidproteine VP1/VP2/VP3 selbst codiert. Zum Gentransfer wird sich heutzutage jedoch sogenannter rekombinanter AAV (rAAV) bedient, die zwar die Kapsidhülle des jeweiligen AAV nutzen, jedoch nicht den ursprünglichen viralen DNA-Strang enthalten. Stattdessen beinhalten sie das Gen und Promotor der Wahl, das in den Zielzellen exprimiert werden soll. Dabei wird dieses Gen von sogenannten *inverted terminal repeats* (ITR) flankiert, die für Replikation und Beladung während des Herstellungsprozesses der AAV nötig sind. Nach der Transduktion des Gens in die Zielzellen wird dieses jedoch nicht in das Genom integriert, sondern verbleibt episomal im Zellkern. Da dieses Gen während der Zellteilung nicht repliziert wird, kommt es über die Tochtergenerationen hinweg zur Abnahme der Genkopien. Dies resultiert in einer zeitlichen Limitation der Nutzung des Genprodukts in Abhängig zur Replikationsfrequenz der transduzierten Zelle. Eine weitere Limitation dieser Methode liegt in der möglichen Größe der eingebrachten Nukleinsäure, die sowohl das Gen selbst, als auch einen Promotor und die Poly-A-Sequenz umfassen muss. Das gesamte Konstrukt sollte dabei eine Länge von 5 Kilobasen nicht überschreiten, damit der AAV-Transfer zum Erfolg führen kann (Naso et al. 2017).

Die Entdeckung und Charakterisierung generischer, also natürlich vorkommender AAV hat zu einer breiten Auswahlmöglichkeit viraler Vektoren geführt, die unterschiedliche Vor- und Nachteile zur Transduktion diverser Zielgewebe haben. Da der AAV2 eines der ersten identifizierten und detailliert charakterisierten Serotypen war, werden heute die AAV2 ITR Sequenzen zur Flankierung des gewünschten Gens in nahezu allen AAV Vektordesigns genutzt. Das Viruskapsid hingegen kann unterschiedliche Eigenschaften haben und dementsprechend gewählt werden. So nutzen die Kapsidproteine der einzelnen AAV-Serotypen verschiedene Rezeptoren, um in die Zellen einzudringen: Beispielsweise bindet das Kapsid des AAV2 bevorzugt an den *fibroblast/ hepatocyte growth factor* sowie die Integrine $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$. AAV6 nutzt den *epidermal growth factor*, während AAV 5 sich einer Bindung des *platelet-derived growth factor* bedient. Hierdurch können die Kapside der verschiedenen AAV-Serotypen unterschiedlich gut an bestimmte Zelltypen andocken, wodurch ein Tropismus des jeweiligen Serotyps für diverse Gewebe/Organe erreicht wird (Wu et al. 2006; Kwon und Schaffer 2008; Naso et al. 2017):

Tabelle 1: Jeweilige AAV-Serotypen mit hohem Tropismus für die angegebenen Gewebe/Organe

Gewebe/Organ	Serotyp Tropismus
Herz	AAV1, AAV8, AAV9
Lunge	AAV5, AAV6, AAV9
Niere	AAV2
Leber	AAV7, AAV8, AAV9
Pankreas	AAV8
ZNS	AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9
Retinale Photorezeptoren	AAV2, AAV5, AAV8
Retinales Pigmentepithel	AAV1, AAV2, AAV5, AAV8
Skelettmuskel	AAV1, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9

Mit dem Ziel einer gesteigerten Transduktionseffizienz und Gewebespezifität wurden neue synthetische AAV designt oder Mutationen in den viralen Kapsidproteinen vorgenommen. Im Zuge der Entwicklung eines Viruskapsids mit besonders hohem Tropismus für Muskelgewebe wurde der AAV2.5 entwickelt (Bowles et al. 2012). Die Namensgebung hat AAV2.5 dabei seinem Mutationsschema zu verdanken: Um das Andocken an (Skelett-) Muskelzellen zu verbessern, wurde in das VP1-Kapsidprotein des AAV2 fünf Mutationen aus dem VP1-Kapsidprotein des AAV1 eingebaut. Der gesteigerte Tropismus für den Skelettmuskel führte dazu, dass dieses Virus für eine präklinische Phase 1 Gentherapie im Rahmen der Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie getestet wurde (Bowles et al. 2012). Ein Jahr nach Publikation des neuartigen AAV2.5 Serotyps konnte eine weitere Arbeitsgruppe zeigen, dass dieser eine hohe Transduktionseffizienz im glatten Muskel hat (Lompré et al. 2013).

Auch im Rahmen der translationalen Weiterentwicklung des optogenetischen Stimulationsansatzes, der in dieser Arbeit untersucht wurde, wird es notwendig sein, einen erfolgreichen Gentransfer des optogenetischen Proteins in glatte Muskelzellen zu entwickeln. Dabei ist die Kenntnis darüber essenziell, welcher AAV über die höchste Transduktionseffizienz für glatte Muskelzellen verfügt. Dies schafft die Möglichkeit, die kleinstmögliche Anzahl an Viren zu applizieren, um das gewünschte Expressionslevel zu erreichen. Das spielt sowohl in der Ausprägung einer möglichen Immunantwort auf das Virus als auch unter ökonomischen Gesichtspunkten eine große Rolle. Eine systematische Analyse der Transduktionseffizienz verschiedener AAV wurde in glatten Muskelzellen und insbesondere denen des Magens bisher nicht vorgenommen. Daher sind in dieser Arbeit die generischen AAV1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sowie die künstlich modifizierten AAV.PHP, AAV.eB (Chan et al. 2017) und AAV2.5 in der Transduktion von SMC verglichen worden.

2 Zusammenfassende Übersicht der angewandten Methoden

Im Folgenden ist eine zusammenfassende Übersicht der angewandten Methoden zu finden. Genaue Angaben zu den Herstellern, Dosierungen und Protokollen sind in den Publikationen aufgeführt.

Mausmodell: Für die durchgeführten Experimente wurden entweder Mäuse der CAG-ChR2-eYFP transgenen Mauslinie oder der CAG-OPN5-eYFP transgenen Mauslinie verwendet. Als Kontrolltiere wurden CD-1 Wildtyp Mäuse genutzt. Der verwendete chicken- β -actin (CAG)-Promoter verfügt über eine hohe Aktivität in Muskelzellen und gewährleistet somit eine Überexpression von ChR2 bzw. OPN5 in der glatten Muskulatur. Durch die Fusion mit dem *enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP)* lässt sich die ChR2- und OPN5-Expression in explantierten Organen mittels Fluoreszenzsignal überprüfen.

Isolation von SMC: Von explantierten Mägen abgetrennte Muskelstreifen wurden in einem Enzym-Mix inkubiert. Dieser enthält verschiedene proteolytische Enzyme wie Papain, Collagenase und Elastase und führt zum Verdau der extrazellulären Matrix. Hierdurch lassen sich einzelne SMC aus dem Zellverband herauslösen. Durch die Verwendung eines 200 μ m Filters können nun freigesetzte Zellen von groben Gewebstücken getrennt werden. Die filtrierten, isolierten Zellen wurden in einer glukose- und ionenhaltigen Lösung bis zu mehreren Stunden im Kühlschrank zwischengelagert. Dies stellt die Vorbereitung für Einzelzell-Experimente wie Patch-Clamp oder Expressionsanalysen dar.

Patch Clamp (Abbildung 3): Hierbei handelt es sich um eine Methode der Elektrophysiologie, mittels derer Transmembranströme lebender Zellen gemessen werden können. Hierfür wird eine Referenzelektrode benötigt, die sich im Bad der Messkammer befindet. Die Messelektrode, die in sogenannte Mikropipetten eingeführt wird, steht über einen Stromkreislauf mit der Referenzelektrode in Verbindung. Diese Mikropipetten werden aus Borosilikat-Glaskapillaren hergestellt, deren Öffnung an der Pipettenspitze nur ca. 50 μ m beträgt, was in einem hohen Widerstand von 3-5 M Ω resultiert. Diese Mikropipette wird anschließend durch einen hochpräzisen Mikromanipulator auf die Zelloberfläche bewegt. Durch einen leichten Unterdruck in der Pipette kann nun die Zelle angesaugt werden, wodurch zwischen Glaskapillare und Zellmembran eine elektrische Isolation aufgebaut wird: Der Widerstand zwischen der inneren Mess- und der äußeren Referenzelektrode übersteigt 1 G Ω , der sogenannte *Gigaseal* entsteht. Durch die ruckartige Erzeugung eines Unterdrucks kommt es zur Ruptur des an der Kapillaröffnung befindlichen Membranabschnittes („Patch“). Hierdurch wird die sogenannte Whole-cell Konfiguration erreicht: Es besteht nun eine Kontinuität zwischen dem Inneren der Pipette und dem Inneren der Zelle. Durch den hohen Widerstand des noch intakten *Gigaseal* sind sie gegen die Außenlösung und der dort befindlichen Referenzelektrode durch die Zellmembran elektrisch isoliert. Daher kann dieses Setup nun genutzt werden, um die Gesamtheit der auftretenden Transmembranströme der

ganzen Zelle zu messen (z.B. nach erfolgter Manipulation durch Lichtstimulation von ChR2-positiven SMC). Hierbei kann zwischen zwei Messverfahren gewählt werden: Einerseits die sogenannte *voltage-clamp* Methode, bei der die Spannung zwischen Mess- und Referenzelektrode konstant gehalten wird (z.B. -60 mV). Anschließend werden die auftretenden Stromstärken über die Zeit gemessen, die notwendig sind, um das vordefinierte Membranpotenzial zu halten. Diese Stromstärken müssen somit dem Betrag der erfolgten Transmembranströme gleichen, die z.B. nach Öffnung von ChR2 auftreten. Andererseits kann mit der *current-clamp* Methode gemessen werden, bei der eine bestimmte Stromstärke dauerhaft injiziert wird (z.B. diejenige, die das Membranpotenzial zu Beginn auf -60 mV bringt). Nach Lichtstimulation bleibt die eingespeiste Stromstärke konstant und erlaubt die Messung des sich ändernden Membranpotentials, die z.B. aus der Öffnung von ChR2 resultiert. Die Untersuchung isolierter Zellen durch die Patch-Clamp Methode erlaubt daher die präzise Charakterisierung lichtinduzierter ChR2-Transmembranströme unter diversen Gesichtspunkten.

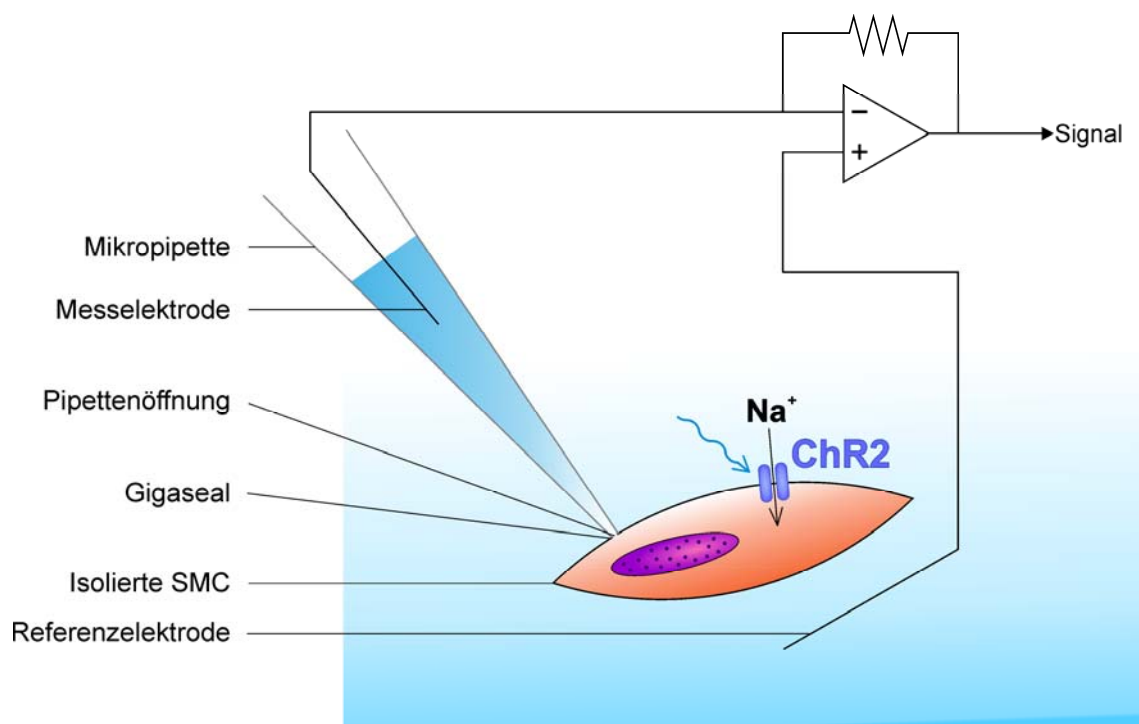


Abbildung 3: Patch-Clamp Setup in whole-cell Konfiguration. Schematisch dargestellt ist der Versuchsaufbau eines Patch-Clamp Experiments an einer SMC. Die Mikropipette aus Borosilikatglas ist der Zellmembran aufgesetzt und bildet einen Gigaseal zur elektrischen Isolation aus. Die in der internen Lösung befindliche Messelektrode steht elektrisch mit dem Zellinneren in direktem Kontakt. Die Referenzelektrode ist in der externen Lösung platziert. Der zwischen beiden Elektroden geschaltete Stromkreis erlaubt Messungen nach der *voltage-clamp* oder *current-clamp* Methode.

Isometrische Kraftmessung: Aus explantierten Mägen präparierte Muskelstreifen wurden hierfür mittels Fäden zwischen einer Haltevorrichtung und einem piezoelektrischen Kraftwandler aufgespannt und in ein mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begastem Organbad eingetaucht. In diesem Setup können die Muskelstreifen nun durch verschiedene Stimuli erregt und die resultierende isometrische Kraft aufgezeichnet werden.

Folgende Stimuli wurden appliziert und miteinander verglichen:

- Kaliumchlorid (KCl), das in hoher Konzentration von 60 mM zur Depolarisation aller SMC und damit deren Erregung führt.
- Carbachol (Carbamoylcholin, CCh), das über den M₃-Rezeptor vermittelt den G_q-Signalweg aktiviert und somit zur Kontraktion der SMC führt.
- Elektrische Feldstimulation (EFS), die über integrierte Platindrähte in der Haltevorrichtung appliziert wird und durch eine spezifische Kombination der Stimulationsparameter zur Ausbildung von Aktionspotenzialen im ENS führt. Die Aktivierung der Neurone bedingt sekundär die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter wie Acetylcholin und damit die Kontraktion der SMC.
- Blaues Licht der Wellenlänge 460 nm, welches Transmembranströme in Chr2-positiven Zellen induziert und somit zur Depolarisation und direkten Erregung der SMC führt.

Diese Parameter wurden für die Stimulation der CAG-ChR2-eYFP transgenen Muskelstreifen verwendet. Auch bei den isometrischen Kraftmessungen der glattmuskulären Organe Duodenum, Harnblase und Uterus aus CAG-OPN5-eYFP transgenen Tieren kamen sie zum Einsatz. Hierfür wurde UV-Licht mit der Wellenlänge von 385 nm benutzt.

Druckmessung im intakten Magen: Vollständig explantierte Mägen wurden in einem Carbogen-begastem Organbad fixiert. Das Organbad ist mit drei Blaulicht-LEDs versehen, die eine Panorama-Beleuchtung des Magens im Zentrum gewährleisten. Über den Ösophagus-Stumpf wurde ein Katheter in das Lumen des Magens eingeführt, der mit einem Druckwandler verbunden ist und somit eine Messung des intraluminalen Magendrucks ermöglicht. Analog zur isometrischen Kraftmessung wurden die intakten Mägen nun mittels KCl, CCh, EFS und Blaulicht stimuliert und die erzeugten Druckentwicklungen charakterisiert und verglichen. Anschließend wurde Methylenblau dem Bad zugefügt, das sich vor allem in die Strukturen des ENS einlagert. Durch Beleuchtung mit rotem Licht kommt es zur Photooxidation des Farbstoffs und zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale. Diese führen durch ihre toxische Wirkung zum Untergang des ENS.

Ebenso wurde der Na_v-Kanalinhibitor Tetrodotoxin (TTX) an intakten Mägen appliziert, um einen potenziellen Einfluss verschiedener, beispielsweise mechanosensitiver Neurone auf das Antwortverhalten der einzelnen Stimuli zu untersuchen.

Propulsionsanalyse in intakten Mägen: Um zu überprüfen, ob eine lichtinduzierte Druckentwicklung des Magens auch die Nahrungspassage induzieren kann, wurden explantierte Mägen im selben Setup fixiert und der duodenale Stumpf per Video aufgenommen. Die Mägen wurden mit blauem Licht repetitiv stimuliert und das aborale Ausstoßen von Mageninhalt nach jedem Stimulus beurteilt. Als Positivkontrolle wurde CCh

appliziert. Die Beurteilung einer möglichen Propulsion nach Licht bei ChR2-transgenen und Wildtyp-Kontrollmäusen erfolgte verblindet.

Die Experimente zur isometrischen Kraftmessung, intraluminarer Druckmessung und der Propulsionsanalyse an intakten Mägen von ChR2-transgenen Mäusen wurden in Rostock im Labor unseres Kollaborationspartner PD Dr. med. Robert Patejdl durchgeführt, bei denen ich im Rahmen zweier Dienstreisen mitgewirkt habe.

Ca²⁺-Imaging: Aus explantierten Mägen präparierte Muskelstreifen wurden mit X-Rhod-1 beladen und horizontal in einem Carbogen-begasteten Bad aufgespannt. X-Rhod-1 ist ein Ca²⁺-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenzemission über das 100-fache ansteigt, sobald Ca²⁺ von diesem gebunden wird. Somit lässt sich eine potenzielle Ca²⁺-Freisetzung in den SMC der untersuchten Muskelstreifen nachweisen. Die Streifen wurden nun mit 50 ms langen Lichtpulsen beleuchtet und durch eine Spezialekamera mit hoher zeitlicher Auflösung aufgezeichnet. Die Videoaufnahmen konnten mit Blick auf eine erhöhte X-Rhod-1 Fluoreszenz und damit indirekt auf die Freisetzung von Ca²⁺ in SMC analysiert werden. Des Weiteren wurden die Muskelstreifen mit dem *gap junction*-Inhibitor Carbenoxolone (CBX) inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Stimulation, um den Einfluss auf die elektrische Kopplung der lichtinduzierten Erregung in ChR2-positiven an benachbarte, ChR2-negative SMC zu charakterisieren.

Da diese Erregung zur Kontraktion des Muskelgewebes führt, die eine ortsgleiche Fluoreszenzanalyse erschwert, kam ein spezieller Algorithmus zur Bewegungstabilisierung zur Anwendung (Christoph und Luther 2018). Dieser ermöglicht eine Nachverfolgung der lichtinduzierten Bewegung und führt verschobene Pixel zu ihrer Ausgangslage zurück. Die Stabilisierung des Bilds erlaubt nun eine präzise Analyse der lichtinduzierten Ca²⁺-Freisetzung und Erregungsausbreitung in der glatten Muskulatur auf Einzelzellebene bei gleichzeitig undissoziierten, vollständigen Muskelstreifen des Magens.

Die Bearbeitung und Analyse der Ca²⁺-Imaging-Videos erfolgte durch die Arbeitsgruppe unseres Kollaborationspartners Dr. rer. nat. Jan Christoph.

Histologie und Immunfluoreszenz-Färbungen: Antikörper-basierte Färbungsmethoden können genutzt werden, um bestimmte Gewebestrukturen sichtbar zu machen. Hierfür wurden Gewebspräparate aus explantierten Mägen mit einem Primärantikörper inkubiert, die ein spezifisches Antigen binden. In dieser Arbeit wurden Primärantikörper gegen folgende Strukturen genutzt:

- *Green Fluorescent Protein (GFP)*: Da sich GFP und eYFP nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden, bindet dieser Antikörper auch eYFP und zeigt damit die Expression des ChR2-eYFP Konstrukts an.
- β -III-Tubulin: Ist eine Mikrotubulus-Subklasse, die nahezu ausschließlich in nervalen Strukturen vorkommt. Somit lassen sich enterische Neurone als auch Axone des ENS anfärben.
- c-Kit: Ist eine Tyrosinkinase, die von den ICC exprimiert wird, wodurch sich diese als Teil des ENS spezifisch anfärben lassen.

- α -Smooth-Muscle-Actin: Ist eine Aktin-Subklasse, die von SMC exprimiert wird und damit als Marker für die glatte Muskulatur verwendet werden kann.

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper werden die Präparate gewaschen und mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser bindet spezifisch an die jeweiligen Primärantikörper und ist selbst mit einem Fluoreszenzfarbstoff aus der Gruppe der Cyanine (z.B. Cy2, Cy3, Cy5) fusioniert. Die oben genannten Zielstrukturen können nun mittels Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht und analysiert werden. Ebenso ermöglicht eine Zugabe von DAPI, einem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, die Visualisierung von Zellkernen.

Diese Färbemethode wurde konventionell auf 8 μm dünne Gewebsschnitte angewandt. Darüber hinaus erfolgte die Färbung eines Präparats der gesamten Magenwand. Voraussetzung hierfür ist die vorherige Behandlung des Präparats nach dem neuen PEGASOS-Protokoll (Jing et al. 2018), wodurch Farbpigmente herausgelöst werden und ein durchsichtiges Gewebe für die Fluoreszenz-Mikroskopie erreicht wird.

Analyse der Transduktionseffizienz verschiedener Adeno-assoziiierter Viren (AAV):

Die Methodik zur Durchführung der AAV-Experimente wird im Folgenden ausführlich beschrieben, da diese nicht Teil der angefügten Publikationen sind.

Zur Kultivierung der benötigten SMC wurden kleine Muskelstücke einer CD-1 Wildtyp Maus präpariert und in eine Ca^{2+} -freie THS (*Tyrode-Hepes-Solution*) überführt und mit folgenden Enzymen für 30 min bei 37 °C inkubiert (in mg/ml): Papain 1 (LS003126, Worthington, USA), Trypsin Inhibitor 1 (T9128, Sigma-Aldrich, Deutschland), Blend Collagenase 1 (C8051, Sigma-Aldrich), Collagenase IV-S 1 (C1889, Sigma-Aldrich), Elastase 0,4 (20929.01, Serva, Deutschland) und Albumin Fraction V 10 (8076.2, Roth, Deutschland). Einzelne SMC wurden mithilfe eines 200 μm pluriStrainer® (pluriSelect, Deutschland) herausgefiltert und in eine T25 Flasche (Sarstedt, Deutschland) überführt. Das verwendete Inkubationsmedium bestand aus Ham's DMEM/F12 + 20% Fetales Kälberserum (FBS Superior, Sigma) + 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies, USA), in dem die Zellen herangezüchtet und kultiviert wurden. Zur Vorbereitung des Experimentes wurden die Zellen passagiert, mit 5000 Zellen pro Well in ein 96-well ausplattiert und 2 Tage bei 37°C im selben Medium inkubiert. Nach der initialen Inkubationsphase erfolgte der Austausch zu einem FBS-freien Medium. Die ausgewählten AAV wurden im 96-well wie folgt appliziert:

Tabelle 2: Pipettierschema der AAV-Applikation auf SMC im 96-well.

	Applizierter AAV											2.5
	1	2	3	5	6	7	8	9	10	eB	PHP	
Promotor_Gen	CMV_eGFP										CAG_OPN5-eYFP	
Hersteller	VectorBuilder, Deutschland										Sirion Biotech, Deutschland	
Anzahl der applizierten Viruspartikel	3,00E+10										3,00E+08	
	1,00E+10										1,00E+08	
	3,00E+09										3,00E+07	
	1,00E+09										1,00E+07	
	3,00E+08										3,00E+06	
	1,00E+08										1,00E+06	
	3,00E+07										3,00E+05	
	1,00E+07										1,00E+05	

Am Tag 6 nach Inkubation wurden die Zellen für 20 min in 4% PFA fixiert und 3x mit PBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung mit 0,2% Triton X für 20 min. Anschließend wurden die fixierten Zellen in mit 5% Eserserum supplementieren PBS mit Primärantikörpern gegen GFP (Chromotek 3H9-100, 1:400) und α -Smooth-Muscle-Actin (SigmaAldrich A2547, 1:400) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen mit PBS und die Inkubation mit PBS + 1:1000 DAPI und Sekundärantikörper mit Konjugation von Cy2 anti-Rat-IgG (1:200) oder Cy5 anti-Mouse-IgG (1:400) (JacksonLab, USA) für 1h bei Raumtemperatur. Es folgten 3x Waschschritte mit PBS. Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem IX83 invertierten Fluoreszenzmikroskop (Olympus), ORCA-flash4.0 Digitalkamera (C11440, Hamamatsu Photonics, Japan) und der MT20 Lichtquelle (Olympus) aufgenommen. Es wurde das 10x Objektiv (UPLSAPO10X, NA: 0,4) mit folgenden Lichtfiltern genutzt (in nm): 387/11 Exzitation, 410 Strahlenteiler and 440/40 Emission für DAPI, 485/20, 504 und 525/30 für eGFP/eYFP und 650/13, 669 und 684/24 für Cy5. Von jedem Well wurden drei Fluoreszenzbilder aufgenommen. Die Analyse der Expressionsrate erfolgte durch eine spezialisierte Pipeline in CellProfiler (Broad Institute, USA). Hierbei wurde sowohl für das eGFP/eYFP als auch das α -SMA-Fluoreszenzsignal ein globaler *Cut-off*-Wert für die Pixelintensität festgelegt, der in mehreren repräsentativen Bildern annehmbare Erkennungsraten positiv gefärbter Zellen ergab. Dieser

wurde nun automatisiert auf alle 288 Bilder (3 pro Well) angewandt und die Anzahl der Pixel über dem festgelegten Schwellenwert bestimmt. Die Expressionsrate in jedem Bild ergab sich aus dem Verhältnis von eGFP/eYFP-positiven zu SMA-positiven Pixeln. Die Ergebnisse aus 3 zugehörigen Bildern wurden gemittelt und stellen die Gesamt-Expressionsrate des jeweiligen Wells dar. Das gesamte Experiment wurde 3x durchgeführt, um ein $n = 3$ für die statistische Analyse zu erreichen.

Die Erstellung der Diagramme sowie die Statistik in Abbildung 14 erfolgte durch GraphPadPrism 8.4.0 (GraphPad Software Inc., USA). Die Erstellung der *fits* mit Angabe der zugehörigen EC_{50} -Werte wurde durch die Funktion *[Agonist] vs. Response – Variable slope* erreicht. Die statistische Testung erfolgte durch einen einfaktoriellen *ANOVA* mit Messwiederholung und *Tukey's* Post-Hoc-Mehrfachvergleich ($p < 0,0001$ für AAV2.5 vs. AAV1, 2, 6, 7 und PHP). **** entspricht $p < 0,0001$.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Analyse der Chr2/eYFP-Expression im Magen transgener Mäuse

In dieser Arbeit wurden Mäuse der CAG-ChR2-eYFP transgenen Mauslinie genutzt. Diese exprimieren die Chr2 H134R Variante (Nagel et al. 2005) in Fusion mit dem *enhanced Yellow Fluorescent Protein*. Die Expression unterliegt dem chicken- β -actin Promotor, der über eine hohe Aktivität in Muskelgeweben verfügt (Bruegmann et al. 2010). In explantierten Mägen dieser Mäuse ließen sich eYFP-Fluoreszenzsignale in der longitudinalen als auch zirkulären Ausrichtung nachweisen (Abbildung 4A). Die histologische Analyse der Gewebeschnitte (Abbildung 4B) als auch des entfärbten Gewebeblocks des Antrums (Vogt et al. 2021, Supplementary Movie S1) zeigten, dass das Fluoreszenzsignal auf die Muskelschichten begrenzt ist und Neurone sowie ICC des ENS aussparen. Das eYFP-Signal war dabei ausschließlich in der Membran der α -Smooth-Muscle-Actin positiven Muskelzellen nachweisbar (Abbildung 4C). Nach dem enzymatischen Verdau der Muskulatur des Antrums zeigten $36 \pm 3\%$ ($n = 5$) der isolierten SMC diese membranständige eYFP-Expression (Abbildung 5A). Es lässt sich zusammenfassen, dass die Expression von Chr2 ausschließlich in SMC nachgewiesen werden konnte, jedoch nur in ca. einem Drittel der Zellen.

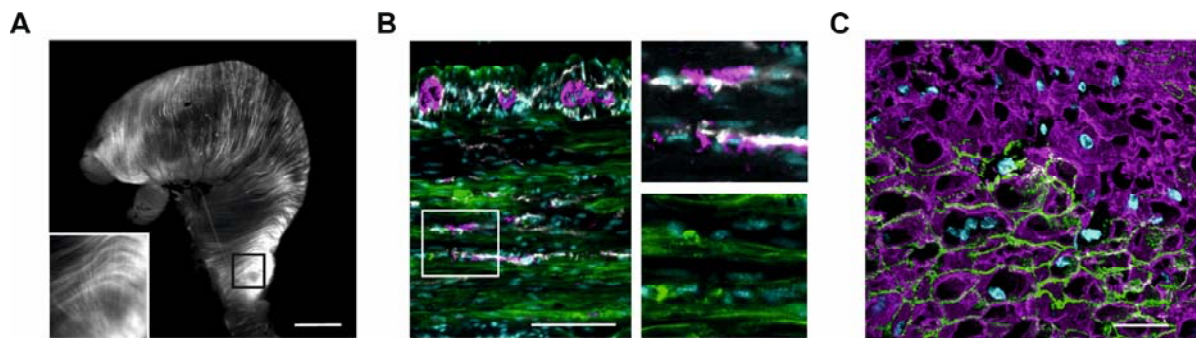


Abbildung 4: Histologische Analyse der Chr2/eYFP Expression im Magen transgener Mäuse. (A) eYFP-Fluoreszenzsignale (weiß) in zirkulärer und longitudinaler Ausrichtung im Magen einer Chr2 transgenen Maus. Maßstab = 3 mm. (B und C) Fluoreszenzaufnahmen der Tunica muscularis des Magenantrums. Zellkerne sind in Cyan und Chr2/eYFP in grün sichtbar. In B ist c-Kit, eine Tyrosinkinase der ICC, in weiß und β -III-Tubulin, eine spezifische Tubulinklasse in Neuronen, in magenta abgebildet (Maßstab = 100 μm). In C ist α -Smooth-Muscle-Actin, ein Zytoskelettfilament in SMC, in magenta sichtbar (Maßstab = 20 μm). Modifiziert aus: Vogt et al. 2021, Figure 1.

3.2 Charakterisierung lichtinduzierter Ströme in isolierten Zellen

Zum funktionellen Nachweis der ChR2-Expression wurden isolierte, eYFP-positive SMC in Patch-Clamp Experimenten untersucht. In diesen Zellen rief die Beleuchtung mit blauem Licht (460 nm) die für ChR2 H134R charakteristischen Einwärtsströme bei vorherrschenden negativen Membranpotentialen hervor (Nagel et al. 2005; Mattis et al. 2012). Diese zeigten den stark ausgeprägten *Peak current*, der unmittelbar in den für die Beleuchtungsdauer stabilen *Steady state current* übergeht (Abbildung 5B). Die Größe der Einwärtsströme ist dabei von der applizierten Lichtintensität abhängig und zeigt eine eLI50 von $0,2 \pm 0,01 \text{ mW/mm}^2$ ($n = 20$) für den *Peak current* (Abbildung 5B). Die lichtinduzierten Ströme zeigten die für ChR2 typische Einwärtsgleichrichtung (Abbildung 5C). Das Umkehrpotential (=Membranpotential, bei dem die Illumination in einem Netto-Strom von 0 pA/pF resultiert) liegt nahe 0 mV und demonstriert die Unselektivität von ChR2 für Kationen. In Patch-Clamp Experimenten mit isolierten SMC aus CD-1 Wildtyp Mäusen konnten hingegen keine lichtinduzierten Ströme nachgewiesen werden (Abbildung 5D).

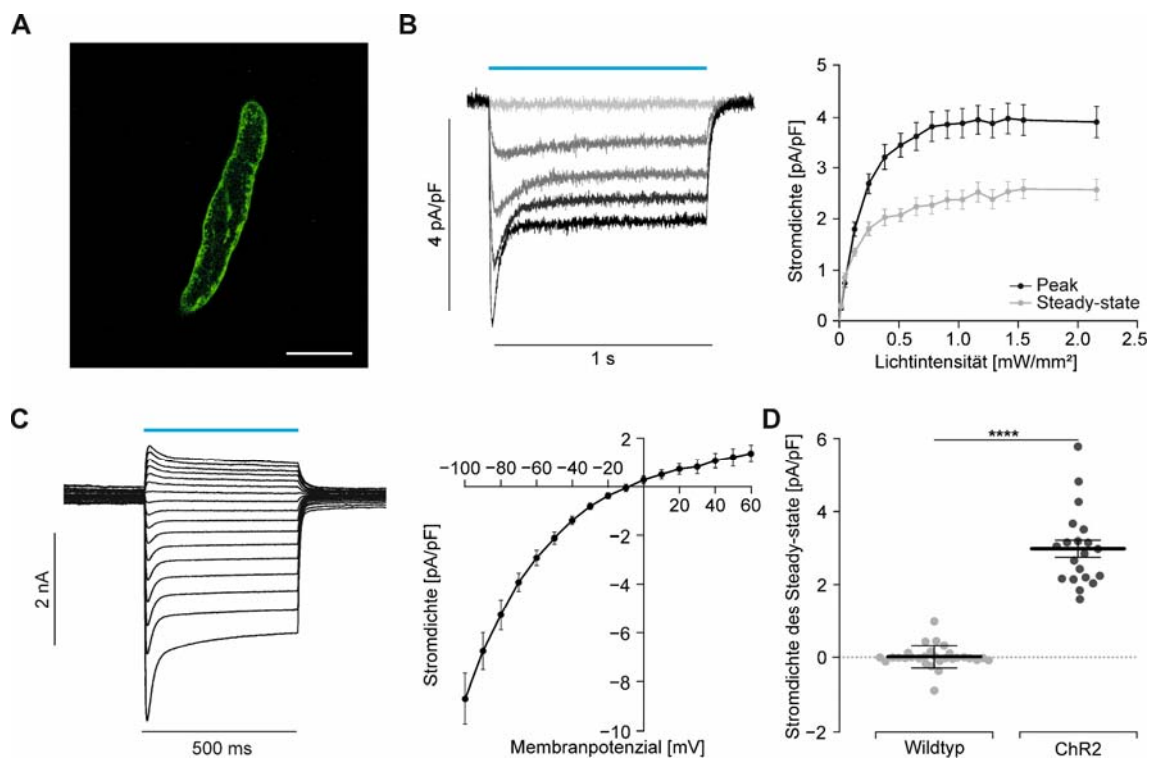


Abbildung 5: Charakterisierung lichtinduzierter Ströme in ChR2-exprimierenden SMC. (A) Eine isolierte SMC mit membranständigem ChR2/eYFP-Fluoreszenzsignal in grün. Maßstab = 20 µm. (B) Links: Bei einem Membranpotential von -60 mV gemessene, repräsentative ChR2 Ströme bei steigenden Lichtintensitäten (Blauer Balken: Beleuchtungsdauer; Lichtintensitäten von grau zu schwarz: 0, 0,05, 0,13, 0,25 und 0,7 mW/mm²). Rechts: Abhängigkeit der *Peak* und *Steady state* Stromstärken von der applizierten Lichtintensität ($N = 4$, $n = 20$). (C) Links: Repräsentative lichtinduzierte Ströme bei Membranpotentialen von -100 bis +60 mV und einer Lichtintensität von 7,5 mW/mm². Rechts: Analyse der Strom-Spannungs-Abhängigkeit ($N = 4$, $n = 15$). (D) Stromdichte des *Steady state current* bei supramaximalem Licht (1 s, 7,5 mW/mm²) und einem Membranpotential von -60 mV in ChR2/eYFP-positiven ($N = 4$; $n = 20$) und CD-

1 Wildtyp (N = 3; n = 25) SMC ($p < 0,0001$). Die statistische Analyse erfolgte mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert \pm der Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert aus: Vogt et al. 2021, Figure 2.

Um Nebenwirkungen auszuschließen, die aus der alleinigen Expression von Chr2 in SMC resultieren könnten, wurden verschiedene elektrophysiologische Parameter in SMC aus Chr2 transgenen und CD-1 Wildtyp Mäusen verglichen. Bei der Membrankapazität, einem Maß für die Größe der untersuchten Zellen, konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 6A). Auch bei dem Membranwiderstand konnten keine signifikanten Abweichungen zwischen Wildtyp und Chr2-positiven Zellen vor und nach Beleuchtung gefunden werden (Abbildung 6B). Des Weiteren waren spannungsaktivierte, auswärtsgerichtete Ströme, die durch schrittweise Erhöhung der Membranspannung von -80 mV auf $+50$ mV hervorgerufen werden, bei allen Zwischenschritten nahezu identisch (Abbildung 6C).

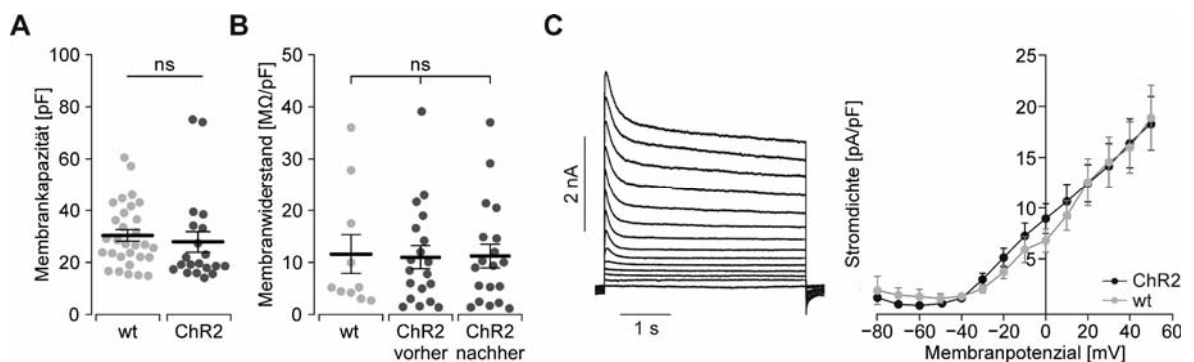


Abbildung 6: Vergleich elektrophysiologischer Parameter zwischen Chr2 (schwarz) und CD-1 Wildtyp SMC (grau, wt). (A) Vergleich der Membrankapazität in *whole-cell* Patch-Clamp Experimenten (N = 3, n = 30 für WT und N = 4, n = 20 für Chr2; $p = 0,56$, ungepaarter, zweiseitiger t-Test).

(B) Vergleich des auf die Membrankapazität normalisierten Membranwiderstands zwischen Wildtyp (N = 4, n = 10) und Chr2-positiven (N = 5, n = 19) SMC vor und nach Belichtung (Alle $p \geq 0,98$; die statistische Testung erfolgte mit einem einfaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung und Tukey's Post-Hoc-Mehrfachvergleich).

(C) Links: Repräsentative spannungsaktivierte Auswärtsströme einer Chr2 SMC. Rechts: Analyse der spannungsaktivierten Auswärtsströme in Chr2 (N = 3, n = 10) und WT (N = 3, n = 12) SMC (Alle $p \geq 0,20$; Statistische Analyse mit ungepaartem, zweiseitigem t-Test). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert \pm der Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert aus: Vogt et al. 2021, Figure 3.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Chr2 in der Membran glatter Muskelzellen lichtinduzierte Ströme ermöglicht. Dabei wird ohne Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Zellen eine lichtabhängige Kontrolle über das Membranpotenzial mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung erreicht.

3.3 Isometrische Kraftmessung in glattemuskulären Streifen des Antrums

Um zu untersuchen, ob durch Licht induzierte Depolarisationen genügen, um eine Kontraktion zu erzeugen, wurden isometrische Kraftmessungen an longitudinalen Muskelstreifen des Magenantrums durchgeführt (Abbildung 7A). Bei supramaximalem Licht konnten dabei Kontraktionen in Präparaten Chr2-transgener Mäuse nachgewiesen werden, jedoch nicht in denen der CD-1 WT Kontrollmäuse. Die von blauem Licht erzeugten Kontraktionen waren in ihrer Amplitude vergleichbar mit denen, die durch eine hohe KCl Konzentration von 60 mM und damit globaler Depolarisation aller SMC hervorgerufen wurden. Dies zeigt, dass Licht auch bei der Expression des Chr2/eYFP Konstrukts in nur 36% der SMC in der Lage war, sämtliche Zellen zu erregen. Die Applikation von 10 μ M CCh induzierte Kontraktionen mit einer nochmals stärkeren Ausprägung. Dies ist durch die gleichzeitige Aktivierung zweier, synergistischer Signalwege erklärbar: Einerseits wird eine verstärkte ICC-vermittelte Depolarisation erreicht, die nachfolgend zur Aktivierung der VDCC führen kann. Andererseits kommt es zur direkten Ca^{2+} -Freisetzung und -Sensitivierung in SMC durch die Proteinkinase C und Rho-Kinase (Unno et al. 2003; Sanders et al. 2010). Die Erregung des enterischen Nervensystems durch supramaximale EFS führte ebenfalls zu Kontraktionen, die in ihrer Amplitude jedoch deutlich schwächer als die lichtinduzierten ausfielen. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die Erregung sowohl aktivierender als auch inhibitorischer Motoneurone durch das unspezifisch wirkende elektrische Feld (siehe Kapitel 1.1.5). Bedeutsam ist ebenfalls, dass die Amplituden der Kraftentwicklungen bei EFS, CCh und K^+ zwischen Chr2 und WT keine signifikanten Unterschiede zeigten, was schwerwiegende Nebenwirkungen der Chr2-Überexpression auf den kontraktilen Apparat der glatten Muskulatur ausschließt. Darüber hinaus kann gezeigt werden, dass eine lichtbasierte Stimulation im Gegensatz zur EFS in der Lage ist, die Stärke der induzierten Kraftentwicklung mit hoher zeitlicher Auflösung zu kontrollieren: Diese stehen sowohl in direkter Abhängigkeit zur Pulsdauer (Abbildung 7B) als auch zur applizierten Lichtintensität (Abbildung 7C).

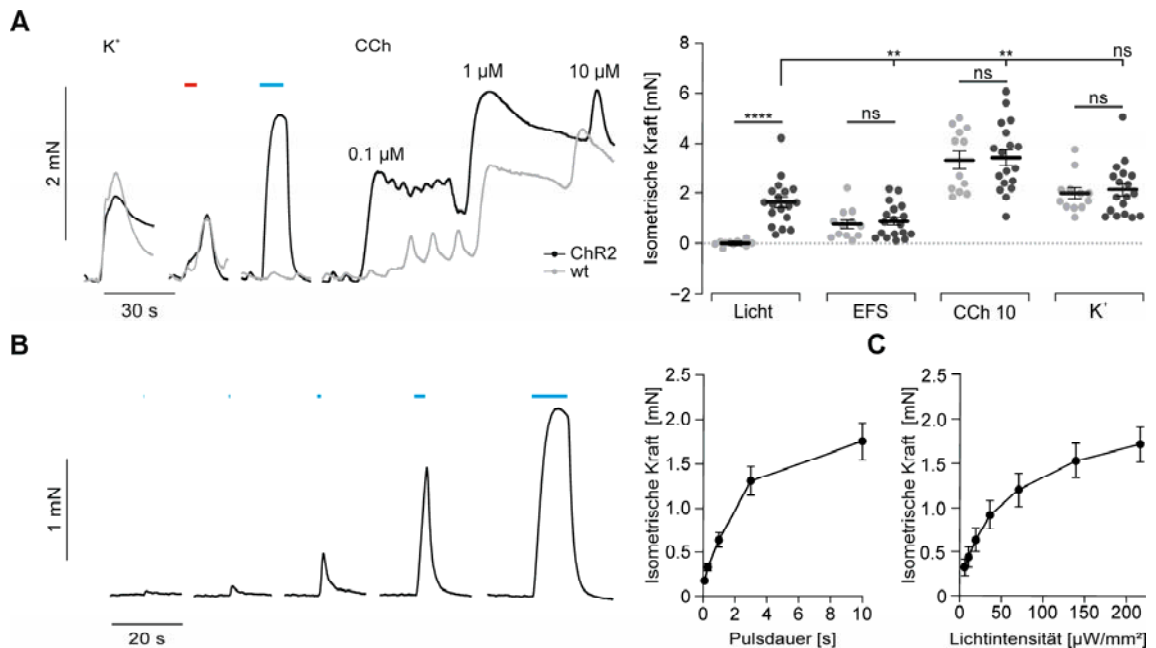


Abbildung 7: Isometrische Kraftmessung in glattmuskulären Streifen des Magenantrums. (A) Links: Repräsentative isometrische Kraftmessungen von longitudinalen Muskelstreifen des Antrums von Wildtyp (grau, wt) und ChR2/eYFP Mäusen (schwarz). Kontraktionen wurden durch blaues Licht (Blauer Balken, 10 s, 0,2 mW/mm²), EFS (Roter Balken, 5 s, 10 Hz, 1-10 ms, 80-150 V), aufsteigenden Konzentration von CCh und 60 mM K⁺ hervorgerufen. Rechts: Analyse der isometrischen Kräfte (N = 5, n = 12 für WT; N = 6, n = 18 für ChR2) der jeweiligen Stimuli (10 µM für CCh). Die statistische Testung erfolgte mit einem zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung und Sidak's Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen ChR2 und WT ($p < 0,0001$ für Licht; $p \geq 0,97$ für EFS, CCh und K) und Tukey's Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen den verschiedenen Stimuli innerhalb der ChR2-Gruppe ($p \leq 0,003$ für Licht vs EFS und CCh; $p = 0,38$ für Licht vs K). (B) Links: Repräsentative isometrische Kraftmessungen bei zunehmenden Belichtungsdauern (links nach rechts: Lichtpulse mit einer Dauer von 0,1, 0,3, 1, 3 und 10 s; Lichtintensität = 0,2 mW/mm²). Rechts: Analyse der Abhängigkeit zwischen isometrischer Kraftentwicklung und zunehmender Belichtungsdauer (N = 6, n = 20). (C) Analyse der Abhängigkeit zwischen isometrischer Kraftentwicklung und zunehmender Lichtintensität bei einer Pulsdauer von 5 s (N = 6, n = 20). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert \pm der Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert aus: Vogt et al. 2021, Figure 4.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die ChR2-getragene Depolarisation von SMC durch blaues Licht mit hoher zeitlicher Auflösung eine effiziente Erzeugung von Kontraktionen und Kraftentwicklungen ermöglicht.

3.4 Analyse der elektrischen Kopplung durch *gap junctions*

Die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts bildet ein funktionelles Synzytium des sogenannten *Single-unit*-Typs (siehe Kapitel 1.1.3) durch eine *gap junction* basierte elektrische Kopplung zwischen den Zellen. Um zu untersuchen, ob lichtinduzierte Depolarisationen von Chr2-positiven zu benachbarten Chr2-negativen SMC weitergeleitet werden, wurde der *gap junction*-Inhibitor Carbenoxolone (CBX) appliziert. In isometrischen Kraftmessungen ließ sich die dabei die Spontanaktivität untersuchter Muskelstreifen nahezu vollständig annullieren (Abbildung 8A). Dies lässt einen Rückschluss auf die erfolgreiche Blockade der Schrittmacherströme zwischen ICC und SMC zu. Auch Folgen einer reduzierten elektrischen Kopplung zwischen SMC selbst waren nachweisbar: Lichtinduzierte Kontraktionen wurden durch die Applikation von CBX in ihrer Amplitude signifikant verringert und zeigten eine deutliche Zunahme der Dauer zwischen Lichtstimulation und maximaler Ausprägung der Kontraktion. Diese beiden Parameter waren bei der Stimulation mit 60 mM K⁺ (führt zur Erregung aller SMC unabhängig ihrer Chr2-Expression) nach Zugabe von CBX weiter unverändert (Abbildung 8A-B).

Um die interzelluläre Kopplung der SMC tiefgreifender zu untersuchen, wurde makroskopisches *Ca²⁺-Imaging* mit Muskelstreifen des Antrums durchgeführt. Hierbei ließen sich zwei Populationen auf zellulärer Ebene als auch im gesamten Streifen nachweisen: In der ersten Population führte die Applikation von CBX zu verzögerten Ca²⁺-Anstiegen und verringerten Amplituden; Effekte, die bei SMC ohne Chr2-Expression und im Gewebe mit geringer Chr2-Expressionsrate zu erwarten sind. In der zweiten Population zeigte sich eine identische Kinetik des Ca²⁺-Anstiegs mit jedoch verlängerter Dauer und nachfolgend höheren Amplituden; Effekte, die sich bei Zellen mit Chr2-Expression erklären lassen (Abbildung 8C-E). In der Summe aller ausgewerteten Ca²⁺-Signale konnte kein signifikanter Unterschied vor und nach CBX festgestellt werden, da sich die oben genannten Effekte auf zellulärer Ebene gegenseitig aufheben (Abbildung 8F). Wurde jedoch die Abhängigkeit des Ca²⁺-Transienten zur Chr2-Expression untersucht, zeigte sich, dass Muskelstreifen mit verzögerten und niedrigeren Ca²⁺-Signalen weniger eYFP-Fluoreszenzsignal und damit eine niedrigere Chr2-Expression aufwiesen. Muskelstreifen mit hohen Ca²⁺-Transienten hingegen verfügten über eine hohe eYFP-Expression (Abbildung 8G). Beide Populationen zeigten eine signifikante Verlängerung der Zeitspanne zwischen Lichtstimulation bis zur maximalen Ausprägung des Ca²⁺-Transienten. Diese Zunahme war bei Muskelstreifen mit hoher Chr2-Expression besonders stark ausgeprägt (Abbildung 8H).

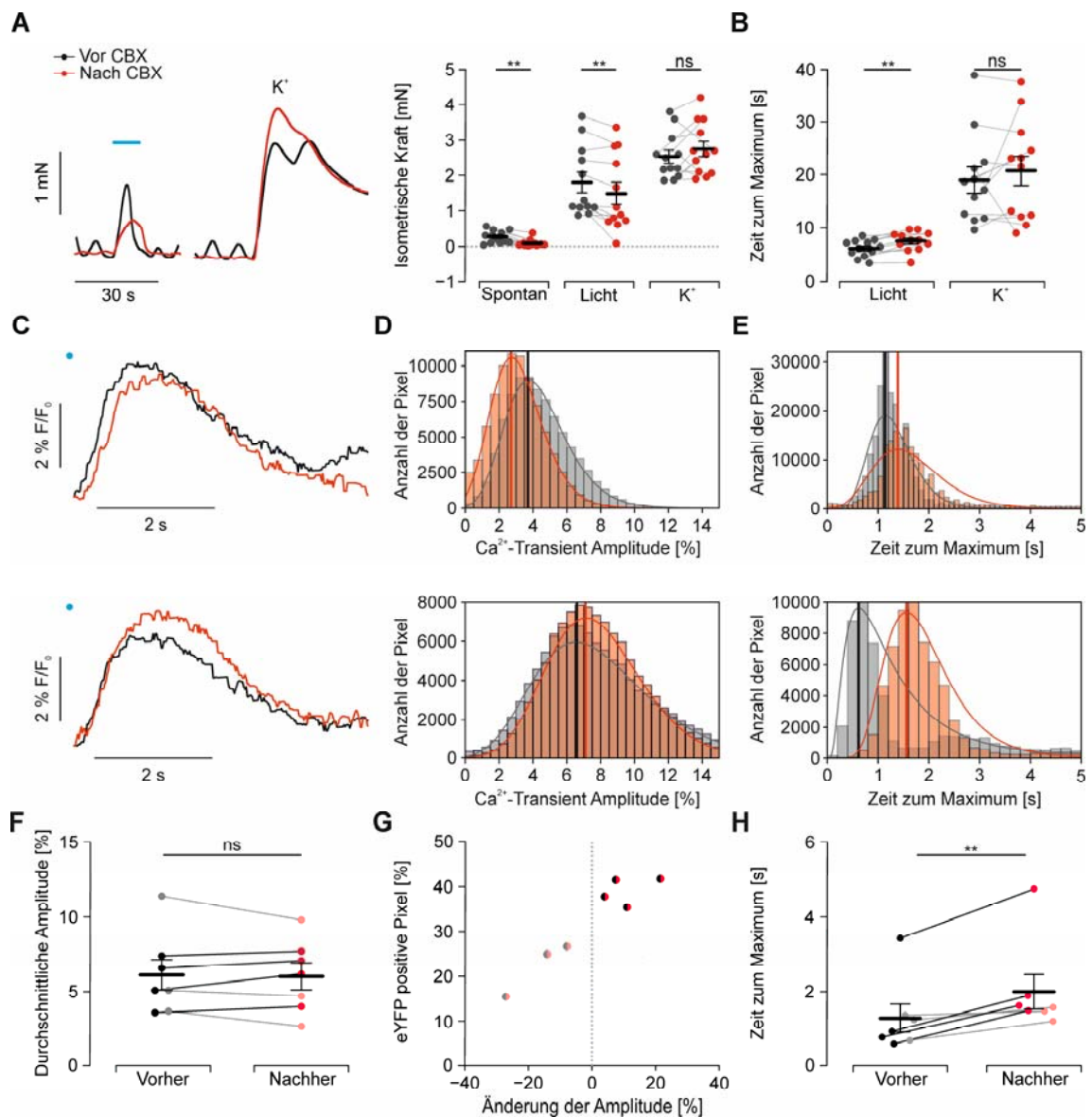


Abbildung 8: Analyse der elektrischen Kopplung der SMC durch *gap junctions*. Zur Blockade der *gap junction*-basierten, elektrischen Kopplung wurden Muskelstreifen des Antrums transgener Mäuse mit 30 μ M Carboxolone (CBX, rot) für 15 min inkubiert. **(A)** Links: Repräsentative isometrische Kraftmessungen mit spontanen, lichtinduzierten (Blauer Balken, 10 s, 0,2 mW/mm²) und K⁺ (60 mM) induzierten Kontraktionen. Rechts: Analyse der isometrischen Kraftentwicklungen (N = 4, n = 12). Die statistische Testung erfolgte durch einen einfaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung und Sidak's Post-Hoc-Mehrfachvergleich (p = 0,003 für Spontanaktivität, p = 0,008 für Licht, p = 0,54 für K⁺). **(B)** Analyse der Zeit zwischen Stimulation und maximaler Amplitude der Kontraktion (N = 4, n = 12). Die statistische Testung erfolgte durch einen zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung und Sidak's Post-Hoc-Mehrfachvergleich (p = 0,003 für Licht, p = 0,63 für K⁺). **(C-H)** Makroskopisches Ca²⁺-Imaging in Muskelstreifen des Antrums mit blauem Licht (11 mm² Beleuchtungsfläche, 50 ms Stimulationszeit, 6 mW/mm² Lichtintensität). **(C)** Originalspuren analysierter ROIs vor (schwarz) und nach (rot) Applikation von CBX. Im oberen Beispiel ist ein verzögerter Anstieg des Ca²⁺-Transienten mit herabgesetzter Amplitude zu beobachten, während im unteren Beispiel ein simultaner Anstieg mit insgesamt höherer Amplitude zu sehen ist. Die Zeit zum Maximum ist in beiden verlängert. **(D)** Histogramme der prozentualen Intensitätsänderung der Maximalamplituden lichtinduzierter Ca²⁺-Transienten (vertikale Linie) in einem log-normal fit zweier analysierter Muskelstreifen vor und nach CBX-Applikation. Im oberen Beispiel zeigt sich eine Verringerung der durchschnittlichen Amplitude, während diese

im unteren Beispiel erhöht ist. **(E)** Histogramme der Zeit zum Maximum lichtinduzierter Ca^{2+} -Transienten (vertikale Linie) in einem *log-normal fit* zweier analysierter Muskelstreifen. In beiden Beispielen zeigt sich eine Verlängerung der Zeit von Lichtstimulation bis zur maximalen Ausprägung des Ca^{2+} -Transienten. **(F)** Analyse der durchschnittlichen prozentualen Amplitudenänderung der Ca^{2+} -Transienten vor und nach CBX. Muskelstreifen mit einem Anstieg der Amplitude sind in schwarz/rot sichtbar, die mit einer Verringerung in grau/hellrot. **(G)** Verhältnis des Anteils eYFP-positiver an allen analysierten Pixeln zur prozentualen Änderung der durchschnittlichen Ca^{2+} -Transient-Amplitude des gesamten Muskelstreifens nach CBX-Applikation. **(H)** Analyse der Zeit zum Maximum vor und nach CBX ($p = 0,004$). In F-H stellt jeder Datenpunkt einen einzelnen analysierten Muskelstreifen dar ($n = 7$). Die statistische Messung erfolgte durch einen gepaarten, zweiseitigen t-Test. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert \pm der Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert aus: Vogt et al. 2021, Figure 5.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die *gap junction*-basierte Kopplung einen Einfluss auf die Weiterleitung lichtinduzierter, elektrischer Ströme hat und sich die Erregung von Chr2-positiven Zellen auf negative Nachbarzellen ausbreitet. In Zukunft bleibt zu untersuchen, welche Mechanismen in welchem Ausmaß an der elektrischen Kopplung der SMC durch *gap junctions* beteiligt sind: Ist die Diffusion von Ionen oder die elektrotonische Ausbreitung der Depolarisation zu benachbarten Zellen von größerer Relevanz für die interzelluläre Kopplung? Auch Erkenntnisse zu den örtlichen und zeitlichen Konstanten dieser Erregungsausbreitung im glatten Muskel sind von Nöten.

3.5 Druckmessung und Propulsionsanalyse des intakten Magens

Um zu untersuchen, inwiefern lichtinduzierte Kontraktionen in einer physiologisch relevanten Druckerhöhung resultieren, wurden intakte Mägen unter kontinuierlicher Druckmessung denselben Stimuli der isometrischen Kraftmessung unterzogen. Kenntnisse über induzierbare Druckerhöhungen sind essenziell, da sie die Basis für eine potenzielle Magenpassage von Nahrungsinhalten darstellen. Die zirkumferenzielle Panorama-Belichtung des gesamten Magens wurde dabei durch drei im 120° -Abstand zueinanderstehenden Blaulicht-LEDs ermöglicht. Hierbei rief die supramaximale Lichtstimulation Druckerhöhungen hervor, die in ihrer Amplitude vergleichbar zu denen waren, die durch EFS induziert wurden. Im Vergleich zu den Druckerhöhungen, die durch 60 mM K^+ oder $10 \text{ } \mu\text{M CCh}$ hervorgerufen wurden, fielen lichtinduzierte Drücke jedoch geringer aus. Dies demonstriert die homogene Erregung der Magenmuskulatur durch Licht, da eine inhomogene Chr2-Expression oder Illumination mit unbelichteten Arealen zu Ausweichbewegungen nicht-kontrahierender Magenwandareale führen und somit eine effektive Druckentwicklung verhindern würde (Abbildung 9A). Analog zu den Ergebnissen der isometrischen Kraftmessung konnte auch hier kein Unterschied zwischen Chr2-transgenen und Wildtyp-Mägen bei Stimulation durch EFS, K^+ oder CCh nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass mechanosensitive Verschaltungen des ENS eine Voraussetzung für lichtinduzierte Druckentwicklungen sind, wurde der Na_v -Kanallocker TTX appliziert, um neuronale Aktivitäten zu annullieren. Hierbei veränderten sich die

hervorgerufenen Druckamplituden bei Lichtstimulation und hohem K^+ nicht, während sie lediglich bei der EFS signifikant herabgesetzt waren (Abbildung 9B). Um Nebenwirkungen auf kompletter Organebene auszuschließen, wurden die Druckamplituden und die Frequenz der Spontanaktivität analysiert. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede in untersuchten Mägen Chr2-transgener und CD-1 WT Mäusen (Abbildung 9C-E).

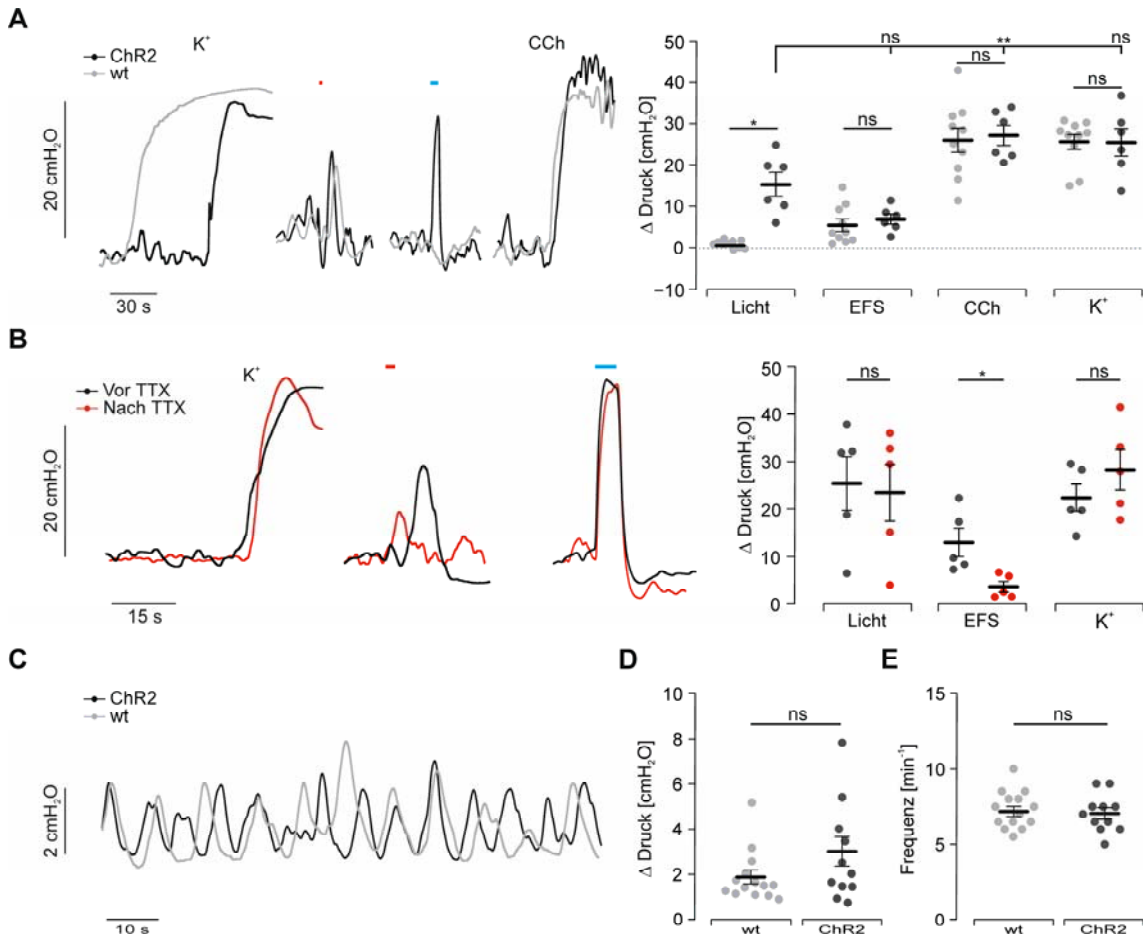


Abbildung 9: Intraluminale Druckmessung intakter Mägen. (A) Links: Repräsentative intraluminale Druckmessungen in Mägen von Wildtyp (grau) und Chr2-transgenen Mäusen (schwarz). Kontraktionen wurden durch 60 mM K^+ , EFS (Roter Balken, 5 s, 10 Hz, 1-10 ms, 80-150 V), blaues Licht (Blauer Balken, 10 s, 0,2 mW/mm²) und 10 μ M CCh hervorgerufen. Rechts: Analyse der Druckentwicklungen (N = 10 für WT; N = 6 für Chr2) der jeweiligen Stimuli. Die statistische Testung erfolgte durch einen zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung und Sidak's Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen Chr2 und WT ($p = 0,01$ für Licht; $p \geq 0,73$ für EFS, CCh und K^+) und Tukey's Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen den verschiedenen Stimuli innerhalb der Chr2-Mägen ($p = 0,001$ für Licht vs CCh; $p \geq 0,052$ für Licht vs EFS und K^+). **(B)** Links: Repräsentative intraluminale Druckmessungen in Mägen Chr2-transgener Mäuse vor (schwarz) und nach (rot) Inkubation mit 1 μ M TTX. Kontraktionen wurden analog zu (A) induziert. Rechts: Analyse der intraluminale Drücke vor und nach TTX (N = 5). Die statistische Testung erfolgte durch einen zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung und Sidak's Post-Hoc-Mehrfachvergleich ($p = 0,14$ für Licht; $p = 0,03$ für EFS; $p = 0,68$ für K^+). **(C)** Repräsentative Druckmessung der Spontanaktivität in intakten Chr2-transgenen (schwarz) und CD-1 Wildtyp (grau) Mägen. **(D-E)** Analyse der Druckamplituden (N = 11; $p = 0,15$) und Frequenz (N = 14; $p = 0,63$) der Spontanaktivität innerhalb der letzten 2 Minuten der initialen 20-minütigen Äquilibrationszeit. Die statistische Testung erfolgte durch einen ungepaarten, zweiseitigen t-

Test. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert \pm der Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert aus: Vogt et al. 2021, Figure 6.

Um zu untersuchen, ob die lichtinduzierte Druckerhöhung in der Lage ist, die Magenpassage des Chymus zu forcieren, wurde die Nahrungspropulsion am Duodenal-Stumpf (dem aboralen Magenausgang) per Videoaufnahme von ChR2 (Abbildung 10A) und Wildtyp Mägen (Abbildung 10B) dokumentiert. Während des Lichtstimulation-Protokolls konnte bei ChR2-transgenen Mägen eine deutlich gesteigerte Propulsion nachgewiesen werden, die nicht bei Wildtyp Mägen zu beobachten war (Abbildung 10C-D). Die Applikation von CCh als Positivkontrolle führte in beiden Gruppen zu einer ausgeprägten Propulsion.

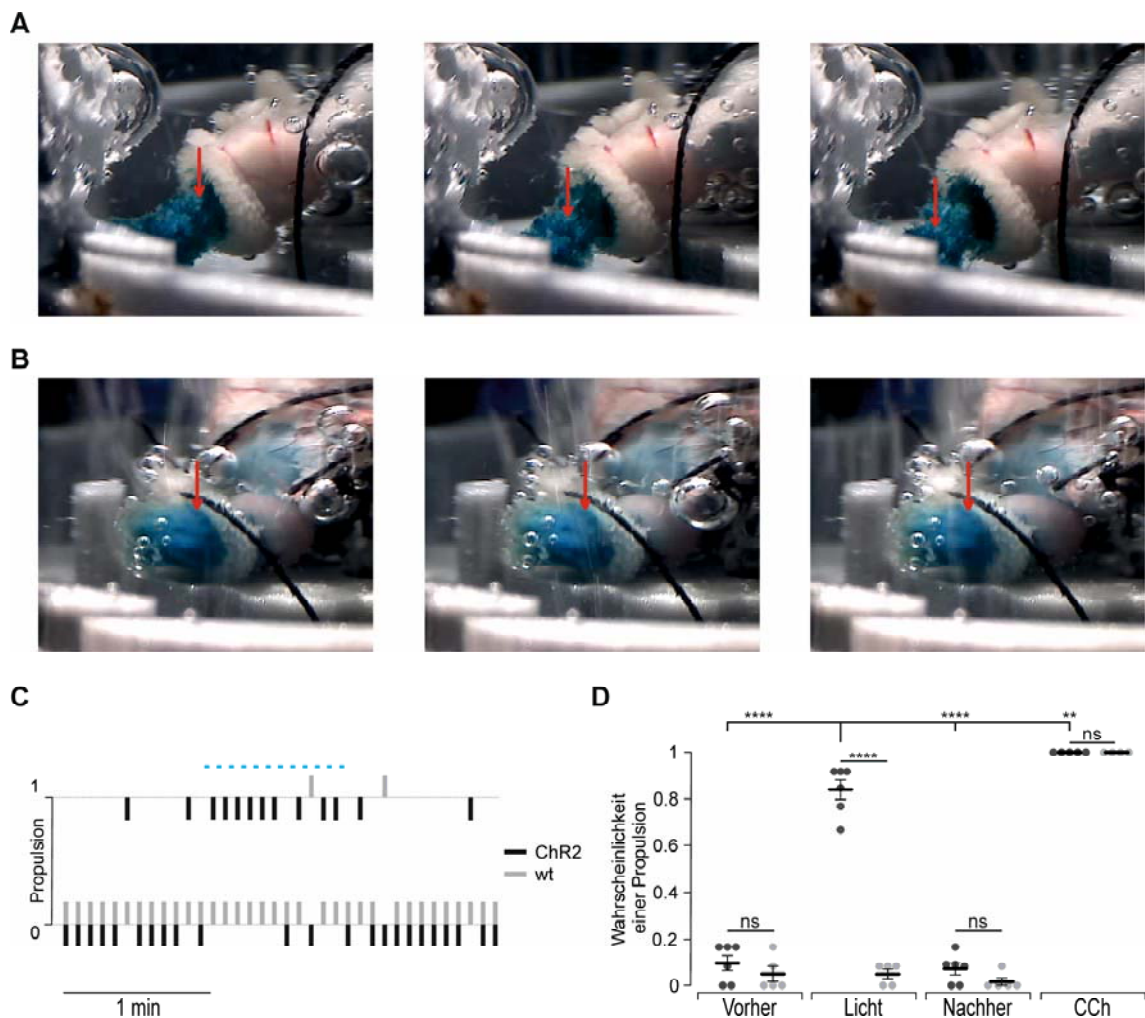


Abbildung 10: Lichtinduzierte Propulsion des Chymus in intakten Mägen ChR2-transgener Mäuse. (A-B) Aufnahmen des duodenalen Stumpfes von ChR2-transgenen (A) und CD-1 Wildtyp (B) Mägen. Die Bilder zeigen den aboralen Magenausgang im Abstand von je 5 s direkt nach 2-sekündiger Lichtstimulation. Hierbei ist eine deutliche Propulsion in (A) aber nicht in (B) zu sehen. **(C)** Repräsentative Auswertung der Videoaufnahme eines ChR2 (schwarz) und WT-Magens (grau). Aufgetragen ist die binäre Beurteilung (0 = nein, 1 = ja) einer potenziell wahrnehmbaren Propulsion wie in (A) vor, während und nach dem Lichtstimulations-Protokoll (Blaue Balken, 12 x 2 s Stimulationszeit, 0,2 mW/mm²). Die Bewertung einer potenziell erfolgten Propulsion wurde von einer verblindeten Person durchgeführt. **(D)** Analyse der Propulsionswahrscheinlichkeit vor, während und nach dem Lichtstimulations-Protokoll (N = 5 für ChR2;

N = 4 für WT), und der Applikation von 10 μ M CCh (N = 5 für ChR2, N = 4 für WT). Die statistische Testung erfolgte durch einen zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung und *Sidak's* Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen ChR2 und WT ($p < 0,0001$ für Licht; $p \geq 0,52$ für vorher, nachher und CCh) und *Tukey's* Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen den verschiedenen Stimuli der ChR2-Mägen ($p > 0,0001$ für Licht vs vorher und nachher; $p = 0,001$ für Licht vs CCh). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert \pm der Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert aus: Vogt et al. 2021, Figure 7.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die lichtinduzierte intraluminaler Druckerhöhung des Magens in einer effektiven Steigerung der Propulsion resultiert, die die Zerkleinerung aufgenommener Nahrung und die Weiterleitung des Magen chymus in das Duodenum ermöglicht.

3.6 Druckmessung im Methylenblau-basierten Gastroparese-Modell des Magens

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, ist bei der Gastroparese ein Ausfall des ENS zu beobachten. Es bleibt daher zu klären, ob die direkte optogenetische Stimulation der glatten Muskulatur trotz dessen wirksam bleibt. Dies wurde mithilfe eines Methylenblau-basierten Gastroparese-Modells des Magens untersucht. Hierbei lagert sich Methylenblau vornehmlich in ICCs und enterischen Neuronen ein und führt durch Rotlicht-induzierte Photooxidation mit Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zur irreversiblen Schädigung der Zellen (Liu et al. 1994). Nach 30-minütiger Inkubation der Mägen mit Methylenblau war dieses im ENS nachweisbar (Abbildung 11A) und zeigte keine Auswirkung auf die ChR2-Expression in SMC (Abbildung 11B-C). Nach Rotlicht-induzierter Phototoxizität waren die Spontanaktivität und die durch EFS induzierten Druckentwicklungen nahezu vollständig annulliert. Dies beweist die erfolgreiche Läsion des ENS mitsamt ICC und Neuronen. Im Gegensatz dazu rief die Stimulation mit Licht weiterhin Druckanstiege hervor. Diese fallen nun zwar etwas niedriger aus als vor der Behandlung mit Methylenblau, sind aber im selben Ausmaß gesunken, wie die Druckentwicklungen, die durch K^+ oder CCh induziert wurden (Abbildung 11D). Dies spricht dafür, dass der leichte Abfall der lichtinduzierten Drücke nicht spezifisch durch den Defekt des ENS zustande gekommen ist, sondern sich auf eine allgemeine Vitalitätsminderung des Gewebes zurückführen lässt.

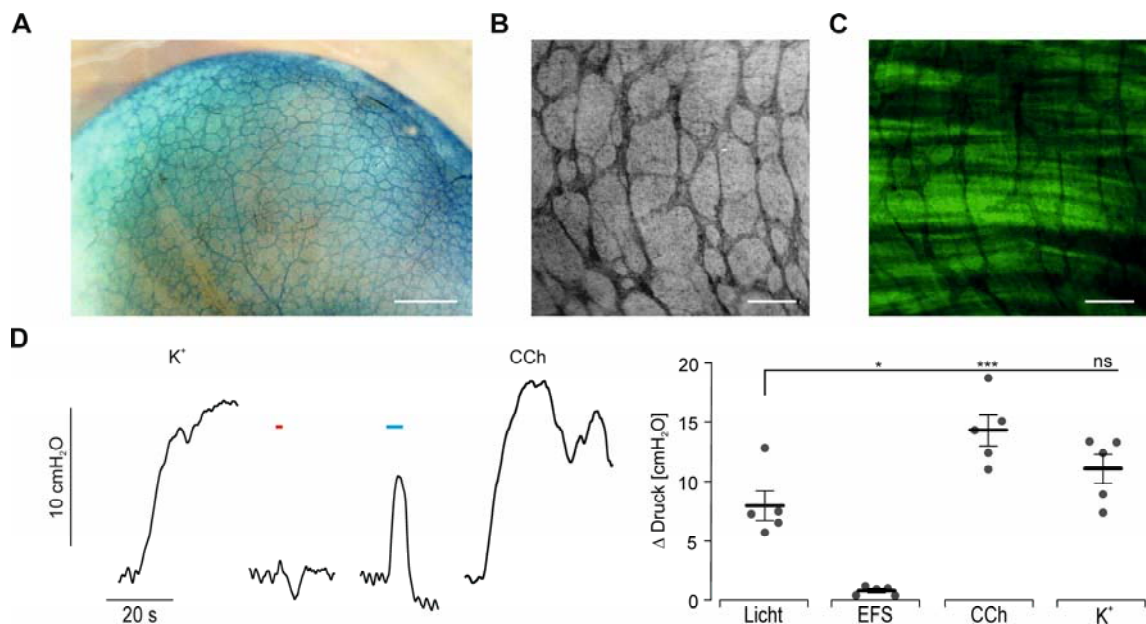


Abbildung 11: Gastroparese Modell. (A) Aufnahme eines explantierten Chr2-transgenen Magens nach 30-minütiger Inkubation mit 50 μM Methylenblau. Maßstab = 1 mm. (B-C) Nahaufnahme der Methylenblau-Färbung (B) und Überlappung mit der nativen eYFP-Fluoreszenz (C) eines Chr2-transgenen Magens zeigen die Selektivität von Methylenblau für ICC und Nervenfasern, jedoch nicht für SMC. Maßstab = 200 μm . (D) Links: Repräsentative intraluminale Druckmessungen in Chr2-transgenen Mägen nach Methylenblau-basierter Phototoxizität. Kontraktionen wurden durch 60 mM K^+ , EFS (roter Balken, 2 s, 10 Hz, 1-10 ms, 80-140 V), Licht (blauer Balken, 5 s, 0,2 mW/mm^2) und 10 μM CCh hervorgerufen. Rechts: Analyse der Druckentwicklung durch die jeweiligen Stimuli (N = 5). Die statistische Testung erfolgte durch einen einfaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung und Tukey's Post-Hoc-Mehrfachvergleich ($p \leq 0,02$ für Licht vs EFS und CCh; $p = 0,17$ für Licht vs K^+). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert \pm der Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert aus: Vogt et al. 2021, Figure 8.

Diese Daten demonstrieren die vollständige Läsion des ENS des Methylenblau-basierten Gastroparese-Modells mit nur leichter Einschränkung der SMC. In diesem Modell resultierte die direkte optogenetische Stimulation weiterhin in signifikanten Kontraktionen und Druckerzeugungen, und könnte somit in Zukunft für die potenzielle Verbesserung der Magenpassage im Rahmen der Gastroparese genutzt werden.

3.7 Lichtinduzierte Kontraktionen durch Aktivierung von OPN5 und Rekrutierung der G_q -Kaskade

Um die Möglichkeit der optogenetischen Stimulation von SMC durch Aktivierung des G_q -Signalwegs mit Licht zu evaluieren, wurden die glattmuskulären Organe Dünndarm (oraler Abschnitt), Uterus und Harnblase von CAG-OPN5-eYFP transgenen Mäusen untersucht. Diese Mäuse exprimieren den UV-lichtsensitiven G_q -gekoppelten Rezeptor Neuropsin (OPN5) in Fusion mit dem *enhanced Yellow Fluorescent Protein*. Die Expression unterliegt dem chicken- β -actin Promotor, der über eine hohe Aktivität in Muskelgeweben verfügt (Bruegmann et al. 2010). Analog zur Chr2-Expression der CAG-Chr2-eYFP transgenen

Mägen zeigten die hier untersuchten Dünndarm-Präparate eine eYFP-Expression in longitudinaler und zirkulärer Ausrichtung (Abbildung 12A-B). Diese war auf SMC begrenzt und nicht in neuronalen Strukturen nachweisbar (Abbildung 12C). In isometrischen Kraftmessungen rief die Lichtstimulation mittels UV-Licht Kontraktionen in OPN5-transgenen Präparaten hervor. Diese waren in ihrer Amplitude vergleichbar mit denen, die durch CCh und hohem K^+ induziert wurden, und höher als jene, die durch EFS induziert wurden (Abbildung 12D). Die Applikation des G_q -spezifischen Inhibitors FR900359 führte dabei zur vollständigen Annullierung der G_q -abhängigen Stimulationen durch Licht, EFS und CCh. In CD-1 Wildtyp Kontrollmägen hingegen konnte keine Lichtreaktion nachgewiesen werden. Die spontanen als auch durch Licht, EFS, CCh und hohes K^+ induzierten Kontraktionen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen OPN5-transgenen und Wildtyp-Präparaten. Dies schließt ausgeprägte Nebenwirkungen der OPN5-Überexpression auf den kontraktilen Apparat des Dünndarms aus. Ebenso ließ sich die induzierte Kontraktionsstärke mit hoher zeitlicher Auflösung in Abhängigkeit von der applizierten Lichtintensität (Abbildung 12E) als auch der Pulsdauer (Abbildung 12F) kontrollieren. Dabei konnte eine halbmaximal effektive Lichtintensität von $140 \pm 24 \mu\text{W}/\text{mm}^2$ ($N = 2, n = 5$) bei 2 s langen Lichtpulsen und eine halbmaximal effektive Pulsdauer von $87 \pm 22 \text{ ms}$ ($N = 2, n = 5$) bei einer Lichtintensität von $3 \text{ mW}/\text{mm}^2$ ermittelt werden.

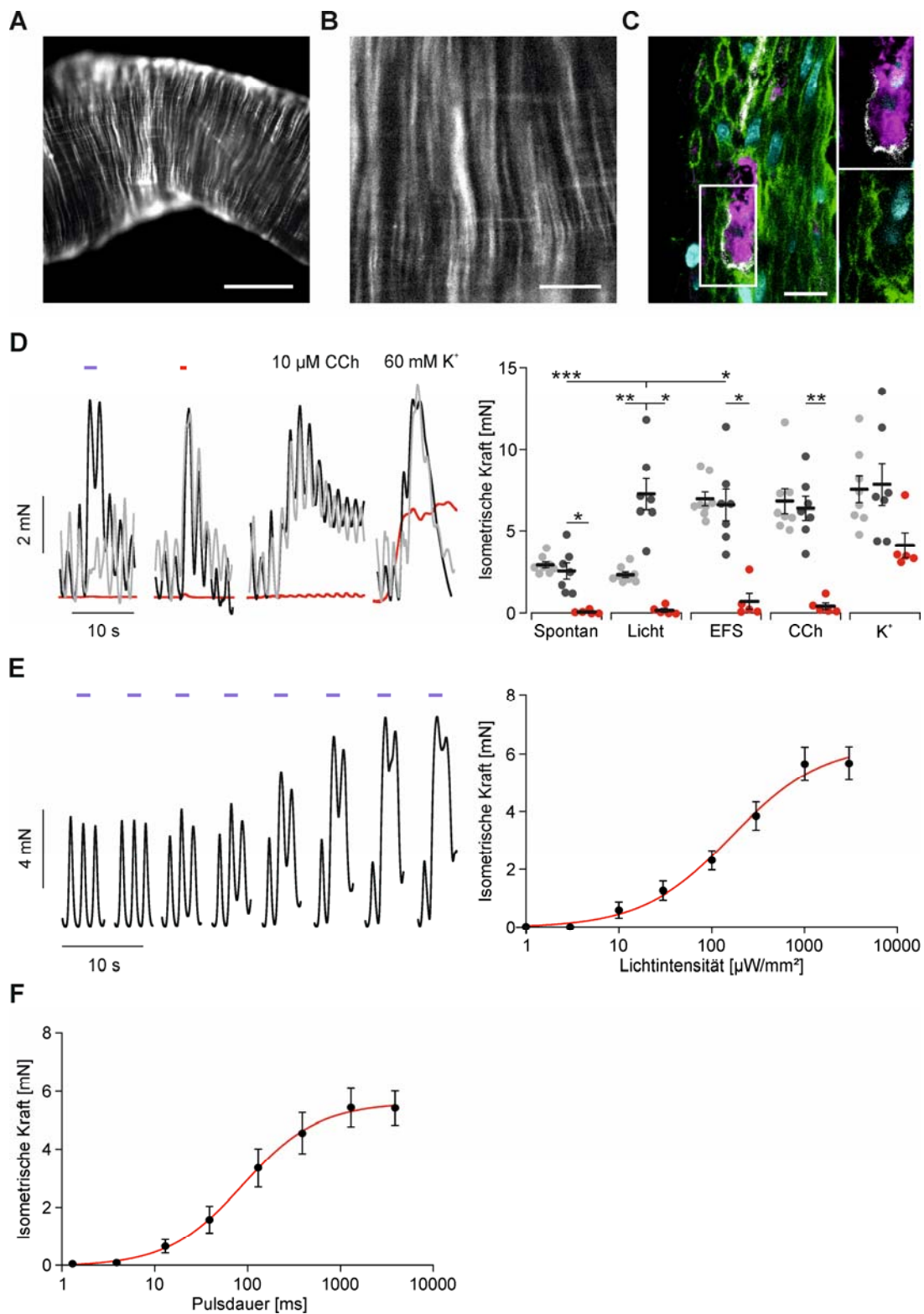


Abbildung 12: Lichtinduzierte Kontraktionen im Dünndarm OPN5-transgener Mäuse. (A-B) Expression von eYFP (weiß) in longitudinaler und zirkulärer Ausrichtung im Dünndarm einer OPN5-transgenen Maus. Maßstab = 2mm in A; 400 μ m in B. (C) Die membranständige OPN5/eYFP-Fluoreszenz ist auf SMC begrenzt und nicht in β -III-Tubulin exprimierenden enterischen Neuronen (magenta) oder c-Kit exprimierenden ICC (weiß) nachweisbar. (D) Links: Repräsentative isometrische Kraftmessungen des Dünndarms von Wildtyp (grau) und OPN5 Mäusen vor (schwarz) und nach (rot) Applikation von FR900359. Kontraktionen wurden durch UV-Licht (violetter Balken, 2 s, 3 mW/mm^2), EFS (Roter Balken, 1 s, 100 Hz,

2 ms, 40 V), 10 μM CCh und 60 mM K^+ hervorgerufen. Rechts: Analyse der induzierten isometrischen Kräfte durch die jeweiligen Stimuli ($N = 3$, $n = 5$ für WT; $N = 3$, $n = 7$ für vor FR; $N = 3$, $n = 5$ für nach FR). Die statistische Testung erfolgte mit einem zweifaktoriellen *ANOVA* mit Messwiederholung und *Sidak's* Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen OPN5 und WT ($p = 0,0023$ für Licht; $p \geq 0,61$ für EFS, CCh, K^+ und Spontan) und *Tukey's* Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen den verschiedenen Stimuli innerhalb der OPN5-Gruppe ($p \leq 0,048$ für Licht vs EFS und Spontan; $p \geq 0,09$ für Licht vs K^+ und CCh). **(E)** Abhängigkeit der isometrischen Kraft von der Lichtintensität (links nach rechts: 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ Lichtintensität bei 2 s Pulsdauer) und Analyse (rechts, $N = 2$, $n = 5$). **(F)** Analyse der Abhängigkeit der isometrischen Kraft von der applizierten Pulsdauer bei einer Lichtintensität von 3000 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ ($N = 2$, $n = 5$). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert \pm der Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert aus: Wagdi et al. 2022, Figure 8.

Auch in explantierten Präparaten des Uterus und der Harnblase transgener Mäuse konnte eine OPN5-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 13A,C). In diesen induzierte UV-Licht Kontraktionen, wohingegen keine Reaktionen in CD-1 Wildtyp Organen beobachtet wurden (Abbildung 13B,D). Die Stimulation mittels EFS, CCh und hohem K^+ zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen OPN5-transgenen und CD-1 Wildtyp Organen.

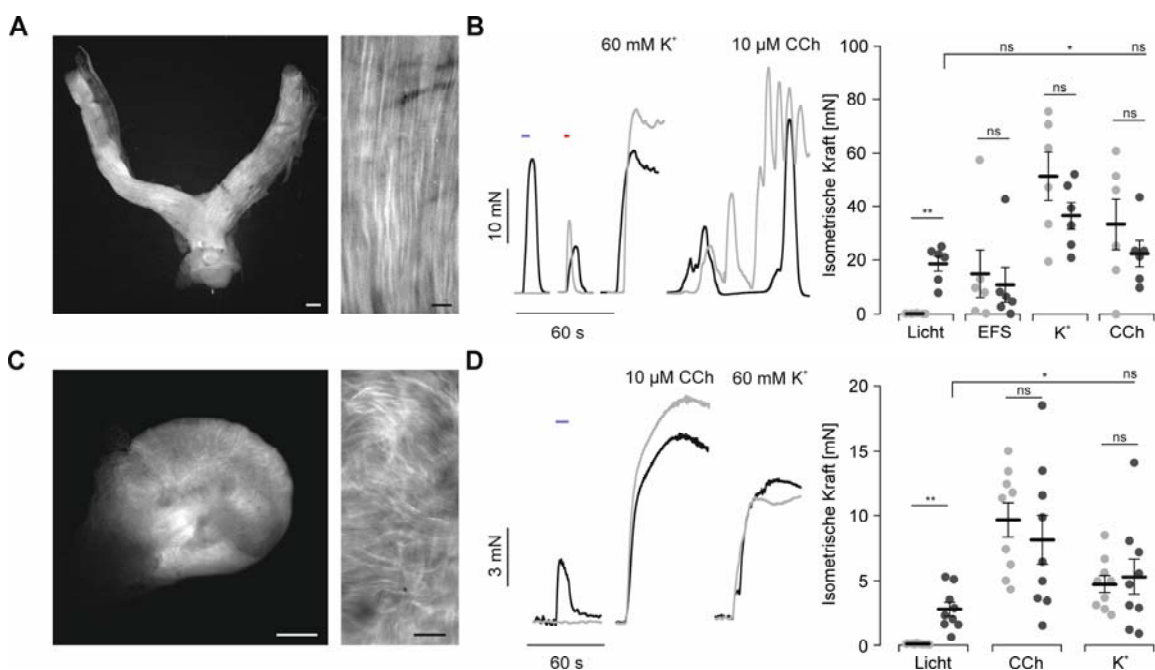


Abbildung 13: Lichtinduzierte Kontraktionen in Uterus und Blase OPN5-transgener Mäuse. **(A,C)** Expression von eYFP (weiß) im Uterus (A; Maßstab = 2 mm links; Maßstab = 200 μm rechts) und in der Harnblase (C; Maßstab = 1 mm links; Maßstab = 200 μm rechts) einer OPN5/eYFP-transgenen Maus. **(B)** Links: Repräsentative isometrische Kraftmessungen des Uterus von Wildtyp (grau) und OPN5/eYFP Mäusen (schwarz). Kontraktionen wurden durch UV-Licht (violetter Balken, 5 s, 3 mW/mm^2), EFS (Roter Balken, 3 s, 100 Hz, 2 ms, 40 V), 10 μM CCh und 60 mM K^+ hervorgerufen. Rechts: Analyse der induzierten isometrischen Kräfte der jeweiligen Stimuli ($N = 3$, $n = 6$ für WT; $N = 2$, $n = 6$ für OPN5). Die statistische Testung erfolgte mit einem zweifaktoriellen *ANOVA* mit Messwiederholung und *Sidak's* Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen OPN5 und WT ($p = 0,007$ für Licht; $p \geq 0,68$ für EFS, CCh und K^+) und *Tukey's* Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen den verschiedenen Stimuli innerhalb der OPN5-Gruppe ($p = 0,03$ für Licht vs K^+ ; $p \geq 0,89$ für Licht vs EFS und CCh). **(D)** Repräsentative isometrische Kraftmessungen der Harnblase von Wildtyp (grau) und OPN5/eYFP Mäusen (schwarz). Kontraktionen wurden durch UV-Licht

(violetter Balken, 10 s, 3 mW/mm²), 10 μM CCh und 60 mM K⁺ hervorgerufen. Rechts: Analyse der induzierten isometrischen Kräfte der jeweiligen Stimuli (N = 3, n = 9 für WT; N = 3, n = 9 für OPN5). Die statistische Testung erfolgte mit einem zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung und *Sidak's* Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen OPN5 und WT ($p = 0,003$ für Licht; $p \geq 0,93$ für CCh und K⁺) und *Tukey's* Post-Hoc-Mehrfachvergleich zwischen den verschiedenen Stimuli innerhalb der OPN5-Gruppe ($p = 0,012$ für Licht vs CCh; $p = 0,09$ für Licht vs K⁺). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert \pm der Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert aus: Wagdi et al. 2022, Supplementary Figure 3.

Diese Daten demonstrieren erstmals, dass durch die lichtinduzierte Aktivierung des G_q-gekoppelten Rezeptors OPN5 die Kontraktilität glattmuskulärer Organe mit hoher zeitlicher Auflösung kontrolliert werden kann.

3.8 Adeno-assoziierte Viren (AAV) zur effizienten Transduktion glatter Muskelzellen

Der erste Schritt zur erfolgreichen Translation der optogenetischen Stimulation stellt die suffiziente Expression lichtsensitiver Proteine wie ChR2 oder OPN5 in den jeweiligen Zielzellen dar. Um dies in lebenden Geweben zu erreichen, erfolgt die Transduktion häufig durch Adeno-assoziierte Viren (AAV). In diesem Projekt wurde die Transduktionseffizienz etablierter, generischer AAV (Typen 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, eB und PHP) mit dem neuartigen AAV2.5 (siehe Kapitel 1.4) systematisch verglichen. Dieser enthält das Capsidprotein des AAV2 mit 5 Punktmutationen aus dem Capsidproteins des AAV1 (Bowles et al. 2012) und verfügt über eine hohe Aktivität in Muskelgewebe, unter anderem im glatten Muskel (Lompré et al. 2013).

An Tag 6 nach AAV-Applikation auf kultivierte SMC ließen sich die Signale des jeweiligen Fluoreszenzproteins in den Zellen nachweisen (Abbildung 14A). Die Analyse der Expressionsrate zu diesem Zeitpunkt zeigte, dass die Transduktion des AAV2.5 um mehr als eine Magnitude effizienter als die des AAV2 war, der wiederum die höchste Expressionsrate unter den generischen AAVs aufwies (Abbildung 14B). Die halbmaximal effektive Anzahl applizierter Viruspartikel ($\log_{10}(\text{EC}_{50})$) der Viren AAV2 und AAV2.5 betrug jeweils $8,08 \pm 0,08$ ($n = 3$) und $6,89 \pm 0,12$ ($n = 3$). Dies bedeutet, dass bei Einsatz des AAV2.5 die benötigte Virusmenge für das Erreichen einer halbmaximalen Transduktion um mindestens 93% im Vergleich zu generischen AAV reduziert werden kann.

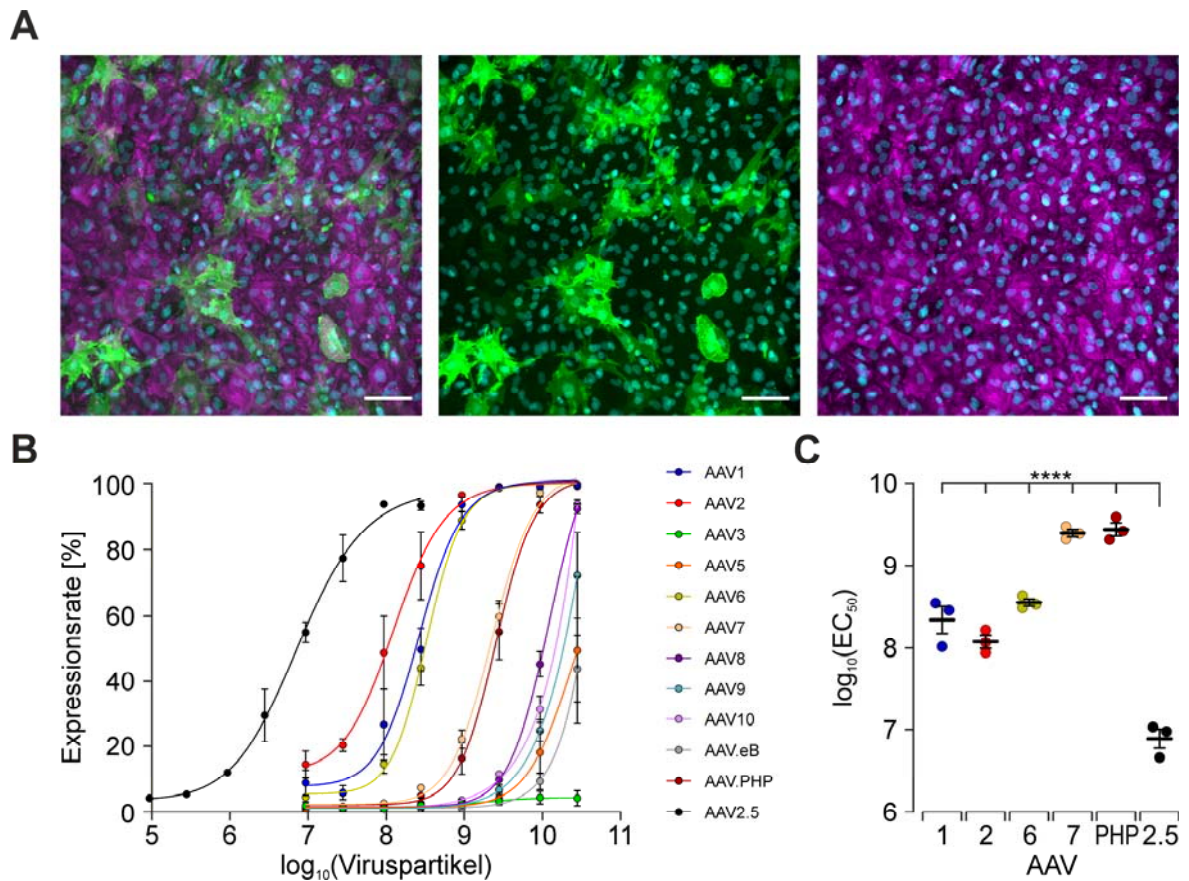


Abbildung 14: Transduktionseffizienz verschiedener AAV in kultivierten SMC. **(A)** Fluoreszenzaufnahmen kultivierter SMC an Tag 6 nach Applikation des AAV2.5 (CAG-OPN5-eYFP) zeigen eine Expressionsrate von 40%. Dargestellt ist der Anteil der eYFP-positiven Pixel (grün) an allen SMA-positiven Pixeln (α -Smooth-Muscle-Actin, magenta). Zellkerne sind in Cyan sichtbar. Maßstab = 100 μ m. **(B)** Analyse der Relation der Expressionsrate zur Anzahl der applizierten Viruspartikel an Tag 6 nach Zugabe des Virus ($n = 3$). **(C)** Vergleich der halbmaximal effektiven Anzahl applizierter Viruspartikel ($\log_{10}(EC_{50})$) ausgewählter AAV ($n = 3$). Die statistische Testung erfolgte durch einen einfaktoriellem ANOVA mit Messwiederholung und *Tukey's* Post-Hoc-Mehrfachtestung ($p < 0,0001$ für AAV2.5 vs AAV1, 2, 6, 7 und PHP).

Diese Daten demonstrieren die Möglichkeit einer suffizienten Transduktion von SMC mit nachfolgender Expression des optogenetischen Proteins mittels generischer sowie neuartiger, hocheffizienter AAV.

4 Diskussion

4.1 Lichtinduzierte Kontraktionen durch ChR2 und OPN5 in der glatten Muskulatur

In dieser Arbeit konnte mittels verschiedener Methoden gezeigt werden, dass die zur Erregung des Magens genutzte optogenetische Stimulation sowohl direkt als auch selektiv auf die glatte Muskulatur wirkt: Durch die histologische Analyse konnte nachgewiesen werden, dass ChR2/eYFP sowie OPN5/eYFP nur in den SMC des *Stratum circulare* und *longitudinale* exprimiert ist. Das ENS, das sich aus ICCs und enterischen Neuronen zusammensetzt, blieb von dieser Expression ausgespart. Zum anderen konnte auf funktioneller Ebene gezeigt werden, dass die Beleuchtung des glatten Muskels sowohl auf Streifen- als auch Organebene signifikante Kraft- und Druckentwicklungen induzierte. Die experimentelle Erregung durch Lichtpulse weicht dabei von der physiologischen Erzeugung peristaltischer Wellen ab: Obwohl das ENS umgangen wird und durch die Panorama-Illumination eine simultan-globale Kontraktion erzeugt wird, konnte eine effektive Induktion der propulsiven Nahrungspassage in ChR2-transgenen Mägen dennoch gezeigt werden.

4.2 Unabhängigkeit der lichtinduzierten Kontraktionen vom enterischen Nervensystem

Um zu demonstrieren, dass dieser Ansatz der muskulären Stimulation auch zur Therapie der Gastroparese genutzt werden kann, haben wir lichtinduzierte intraluminale Druckentwicklungen in explantierten Mägen nach Methylenblau-basierter Phototoxizität analysiert. Da Methylenblau selektiv von ICC und enterischen Neuronen aufgenommen wird, erlaubt die nachfolgende Beleuchtung mit rotem Licht die effektive Destruktion des ENS (Liu et al. 1994). Um eine vollständige Annullierung des ENS zu gewährleisten, musste eine leichte Funktionseinschränkung der glatten Muskulatur in Kauf genommen werden. Dies ist an den verminderten Antworten auf Stimulationen durch Licht, hohes K^+ oder CCh zu erkennen. Trotz dessen führte blaues Licht weiterhin zu signifikanten Druckentwicklungen, während diese bei der Stimulation mit EFS vollständig ausfielen. Dieser Nachweis demonstriert die Suffizienz der ChR2-getragenen, optogenetischen Depolarisation glatter Muskelzellen unter Umgehung des geschädigten enterischen Nervensystems.

In vivo werden von ICC erzeugte Schrittmacherpotenziale elektrotonisch an SMC weitergegeben und nachfolgend depolarisiert. Diese elektrische Erregung unterliegt dabei einer strengen Regulation durch verschiedene Neuronenpopulationen des ENS. Diese stimulieren aber auch direkt die glatten Muskelzellen beispielsweise mittels Acetylcholin über deren muskarinergen M_3 -Rezeptor. Die SMC werden hierdurch in ihrer Suszeptibilität für

Schrittmacherströme der ICC gesteigert. Diese komplexe Verschaltung ist daher essenziell für überschwellige Erregungen der SMC durch Schrittmacherströme, die durch die spannungsgesteuerte Öffnung der VDCC in vivo zur Kontraktion führen. Da es bei der Gastroparese zum Untergang des ENS kommt, ist der Nachweis einer direkten und suffizienten Depolarisation der SMC durch Licht, die von ICC und enterischen Neuronen gänzlich unabhängig ist, eine fundamentale Voraussetzung.

4.3 Erregungsausbreitung der Lichtstimulation durch *gap junctions*

Die Fluoreszenzanalyse in enzymatisch isolierten Zellen offenbarte eine ChR2/eYFP-Expressionsrate von 36% der Zellen. Interessanterweise erzielten lichtinduzierte Kontraktionen dieselben Amplituden wie die globale Depolarisation durch 60 mM K⁺, bei der sämtliche SMC erregt werden. Auch dies demonstriert, dass die ChR2-getragenen Membrandepolarisationen zur Öffnung der VDCC ausreichen und stark genug sind, um durch eine effiziente elektrische Kopplung ChR2-negative Nachbarzellen mitzuerregen. Die Applikation von CBX belegt die Relevanz intakter *gap junctions* für die Weiterleitung depolarisierender Ströme: Durch die Blockade der *gap junctions* verringerte sich die isometrische Kraftentwicklung nach Lichtstimulation signifikant, erreichte aber dennoch 82,8% des Ausgangswerts. Es bleibt zu untersuchen, ob dies durch eine nur teilweise erfolgte Blockade der *gap junctions* mit CBX bedingt ist oder ob auch hier zusätzliche Kopplungsmechanismen existieren. Dies könnte zukünftig durch Experimente erweitert werden, die eine Verstärkung der elektrischen Kopplung durch *gap junctions*-öffnende Substanzen bewirken.

Durch die neu etablierte, bildstabilisierende Methode des makroskopischen *Ca²⁺-Imaging* sowie der SMC-selektiven optogenetischen Stimulation konnte erstmals die interzelluläre elektrische Kopplung zwischen den SMC untersucht werden. Von großem Vorteil ist hierbei, dass dies ohne den Einfluss des ENS auf die Zellen selbst sowie deren Kopplung untereinander analysiert werden kann. Hierbei konnten Unterschiede zwischen der heterozellulären ICC-SMC Kopplung und der homozellulären SMC-SMC Kopplung identifiziert werden: Zum einen führte die Applikation von CBX zur nahezu vollständigen Annullierung der ICC-induzierten Spontanaktivität. Zum anderen rief dieselbe Konzentration zwar eine statistisch signifikante, jedoch quantitativ deutlich geringere Abschwächung der lichtinduzierten Kontraktionen und Ca²⁺-Transienten hervor. Dies weist auf Unterschiede in der elektrischen Kopplung zwischen den SMC selbst, sowie zwischen den ICC und SMC hin. Ursachen hierfür könnten die unterschiedliche Ausprägung der *gap junctions*-Expression oder zusätzliche, gänzlich anderweitige Kopplungsmechanismen innerhalb der SMC sein. Hierzu zählt z.B. die *coupled oscillator theory*, die zwar in Modellen beschrieben worden ist (Vigmond und Bardakjian 1995; Tse et al. 2016), aber bisher ohne experimentelle Grundlage auskommen musste. Auch dies demonstriert die Stärken der Optogenetik, die durch ihre hohe räumliche und zeitliche Auflösung und zell-spezifischer

Stimulation derlei neuartige Analysemethoden für künftige Grundlagenforschungen ermöglicht.

4.4 Weiterentwicklung der optogenetischen Stimulation durch andere licht-sensitive Kanäle

Zwar wurde in dieser Arbeit die grundsätzliche Möglichkeit der optogenetischen Stimulation durch lichtinduzierte Öffnung von ChR2 demonstriert. Jedoch gilt es, in Zukunft diesen Stimulationsansatz weiter zu optimieren. In den letzten Jahren wurden viele verschiedene optogenetische Ionenkanäle entwickelt, die sich in ihren Eigenschaften spezifisch voneinander unterscheiden und somit für gezielte Fragestellungen eingesetzt werden können. So bleibt zu untersuchen, ob z.B. der Einsatz von Kanälen mit höherer *Steady state*-Stromstärke wie ChIEF oder längerer τ_{off} -Zeit wie ChETA_A von Vorteil für die optogenetische Stimulation sein könnten (Mattis et al. 2012). Ebenso wären Kanäle wie Chrimson, dessen Exzitationswellenlänge im Rotlicht-Bereich liegt (Klapeetke et al. 2014), für die Erregung tiefergelegener Zellschichten hilfreich: Licht längerer Wellenlänge kann aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften tiefer in das Gewebe eindringen und weist zudem eine geringere Licht-Toxizität auf (Richter und Bruegmann 2020). Auch Kanäle mit hoher Lichtsensitivität wie C1V1_T (Mattis et al. 2012) können von Interesse sein, um bereits bei niedriger Lichtintensität und -toxizität Zellen erregen zu können und ebenso Energie bei der Lichtstimulation einzusparen. Dies würde die Lebensdauer von implantierbaren Batterien als Energiequellen verlängern.

4.5 GPCR mit Rekrutierung der G_q-Kaskade als alternative Lichtstimulation glatter Muskelzellen

Oben genannte Optimierungsansätze müssen jedoch nicht auf Ionenkanäle beschränkt sein: In dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass die glatte Muskulatur auch durch die lichtinduzierte Aktivierung des GPCR OPN5 erregt werden kann (Wagdi et al. 2022). Nach Applikation von UV-Licht kommt es Aktivierung der G_q-Signalkaskade mit nachfolgender Kontraktion der SMC (Mechanismus siehe Abbildung 2). Isometrische Kraftmessungen an explantierten Dünndarm-Präparaten zeigten, dass auch hierbei die Amplituden der lichtinduzierten Kraftentwicklung nicht signifikant niedriger ausfallen als diejenigen, die durch hohes K⁺ oder CCh induziert wurden. Es bleibt zu untersuchen, ob die Aktivierung der G_q-Kaskade auch in der glatten Muskulatur des Magens eine realisierbare oder gar effizientere Alternative zu Ionenkanälen wie ChR2 darstellt. Beide Ansätze führen auf grundlegend verschiedenen Wegen zur Kontraktion (siehe Abbildung 15): Während die ChR2-getragene Depolarisation wie beschrieben zur Öffnung spannungsgesteuerter L-Type VDCC führt, werden durch die G_q-Kaskade zwei auf die Stimulation von SMC synergistisch wirkende Effekte erzielt: Ca²⁺ wird primär über den *second messenger* IP₃ aus dem glatten

endoplasmatischen Retikulum freigesetzt und kann somit die Kontraktion einleiten. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aktivität der in der G_q -Kaskade rekrutierten Proteinkinase C auch die L-Type VDCC vermittelten Ca^{2+} -Ströme in glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten erhöht. Dies wird durch eine erhöhte Expression in der Zellmembran sowie der Phosphorylierung des N-Terminus dieser Kanäle erreicht (Weiss et al. 2012; Raifman et al. 2017). Auch der Einfluss auf die elektrische Kopplung ist von Interesse: Da OPN5 primär über die oben genannte *second messenger*-Kaskade wirkt, ist anzunehmen, dass die Membrandepolarisation im Vergleich zu Chr2 niedriger ausfällt. Dies kann wiederum eine Abschwächung der *gap junctions*-basierten Depolarisationsweiterleitung bedeuten, was in einer ineffizienteren elektrischen Kopplung des SMC-Synzytiums resultieren würde.

Im Kontrast dazu wird G_q -vermittelt eine höhere Konzentration von IP_3 in lichtstimulierten Zellen erreicht, die eine effektivere Kontraktion auf Einzelzell-Ebene bewirken könnte. Die starke Erhöhung der IP_3 -Konzentration ist dabei der Signalamplifikation innerhalb der Signalkaskade zu verdanken: Einerseits wird durch einen einzelnen GPCR der GDP/GTP-Austausch vieler G_q -Proteine katalysiert. Andererseits werden aktive G_q -Proteine mehrere PIP_2 zu DAG und IP_3 spalten. Diese Signalamplifikation auf zellulärer Ebene war ebenfalls in den Experimenten der Kraft- und Druckmessungen zu beobachten: Aufgrund dieser resultierte die Stimulation des M_3 -Acetylcholinrezeptor durch das Analogon CCh stets in der höchsten Amplitude, obwohl auch die K^+ -induzierte Depolarisation alle SMC global erregt.

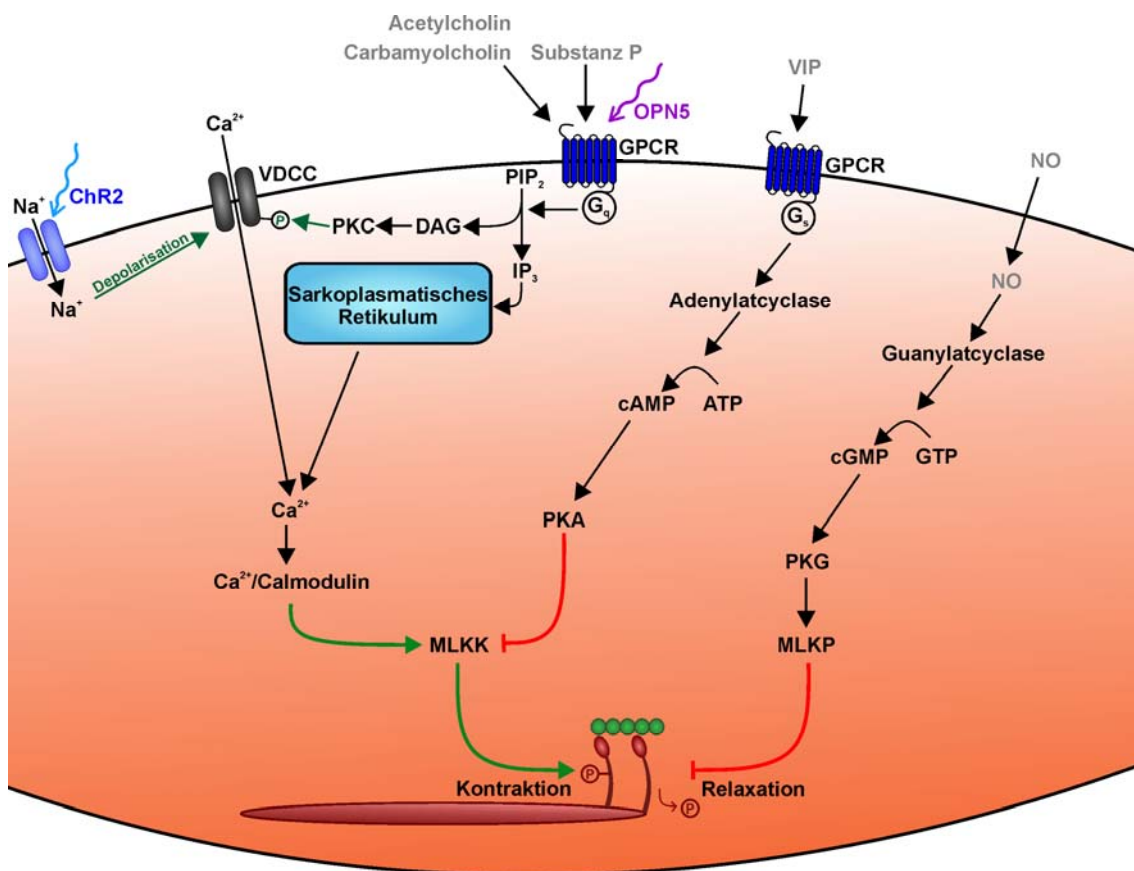


Abbildung 15: Chr2 und OPN5 eröffnen neue Möglichkeiten der Stimulation glatter Muskelzellen mit Licht. Dargestellt sind zwei neuartige Stimulationswege von SMC: Durch Applikation blauen Lichts

kommt es zum Chr2-getragenen Netto-Einwärtsstrom, der über eine Depolarisation die Öffnung der VDCC bewirkt. Die Applikation von UV-Licht führt zur Aktivierung des GPCRs OPN5 und zur Rekrutierung der G_q -Kaskade.

Diese Aspekte der G_q -abhängigen Stimulation müssen in künftigen Studien detailliert charakterisiert und in ihrer Effizienz mit der Erregung durch Chr2 verglichen werden. Denn die Anwendung von hOPN5 verfügt über einen erheblichen Vorteil in der translationalen Entwicklung des optogenetischen Magenschrittmachers: Da es sich bei diesem Rezeptor um ein humanes Protein handelt, ist keine Immunreaktion gegen exprimierende Zellen zu erwarten.

4.6 Realisierung der optogenetischen Stimulation des Magens *in vivo*

Die Implantation ferngesteuerter LED-Lichtquellen wurde bereits zur Erregung des Kolons transgener Tiere mit dem Ziel einer erhöhten Darmpassage (Hibberd et al. 2018) und in der Blase zur Kontrolle der Miktion (Jang et al. 2020) erfolgreich etabliert. Die Dicke der glatten Muskelschicht im humanen Magen beträgt ca. 2 mm (Rapaccini et al. 1988; Lee Y et al. 2020). Man kann daher davon ausgehen, dass eine suffiziente Erregung der gesamten Muskelschicht durch blaues Licht bei tolerierbaren Lichtintensitäten und damit minimalen Toxizitätseffekten möglich ist. Auch dies muss jedoch im Rahmen weiterer Studien untersucht werden. Eine derartige Beleuchtung könnte hierbei durch kürzlich beschriebene implantierbare optoelektronische Gitternetze erfolgen, die mit μ LEDs zur Lichterzeugung ausgestattet sind (Jang et al. 2020). Hierdurch können ebenfalls diverse Stimulationsparameter wie die globale Panorama-Illumination, aber auch pulsatil, lokal-voranschreitende Belichtungswellen realisiert werden, um eine physiologische Peristaltik nachzuahmen. Im Gegensatz zur EFS erfolgt die Lichtstimulation dabei schmerzfrei, mit weniger Nebenwirkungen und höherer zeitlicher und räumlicher Kontrolle über die erzeugten Kontraktionen.

4.7 Erreichen einer suffizienten Expression lichtsensitiver Proteine durch AAV-Transfer

Die Voraussetzung für eine Lichtstimulation stellt die suffiziente und stabile Expression von optogenetischen Proteinen wie Chr2 oder OPN5 dar. Der Gentransfer von Chr2 hat sich in der AAV-basierten Transduktion des menschlichen Auges als sicher erwiesen und befindet sich aktuell in Phase I/II der klinischen Studie mit erst kürzlich publizierten Erfolgen im Patienten (Sahel et al. 2021). Darüber hinaus ist es von Bedeutung, eine selektive Expression in SMC des Magengewebes zu erreichen, um eine z.B. schmerzhafte Co-Stimulation nozizeptiver Nervenfasern zu vermeiden. Dies kann durch den Einsatz SMC-spezifischer Promotoren wie u.a. SM22 α (Akyürek et al. 2000; Deindl et al. 2006) oder durch Anwendung von AAV mit besonders hohem Tropismus zur glatten Muskulatur (siehe

Tabelle 1, Abbildung 14) erreicht werden (Pankajakshan et al. 2012). Der in dieser Arbeit durchgeführte systematische Vergleich der Transduktionseffizienz verschiedener AAV zeigte, dass sich unter den generischen AAV der Subtyp AAV2 gefolgt von AAV1 und AAV6 eignet. Jedoch kann die Anwendung moderner, erst kürzlich entwickelter AAV diese Effizienz drastisch steigern: Der ursprünglich zur Gentherapie der Duchenne-Dystrophie entwickelte AAV2.5 enthält das Capsidprotein des AAV2 mit 5 Mutationen des AAV1 und verbessert die Transduktion von Muskelzellen erheblich (Bowles et al. 2012; Lompré et al. 2013). Durch den Einsatz dieses Virus konnte die zu applizierende Virusmenge, die zum Erreichen der halbmaximalen Expressionsrate (EC_{50}) notwendig ist, im Vergleich zum AAV2 um weitere 93% gesenkt werden. Daher scheint es auf den ersten Blick umsetzbar, auch *in vivo* künftig eine SMC-Expressionsrate von mindestens 36%, wie sie in den hier untersuchten Mäusen vorlag, durch virale Transduktion zu erreichen. Da die Muskulatur des Magens die äußerste Gewebsschicht darstellt und dünn ist, bietet sich die Methode des sogenannten *gene painting* (Kikuchi et al. 2005) an: Hierbei wird der Gentransfer-Vektor (in diesem Fall der AAV) als Teil eines Gemisches flächenhaft auf das Organ aufgetragen und diffundiert von dort in das Gewebe.

Darüber hinaus ist es nötig, eine potenzielle Immunantwort gegenüber den verwendeten Viren aber auch den optogenetischen Proteinen selbst detailliert zu charakterisieren und im Folgenden zu unterbinden. Während es sich bei Chr2 um ein aus der Grünalge stammendes Protein handelt, kommt hOPN5 natürlicherweise im Menschen vor. Daher ist auch bei Überexpression im humanen Magen eine Immuntoleranz zu erwarten.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit erstmals die erfolgreiche Etablierung und Charakterisierung einer direkten und selektiven lichtbasierten Stimulation der gastrointestinalen Muskulatur sowohl im intakten als auch in einem Gastroparesemodell beschrieben. Die intrinsischen Vorteile dieses optogenetischen Stimulationsansatzes eröffnen der Grundlagenforschung neue Analysemethoden der Erregung und Kopplung glatter Muskulatur: Durch die hohe räumliche und zeitliche Präzision des applizierten Lichts kann die Rekrutierung einzelner Zellen, ihre elektrische Kopplung untereinander sowie die Kinetik und Ausbreitung induzierter Kontraktionen detailliert untersucht werden. Darüber hinaus kann dies in bisher unerreichter Unabhängigkeit von innervierenden Strukturen wie dem ENS erfolgen. Der Nachweis lichtinduzierbarer, weiterhin potenter Kraft- und Druckentwicklungen nach Zerstörung des ENS legt den Grundstein zur Entwicklung eines optogenetischen Magenschrittmachers zur Therapie der Gastroparese. Die Etablierung der direkten Erregung der glatten Muskulatur durch die beiden optogenetischen Proteine Chr2 und OPN5 sowie die Analyse viraler Transduktionseffizienzen schaffen das Fundament für zukünftige Arbeiten in Grundlagenforschung und Translation.

5 Anhang der Publikationen

6 Literaturverzeichnis

- Abell TL, Johnson WD, Kedar A, Runnels JM, Thompson J, Weeks ES, Minocha A, Griswold ME (2011): A double-masked, randomized, placebo-controlled trial of temporary endoscopic mucosal gastric electrical stimulation for gastroparesis. *Gastrointest Endosc* 74, 496–503
- Aguilar H, Mitchell B (2010): Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update* 16, 725–744
- Akyürek LM, Yang ZY, Aoki K, San H, Nabel GJ, Parmacek MS, Nabel EG (2000): SM22alpha promoter targets gene expression to vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Mol Med* 6, 983–991
- Andrews PL, Grundy D, Scratcherd T (1980): Reflex excitation of antral motility induced by gastric distension in the ferret. *J Physiol* 298, 79–84
- Bailes HJ, Lucas RJ (2013): Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light ($\lambda_{\max} \approx 479$ nm) supporting activation of G(q/11) and G(i/o) signalling cascades. *Proc R Soc B Biol Sci* 280, 1–9
- Bailes HJ, Zhuang LY, Lucas RJ (2012): Reproducible and Sustained Regulation of G α s Signalling Using a Metazoan Opsin as an Optogenetic Tool. *PLoS One* 7, e30774
- Bauer AJ, Sanders KM (1986): Passive and active membrane properties of canine gastric antral circular muscles. *Am J Physiol - Cell Physiol* 251, 268–273
- Bean B (2007): The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 2007 8, 451–465
- BfArM.
https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/R_V_STP/m-r/metoclopramid.html; Zugriff am 30.01.2022a
- BfArM.
https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/R_HB/2014/rhb-domperidon.html; Zugriff am 04.07.2021b
- Bowles DE, McPhee SWJ, Li C, Gray SJ, Samulski JJ, Camp AS, Li J, Wang B, Monahan PE, Rabinowitz JE, et al. (2012): Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol Ther* 20, 443–455
- Brandstaeter S, Fuchs SL, Aydin RC, Cyron CJ (2019): Mechanics of the stomach: A review of an emerging field of biomechanics. *GAMM Mitteilungen* 42, e201900001
- Braun FJ, Hegemann P (1999): Two light-activated conductances in the eye of the green alga *Volvox carteri*. *Biophys J* 76, 1668–1678
- Browning KN, Travagli RA (2014): Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. *Compr Physiol* 4, 1339–1368
- Bruegmann T, Malan D, Hesse M, Beiert T, Fuegeman CJ, Fleischmann BK, Sasse P (2010): Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat Methods* 2010 7, 897–900
- Bruegmann T, van Bremen T, Vogt CC, Send T, Fleischmann BK, Sasse P (2015): Optogenetic control of contractile function in skeletal muscle. *Nat Commun* 6, 7153
- Buhr ED, Yue WWS, Ren X, Jiang Z, Liao HWR, Mei X, Vemaraju S, Nguyen MT, Reed RR, Lang RA, et al. (2015): Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local

- circadian oscillators in mammalian retina and cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 13093–13098
- Camilleri M, Chedid V, Ford AC, Haruma K, Horowitz M, Jones KL, Low PA, Park SY, Parkman HP, Stanghellini V (2018): Gastroparesis. *Nat Rev Dis Prim* 4, 41
- Cannon WB, Lieb CW (1911): The receptive relaxation of the stomach. *Am J Physiol Content* 29, 267–273
- Center for Disease Control. https://www.cdc.gov/diabetes/statistics/slides/long_term_trends.pdf; Zugriff am 30.05.2021
- Chan KY, Jang MJ, Yoo BB, Greenbaum A, Wu WL, Sánchez-Guardado L, Lois C, Mazmanian SK, Deverman BE, Gradinaru V (2017): Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci* 20, 1172–1179
- Chen J, Guo Z, Tian H, Chen X (2016): Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Mol Ther Methods Clin Dev* 3, 16023
- Cheng LK, Du P, O’Grady G (2013): Mapping and modeling gastrointestinal bioelectricity: From engineering bench to bedside. *Physiology* 28, 310–317
- Choi KM, Gibbons SJ, Nguyen T V., Stoltz GJ, Lurken MS, Ordog T, Szurszewski JH, Farrugia G (2008): Heme Oxygenase-1 Protects Interstitial Cells of Cajal From Oxidative Stress and Reverses Diabetic Gastroparesis. *Gastroenterology* 135, 2055–2064
- Christoph J, Luther S (2018): Marker-free tracking for motion artifact compensation and deformation measurements in optical mapping videos of contracting hearts. *Front Physiol* 9, 1483–1495
- Cipriani G, Gibbons SJ, Verhulst PJ, Choi KM, Eisenman ST, Hein SS, Ordog T, Linden DR, Szurszewski JH, Farrugia G (2016): Diabetic Csf1op/op Mice Lacking Macrophages Are Protected Against the Development of Delayed Gastric Emptying. *CMGH* 2, 40–47
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC (2002): Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 637–706
- Cotter MJ, Muruve DA (2005): The induction of inflammation by adenovirus vectors used for gene therapy. *Front Biosci* 10, 1098–1105
- Deindl E, Middeler G, Müller O, Selbert S, Schlenke P, Marienfeld U, Thirion C, Katus H, Franz W (2006): Identification of a 94-bp GC-rich element in the smooth muscle myosin heavy-chain promoter controlling vascular smooth muscle cell-specific gene expression. *Cell Biochem Biophys* 45, 279–288
- Elden L, Bortoff A (1984): Electrical coupling of longitudinal and circular intestinal muscle. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2, 618–626
- Fitts R (2008): The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *J Appl Physiol* 104, 551–558
- Gradinaru V, Thompson KR, Zhang F, Mogri M, Kay K, Schneider MB, Deisseroth K (2007): Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27, 14231–14238
- Grant A (2009): Cardiac ion channels. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2, 185–194

- Guy R, Dawson J, Garrett J, Laws J, Thomas P, Sharma A, Watkins P (1984): Diabetic gastroparesis from autonomic neuropathy: surgical considerations and changes in vagus nerve morphology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47, 686–691
- Haltaufderhyde K, Ozdeslik RN, Wicks NL, Najera JA, Oancea E (2015): Opsin expression in human epidermal skin. *Photochem Photobiol* 91, 117–123
- Harberson J, Thomas RM, Harbison SP, Parkman HP (2010): Gastric neuromuscular pathology in gastroparesis: Analysis of full-thickness antral biopsies. *Dig Dis Sci* 55, 359–370
- Hartsough L, Park M, Kotlajich M, Lazar JT, Han B, Lin CC, Musteata E, Gambill L, Wang M, Tabor J (2020): Optogenetic control of gut bacterial metabolism to promote longevity. *Elife* 9, 56849
- Hegemann P, Nagel G (2013): From channelrhodopsins to optogenetics. *EMBO Mol Med* 5, 173–176
- Herrmann TR, Rayfield GW (1976): A measurement of the proton pump current generated by bacteriorhodopsin in black lipid membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 443, 623–628
- Hibberd T, Feng J, Luo J, Yang P, Samineni V, Gereau R, Kelley N, Hu H, Spencer N (2018): Optogenetic Induction of Colonic Motility in Mice. *Gastroenterology* 155, 514–528
- Iyer SM, Montgomery KL, Towne C, Lee SY, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Delp SL (2014): Virally mediated optogenetic excitation and inhibition of pain in freely moving nontransgenic mice. *Nat Biotechnol* 32, 274–278
- Jang T, Lee JH, Zhou H, Joo J, Lim BH, Cheng H, Kim SH, Lee K-S, Park E, Hwang S-W (2020): Expandable and implantable bioelectronic complex for analyzing and regulating real-time activity of the urinary bladder. *Sci Adv* 6, 9675–9686
- Jing D, Zhang S, Luo W, Gao X, Men Y, Ma C, Liu X, Yi Y, Bugde A, Zhou BO, et al. (2018): Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. *Cell Res* 28, 803–818
- Jung HK, Choung RS, Locke GR, Schleck CD, Zinsmeister AR, Szarka LA, Mullan B, Talley NJ (2009): The Incidence, Prevalence, and Outcomes of Patients With Gastroparesis in Olmsted County, Minnesota, From 1996 to 2006. *Gastroenterology* 136, 1225–1233
- Kamato D, Mitra P, Davis F, Osman N, Chaplin R, Cabot PJ, Afroz R, Thomas W, Zheng W, Kaur H, et al. (2016): Gαq proteins: molecular pharmacology and therapeutic potential. *Cell Mol Life Sci* 74, 1379–1390
- Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, et al. (2012): Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* 482, 369–374
- Katritch V, Cherezov V, Stevens RC (2013): Structure-Function of the G-protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 531–556
- Kikuchi K, McDonald A, Sasano T, Donahue J (2005): Targeted modification of atrial electrophysiology by homogeneous transmural atrial gene transfer. *Circulation* 111, 264–270
- Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, Pulver SR, Birdsey-Benson A, Cho YK, Morimoto TK, Chuong AS, Carpenter EJ, Tian Z, et al. (2014): Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods* 11, 338–346
- Koch KL (2015): Diabetic Gastroparesis. *Gastroenterol Clin NA* 44, 39–57

- Kohda M, Komori S, Unno T, Ohashi H (1997): Characterization of action potential-triggered $[Ca^{2+}]_i$ transients in single smooth muscle cells of guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 122, 477–486
- Kojima D, Mori S, Torii M, Wada A, Morishita R, Fukada Y (2011): UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS One* 6, e26388
- Krishnasamy S, Abell TL (2018): Diabetic Gastroparesis: Principles and Current Trends in Management. *Diabetes Ther* 2, 1–42
- Kuriyama H, Osa T, Tasaki H (1970): Electrophysiological studies the antrum muscle fibers of the guinea pig stomach. *J Gen Physiol* 55, 48–62
- Kwon I, Schaffer D V. (2008): Designer Gene Delivery Vectors: Molecular Engineering and Evolution of Adeno-Associated Viral Vectors for Enhanced Gene Transfer. *Pharm Res* 25, 489–499
- Lee C, Lavoie A, Liu J, Chen S, Liu B (2020): Light Up the Brain: The Application of Optogenetics in Cell-Type Specific Dissection of Mouse Brain Circuits. *Front Neural Circuits* 14, 18
- Lee Y, Kim Y, Park S (2020): Measurement of Stomach Wall Thickness to Guide Staple Selection during Sleeve Gastrectomy. *Obes Surg* 30, 2140–2146
- Li S, Chen J (2014): Decreased L-type calcium current in antral smooth muscle cells of STZ-induced diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil* 26, 971–979
- Lin J, Thompson TJ, Cheng YJ, Zhuo X, Zhang P, Gregg E, Rolka DB (2018): Projection of the future diabetes burden in the United States through 2060. *Popul Health Metr* 16, 9
- Lin JY (2011): A user's guide to channelrhodopsin variants: Features, limitations and future developments. *Exp Physiol* 96, 19–25
- Liu LW, Thuneberg L, Huizinga JD (1994): Selective lesioning of interstitial cells of Cajal by methylene blue and light leads to loss of slow waves. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 266, 485–496
- Liu W, Jin Y, Wilde PJ, Hou Y, Wang Y, Han J (2021): Mechanisms, physiology, and recent research progress of gastric emptying. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61, 2742–2755
- Lompré A-M, Hadri L, Merlet E, Keuylian Z, Mougenot N, Karakikes I, Chen J, Atassi F, Marchand A, Blaise R, et al. (2013): Efficient transduction of vascular smooth muscle cells with a translational AAV2.5 vector: a new perspective for in-stent restenosis gene therapy. *Gene Ther* 20, 901–912
- Makowka P, Bruegmann T, Dusend V, Malan D, Beiert T, Hesse M, Fleischmann BK, Sasse P (2019): Optogenetic stimulation of Gs-signaling in the heart with high spatio-temporal precision. *Nat Commun* 10, 1281
- Masseck OA, Spoida K, Dalkara D, Maejima T, Rubelowski JM, Wallhorn L, Deneris ES, Herlitze S (2014): Vertebrate cone opsins enable sustained and highly sensitive rapid control of Gi/o signaling in anxiety circuitry. *Neuron* 81, 1263–1273
- Mattis J, Tye KM, Ferenczi EA, Ramakrishnan C, O'Shea DJ, Prakash R, Gunaydin LA, Hyun M, Fenno LE, Gradinaru V, et al. (2012): Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat Methods* 9, 159–172
- McFadzean I, Gibson A (2002): The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 135, 1–13

- Merrill DR, Bikson M, Jefferys JGR (2005): Electrical stimulation of excitable tissue: Design of efficacious and safe protocols. *J Neurosci Methods* **141**, 171–198
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002): Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae. *Science* (80-) **296**, 2395–2398
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003): Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13940–13945
- Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A (2005): Light activation of Channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* **15**, 2279–2284
- Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR (2017): Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *Biodrugs* **31**, 317–334
- Navas CM, Patel NK, Lacy BE (2017): Gastroparesis: Medical and Therapeutic Advances. *Dig Dis Sci* **62**, 2231–2240
- Ni R, Zhou J, Hossain N, Chau Y (2016): Virus-inspired nucleic acid delivery system: Linking virus and viral mimicry. *Adv Drug Deliv Rev* **106**, 3–26
- O’Grady G, Abell TL (2015): Gastric arrhythmias in gastroparesis: Low- and high-resolution mapping of gastric electrical activity. *Gastroenterol Clin North Am* **44**, 169–184
- Oesterhelt D, Stoerkenius W (1971): Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol* **233**, 149–152
- Pankajakshan D, Makinde TO, Gaurav R, Del Core M, Hatzoudis G, Pipinos I, Agrawal DK (2012): Successful transfection of genes using AAV-2/9 vector in swine coronary and peripheral arteries. *J Surg Res* **175**, 169–175
- Perez-Medina AL, Galligan JJ (2019): Optogenetic analysis of neuromuscular transmission in the colon of ChAT-ChR2-YFP BAC transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **317**, 569–579
- Phillips RJ, Powley TL (1998): Gastric volume detection after selective vagotomies in rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **274**, 43–61
- Powley TL, Wang XY, Fox EA, Phillips RJ, Liu LWC, Huizinga JD (2008): Ultrastructural evidence for communication between intramuscular vagal mechanoreceptors and interstitial cells of Cajal in the rat fundus. *Neurogastroenterol Motil* **20**, 69–79
- Raifman TK, Kumar P, Haase H, Klussmann E, Dascal N, Weiss S (2017): Protein kinase C enhances plasma membrane expression of cardiac L-type calcium channel, CaV1.2. *Channels* **11**, 604–615
- Rapaccini G, Aliotta A, Pompili M, Grattagliano A, Anti M, Merlino B, Gambassi G (1988): Gastric wall thickness in normal and neoplastic subjects: a prospective study performed by abdominal ultrasound. *Gastrointest Radiol* **13**, 197–199
- Richter C, Brueggemann T (2020): No light without the dark: Perspectives and hindrances for translation of cardiac optogenetics. *Prog Biophys Mol Biol* **154**, 39–50
- Rose JA, Hoggan MD, Shatkin AJ (1966): Nucleic acid from an adeno-associated virus: chemical and physical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 86–92
- Sahel JA, Boulanger-Scemama E, Pagot C, Arleo A, Galluppi F, Martel JN, Esposti SD, Delaux A, de Saint Aubert JB, de Montleau C, et al. (2021): Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med* **27**, 1223–1229

- Sanders KM, Koh SD, Ward SM (2006): Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 68, 307–343
- Sanders KM, Hwang SJ, Ward SM (2010): Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *J Physiol* 588, 4621–4639
- Shahi PK, Choi S, Zuo DC, Kim MY, Park CG, Kim YD, Lee J, Park KJ, So I, Jun JY (2014): The possible roles of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide channels in regulating pacemaker activity in colonic interstitial cells of Cajal. *J Gastroenterol* 49, 1001–1010
- Soffer E (2012): Gastric electrical stimulation for gastroparesis. *J Neurogastroenterol Motil* 18, 131–137
- Soykan I, Sivri B, Sarosiek I, Kiernan B, Mccallum RW (1998): Demography, clinical characteristics, psychological and abuse profiles, treatment, and long-term follow-up of patients with gastroparesis. *Dig Dis Sci* 43, 2398–2404
- Spencer NJ, Travis L, Hibberd T, Kelly N, Feng J, Hu H (2020): Effects of optogenetic activation of the enteric nervous system on gastrointestinal motility in mouse small intestine. *Auton Neurosci Basic Clin* 229, 102733
- Spoida K, Eickelbeck D, Karapinar R, Eckhardt T, Mark MD, Jancke D, König P, Dalkara D, Herlitze S, Masseck OA (2016): Melanopsin Variants as Intrinsic Optogenetic On and Off Switches for Transient versus Sustained Activation of G Protein Pathways. *Curr Biol* 26, 1206–1212
- Sugiyama T, Suzuki H, Takahashi T (2014): Light-induced rapid Ca²⁺ response and MAPK phosphorylation in the cells heterologously expressing human OPN5. *Sci Rep* 4, 5352
- Tanahashi Y, Komori S, Matsuyama H, Kitazawa T, Unno T (2021): Functions of muscarinic receptor subtypes in gastrointestinal smooth muscle: A review of studies with receptor-knockout mice. *Int J Mol Sci* 22, 926
- Tarttelin EE, Bellingham J, Hankins MW, Foster RG, Lucas RJ (2003): Neuropsin (Opn5): a novel opsin identified in mammalian neural tissue1. *FEBS Lett* 554, 410–416
- Tse G, Lai ETH, Yeo JM, Tse V, Wong SH (2016): Mechanisms of Electrical Activation and Conduction in the Gastrointestinal System: Lessons from Cardiac Electrophysiology. *Front Physiol* 7, 182
- Unno T, Kwon S, H O, Irie Y, Kato Y, Matsuyama H, Komori S (2003): Receptor signaling mechanisms underlying muscarinic agonist-evoked contraction in guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 139, 337–350
- Vigmond E, Bardakjian B (1995): The effect of morphological interdigitation on field coupling between smooth muscle cells. *IEEE Trans Biomed Eng* 42, 162–171
- Vogt M, Schulz B, Wagdi A, Lebert J, van Belle GJ, Christoph J, Bruegmann T, Patejdl R (2021): Direct optogenetic stimulation of smooth muscle cells to control gastric contractility. *Theranostics* 11, 5569–5584
- Wagdi A, Malan D, Sathyanarayanan U, Beauchamp JS, Vogt M, Zipf D, Beiert T, Mansuroglu B, Dusend V, Meininghaus M, et al. (2022): Selective optogenetic control of G q signaling using human Neuropsin. *Nat Commun* 13, 1765
- Wang XY, Lammers WJEP, Bercik P, Huizinga JD (2005): Lack of pyloric interstitial cells of Cajal explains distinct peristaltic motor patterns in stomach and small intestine. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 289, 52–63
- Webb R (2003): Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27, 201–206

- Weiss S, Keren-Raifman T, Oz S, Ben-Mocha A, Haase H, Dascal N (2012): Modulation of distinct isoforms of L-type calcium channels by Gq-coupled receptors in *Xenopus* oocytes: Antagonistic effects of G $\beta\gamma$ and protein kinase C. *Channels* 6, 426–437
- Wu Y, Li SS, Jin X, Cui N, Zhang S, Jiang C (2015): Optogenetic approach for functional assays of the cardiovascular system by light activation of the vascular smooth muscle. *Vascul Pharmacol* 71, 192–200
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006): Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol Ther* 14, 316–327
- Xue L, Suzuki H (1997): Electrical responses of gastric smooth muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 272, 77–83
- Yamashita T, Ohuchi H, Tomonari S, Ikeda K, Sakai K, Shichida Y (2010): Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22084–22089
- Yarandi SS, Srinivasan S (2014): Diabetic gastrointestinal motility disorders and the role of enteric nervous system: Current status and future directions. *Neurogastroenterol Motil* 26, 611–624
- Yin J, Abell TD, McCallum RW, Chen JDZ (2012): Gastric neuromodulation with Enterra system for nausea and vomiting in patients with gastroparesis. *Neuromodulation* 15, 224–231
- Yuan S, Costa M, Brookes S (2001): Neuronal control of the pyloric sphincter of the guinea-pig. *Neurogastroenterol Motil* 13, 187–198
- Zagorodnyuk VP, Chen BN, Brookes SJH (2001): Intraganglionic laminar endings are mechano-transduction sites of vagal tension receptors in the guinea-pig stomach. *J Physiol* 534, 255–268

Danksagung

Allem voran gilt mein Dank meinem Doktorvater Professor Tobias Brüggemann. Nach seiner Berufung zum Juniorprofessor für Physiologie in Göttingen im Jahr 2019 bekam ich die Chance, als erster Doktorand seiner neuen Arbeitsgruppe betreut zu werden. Dabei durfte ich miterleben, wie das Labor über die Jahre erfolgreich aufgebaut wurde und habe im Rahmen dessen stets eine direkte und intensive Betreuung erhalten. Die Möglichkeit, von ihm auf jegliche Fragestellung unmittelbaren Rat zu erhalten, war der Grundstein für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Veröffentlichung dieser Publikationen. Auch bin ich dankbar, im Rahmen seiner Betreuung unsere Ergebnisse auf verschiedenen Tagungen und Kongressen präsentiert haben zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt darüber hinaus unserem Kollaborationspartner PD Dr. med. Robert Patejdl der Universität Rostock und seinem Master-Studenten Benjamin Schulz für die gute Zusammenarbeit. Durch ihre langjährige Erfahrung im Umgang mit der glatten Muskulatur wurden viele dieser Experimente erst möglich. Auch unserem Kollaborationspartner Dr. rer. nat. Jan Christoph möchte ich für die Unterstützung bei der Analyse der Videoaufnahmen danken.

Weiterhin möchte ich meiner Zweitbetreuerin Professor Elisabeth Heßmann danken, sich bereit erklärt zu haben, die Arbeit mit ihrer Expertise im Gebiet der gastroenterologischen Grundlagenforschung zu begleiten.

Dankbar bin ich ebenso der Studienstiftung des deutschen Volkes und der *International Research Training Group 1816* für die finanzielle sowie ideelle Förderung während dieser Zeit.

Schließlich gilt mein Dank allen Doktoranden und Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe sowie des Instituts. Durch sie habe ich unzählige Male Hilfestellungen bei der Durchführung, Analyse und Auswertung der Experimente erhalten. Hierbei möchte mich besonders bei Ahmed Wagdi, Marc Hüser, Gjsbert van Belle, Udhay Narayanan, Runzhu Shi, Svenja Kiehn, Janosch Beauchamp und Melanie von Ahlen bedanken.