

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel

Regulation sekretorischer Aktivität im Humandarm *in vitro*

Dagmar I. Krüger

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. Haller

2. Univ.-Prof. Dr. H. Luksch

3. Univ.-Prof. Dr. M. Diener, Justus-Liebig-Universität Gießen

(schriftliche Beurteilung)

Die Dissertation wurde am 10.03.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.05.2010 angenommen.

**Meinen Eltern**

**Die vorliegende Doktorarbeit basiert auf drei Publikationen, die bereits veröffentlicht sind, einem in Revision befindlichen Manuskript, einem zur Publikation eingereichten Manuskript und einem in Vorbereitung befindlichen Manuskript:**

D. Krueger, F.Zeller; IE. Demir, GO. Ceyhan, M.Schemann

**Functional and pharmacological characterisation of the nerve mediated secretion in human intestine *in vitro*** Manuskript für Veröffentlichung vorbereitet

K. Michel, F. Zeller, R. Langer, H. Nekarda, D. Krueger, T.J. Dover, C. A. Brady, N.N. Barnes, M. Schemann

**Serotonin excites neurons in the human submucous plexus via 5-HT<sub>3</sub> receptors**

Gastroenterology 2005; 128:1317-1326 (Appendix 1)

D. Krueger, L. Gruber, S. Buhner, F. Zeller, R.Langer, S. Seidl, K. Michel, M. Schemann

**“The multi-herbal drug STW5 (Iberogast®) has prosecretory action in the human intestine”** Neurogastroenterol Motil 2009; 21:1203-e110 (Appendix 2)

R. Schicho\*, D. Krueger\*, F. Zeller, C.W. Hann von Weyhern, T.Frieling, H. Kimura, R. de Giorio, B. Campi, M. Schemann. \* Gleichrangige Erstautoren

**Hydrogen sulphide is a novel prosecretory neuromodulator in the guinea-pig and human colon** Gastroenterology 2006; 131:1542-1552 (Appendix 3)

D. Krueger, M. Foerster, K. Mueller, F. Zeller, J. Slotta-Huspenina, J. Donovan, D. Grundy, M. Schemann

**“Signalling mechanisms involved in the intestinal prosecretory actions of hydrogen sulphide”** In Revision bei Neurogastroenterol Motil (Appendix 4)

W. Rong, W. Ma, M. Beyak, W Jiang, B. Sun, X. Wang, D. Krueger, M. Schemann, A. Surprenant, D. Grundy

**“Hydrogen sulphide activates mechnosensitive afferent fibres via TRP channel-induced release of ATP”** Eingereicht (Appendix 5)

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Aufbau des Darms	7
1.2	Chloridsekretion: Kanäle und Transporter	9
1.2.1	CFTR: ein cAMP aktivierter Chloridkanal	10
1.2.2	Kalziumaktivierte Chloridkanäle (CaCC)	11
1.2.3	Spannungsabhängige kalziumaktivierte Chloridkanäle (ClC)	12
1.3	Regulation der Sekretion	12
1.3.1	Das enterische Nervensystem	13
1.3.2	Sensorische Innervation des Darms	14
1.3.2.1	Sensorische Neurone des enterischen Nervensystems: intrinsische primäre Afferenzen	15
1.3.2.2	Enterochromaffine Zellen (EC Zellen):	16
1.3.2.3	Extrinsische sensorische Neurone: viszerale Afferenzen	17
1.3.2.4	Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle	19
1.4	Transmitter und Modulatoren im humanen Darm:	23
1.5	Schwefelwasserstoff: ein dritter gasförmiger Neuromodulator und endogenes Signalmolekül	24
2	Ziel der Arbeit	26
3	Ergebnisse:	28
3.1	Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung der nerval vermittelten Epithelantworten im Humandarm in vitro	28
3.1.1	Material und Methoden	28
3.1.2	Reproduzierbarkeit und Stimulusabhängigkeit der nerval induzierten Sekretion	30
3.1.3	Regionale Unterschiede der nerval induzierten Sekretion und des basalen Gewebswiderstandes im humanen Darm	33
3.1.4	Nerval induzierte Sekretion und basaler Gewebswiderstand sind unabhängig von Alter und Geschlecht.	35
3.1.5	Einfluss der Erkrankung auf nerval induzierte Sekretion und basalen Gewebswiderstand	36
3.1.6	Pharmakologische Charakterisierung der nerval induzierten Sekretion	38

3.1.7	Diskussion	50
3.2	Serotonin aktiviert Neurone im humanen submukösen Plexus über 5-HT <sub>3</sub> Rezeptoren (Publikation: Appendix 1)	59
3.3	Das pflanzliche Kombinationspräparat STW5 (Iberogast®) hat im humanen Darm eine pro-sekretorische Wirkung (Publikation: Appendix 2)	63
3.4	Schwefelwasserstoff ist ein neuer pro-sekretorischer Neumodulator im Darm vom Meerschweinchen und Mensch (Publikation: Appendix 3)	67
3.5	Untersuchung des pro-sekretorischen Wirkmechanismus von Schwefelwasserstoff im Humandarm und Meerschweinchenkolon (Publikation: Appendix 4)	70
3.6	Schwefelwasserstoff aktiviert mechanosensitive afferente Fasern via TRP-Kanal induzierte Ausschüttung von ATP (Publikation: Appendix 5)	77
4.	Literaturverzeichnis	80
5.	Zusammenfassung	94
6.	Summary	97
7.	Abkürzungsverzeichnis	99
	Appendix 1	100
	Appendix 2	111
	Appendix 3	120
	Appendix 4	132
	Appendix 5	156
	Danksagung	198
	Curriculum vitae	199

# 1 Einleitung

Der mukosale Transport von Nährstoffen, Wasser und Elektrolyten ist eine der Hauptaufgaben des Gastrointestinaltraktes. Diese Transportvorgänge finden mit unterschiedlicher Gewichtung in allen Regionen des Gastrointestinaltraktes statt. Nach der enzymatischen Spaltung im Dünndarm werden die Nährstoffe durch apikale und basolaterale Transporter aufgenommen. Nach der Passage durch den Dünndarm wird der Chymus im Kolon (Dickdarm) durch Resorption von Wasser und Elektrolyten eingedickt und über den Enddarm ausgeschieden. Obwohl Netto Flüssigkeit und Elektrolyte resorbiert werden, erfolgt in allen Abschnitten des Darms auch eine Sekretion von Wasser und Elektrolyten. Hierbei steht insbesondere die Sekretion von Chlorid im Vordergrund, da damit Wasser dem osmotischen Gradient folgend in das Lumen gelangen kann. Die Koordination dieser Sekretion steht unter nervaler Kontrolle und wird reguliert durch das darmeigene Nervensystem, das enterische Nervensystem (ENS) sowie durch extrinsische Nerven, deren Nervenzellkörper außerhalb des Darms liegen (Vanner et al., 2004). Die extrinsischen Nerven haben motorische (efferente) und sensorische (afferente) Funktionen. Der Sympathikus und Parasympathikus versorgt den Darm mit extrinsischen efferenten Nervenfasern. Die viszerale extrinsische Afferenzen verlaufen ebenfalls entlang sympathischer und parasympathischer Nervenbahnen. Das Verhältnis extrinsischer Afferenzen zu extrinsischen Efferenzen beträgt ca. 10:1 (Blackshaw et al., 2007; Holzer et al., 2001). Die funktionelle und quantitativ weitaus bedeutendste Innervation des Darms erfolgt über das ENS, welches über mehr als 100 Millionen Nervenzellen verfügt (Grundy et al., 2007).

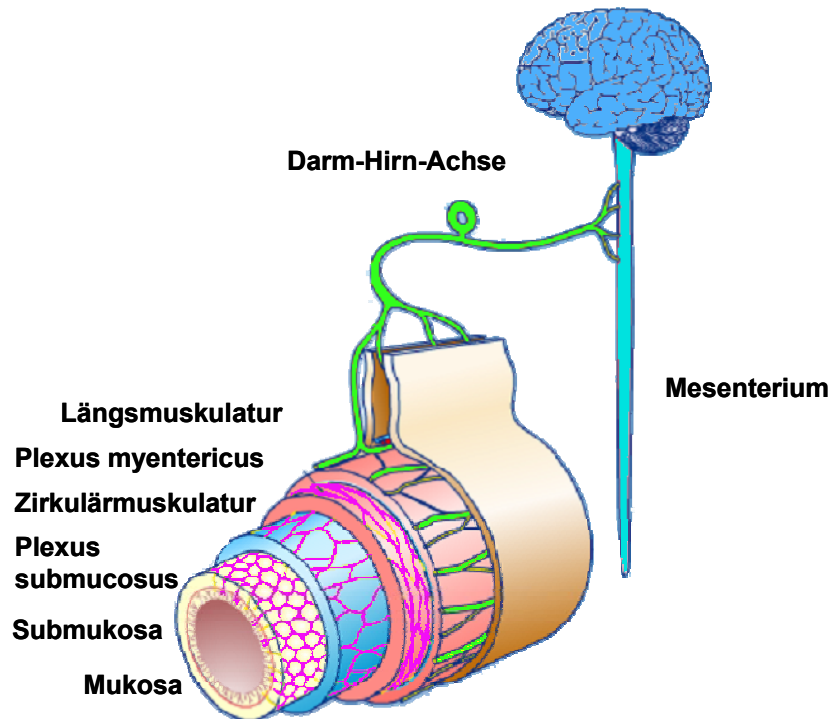
Die Sekretion und Absorption von Elektrolyten, insbesondere von Chlorid- und Natriumionen spielt bei der Homöostase eine wichtige Rolle. Sekretion von Chloridionen ins Darmlumen generiert einen Gradienten, dem Wasser passiv ins Lumen nachfolgt. Neben Störungen in der Motilität können pathologische Veränderungen in der Chloridsekretion zu Änderungen der Konsistenz und Fluidität des Chymus und somit zu Obstipation oder Diarrhöe führen. Die Flüssigkeitsmenge, die vom Darm ins Lumen abgegeben wird, kann von 1 Liter pro Tag unter normalen Bedingungen bis zu 20 Liter und mehr pro Tag ansteigen, wie z.B. nach einer Infektion mit Choleratoxin (Cooke, 1998). Eine Stimulation der Chloridsekretion stellt damit auch eine Abwehrreaktion dar. Wie ein Fremdkörper im Auge durch vermehrte Tränenflüssigkeit ausgespült wird, so sorgt eine

## Einleitung

vermehrte Chloridsekretion verbunden mit einer erhöhten Wassersekretion dafür, dass Toxine aus dem Darm ausgewaschen werden. Für die Produktion dieser „enteric tears“ (Cooke, 1998) sind Enterozyten verantwortlich. Deren Aktivität wird reguliert von enterischen, sympathischen und parasympathischen Nerven, von extrinsischen Afferenzen sowie enterochromaffinen Zellen (EC Zellen), die als „Geschmacksrezeptoren“ fungieren. Strukturelle oder funktionelle Veränderungen im enterischen Nervensystem, den sensorischen Neuronen, den Transmittern, Rezeptoren oder den beteiligten Signalkaskaden führen zu Fehlregulation der sekretorischen Vorgänge und sind pathophysiologisch relevante Mechanismen bei der Entstehung gastrointestinaler Störungen (Schemann et al., 2004; Azpiroz et al., 2007; Spiller et al., 2006).

### 1.1 Aufbau des Darms

Eine dünne Epithelschicht (20-40µm) trennt das Darmlumen von tiefer gelegenen Schichten der Darmwand. Durch die Ausbildung von Falten und Villi im Dickdarm und einem zusätzlichen bürstenartigen Saum aus Mikrovilli im Dünndarm ist die resorbierende bzw. sezernierende Oberfläche enorm vergrößert (ca. 100m<sup>2</sup>). Die Mukosa ist reichlich von Blutgefäßen und Lymphgefäßen durchzogen. Angrenzend an die Mukosa befindet sich eine dünne Muskelschicht, die Lamina muscularis mucosae. Es folgt eine gut durchblutete Bindegewebsschicht mit einem der Plexus des enterischen Nervensystem, dem Plexus submucosus (SMP) (Meissner, 1857). Der SMP reguliert hauptsächlich die sekretorische Aktivität des Darms. Nach außen folgen Zirkulär- und Longitudinalmuskelschicht, die zusammen die Tunica muscularis bilden. Diese Muskelschichten ermöglichen propulsive peristaltische Bewegungen für den Transport des Chymus nach distal, aber auch Segmentationsbewegungen für Durchmischung und Resorption. Zwischen beiden Muskelschichten liegt ein weiterer Plexus des enterischen Nervensystems, der Plexus myentericus (Auerbach, 1862), der hauptsächlich die Aktivität der Muskulatur reguliert. Nach außen ist der Darm von der Serosa umschlossen. Die Serosa ist mit dem Mesenterium verbunden, welches zum einen der Verankerung des Darm in der Leibeshöhle dient, zum anderen ziehen hier Blutgefäße Lymphgefäße und die extrinsischen Nerven zum Darm (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Der Darm besteht aus mehreren Schichten. Angrenzend ans Lumen befinden sich Mukosa und Submukosa und der Nervenplexus Plexus submucosus. Daran schließen sich zwei Muskelschichten an und dazwischen liegt der Plexus myentericus. Die extrinsischen Afferenzen bilden die Darm-Hirn-Achse, sie ziehen durch den Mesenterialansatz zum Darm.

Die Mukosa von Dünndarm und Dickdarm ist entsprechend ihrer Funktion unterschiedlich ausgebildet. Im Dünndarm findet Endverdauung und Resorption statt, dementsprechend ist die apikale resorbierende Oberfläche durch Falten (Kerkringsche Falten), fingerförmige Zotten (Villi) um die Lieberkühnschen Krypten und die Ausbildung von Mikrovilli auf der luminalen Seite der Enterozyten stark vergrößert. Im Dickdarm hingegen sind nur tiefe Lieberkühnsche Krypten ausgebildet.

Morphologisch lassen sich im Wesentlichen vier Zelltypen in der Kolonmukosa unterscheiden: Enterozyten, Schleim produzierende Becherzellen, M-Zellen und enteroendokrine Zellen, wie die enterochromaffinen Zellen (EC Zellen), wobei Enterozyten und Becherzellen zusammen etwa 95% der Zellen ausmachen (Geibel, 2005). An der Basis der Lieberkühnschen Krypten findet eine Zellneubildung statt und die Zellen wandern dann zur Oberfläche; während dieser Wanderung erfolgt eine Differenzierung der Zellen. Im Allgemeinen besitzen die Kryptenzellen eher sekretorische Funktion, die Enterozyten an der Oberfläche eher resorptive Eigenschaften (Barrett et al., 2006), obwohl auch in Enterozyten apikal eine cAMP abhängige Chloridsekretion nachgewiesen wurde



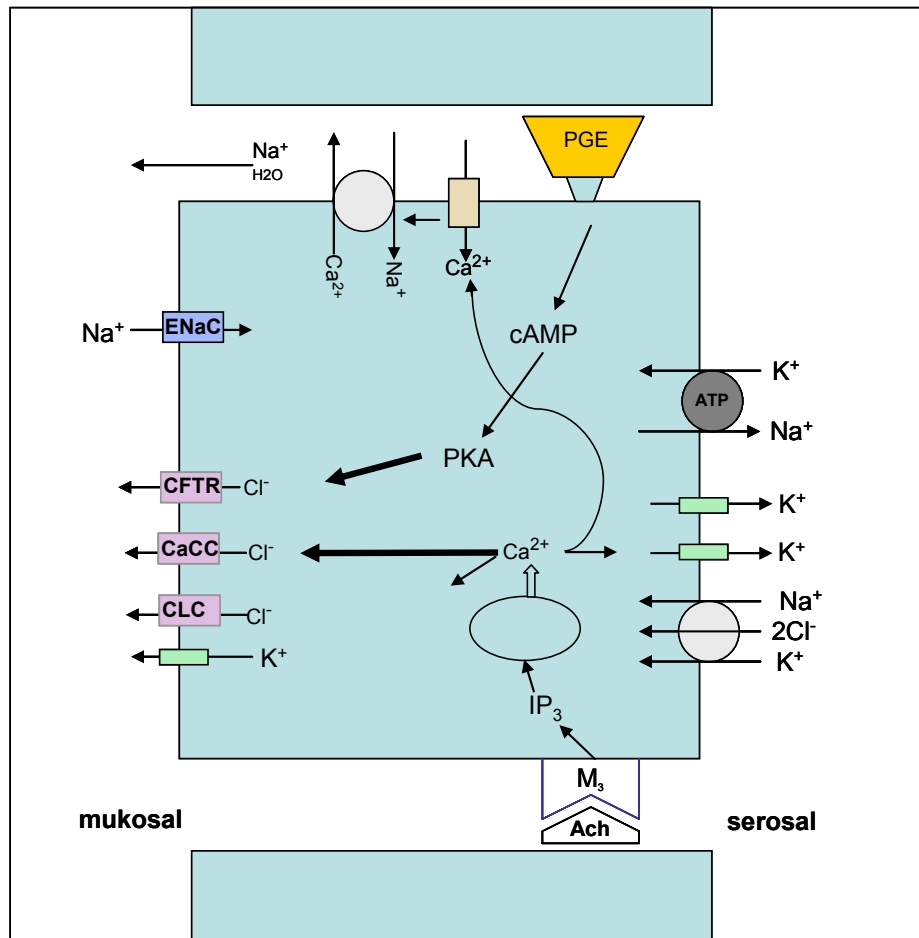
(Kockerling et al., 1993). Bei der Expression der jeweiligen Transporter und Ionenkanäle spielen Bedarf und auch regionale Unterschiede eine Rolle.

Das intestinale Epithel ist Teil eines funktionellen Schutzmechanismus des Darms und erfüllt damit Aufgaben einer intestinalen Barriere. An der Barriere beteiligt sind Enterozyten und Becherzellen, die Mukus sezernieren, die Mikrobiota und Teile des Darm-assoziierten Immunsystems (GALT "gut associated lymphoid tissue"). Zwischen den Enterozyten bilden die Tight junctions eine parazelluläre Permeabilitätsschranke. Die transzelluläre Barriere wird von der basolateralen und apikalen Membran gebildet (Clavel et al., 2007).

## 1.2 Chloridsekretion: Kanäle und Transporter

Flüssigkeitssekretion erfolgt hauptsächlich durch die transepitheliale Sekretion von Chlorid, Flüssigkeitsresorption durch die transepitheliale Absorption von Natrium. Wasser folgt passiv, getrieben durch den osmotischen Gradienten. Dabei kann der Wasserfluss parazellulär durch die Tight junctions oder transzellulär unter Beteiligung von Aquaporinen erfolgen (Thiagarajah et al., 2006). Die Regulation der Flüssigkeitsmenge erfolgt damit über die Regulation der ionalen Sekretion und Absorption und zwar hauptsächlich durch Chloridsekretion und Natriumabsorption.

Die Grundlagen der Chloridsekretion wurden in den letzten Jahren, hauptsächlich in Tiermodellen, eingehend untersucht (Barrett, 2008; Xue et al., 2007). Auf der basolateralen (serosalen) Seite befindet sich der sekundär aktive  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC1), der Chloridionen entgegen dem elektrochemischen Gradienten in die Zelle transportiert. Treibende Kraft für diesen Vorgang ist die basolaterale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Um die Kaliumkonzentration in der Zelle stabil zu halten, verlässt Kalium über basolaterale Kaliumkanäle (KCNQ1/KCNE3) wieder die Zelle (Greger, 2000; Nilius et al., 2003). Auf der apikalen (mukosalen) Seite befinden sich verschiedene Klassen von Chloridkanälen. Durch sie verlässt Chlorid entlang dem elektrochemischen Gradienten die Zelle, wobei Wasser und Natrium passiv folgen. Im Kolon findet vornehmlich eine Natrium- und Wasserabsorption statt, gleichzeitig konnte eine luminale Kaliumsekretion gemessen werden (Archampong et al., 1972). Natrium wird über epitheliale Natriumkanäle (ENaC) aufgenommen; die Triebkraft hierfür ist die niedrige intrazelluläre Natriumkonzentration, die durch die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erzeugt wird (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Kanäle und Transporter der Epithelzellen des Darms. Auf der apikalen Seite kann Chlorid durch verschiedene Kanäle ins Lumen sezerniert werden, durch den apikalen Natriumkanal ENaC wird Natrium absorbiert. Treibende Kraft für diese Ionenbewegungen sind die basolateralen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und der NKCC1-Cotransporter. Sekretionssteigernde Substanzen können über die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration oder über den cAMP/Proteinkinase A Signalweg die Chloridsekretion steigern.

### 1.2.1 CFTR: ein cAMP aktivierter Chloridkanal

Der cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) ist ein cAMP aktivierter Chloridkanal, der nicht nur im Gastrointestinaltrakt und Lunge exprimiert wird, sondern ubiquitär in sezernierenden Geweben vorhanden ist. Bei der autosomal rezessiv vererbten zystischen Fibrose ist dieser Kanal defekt. Bisher sind mehr als 1500 Mutationen in diesem Gen bekannt, am häufigsten ist die Mutation Delta F 508 (66% der Betroffenen) (Greger, 2000). Hierdurch kommt es zu einer verringerten Proteinreifung und verminderten Inkorporation von CFTR Kanälen in die Plasmamembran (Nilius et al., 2003). Die dadurch erniedrigte Chloridsekretion hat schwerwiegende pathophysiologische Veränderungen zur

Folge, die sich vor allem in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt manifestieren (Planells-Cases et al., 2009). Die Aktivierung des CFTR erfolgt durch Phosphorylierung von Serinresten in der R-Domäne durch eine cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) (Verkman et al., 2009) (Abbildung 2). Dieser Aktivierungsmechanismus ist unter quantitativen Aspekten der wichtigste (Barrett et al., 2006). Sekretionsfördernde Mediatoren wie Prostaglandin E<sub>2</sub> oder der Neurotransmitter Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren und aktivieren dadurch die Adenylatzyklase und in Folge davon die Freisetzung der katalytischen Einheit der PKA (Banks et al., 2005; Kimberg et al., 1971). Neben der Aktivierung des CFTR Kanals hat die PKA einen stimulierenden Einfluss auf einen Kaliumkanal (KvLQT1) und den NKCC1 auf der basolateralen Seite (Barrett et al., 2006). Eine weitere Aktivierung des CFTR Kanals kann durch Erhöhung des intrazellulären cGMP Spiegels vermittelt werden. Dies ist zum Beispiel der Fall bei einer Infektion mit *Escherichia coli*. Das *E. coli* Toxin bindet an den Guanylylzyklase C Rezeptor auf der apikalen Seite der Enterozyten. Die Aktivierung des CFTR Kanals erfolgt dann zum Teil durch cGMP selbst. Zum anderen scheint cGMP auch die cAMP Bildung zu stimulieren (Barrett et al., 2006) (Abbildung 2).

### 1.2.2 Kalziumaktivierte Chloridkanäle (CaCC)

Eine weitere Klasse von Chloridkanälen in der apikalen Membran von intestinalen Epithelzellen sind die kalziumaktivierten Chloridkanäle (CaCC). Trotz ihres ubiquitären Auftretens sind Aktivierungsmechanismus und molekulare Struktur weitgehend unbekannt. Bei dem kürzlich entdeckten transmembranen Protein 16A (TMEM16A), auch Anoctamin1 (ANO1) genannt, handelt es sich vermutlich um einen der CaCC. TMEM16A knock out Mäuse zeigten eine verminderte Chloridsekretion nach Stimulation mit einem Agonisten (Ousingsawat et al., 2009). Die kalziumaktivierte Chloridsekretion im Darm wird unter anderem durch den Neurotransmitter Acetylcholin, der an muskarinerge m<sub>3</sub> Rezeptoren der Epithelzellen bindet, stimuliert (Abbildung 2). Dies führt zu einer Erhöhung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie zu einer Erhöhung von Diacylglycerol (DAG) und der Aktivierung von Proteinkinase C (Barrett et al., 2006; Mall et al., 1998). Bei diesem Aktivierungsmechanismus scheint aber der CaCC Kanal nicht direkt aktiviert zu werden, sondern vielmehr aktiviert der intrazelluläre Kalziumanstieg direkt SK4 Kaliumkanäle sowie einen nicht genauer definierten Kaliumkanal in der apikalen Membran der Epithelzellen. Aufgrund des Kaliumausstroms entsteht ein elektrochemischer Gradient, der

damit indirekt die Chloridsekretion steigert. Die kalziumabhängige Chloridsekretion kann verstärkt werden, indem die aktivierte Proteinkinase C auch den CFTR Kanal durch Phosphorylierung stimuliert (Mall et al., 1998). Die Sekretionsantwort der kalziumabhängigen Aktivierung unterscheidet sich in ihrer Kinetik von der cAMP abhängigen Aktivierung. Die sekretorische Antwort beginnt schnell, ist relativ gering und von kurzer Dauer (Barrett et al., 2006). Ein Grund hierfür liegt darin, dass der kalziumabhängige Wirkmechanismus die Aktivität der NKCC1 nicht erhöhen kann. Darüber hinaus stimuliert eine intrazelluläre Kalziumerhöhung nicht nur sekretionsfördernde, sondern gleichzeitig auch sekretionshemmende Signalkaskaden (Keely et al., 2000) (Abbildung 2).

### **1.2.3 Spannungsabhängige kalziumaktivierte Chloridkanäle (CIC)**

Die Familie der spannungsabhängigen Chloridkanäle (CIC) umfasst mehrere Gruppen, die sich in ihren Regulationsmechanismen und Kanaleigenschaften unterscheiden (Nilius et al., 2003). CIC2 wird vermutlich von humanen intestinalen Epithelzellen exprimiert (Lipecka et al., 2002) und scheint unter physiologischen Bedingungen an der Chloridsekretion beteiligt zu sein. Die Aktivierung kann zum einen durch Hyperpolarisation aber auch durch PKA vermittelte Phosphorylierung erfolgen (Lipecka et al., 2002; Nilius et al., 2003) (Abbildung 2).

## **1.3 Regulation der Sekretion**

Die Funktionen des Gastrointestinaltraktes werden durch das intrinsische enterische Nervensystem, auch „Darmhirn“ genannt, extrinsische sympathische und parasympathische Nerven, sowie durch extrinsische Afferenzen kontrolliert und moduliert (Blackshaw et al., 2007; Xue et al., 2007). Das enterische Nervensystem ist ein selbstständig arbeitendes, im klassischen Sinn autonomes Nervensystem. Es reguliert den Transit des luminalen Inhaltes sowie die mukosalen Transportvorgänge. Über extrinsische efferente und afferente Nervenbahnen ist der Darm mit dem zentralen Nervensystem verbunden. Diese Darm-Hirnachse wird zu über 90% von sensorischen Nervenfasern gebildet, während nur 10% der Nerven der Darm-Hirnachse als sympathische bzw. parasympathische Nervenfasern eine efferente Funktion haben. Allerdings haben die sensorischen Nervenfasern ebenfalls eine lokale efferente Funktion, da sie in der Darmwand Axonkollaterale bilden, die in Kontakt mit enterischen Nervenzellen oder auch

Muskel- und Epithelzellen treten. Sowohl die afferente als auch die efferente extrinsische Innervation des Darms kann nur einen modulierenden Einfluss auf die Darmfunktionen ausüben (Beyak et al., 2006; Blackshaw et al., 2007) (Abbildung 3). Hierbei werden die Effektoren, wie Muskelzellen oder Epithelzellen nur in einem sehr geringen Ausmaße direkt innerviert. Vielmehr benutzen die extrinsischen Nervenfasern das enterische Nervensystem als Interface.

### **1.3.1 Das enterische Nervensystem**

Das enterische Nervensystem ist ein in der Darmwand gelegenes ganglioniertes Netzwerk von Nervenzellen, das sich von Oesophagus bis zum Anus erstreckt. Es besteht aus zwei Plexus: dem Plexus myentericus und dem Plexus submucosus (SMP) (Abbildung 1). Größere Säugetiere wie Schwein und Hund besitzen zwei getrennte aber miteinander verbundene SMP, einen inneren Plexus, der nahe an der Muscularis Mucosae liegt und einen äußeren Plexus, der an die Zirkulärmuskelschicht grenzt. Beim Menschen konnte sogar ein dritter Nervenplexus zwischen innerem und äußerem Plexus nachgewiesen werden (Hens et al., 2001). Die Nerven der drei Plexus des SMP ziehen hauptsächlich zur Mukosa. Damit ist der SMP vornehmlich für die Regulation der Epithelfunktionen, insbesondere der Sekretion, zuständig (Schemann et al., 2004). Einige Nerven des äußeren und wenige des inneren SMP innervieren die beiden Muskelschichten (Hens et al., 2001). Die Ganglien der drei Plexus des SMP weisen unterschiedliche Populationen von Nervenzellen auf, die sich in ihrer Morphologie und neurochemischen Kodierung unterscheiden. Funktionell lassen sich intrinsische primäre afferente Neurone (IPAN), Interneurone und Sekretomotoneurone unterscheiden (Furness, 2006).

Im SMP des Meerschweinchens lassen sich zwei unterschiedliche Klassen von Nervenzellen nachweisen: AH/Typ 2 und S/Typ 1 (Cooke et al., 2006). Diese beiden Neuronentypen unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften (Furness, 2006). S/Typ 1 Zellen gehören zur morphologischen Klasse der Dogiel-Typ I Neurone, da sie uniaxonal sind. Alle S (für synaptisch) Zellen erhalten schnelle erregende postsynaptische Potentiale, die über Aktivierung nikotinerger, purinerger und serotonerger Rezeptoren vermittelt werden (Galligan, 2002). Ihr Aktionspotential wird ausschließlich durch Öffnen Tetrodotoxin (TTX) sensitiver Natriumkanäle getragen. Funktionell sind S/Typ 1 Zellen im SMP Sekretomotoneurone oder Interneurone. Ein Axon innerviert dabei mehrere Nervenzellen bzw. Enterozyten. Die Transmitter der Sekretomotoneurone sind die prosekretorischen

## Einleitung

Transmitter Acetylcholin und Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) sowie die sekretionshemmenden Transmitter Neuropeptid Y und Somatostatin (Furness, 2006). Die Co-Lokalisation der Transmitter ist speziesabhängig. Während die Sekretomotoneurone beim Meerschweinchen entweder cholinerg oder VIPerg sind, co-exprimieren die Sekretomotoneurone im humanen SMP Acetylcholin und VIP (Schneider et al., 2001; Xue et al., 2007). Interneurone exprimieren neben Acetylcholin Substanz P (SP). Im humanen SMP hat die überwiegende Mehrzahl der Neurone S/Typ 1 Eigenschaften (Schemann et al., 2004).

AH-Neurone weisen eine Dogiel Typ II Morphologie auf, da sie viele lange Fortsätze aufweisen aber relativ wenig dendritische Fortsätze. Die Aktionspotentiale sind primär kalziumabhängig und haben daher eine längere Dauer als Aktionspotentiale in S/Typ 1 Zellen (Hirst et al., 1985). Sie zeichnen sich durch eine, im Anschluss an ein Aktionspotential auftretende, langanhaltende Nachhyperpolarisation (Afterhyperpolarisation, AH) durch Öffnen kalziumabhängiger Kaliumkanäle aus. Beim Meerschweinchen sind etwa 15% der Neurone im SMP AH-Neurone (Cooke et al., 2006). Im Gegensatz dazu konnten im humanen SMP keine AH/Typ 2 Neurone nachgewiesen werden (Schemann et al. 2002), obwohl Neurone mit Dogiel Typ II Morphologie im humanen enterischen Nervensystem beschrieben wurden (Hens et al., 2001). AH-Zellen werden sensorische Funktionen zugeschrieben. Sie erfüllen gleichzeitig Aufgaben als Interneurone. Nach neuesten Befunden scheinen neben AH-Zellen auch S-Zellen sensorische Funktionen auszuüben (Mazzuoli et al., 2009).

Die axonale Weiterleitung von Aktionspotentialen ist sowohl in AH/Typ 2 als auch in S/Typ 1 Neuronen TTX sensitiv. Neben den Sekretomotoneuronen mit der chemischen Codierung VIP/ChAT (Cholinacetyltransferase als cholinerges Marker) konnten im humanen SMP Neurone mit der Codierung ChAT/SP, VIP/- oder ChAT/- nachgewiesen werden (Schneider et al., 2001). Die SP haltigen Nervenzellen fungieren sehr wahrscheinlich als Interneurone.

### **1.3.2 Sensorische Innervation des Darms**

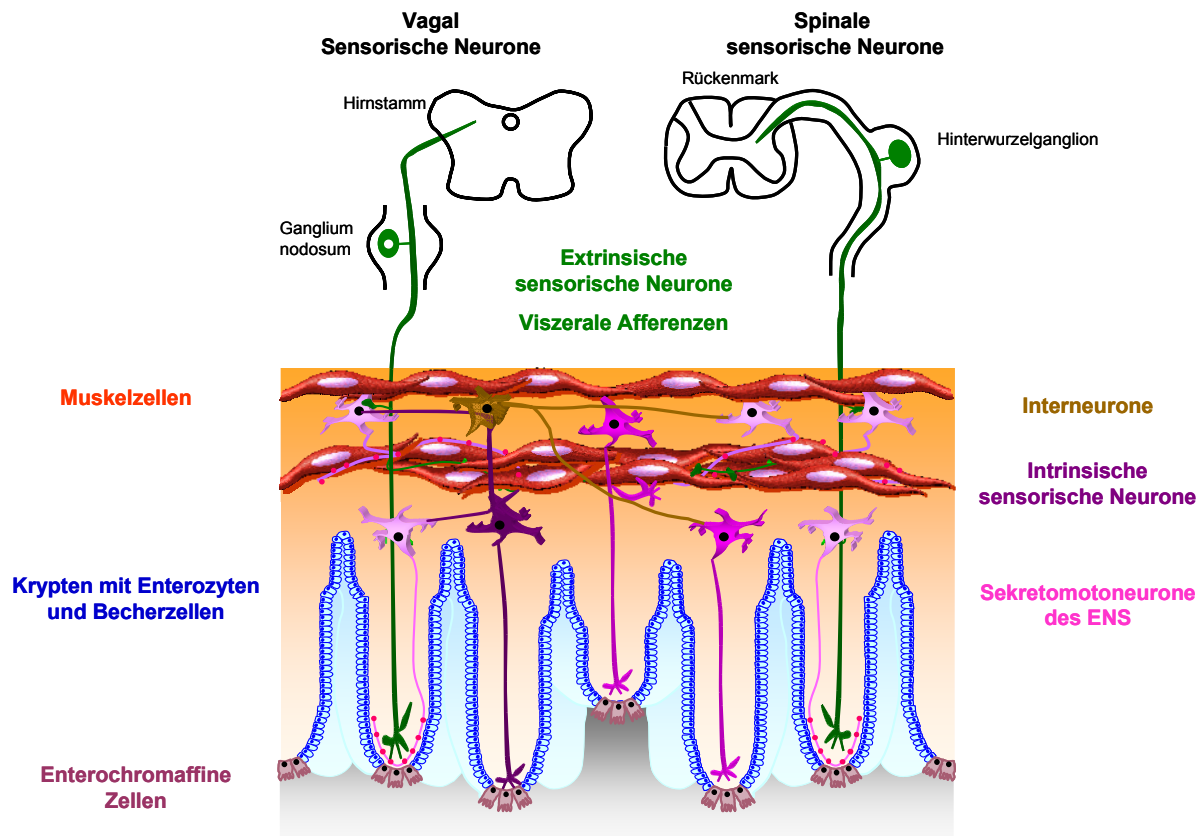
Sensorische Nervenzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung normaler Darmfunktionen und der Initiierung der motorischen und sekretorischen Reflexe. Für die sensorische Innervation des Darms existiert eine gewisse Redundanz, da chemische und mechanische Reize von sensorischen Nerven des enterischen Nervensystems und des extrinsischen Nervensystems kodiert werden (Blackshaw et al., 2007). Bei den

sensorischen Nerven des enterischen Nervensystems liegen Zellkörper, Fortsätze und synaptische Verbindungen in der Darmwand. Die Zellkörper der extrinsischen Sensoren liegen außerhalb des Darms im Ganglion nodosum (vagale Afferenzen) oder im Hinterwurzelganglion (spinale Afferenzen) (Furness, 2006). Ihre peripheren Nervenenden verlaufen in der Darmwand. Alle sensorische Nerven des enterischen und extrinsischen Nervensystems werden durch eine Reihe von Mediatoren, die von unterschiedlichsten Zellen in der Darmwand ausgeschüttet werden, in ihrer Aktivität und Sensitivität moduliert (Blackshaw et al., 2007). Damit haben Änderungen im Darmmilieu direkte Auswirkungen sowohl auf die sensorischen als auch die motorischen Bahnen. Manche nicht-nervale Zellen haben dabei eine zentrale Stellung und üben selbst die Rolle eines Sensors aus. Dies gilt insbesondere für enterochromaffine Zellen der Schleimhaut, die auf mechanische und chemische Reize mit einer Ausschüttung von Serotonin und ATP reagieren (Christofi, 2008; Gershon et al., 2007). Serotonin aktiviert dann in Folge Nerven des enterischen und extrinsischen Nervensystems, die beide eine Reihe von Serotoninrezeptoren exprimieren. In diesem Fall würde man entsprechend der klassischen sensorischen Neurophysiologie die antwortenden Nervenzellen eher als „second order“ Neurone bezeichnen. Trotzdem hat sich in der Neurogastroenterologie die Terminologie „sensorisch bzw. „intrinsisch primär afferent“ etabliert.

### **1.3.2.1 Sensorische Neurone des enterischen Nervensystems: intrinsische primäre Afferenzen**

Etwa 30% der enterischen Nervenzellen reagieren auf mechanische Reize wie Dehnung, Druck oder Deformation, aber auch auf chemische Stimuli wie kurzkettige Fettsäuren oder pH-Änderungen (Neunlist et al., 2001; Tough et al., 2003). Diese Nervenzellen werden als primär afferente oder intrinsische sensorische Neurone bezeichnet, obwohl die Aktivierung dieser Nervenzellen keine bewusste Wahrnehmung erzeugt. Enterische und extrinsische Neurone werden zusätzlich durch die Ausschüttung von Serotonin und ATP aus den enterochromaffinen Zellen erregt, die selbst sowohl auf mechanische als auch chemische Stimuli reagieren (Bertrand et al., 1997; Blackshaw et al., 2007; Cooke et al., 2006).

Die intrinsischen primär afferenten Neurone haben synaptische Verbindungen zu Interneuronen oder Sekretomotoneuronen und bilden so sekretorische Reflexbögen (Abbildung 3). Diese lokalen Reflexbögen mit integrativen Funktionen sind notwendig um die sekretorischen Funktionen des Darms zu koordinieren (Weber et al., 2001).



**Abbildung 3:** Die Nervenzellen des enterischen Nervensystems regulieren Motilität und Sekretion. Die Sekretomotoneurone ziehen zu den Effektoren und sind über sensorische Neurone und Interneurone zu Schaltkreisen verbunden. Parasympathische, sympathische und extrinsische sensorische Neurone bilden die Darm-Hirnnachse. Enterochromaffine Zellen in der Schleimhaut fungieren als Geschmacksknospen.

### 1.3.2.2 Enterochromaffine Zellen (EC Zellen)

Die EC Zellen, die zwischen den Enterozyten liegen, fungieren als Sensoren (Abbildung 3). Sie reagieren auf mechanische Stimuli wie Deformation, Dehnung, Druck, Berührung oder auf chemische Stimuli wie pH Änderungen und Nährstoffe (Gershon et al., 2007). Ihre primären Mediatoren sind Serotonin und ATP. Mehr als 90% des Serotonins im Körper stammt von EC Zellen. Nach Stimulation schütten sie ihre Mediatoren aus und aktivieren dadurch Nervenzellen des SMP (Cooke et al., 2006). Serotonin ist einer der wichtigsten Signalmoleküle im Darm, da es sekretorische und motorische Reflexe initiiert und moduliert (Gershon et al., 2007). Neben den EC Zellen wird Serotonin auch von den enterischen Interneuronen freigesetzt. Bis heute sind 14 unterschiedliche Serotoninrezeptoren bekannt. Sie werden in die Familien 5-HT<sub>1-7</sub> eingeteilt (Beattie et al., 2008).

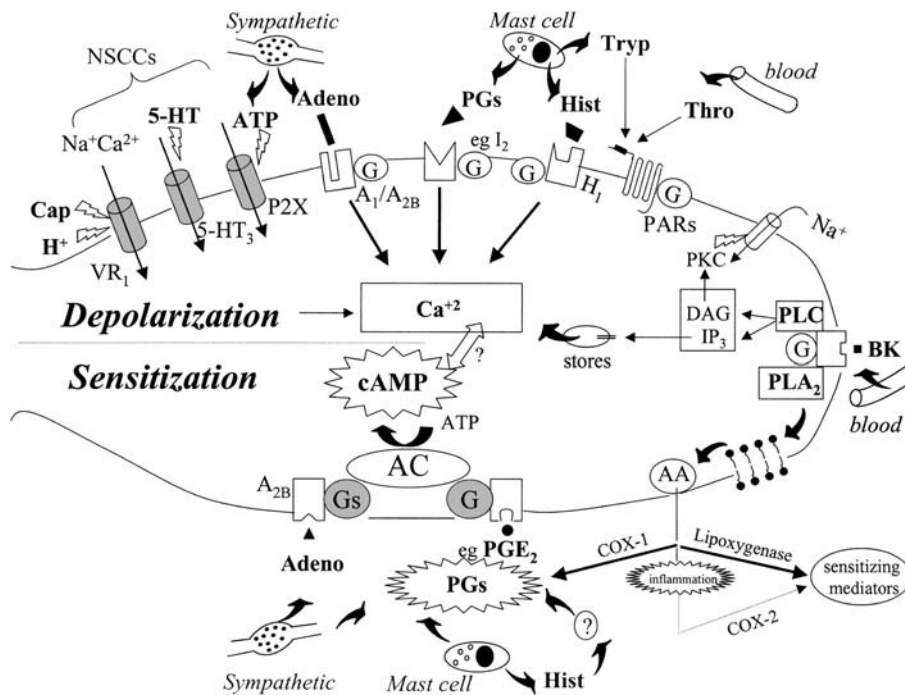
Die Berührung der Mukosa (mucosal stroking) oder Dehnung des Darms löst im distalen Kolon des Meerschweinchens einen Reflex aus, der zu einer Erhöhung der Sekretion führt.



Hierbei spielt die Ausschüttung von Serotonin aus EC Zellen und die Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>1P</sub> und 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren auf Nervenzellen des enterischen Nervensystems eine entscheidende Rolle (Weber et al., 2001). Beim Menschen führt mucosal stroking im Jejunum ebenfalls zu einer Sekretionserhöhung (Kellum et al., 1994). Hier konnte die Beteiligung von 5-HT<sub>4</sub>, nicht jedoch von 5-HT<sub>1P</sub>, 5-HT<sub>2</sub> oder 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren gezeigt werden. Serotonin scheint hierbei einen epithelialen 5H-T<sub>4</sub> Rezeptor zu aktivieren, da der induzierte Kurzschluss-Strom durch das Nervengift Tetrodotoxin nicht zu blockieren war. Im Gegensatz zum Meerschweinchendarm war die induzierte Sekretion Capsaicin sensitiv, was auf eine Beteiligung Capsaicin sensitiver extrinsischer Afferenzen hinweist (Burleigh et al., 1993).

### **1.3.2.3 Extrinsische sensorische Neurone: viszerale Afferenzen**

An den Reflexbögen sind auch die extrinsischen Afferenzen beteiligt, die Informationen vom Darm zum ZNS leiten, wobei diese Informationen unter physiologischen Bedingungen nicht bewusst wahrgenommen werden. Die Zellkörper der spinalen Afferenzen liegen im Hinterwurzelganglion und enden im Rückenmark, während die Zellkörper der parasympathischen vagalen Afferenzen im Ganglion nodosum liegen und im Tractus solitarius enden (Abbildung 3). Obwohl ihre Anzahl (ca. 100000) im Vergleich zu der Zahl enterischer Nervenzellen (ca. 100 Millionen) gering ist, haben sie doch Auswirkungen auf Darmfunktionen. Ihre peripheren Enden projizieren zur Mukosa, zur Muskulatur und zu den Plexus des enterischen Nervensystems, wo sie enterische Nervenzellen innervieren. Hierbei zeigt sich eine starke Arborisierung der Nervenfasern so bald sie in die Darmwand projizieren (Berthoud et al., 2004). Die vagalen und spinalen Afferenzen sind im proximalen Teil des Darms prävalent; der distale Darmabschnitt wird von spinalen und parasympathischen Nerven des Nervus pelvici innerviert (Blackshaw et al., 2007). Nach ihrer Aktivierung senden die Afferenzen nicht nur Signale zum ZNS, sondern können in der Darmwand ihre Transmitter Substanz P und Calcitonin gene related peptide (CGRP) ausschütten und damit enterische Nerven und in geringerem Masse auch Effektororgane direkt beeinflussen (Holzer et al., 2001).



**Abbildung 4:** Die viszeren Afferenzen exprimieren zahlreiche Rezeptoren und Kanäle. 5HT, ATP, Capsaicin (Cap) oder Protonen aktivieren direkt nicht selektive Kationenkanäle (NSCC), zu denen auch die TRP Kanäle einschließlich TRPV1 oder TRPA1 gehören. Die Aktivierung dieser Kanäle depolarisiert die Nervenzelle. Adenosin (über  $A_1/A_{2B}$ ) Histamin, Prostaglandine (außer  $PGE_2$ ) und Proteasen binden an G-gekoppelte Rezeptoren und erhöhen die intrazelluläre Kalziumkonzentration, wodurch die Ionenkanal Aktivität moduliert wird. Bindung von  $PGE_2$ , Adenosin (über  $A_{2B}$ ) an G-gekoppelte Rezeptoren aktiviert die Adenylatzyklase der Zelle. Die Sensibilisierung soll über erhöhte cAMP Spiegel in der Zelle vermittelt werden (Kirkup et al., 2001).

Die extrinsischen Afferenzen können durch Serotonin und Aktivierung der  $5\text{-HT}_3$  Rezeptoren stimuliert werden (Blackshaw et al., 2007). Die meisten extrinsischen Afferenzen sind unmyelinisierte C-Fasern. Während die mit dem Parasympathikus laufenden extrinsischen Afferenzen primär mechanische und chemische Stimuli im physiologischen Bereich kodieren, antworten spinale Afferenzen erst auf unphysiologisch starke Reize; viele von ihnen fungieren daher als Nozizeptoren (Blackshaw et al., 2010). Ionenkanäle, die sowohl in den Axonterminalen als auch im Zellkörper exprimiert werden, sind für die Transduktion der Reize in den sensorischen Afferenzen verantwortlich. Die Transient receptor potential (TRP) Kanäle spielen hier eine besondere Rolle (Blackshaw et al., 2010). Daneben exprimieren Nozizeptoren 5-HT, ATP und Prostaglandin Rezeptoren sowie  $K_{ATP}$  Kanäle und spannungsabhängige T-Typ Kalziumkanäle (Blackshaw et al., 2010; Distrutti et al., 2006; Matsunami et al., 2009) (Abbildung 4).

### **1.3.2.4 Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle**

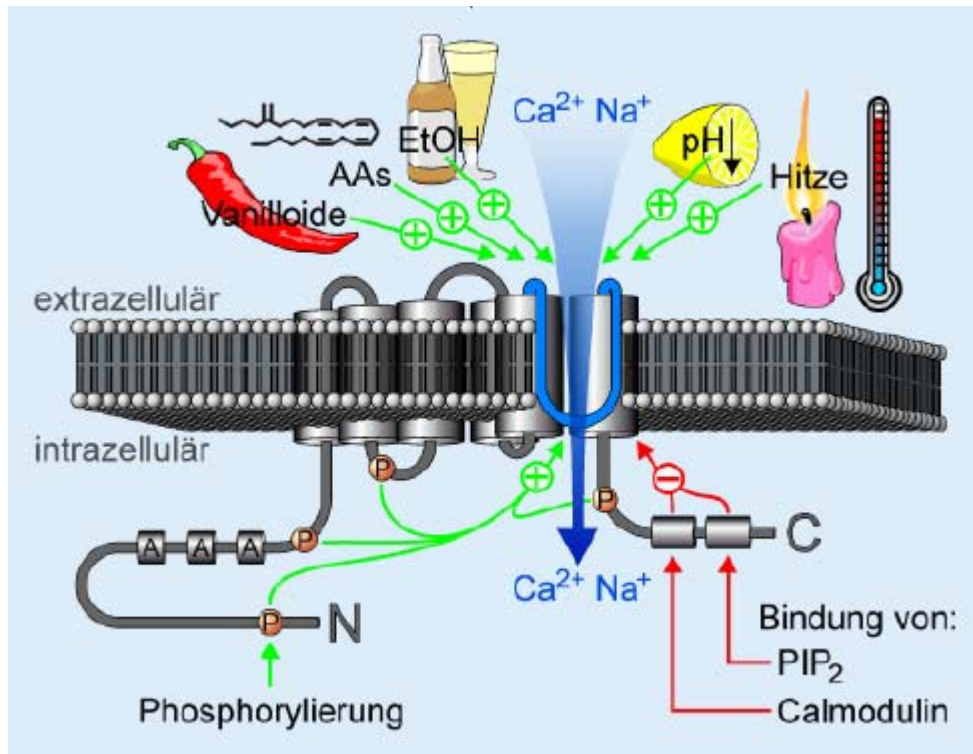
TRP Kanäle sind eine große Familie nicht selektiver Kationenkanäle (NSCC), die in unterschiedlichste physiologische Funktionen eingebunden sind. Sie werden auf erregbaren und nicht erregbaren Zellen exprimiert und sind, mit wenigen Ausnahmen, nicht spannungsabhängig (Appendino et al., 2008). Derzeit sind über 50 verschiedene TRP Kanäle bekannt, die in sechs Familien eingeteilt werden: TRPA (Ankyrin), TRPC (kanonisch), TRPM (Melastatin), TRPML (Mucolipin), TRPP (Polycystin) und TRPV (Vanilloid). Alle TRP Kanäle weisen eine charakteristische modulare Struktur auf: Sie besitzen 6 Transmembrandomänen, die sich in die Zellmembran einlagern, wobei die N- und C- Terminalen intrazellulär liegen (Appendino et al., 2008). Dort befinden sich 3 Ankyrindomänen, die eine Verbindung zum Zytoskelett herstellen, sowie als regulatorisch wirksame Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen und Bindungsstellen für Calmodulin und das Phospholipid PIP2 fungieren. Die 5. und 6. Transmembrandomäne bildet die Pore des Kanals. Durch Zusammenlagerung von 4 TRP Untereinheiten entstehen homotetramere Membrankanäle. Da in vielen Zellen jedoch mehrere unterschiedliche TRP Kanäle vorhanden sind, können auch hybride heterotetramere Membrankanäle gebildet werden. (Appendino et al., 2008). TRP Kanäle können für Natrium, Kalium, Kalzium und Magnesium permeabel sein. Wird der Kanal aktiviert, bewirkt ein einwärtsgerichteter Strom von Kationen eine Depolarisation der Zelle (Pedersen et al., 2005; Venkatachalam et al., 2007). In der Zellmembran verankert antworten TRP Kanäle auf eine Reihe physikalischer und chemischer Stimuli, sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle (Pedersen et al., 2005; Venkatachalam et al., 2007). Eine weitere besondere Eigenschaft einiger TRP Kanäle ist ihre Thermosensitivität. TRPV1-4, TRPM8 und TRPA1 fungieren als „Thermo-Kanäle“ und reagieren auf noxische Kälte- oder Hitzereize und sind damit entscheidend für die Temperaturwahrnehmung und Thermoregulation (Caterina et al., 1997; Caterina, 2007; Pedersen et al., 2005; Venkatachalam et al., 2007).

#### **TRPV1 Kanäle**

Der transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV1) Kanal gehört zur TRPV Subfamilie, die aus 6 Mitgliedern besteht, TRPV1-TRPV6. TRPV1 wird von Vanilloidkomponenten wie Capsaicin oder Resiniferatoxin, noxischer Hitze (<42°C) und Protonen aktiviert (Caterina et al., 1997). Weitere Agonisten sind Ethanol,

## Einleitung

Lipidmediatoren wie Anandamide, oder N-arachidonoyl-dopamine (NADA) und verschiedene Fettsäurenagonisten (Caterina, 2003) (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** TRPV1 ist ein unselektiver Kationenkanal aus 6 transmembranösen Domänen. Die N- und C- Terminalen des TRPV1-Proteins liegen intrazellulär. Am N-terminalen Ende befinden sich 3 Ankyrindomänen sowie die regulatorisch wirksamen Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen. Am C-terminalen Ende befinden sich die Bindungsstellen für Calmodulin und das Phospholipid PIP<sub>2</sub>. Die Pore wird durch TM5/TM6 gebildet. Aktiviert wird TRPV1 u. a. durch zahlreiche Vanilloide und Arachidonsäurederivate (AAs), Ethanol (EtOH), saure pH-Werte und durch noxische Hitzereize >42°C (Greffrath, 2006)

Die Bindungsstelle für alle Vanilloide und Lipidagonisten wird intrazellulär von den Transmembrandomänen TM3-TM4 gebildet (Gavva et al., 2004). Die Protonen induzierte Aktivierung des TRPV1 wird von Bindungsstellen außerhalb der Membran zwischen TM5 und TM6 reguliert (Tousova et al., 2005). Eine milde Azidose führt zu einer Sensibilisierung des TRPV1, womit die Schwelle zur Aktivierung, z.B. durch Hitze, herabgesetzt wird. Die für die Sensibilisierung verantwortliche Region unterscheidet sich von der Protonenbindungsstelle (Jordt et al., 2000). TRPV1 zeigen ausgeprägte Desensibilisierung. Eine Langzeitbehandlung des isolierten Darms mit Capsaicin führt nach einer anfänglichen vorübergehenden Aktivierung zu einer lang anhaltenden Inaktivierung bzw. Defunktionalisierung des Kanals (Weber et al., 2001).

TRPV1 Kanäle werden im Darm von neuronalen und nicht neuronalen Zellen exprimiert, wobei die Expression auf den extrinsischen Afferenzen 30-mal höher ist (Ward et al.,

2003). Keine der enterischen Nervenzellen exprimiert TRPV1 (Ward et al., 2003). TRPV1 Kanäle spielen nicht nur bei der Nozizeption sondern auch bei Entzündung eine wichtige Rolle (Szallasi et al., 2006). Bei Patienten mit viszeraler Hypersensitivität oder Reizdarmsymptomatik ist die Anzahl der TRPV1-Rezeptoren erhöht (Akbar et al., 2008; Chan et al., 2003). Der polymodale Capsaizinrezeptor spielt somit als eine Art „Lautstärkeregerler“ bei Schmerz und Entzündung eine entscheidende Rolle. Die Entwicklung von TRPV1-Antagonisten ist daher eine aktuelle Strategie zur Behandlung chronischer Schmerzen. Verschiedene TRPV1 Antagonisten wie z.B. SB 705498 wurden bereits in präklinischen Studien getestet (Chizh et al., 2007). Aber auch TRPV1 Agonisten sind potentielle Analgetika, da längere Applikationen des TRPV1 Agonisten Capsaicin zu Tachyphylaxie führt und den TRPV1 Rezeptor defunktionalisiert (Wong et al., 2009).

TRPV1 Antagonisten, die sowohl die Capsaicin- als auch Protonaktivierung blockieren, werden als Gruppe A Antagonisten bezeichnet. Hierzu gehören die kompetitiven Antagonisten Capsazepin, BCTC (*N*-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorpyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2*H*)-carbox-amide), AMG 9810 ((*E*)-3-(4-*t*-butylphenyl)-*N*-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide) und SB 705498 (*N*-(2-bromophenyl)-*N'*-[*(R)*-1-(5-trifluoromethyl-2-pyridyl)pyrrolidin-3-yl]urea). Agonisten wie Capsaicin und Gruppe A Antagonisten wirken durch Interaktionen mit der Transmembrandomäne TM3/4 und der Aminosäure Thr<sup>550</sup> (Gavva et al., 2005).

## TRPA1-Kanäle

TRPA1 ist ein TRP Kanal mit vielen N-terminalen Ankyrin-Wiederholungen. TRPA1 wird durch die psychoaktive Komponenten Tetrahydrocannabinol im Marihuana, den Reizstoffe Acrolein (Tränengas), Zimtaldehyd, Allicin und Isothiocyanat, den scharfen Inhaltsstoff von Wasabi, Meerrettich und Senföl aktiviert (Venkatachalam et al., 2007). TRPA1 fungiert auch als Kälte-Thermosensor. Es konnte gezeigt werden, dass in HEK-Zellen exprimierte TRPA1 Kanäle durch Kühlung auf 5-18°C aktiviert werden (Sawada et al., 2007). Die Hypothese, dass TRPA1 Kanäle auch als Mechanosensoren fungieren, wurde untermauert durch Befunde, dass TRPA1 in den Innenohrzellen exprimiert wird und dort sollen die Ankyrin-Wiederholungen dazu dienen, die Spannung der Zellen zu messen (Corey et al., 2004). Allerdings haben TRPA1 knockout Mäuse weder ein eingeschränktes Hörvermögen noch zeigen sie ein veränderte Reaktion auf noxische mechanische Reize (Bautista et al., 2006) Ob TRPA1 unter physiologischen Bedingungen durch Kälte, mechanische Reize oder beides stimuliert werden kann, bleibt daher unklar (Appendino et

al., 2008; Venkatachalam et al., 2007). Auf extrinsischen sensorischen Nervenfasern sind TRPA1 und TRPV1 Kanäle häufig co-exprimiert (Blackshaw et al., 2010; Story et al., 2003).

### **TRPC Kanäle**

TRPC Kanäle werden nach ihrer Homologie und funktionellen Gemeinsamkeiten bei Säugern in vier Unterfamilien eingeteilt: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5. Beim Mensch werden nur 6 unterschiedliche TRPC Varianten exprimiert, da es sich bei TRPC2 um ein Pseudogen handelt (Venkatachalam et al., 2007). TRPC Kanäle werden ubiquitär im Körper exprimiert und Zellen exprimieren mehr als eine TRPC Variante. Die funktionelle Charakterisierung der TRPC Kanäle wird dadurch erschwert, dass sich unterschiedliche Varianten zu Heterotetrameren zusammenlagern können (Venkatachalam et al., 2007). Die Aktivierung einiger TRPC Kanäle von Säugetieren scheint mit der Aktivierung von Phospholipase C gekoppelt zu sein. TRPC 3/6/7 scheinen auch direkt durch DAG aktiviert zu werden (Pedersen et al., 2005; Venkatachalam et al., 2007). Neben diesen Rezeptor gesteuerten TRPC Kanälen gibt es TRPC Kanäle, deren Aktivierung durch Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher erfolgt. Damit gehören sie zu den so genannten store operated Kalziumkanälen (SOC) (Ambudkar, 2007). Eine funktionelle Beschreibung von TRPC Kanälen ist durch den Mangel an selektiven Aktivatoren und Inhibitoren zur Zeit nicht möglich (Clapham, 2003; Freichel et al., 2005; Pedersen et al., 2005; Venkatachalam et al., 2007).

### **TRPM Kanäle**

Die Mitglieder der TRPM Familie werden nach ihrer Homologie in 4 Gruppen eingeteilt: TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5 und TRPM6/7. Die Permeabilitäten für Kalzium und Magnesium unterscheiden sich von Kanal zu Kanal sehr stark. So sind z.B. TRPM4 und 5 für Kalzium impermeabel, TRPM6 und 7 hingegen äußerst permeabel für Kalzium und Magnesium. Im Gegensatz zu TRPC und TRPV weisen die TRPM Kanäle keine Ankyrin-Wiederholungen auf (Pedersen et al., 2005). Der TRPM8 wird ubiquitär im Körper exprimiert, besonders häufig jedoch auf sensorischen Neuronen, wobei TRPM8 nicht mit TRPV1 und TRPA1 co-lokalisiert ist (Blackshaw et al., 2010). Wie TRPV1 und TRPA1 gehört TRPM8 zu den Thermorezeptoren und wird durch mäßige Kälte aktiviert (<23-28C) (Venkatachalam et al., 2007). Weitere Agonisten sind Stoffe, die ein Kältegefühl auslösen

wie Menthol, Cineol und Icilin (Blackshaw et al., 2010). Der TRPM8-Kanal ist spannungsabhängig (Voets et al., 2004).

**Tabelle 1:** Transmitter des enterischen Nervensystems unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses auf die Epithelzellfunktionen beim Menschen.

<b>Transmitter</b>	<b>Wirkmechanismus</b>	<b>Ursprung</b>
Acetylcholin	Aktivierung hemmender und erregender enterischer Nerven, Aktivierung epithelialer m3-Rezeptoren, pro-sekretorische Wirkung	Interneurone und erregende Sekretomotoneuronen
Noradrenalin	Inhibition erregender postsynaptischer Potentiale im ENS, anti-sekretorische Wirkung	sympathische Nerven
Substanz P	Aktivierung enterischer Neurone, insb. Sekretomotoneurone über NK1 und NK2 Rezeptoren, pro-sekretorische Wirkung	extrinsische Afferenzen, enterische Interneurone
Calcitonin gene-related peptide	Aktivierung enterischer Neurone, insb. Sekretomotoneurone, pro-sekretorische Wirkung	extrinsische Afferenzen
Stickstoffmonoxid	pro- und anti-sekretorische Wirkung.	enterische Nervenzellen, Epithel- und Immunzellen
Vasoaktives Intestinales Peptid	Aktivierung hemmender und erregender enterischer Nerven, pro-sekretorische Wirkung	erregende enterische Sekretomotoneurone, Interneurone
Neuropeptid Y	Inhibition erregender postsynaptischer Potentiale im ENS, anti-sekretorische Wirkung	hemmende enterische Sekretomotoneurone
Somatostatin	Inhibition erregender postsynaptischer Potentiale im ENS, anti-sekretorische Wirkung	hemmende enterische Sekretomotoneurone, sympathische Nerven
Serotonin	aktiviert enterische Nervenzellen über 5-HT <sub>3</sub> , 4, 7, 1P Rezeptoren, Aktivierung viszeraler Afferenzen, pro-sekretorische Wirkung	Enterische Nerven, EC Zellen
ATP (Nukleotide)	P2 Rezeptoren, pro-sekretorische Wirkung	Enterische Nerven, EC Zellen
Adenosin	Endogen erzeugt, P1 Rezeptoren A1 inhibitorisch, A2, A3 exzitatorisch Pro-sekretorische Wirkung	Enterische Nerven, Entzündungszellen
Histamin	Pro-sekretorische Wirkung über epitheliale H1-Rezeptoren	Mastzellen

Nach Christofi, 2008; Furness, 2006; Hirota et al., 2006; Keely et al., 1995 und eigenen Untersuchungen.

## 1.4 Transmitter und Modulatoren im humanen Darm

Für die koordinierte Regulation von Sekretion und Motilität im Darm werden vom enterischen Nervensystem, den extrinsischen Afferenzen und von nicht-nervalen Sensoren, wie enterochromaffinen Zellen, Mediatoren ausgeschüttet, die eine aktivierende oder hemmende Wirkung ausüben. Die Tabelle 1 fasst die wichtigsten Transmitter und ihre

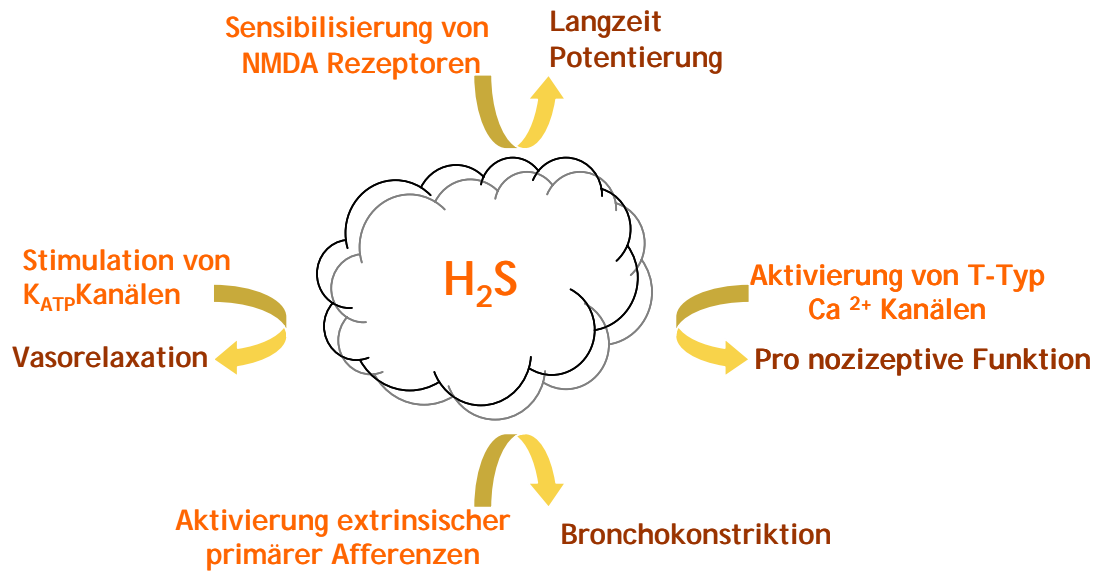
Wirkung unter Berücksichtigung ihrer Bedeutung für die Regulation der Sekretion zusammen.

## **1.5 Schwefelwasserstoff: ein dritter gasförmiger Neuromodulator und endogenes Signalmolekül**

Erst vor kurzem wurde Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) als weiteres gasförmiges Signalmolekül neben Kohlenmonoxid und Stickstoff entdeckt (Abe et al., 1996; Lowicka et al., 2007). Bis heute konnten zahlreiche physiologische und auch pathophysiologische Wirkmechanismen von  $H_2S$  in unterschiedlichsten Organsystemen nachgewiesen werden (Li et al., 2009; Linden et al., 2009; Mancardi et al., 2009; Schemann et al., 2009b) (Abbildung 6). Als erster zeigte Kimura, dass  $H_2S$  im Gehirn durch Sensibilisierung von NMDA-Rezeptoren Langzeitpotenzierung fördert (Kimura, 2000). Im kardiovaskulären System führt  $H_2S$  zur Erweiterung der Blutgefäße, indem es  $K_{ATP}$  Kanäle öffnet (Zhao et al., 2001). Über  $K_{ATP}$  Kanäle scheint auch die anti-nozizeptive Wirkung von  $H_2S$  im Gastrointestinaltrakt vermittelt zu werden (Distrutti et al., 2006). TRP Kanäle sind ebenfalls ein Target von  $H_2S$ . Die Aktivierung von TRPV1 hat eine Entzündung der Atemwege zur Folge (Trevisani et al., 2005). Darüber hinaus hatte  $H_2S$  in einem Mausmodell pro-nozizeptive Wirkung über Aktivierung von T-Typ Kalziumkanälen (Kawabata et al., 2007; Matsunami et al., 2009)). Im Meerschweinchendarm hat  $H_2S$  eine relaxierende Wirkung (Teague et al., 2002). Bis zur Publikation unserer Studie waren Wirkungen und Wirkmechanismen von  $H_2S$  auf nervaler Ebene und auf die Sekretion im Darm weitgehend unbekannt (siehe 3.4-3.6). Im Humandarm hat  $H_2S$  einen inhibierenden Einfluss auf die Motilität (Gallego et al., 2008).  $H_2S$  scheint multiple Angriffstellen und komplexe Wirkmechanismen zu haben, die darüber hinaus noch speziesabhängig zu sein scheinen (siehe 3.6).  $H_2S$  entsteht im Cysteinestoffwechsel durch die Enzyme Cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE) und Cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS). Beide Enzyme werden im Körper exprimiert, wobei das Expressionsmuster gewebeabhängig ist (Lowicka et al., 2007). Linden et al. zeigten, dass isolierte Kolonpräparate der Maus  $H_2S$  freisetzen (Linden et al., 2008). Die Tatsache, dass Gewebe, die auf  $H_2S$  antworten, auch selbst Schwefelwasserstoff produzieren, unterstreicht die Bedeutung von Schwefelwasserstoff als endogen erzeugtes Signalmolekül.



## Einleitung



**Abbildung 6:** Schwefelwasser hat viele physiologische und pathophysiologische Funktionen im Körper (Kawabata et al., 2007; Liu et al., 2004; Trevisani et al., 2005; Zhao et al., 2001).

## 2 Ziel der Arbeit

Funktionsstörungen des enterischen Nervensystems, der sensorischen Neurone, der Transmitter, Rezeptoren und verschiedener Signalkaskaden können zu Fehlregulation der sekretorischen Vorgänge am Epithel führen und somit zur Pathogenese von gastrointestinalen Störungen beitragen (Schemann et al., 2004; Azpiroz et al., 2007; Spiller et al., 2006). Die Kenntnisse der Regulation der Sekretion auf epithelialer und neuroepithelialer Ebene sind insbesondere für die Behandlung funktioneller Darmerkrankungen von entscheidender Bedeutung. Es gibt zahlreiche funktionelle Untersuchungen in verschiedenen Tiermodellen über das Zusammenspiel von Epithel und Neuronen (Xue et al., 2007); Kenntnisse über neuroepitheliale Interaktionen im Humandarm sind dagegen sehr limitiert.

Mit dieser Arbeit sollten grundlegende Mechanismen der Sekretion im Humandarm untersucht werden. Zum einen sollten basale Eigenschaftenn der verwendeten Geweberesektate definiert werden. Zum anderen dienen die funktionellen Studien der Aufklärung der neural vermittelten Sekretionsantworten im humanen Darm unter besonderer Berücksichtigung regionenspezifischer Unterschiede.

Störungen im Serotonin Metabolismus sind ein möglicher Faktor bei der Pathogenese von Magen-Darm-Erkrankungen (Gershon et al., 2007). Deshalb sollte die Bedeutung von 5-HT-Rezeptoren, insbesondere 5-HT<sub>3</sub> bzw. 5HT<sub>4</sub> Rezeptoren im Humandarm untersucht werden.

Iberogast<sup>®</sup> ist ein pflanzliches Präparat und wird erfolgreich zur Behandlung funktioneller Darmerkrankungen eingesetzt (Melzer et al., 2004; von Arnim et al., 2007). Bei Reizdarmpatienten konnte in klinischen Studien eine deutliche Symptomverbesserung festgestellt werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Iberogast<sup>®</sup> auf den humanen Darm zu untersuchen. Schwerpunkt war hier die Wirkung des Präparates auf epithelialer Ebene.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Wirkung und den Wirkmechanismus von H<sub>2</sub>S im Darm zu untersuchen. H<sub>2</sub>S ist nicht nur ein übel riechendes Gas, sondern neben NO und CO der dritte „Gasotransmitter“ (Lowicka et al., 2007). Als solcher beeinflusst H<sub>2</sub>S zahlreiche physiologische Organfunktionen und seine Rolle in der Pathophysiologie von entzündlichen, kardiovaskulären Erkrankungen und neuralen Störungen wird zunehmend realisiert. Bis zu unseren Untersuchungen war die Wirkung H<sub>2</sub>S im humanen Darm unbekannt. Besonderer Schwerpunkt war hier die Aufklärung der Signalkaskaden

## Zielsetzung

der H<sub>2</sub>S Wirkung im Humandarm, insbesondere die Identifizierung beteiligter neuronaler Komponenten und Transmitter. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die H<sub>2</sub>S Wirkung speziesabhängig ist.

### **3 Ergebnisse:**

#### **3.1 Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung der neural vermittelten Epithelantworten im Humandarm in vitro**

D. Krueger, F.Zeller; IE. Demir, GO Ceyhan, M.Schemann

*Manuskript in Vorbereitung*

*D. Krueger: Planung, Durchführung und Auswertung aller Versuche.*

Fremdanteil: Humane Darmresektate wurden von F.Zeller (Klinikum Freising), IE. Demir und GO. Ceyhan (Klinikum Rechts der Isar) entnommen. B. Kuch führte die immunhistochemischen Färbungen durch.

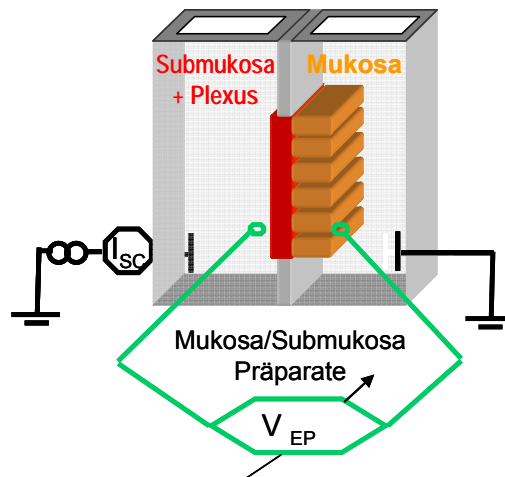
Die neural induzierte Sekretion ist in Tiermodellen wie Meerschweinchen gut untersucht (Cooke et al., 2006; Vanner et al., 2004; Xue et al., 2007). Allerdings gibt es nur wenige Untersuchungen über neural vermittelte Epithelantworten im Humandarm und diese basieren auf relativ geringen n-Zahlen (Hubel et al., 1982; Hubel et al., 1987; Isaacs et al., 1976; Kuwahara et al., 1989). Funktionelle und entzündliche Darmerkrankungen sind oft assoziiert mit Störungen der Schleimhautfunktionen (Azpiroz et al., 2007; Spiller, 2004). Eine Behandlung dieser Erkrankungen wird gerade durch unzureichende Kenntnisse über neural vermittelte Epithelantworten im humanen Darm erschwert. Ziel der Untersuchungen dieses Projektes war es, die an der neural vermittelten Sekretion beteiligten Ionenkanäle und Neurotransmitter zu charakterisieren. Außerdem wurde der Einfluss von Nerven bzw. Transmittern auf die basale, nicht stimulierte Sekretion untersucht. Des Weiteren sollte erstmal der Einfluss von Alter, Geschlecht, Darmregion und der Darmresektion zugrunde liegende Krankheit auf die neural stimulierte Sekretion und den basalen Gewebswiderstand untersucht werden.

##### **3.1.1 Material und Methoden**

Bei den untersuchten Geweben handelte es sich um Resektate von Dünn- und Dickdarmoperationen, die am Klinikum Freising oder am Klinikum Rechts der Isar durchgeführt wurden. Nach der operativen Entnahme wurden die Resektate sofort in eisgekühlter Krebslösung für den Transport gelagert und schnellstmöglich zum Institut geliefert. Die Präparation der Resektate erfolgte nach dreimaliger Waschung des Gewebes und mit Perfusion von eiskalter Krebslösung. Es wurden nur makroskopisch unauffällige

## Ergebnisse

Resektate verwendet. Die Darmsegmente wurden, falls erforderlich, unter dem Mikroskop geöffnet und die Muskelschichten entfernt. Das Mukosa/Submukosa Präparat wurde dann in ca. 1x1cm<sup>2</sup> Stücke zerteilt. Mit Hilfe von kleinen Nadeln wurden die Gewebestücke auf den Gewebehaltern fixiert und zwischen die beiden Hälften der Ussingkammern eingebaut. Es war möglich bis zu 8 Gewebestücke in einem Versuchsdurchgang zu messen. Zur Messung wurde die Ussingkammer Voltage Clamp Methode verwendet (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Mukosa/Submukosa-Präparate von Darmresektaten wurden mit der Ussingkammer Voltage Clamp-Methode untersucht. Die Mukosa/Submukosa Präparate des Humanendarmes trennen zwei mit Krebslösung gefüllte Kammern. Durch das „lebende Gewebe“ werden Ionen absorbiert oder sezerniert und es entsteht eine elektrische Spannung. Diese wird durch gewebsnahe Elektroden (grün) detektiert und durch Applikation eines Kurzschlussstromes ( $I_{sc}$ ) (schwarz) auf Null gesetzt wird (Voltage Clamp Methode).

Auftretende elektrische Potentiale, die durch ionale Bewegungen über das Gewebepreparat entstehen, werden bei dieser Methode durch Applikation eines Kurzschluss-Stromes auf Null gesetzt. Während des gesamten Versuches wurde der applizierte Kurzschluss-Strom ( $I_{sc}$ ) aufgezeichnet. Nach einer Equilibrierungszeit von 45 min wurde der basale Anfangswiderstand des Gewebes ermittelt. Durch Platinelektroden in den Gewebehaltern war eine elektrische Stimulation (elektrische Feldstimulation, EFS) der Präparate möglich. Hierbei werden die Nerven durch elektrische Impulse depolarisiert und die Ausschüttung von Neurotransmittern induziert. Die Stimulationsparameter waren wie folgt: Stimulusstärke 20 V, Impulsdauer 1ms, Frequenz 10Hz und Gesamtdauer der Stimulation 10 sec. Diese Stimulusparameter garantierten die ausschließliche Stimulation von Nerven (siehe Ergebnisse). In einigen Versuchen wurden die Stimulusstärke und die

Stimulusfrequenz variiert, um den Einfluss dieser Parameter auf die Sekretion zu untersuchen.

Insgesamt wurden 1394 Darmpräparate von 295 Patienten (125 Frauen und 142 Männer) untersucht. Das mittlere Alter der Patienten betrug  $66 \pm 14$  Jahre. Die häufigste Indikation für die Darmresektion war Karzinom (n=190), gefolgt von Divertikulitis (n=36), Polypen (n=11), Neoplasie (n=7), Ileus (n=4), Blutung (n=3), Morbus Crohn (n=3), Nekrosen (n=2). Peritonitis, Stenose, Abszess, Pankreatitis und Perforation war jeweils nur bei einem Patienten diagnostiziert worden. Von 34 Patienten lagen keine Angaben zur Erkrankung vor. Insgesamt wurden Dickdarmresektate von 288 Patienten und Dünndarmresektate von 60 Patienten untersucht, von einigen Patienten wurden uns sowohl Dickdarm als auch Dünndarm zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Technischen Universität München (1512/06, 1746/07) genehmigt.

Die statistische Analyse erfolgte mit SigmaPlot Software. Die EFS-Antworten wurden vor und nach Zugabe von Blockern oder Inhibitoren paarweise miteinander verglichen. Um signifikante Veränderungen nachzuweisen, wurde bei normal verteilten Werten ein gepaarter t-Test, bei nicht normal verteilten Werten der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Bei dem Vergleich der EFS-Antworten oder Gewebswiderstände von Dünndarm und Dickdarm wurde ein t-Test durchgeführt oder bei nicht normal verteilten Werten ein Mann-Whitney-U-Test. Ein Vergleich der ermittelten Parameter in den einzelnen Darmregionen wurde mit Varianzanalyse und post hoc Kruskal-Wallis Test untersucht. Für die Korrelation zwischen EFS-Antwort und ermitteltem Gewebswiderstand und dem Alter der Patienten wurde eine Spearman-Rangkorrelation durchgeführt.  $P < 0,05$  wurden als signifikant betrachtet.

### **3.1.2 Reproduzierbarkeit und Stimulusabhängigkeit der neural induzierten Epithelantworten**

Die elektrische Stimulation der Dünndarm- und Dickdarmpräparate ermöglichte die zuverlässige Messung von Epithelantworten. Von den untersuchten Resektaten konnten von 279 Patienten mindestens ein oder mehrere Gewebe elektrisch stimuliert werden. Dies entsprach einer Gesamtzahl von 1297 Gewebepräparaten. Von nur 16 Patienten war keines der Mukosa/Submukosa Präparate elektrisch erregbar. In der Tabelle 2 sind die Daten zur Stimulierbarkeit aller untersuchten Präparate zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Anzahl der untersuchten Patienten, Präparate und ihre Stimulierbarkeit.

Anzahl	Patienten	Präparate
Gesamt	295	1394
Patienten: ein oder mehr Gewebe stimulierbar	279 (95%)	
Präparate stimulierbar		1297 (93%)
Präparate nicht stimulierbar		42 (3%)
Patienten: kein Gewebe stimulierbar	16 (5%)	55 (4%)

Die Abbildung 8 zeigt eine typische Epithelantwort induziert durch elektrische Stimulation der Nerven mit 20 V. Die durchschnittliche Höhe des Anstiegs des Kurzschluss-Stromes betrug  $29,9 \pm 1,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n= 103$  Patienten, 214 Präparate). Nach einem raschen Anstieg erreichte der  $I_{sc}$  nach durchschnittlich  $9,2 \pm 0,6 \text{min}$  ( $n= 20$  Patienten, 52 Präparate) wieder Basalwerte.

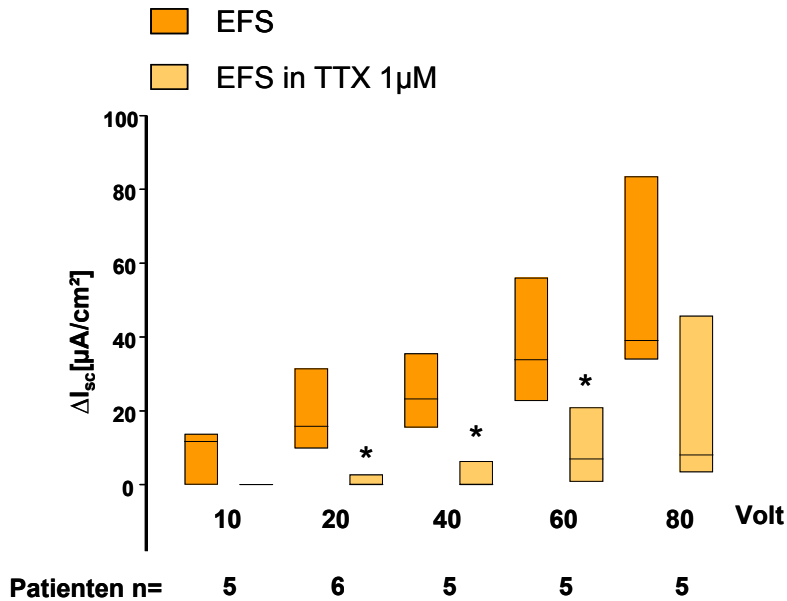


**Abbildung 8:** Typische Sekretionsantwort eines humanen Mukosa/Submukosa Präparates. Die elektrische Feldstimulation (EFS) erfolgte mit folgenden Parametern: 20V, 1ms, 10Hz für 10sec.

Um zu testen, ob die EFS-Antworten von der Stimulusstärke abhängig sind, wurden Kolonpräparate von 5 bzw. 6 Patienten mit steigender Voltzahl zwischen 10 und 80V stimuliert. Die anderen Stimulationsparameter blieben unverändert. Mit zunehmender Voltzahl stieg der gemessene Kurzschluss-Strom von  $7,8 \pm 3,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bei 10 V auf  $54,8 \pm 11,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bei 80V an (Abbildung 9). In einem Bereich zwischen 20 und 60V wurde die induzierte Epithelantwort durch Präinkubation mit dem Nervenblocker TTX ( $1 \mu\text{M}$ , serosal) signifikant auf 6%, 8% bzw. 22% der Kontrollantwort reduziert (Abbildung 9). Die Sekretionsantwort nach Stimulation mit 80V war nur teilweise TTX sensitiv. Dies

## Ergebnisse

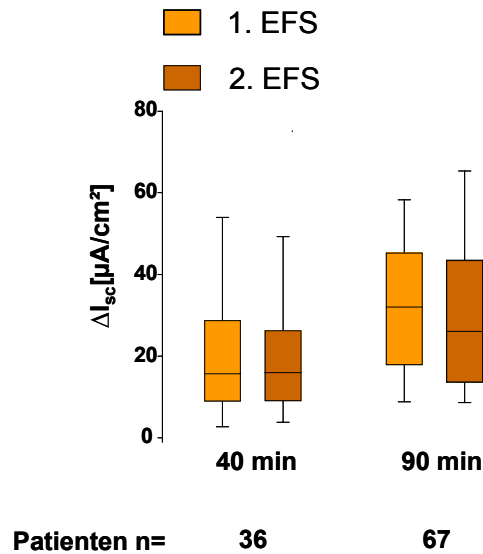
hatte sehr wahrscheinlich zwei Gründe: zum einen könnten bei dieser Stimulationsstärke Epithelzellen direkt stimuliert werden; zum anderen könnte ein solch starker Stimulus direkt neuroepitheliale Synapsen stimulieren, deren Transmitterausschüttung nicht TTX sensitiv ist. Die Stimulationsstärke von 20V wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet, da die Antworten zu fast 100% TTX sensitiv waren und gleichzeitig die Stimulationsantwort submaximal war. Dadurch konnten neben hemmenden Einflüssen auch potenzierende Wirkungen von Substanzen identifiziert werden.



**Abbildung 9:** Abhängigkeit der Sekretion von der Stimulationsstärke. Mit zunehmender Voltzahl steigt die sekretorische Antwort des Epithels. Zwischen 20 und 60V konnte die Antwort durch das Nervengift Tetrodotoxin (TTX, 1μM) in den Dickdarmpräparaten signifikant reduziert werden ( $p < 0,05$  Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

Um die Reproduzierbarkeit der EFS-Antworten zu untersuchen, wurden die Präparate wiederholt elektrisch stimuliert. Bei 66 Präparaten (Dünndarm und Dickdarm) von 36 Patienten erfolgte die zweite Stimulation nach 40 Minuten, bei 142 Präparaten (Dünndarm und Dickdarm) von 67 Patienten nach 90 Minuten. Die Restantwort betrug nach 40 Minuten 94%, nach 90 Minuten 95% im Vergleich zur 1. Stimulationsantwort (Abbildung 10). Die beiden Antworten waren nicht signifikant unterschiedlich. Diese Versuche waren entscheidend, um später die Wirkungen von Substanzen auf die neural induzierte Sekretion verlässlich auswerten zu können.





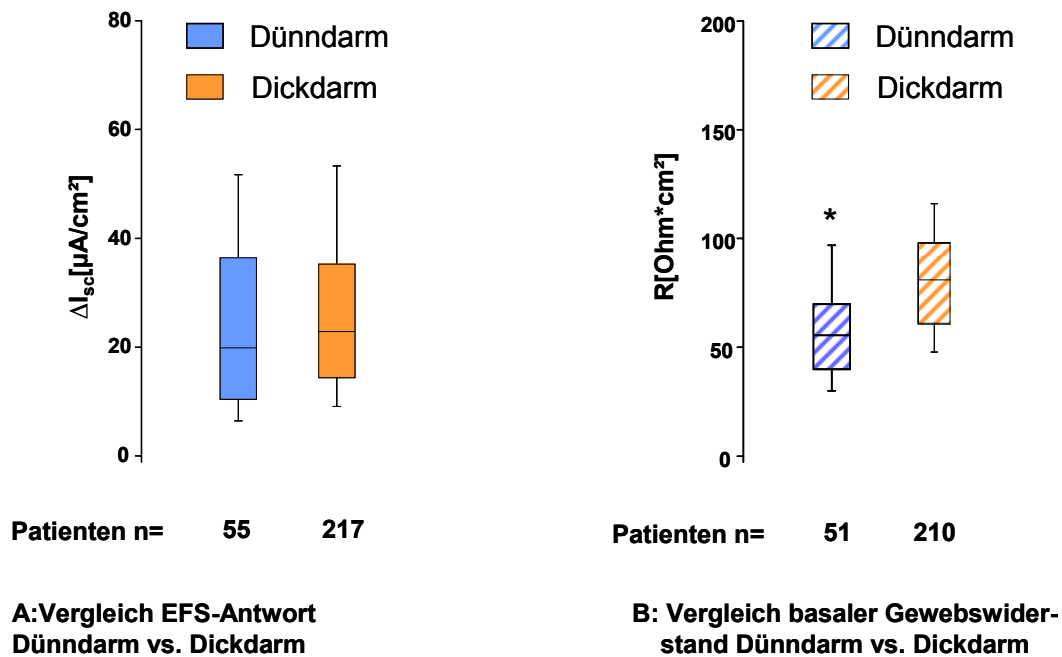
**Abbildung 10:** Reproduzierbarkeit der EFS-Antworten von Dün- und Dickdarmpräparaten. Nach 40 bzw. 90 Minuten war die 2. Stimulationsantwort mit der 1. Antwort vergleichbar.

### 3.1.3 Regionale Unterschiede der nerval induzierten Sekretion und des basalen Gewebswiderstandes im humanen Darm

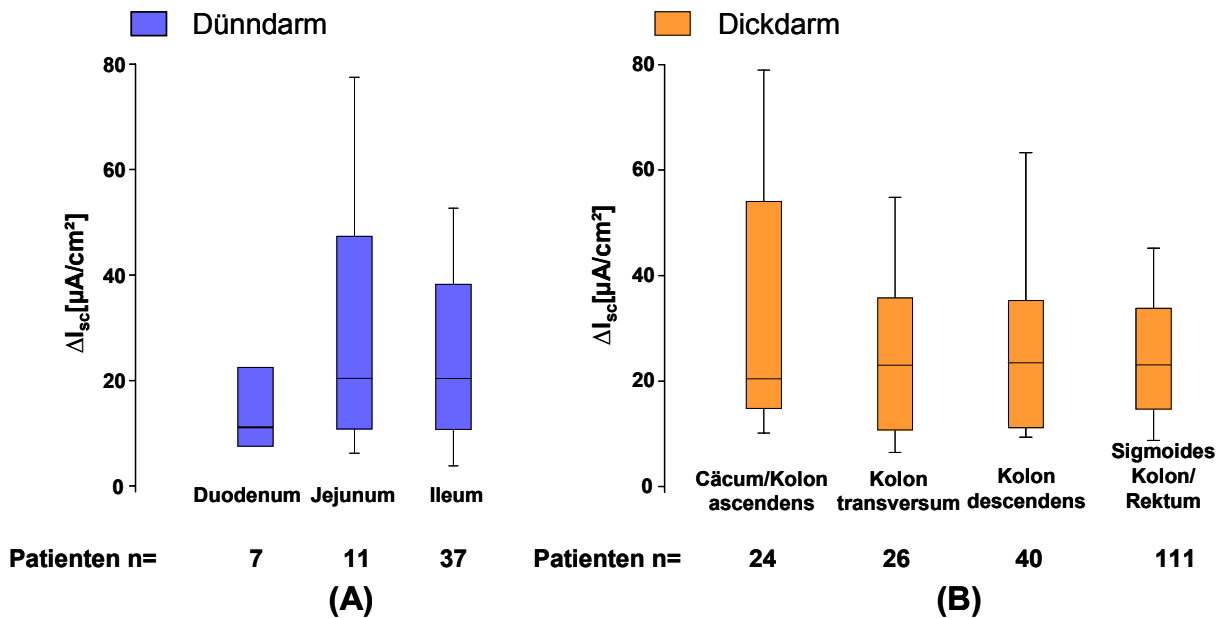
Die elektrische Feldstimulation mit einem Stimulus von 20V erzeugte im Dünndarm und Dickdarm vergleichbare Sekretionsantworten. Der Anstieg des Kurzschluss-Stromes betrug durchschnittlich im Dünndarm  $25,6 \pm 2,9 \mu A/cm^2$  (n= 55 Patienten) und im Dickdarm  $27,4 \pm 1,2 \mu A/cm^2$  (n= 217 Patienten) (Abbildung 11). Die EFS-Antwort unterschied sich auch nicht bei getrennter Betrachtung der einzelnen Regionen von Dün- und Dickdarm (Abbildung 12).

Der zu Beginn der Versuche ermittelte basale Gewebswiderstand der Dünndarmpräparate war mit  $58,3 \pm 3,5 \Omega \cdot cm^2$  (n= 51 Patienten) signifikant niedriger als der Gewebswiderstand der Dickdarmpräparate, der durchschnittlich  $81,9 \pm 4,2 \Omega \cdot cm^2$  betrug (n=210 Patienten;  $p > 0,001$ , t-Test) (Abbildung 11). Innerhalb der einzelnen Regionen des Dünndarms, aber auch zwischen den einzelnen Regionen des Dickdarms ergaben sich keine Unterschiede im Gewebswiderstand (Abbildung 13).

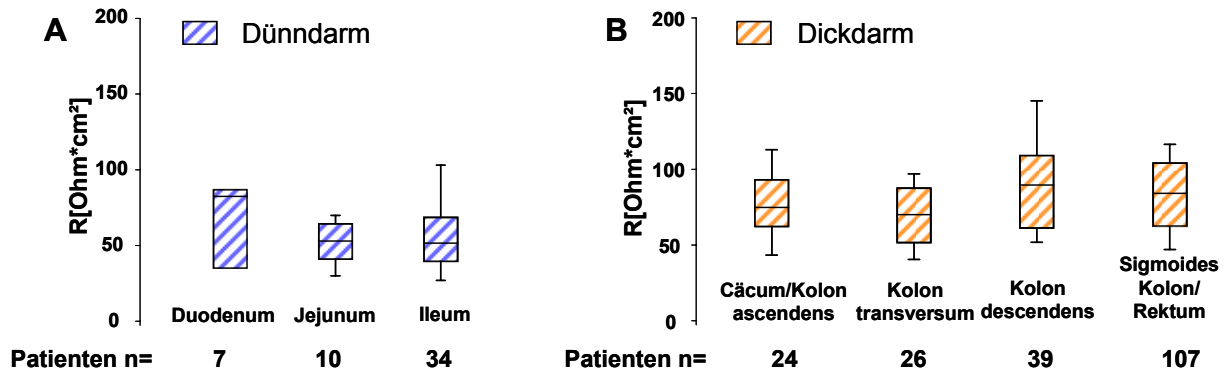
## Ergebnisse



**Abbildung 11:** Vergleich der EFS-Antworten und des basalen Gewebswiderstandes vom humanen Dünn- und Dickdarm. Dünn- und Dickdarmpräparate zeigen vergleichbare EFS-Antworten nach der elektrischen Stimulation mit 20V (A). Der Widerstand der Dünndarmpräparate ist signifikant niedriger als der Widerstand der Dickdarmpräparate (\* $p < 0,001$ ; Mann-Whitney-U-Test)(B).



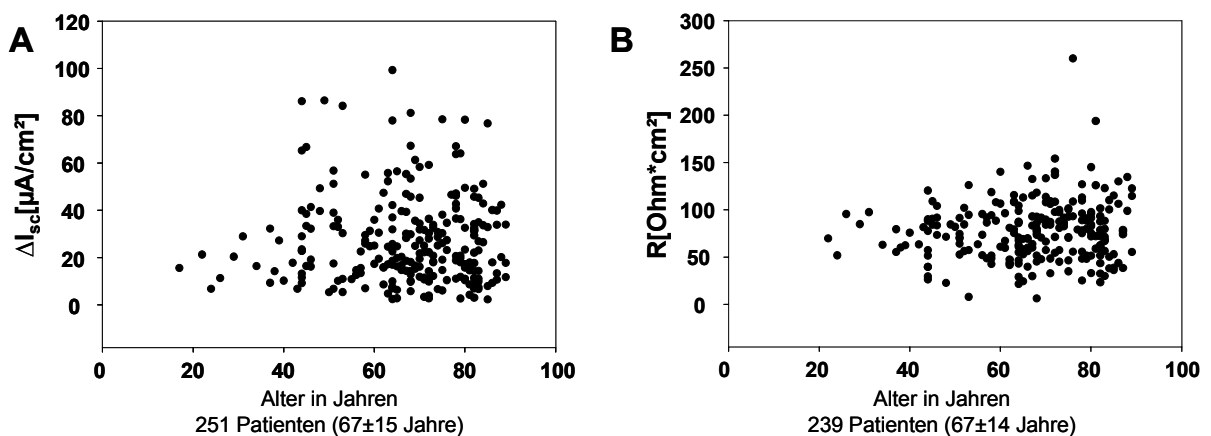
**Abbildung 12:** EFS-Antwort in den einzelnen Regionen von Dünn- (A) und Dickdarm (B). Die einzelnen Regionen des Dünn- und Dickdarms zeigten vergleichbare EFS-Antworten nach der elektrischen Stimulation mit 20V.



**Abbildung 13:** Basaler Gewebswiderstand in den einzelnen Regionen von Dünndarm (A) und Dickdarm (B). Der basale Gewebswiderstand war in den einzelnen Regionen des Dünndarms und in den einzelnen Regionen des Dickdarms vergleichbar.

### 3.1.4 Nerval induzierte Sekretion und basaler Gewebswiderstand sind unabhängig von Alter und Geschlecht.

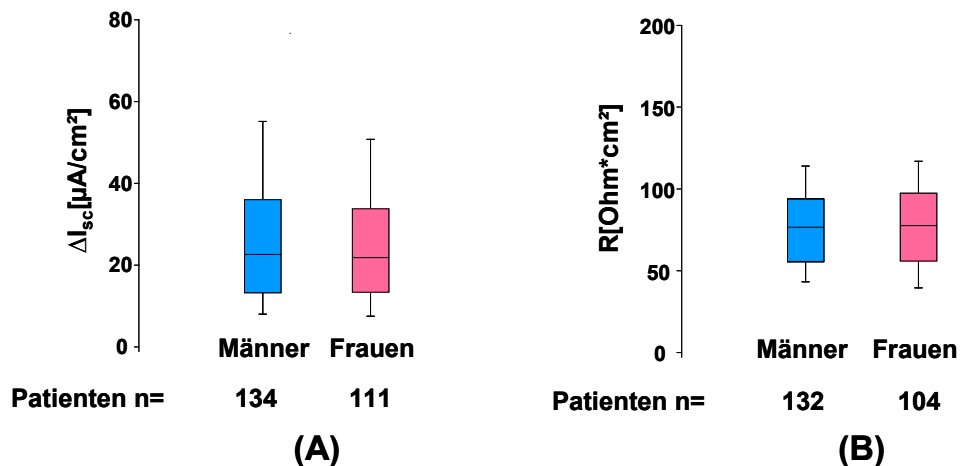
Das durchschnittliche Alter der Patienten, deren Resektate untersucht wurden, betrug 67 Jahre. Die Altersspanne lag zwischen 17 und 89 Jahren. Um zu testen, ob die nerval induzierten EFS-Antworten und der Gewebswiderstand vom Alter der Patienten und damit von alterungsbedingten Veränderungen in Darm beeinflusst werden, wurden Korrelationen zwischen dem Alter der Patienten und den EFS-Antworten (n= 251 Patienten, Dünndarm- und Dickdarm) bzw. dem Gewebswiderstand (n= 239 Patienten, Dünndarm- und Dickdarm) durchgeführt. Wie die Abbildung 14 zeigt gab es keinen Hinweis, dass die ermittelten Parameter vom Alter beeinflusst werden.



**Abbildung 14:** EFS-Antworten und Gewebswiderstand von Dünndarm und Dickdarm sind unabhängig vom Alter: Weder die nerval stimulierte Sekretionsantwort (A) noch der ermittelte Gewebswiderstand (B) scheint vom Alter des Patienten abhängig zu sein. (Spearman-Rangkorrelation (A):  $p=0,808$ ,  $r=-0,0154$ ; (B):  $p=0,320$ ,  $r=0,0646$ ).

## Ergebnisse

Die EFS-Antworten und der Gewebswiderstand zeigten auch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (Abbildung 15). Die EFS-Antwort der Präparate von männlichen Patienten (n=134, Dünn- und Dickdarm) war mit  $26,9 \pm 1,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  nahezu identisch zu der durchschnittlichen EFS-Antwort in Präparaten weiblicher Patienten ( $26,5 \pm 1,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , n=111, Dünn- und Dickdarm).



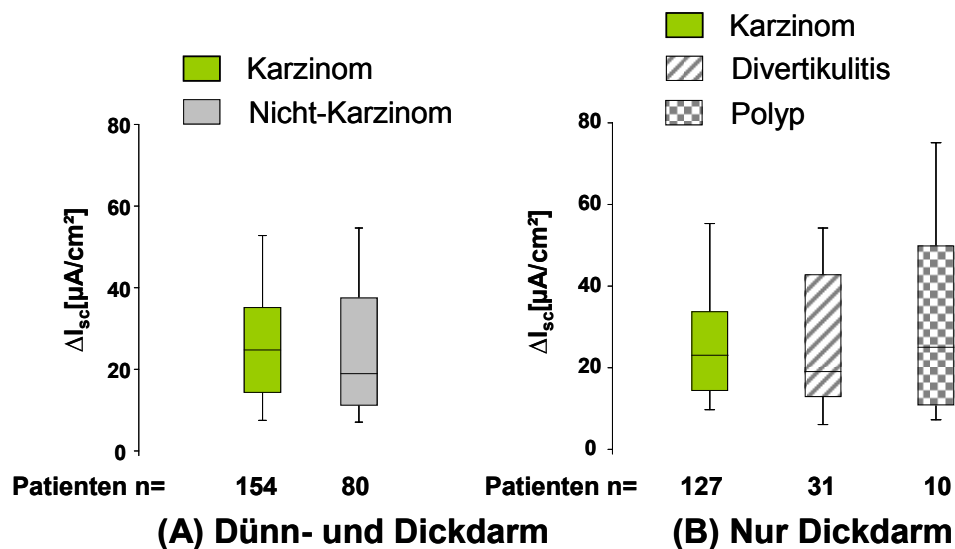
**Abbildung 15:** EFS-Antwort und Gewebswiderstand von Dünn- und Dickdarm sind unabhängig vom Geschlecht. Die EFS-Antworten der Mukosa/Submukosa Präparate von Männern und Frauen sind nahezu identisch (A). Ebenso unterscheiden sich die basalen Gewebswiderstände nicht (B).

Ähnliche Ergebnisse ergab ein Vergleich der Gewebswiderstände der Präparate von Männern und Frauen. Der mittlere Gewebswiderstand betrug  $77,1 \pm 2,4 \text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$  bei Präparaten männlicher Patienten (n=132, Dünn- und Dickdarm) und  $78,9 \pm 3,6 \text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$  bei Präparaten weiblicher Patienten (n=104, Dünn- und Dickdarm).

### 3.1.5 Einfluss der Erkrankung auf nerval induzierte Sekretion und basalen Gewebswiderstand

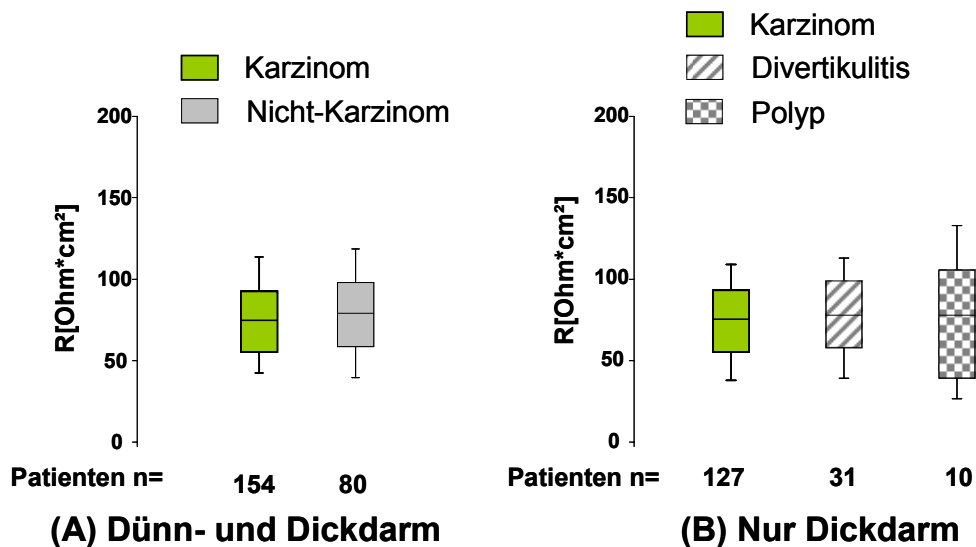
Um den Einfluss der Erkrankung auf EFS-Antworten und basalen Gewebswiderstand festzustellen, wurden die Gewebe nach der Diagnose Karzinom und Nicht-Karzinom unterteilt. Mit einer mittleren EFS-Antwort von  $27,1 \pm 1,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (n=154 Patienten mit Karzinom) bzw.  $26,9 \pm 2,3$  (n=80 Patienten ohne Karzinom) zeigte sich keine Abhängigkeit der Erregbarkeit von der gestellten Diagnose (Abbildung 16A). Auch bei einer weiteren Untergliederung von Dickdarmpräparaten in die drei häufigsten Diagnosen,

nämlich Karzinom, Divertikulitis und Polypen, konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die durchschnittliche Stimulationsantwort der Dickdarmpräparate von Karzinompatienten betrug  $27,1 \pm 1,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n=127$ ),  $27,4 \pm 3,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n=21$ ) für Präparate von Divertikulitispatienten und  $31,2 \pm 7,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n=10$ ) für Präparate von Patienten mit Polypen (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** EFS-Antworten sind unabhängig von der gestellten Diagnose. Eine Unterteilung der Stimulationsantworten des Dün- und Dickdarms in Karzinom- und Nicht-Karzinompatienten ergab ähnliche Antworten in beiden Gruppen (A). Eine weitere Aufgliederung der Stimulationsantworten von Dickdarmpräparaten in die häufigsten Diagnosen ergab ebenfalls ähnliche Stimulationshöhen (B).

Der mittlere basale Gewebswiderstand der Dün- und Dickdarmpräparaten von Karzinompatienten betrug  $75,4 \pm 2,3 \text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$  ( $n= 150$  Patienten) und war somit mit dem mittleren Gewebswiderstand von  $81,8 \pm 4,4 \text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$  ( $n= 80$  Patienten) von Nicht-Karzinompatienten vergleichbar (Abbildung 17A). Ähnliche Ergebnisse ergab die Analyse des basalen Gewebswiderstands des Dickdarms entsprechend der häufigsten Diagnosen. Mit einem durchschnittlichen basalen Gewebswiderstand von  $75,5 \pm 2,5 \text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$  für Präparate von Karzinompatienten ( $n=126$ ),  $78,2 \pm 5,7 \text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$  für Divertikulitispatienten ( $n=26$ ) und  $76,2 \pm 11,4 \text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$  für Patienten mit Polypen ( $n=10$ ) ergaben sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 17B).



**Abbildung 17:** Der basale Gewebewiderstand ist unabhängig von der gestellten Diagnose. Eine Unterteilung der basalen Gewebewiderstände des Dünndarm- und Dickdarms in Karzinom- und Nicht-Karzinompatienten ergab ähnliche Werte in beiden Gruppen (A). Eine weitere Aufgliederung der basalen Gewebewiderstände von Dickdarmpräparaten in die häufigsten Diagnosen zeigte ähnliche Werte (B).

### 3.1.6 Pharmakologische Charakterisierung der neural induzierten Sekretion

#### Identifizierung von Kanälen, Transportern und Signalkaskaden

Die EFS-Antwort führte zu einem kurzfristigen Anstieg des Kurzschluss-Stromes. Diese Erhöhung des Kurzschluss-Stromes könnte sowohl durch eine Anionensekretion als auch durch eine Kationenabsorption verursacht werden. Zur Identifizierung der ionalen Ströme wurden die Darmpräparate nach der Kontrollstimulation mit dem Inhibitor des NKCC1-Cotransporters Bumetanid ( $100\mu\text{M}$ , serosal) oder dem epithelialen Natrium Kanalblocker Amilorid ( $10\mu\text{M}$ , mukosal) präinkubiert und dann erneut stimuliert. Durch Bumetanid wurde die EFS-Antwort signifikant von  $44,1 \pm 8,0\mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $25,9 \pm 3,8\mu\text{A}/\text{cm}^2$  reduziert ( $n=11$  Patienten nur Dickdarmpräparate,  $p=0,002$  gepaarter t-Test). Nach Amilorid kam es zu einer Erhöhung der EFS-Antworten: im Dickdarm nahm die Antwort von  $31,9 \pm 3,9\mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $39,8 \pm 5,9\mu\text{A}/\text{cm}^2$  zu ( $n=14$  Patienten,  $p=0,056$  gepaarter t-Test). Im Dünndarm wurde eine Erhöhung von  $12,9 \pm 1,3\mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $21,9 \pm 1,8\mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen ( $n=5$  Patienten,  $p=0,007$  gepaarter t-Test). Zum weiteren Beweis der Chloridabhängigkeit wurde die 2. Stimulation in chloridfreier Krebslösung durchgeführt. Die EFS-Antwort in chloridfreier Krebslösung war im Dünndarm von  $24,5 \pm 4,9\mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $7,5 \pm 2,0\mu\text{A}/\text{cm}^2$

## Ergebnisse

(n= 6 Patienten, p=0,004 gepaarter t-Test) und im Dickdarm von  $42,3 \pm 17,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $21,8 \pm 12,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (n= 5 Patienten, p=0,029 gepaarter t-Test) reduziert. MDL 12330A ist ein Adenylatzyklasehemmer und verhindert die Bildung von cAMP. In Anwesenheit von MDL 12330A ( $20 \mu\text{M}$ , serosal) war die EFS-Antwort von  $20,6 \pm 5,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $7,1 \pm 2,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  reduziert (n= 8 Patienten, nur Dickdarm, p= 0,011 gepaarter t-Test). Prostaglandine scheinen an der Stimulationsantwort nicht beteiligt zu sein, da der Zykllooxygenasehemmer Piroxicam ( $10 \mu\text{M}$ , serosal) die EFS-Antwort nicht beeinflusste ( $22,9 \pm 4,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $19,9 \pm 4,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; n= 7 Patienten nur Dickdarm, p= 0,521 gepaarter t-Test). Die prozentualen Restantworten in Anwesenheit der verschiedenen Blocker und Inhibitoren ist in Abbildung 18 dargestellt.

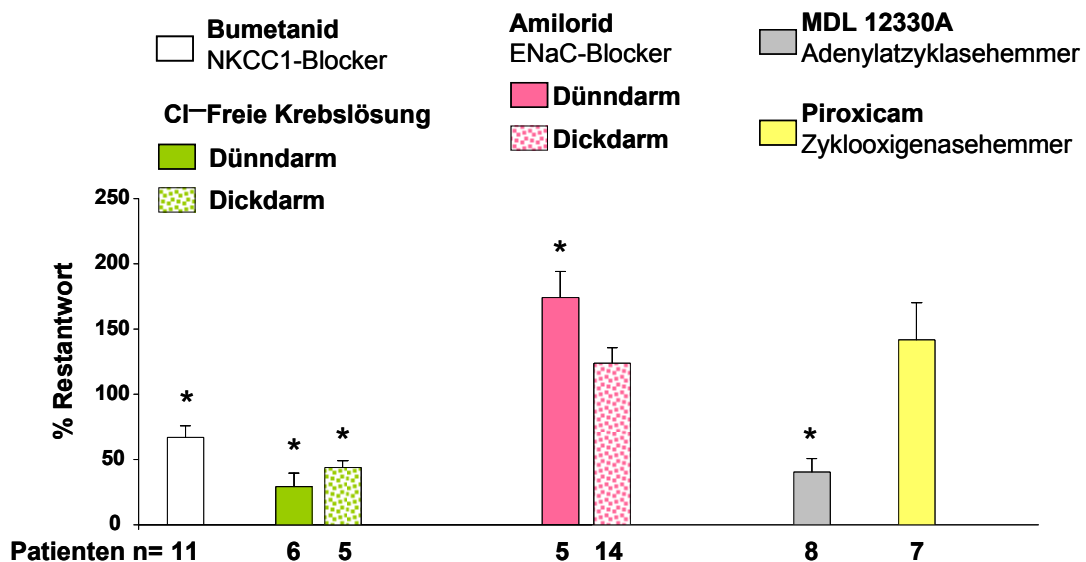


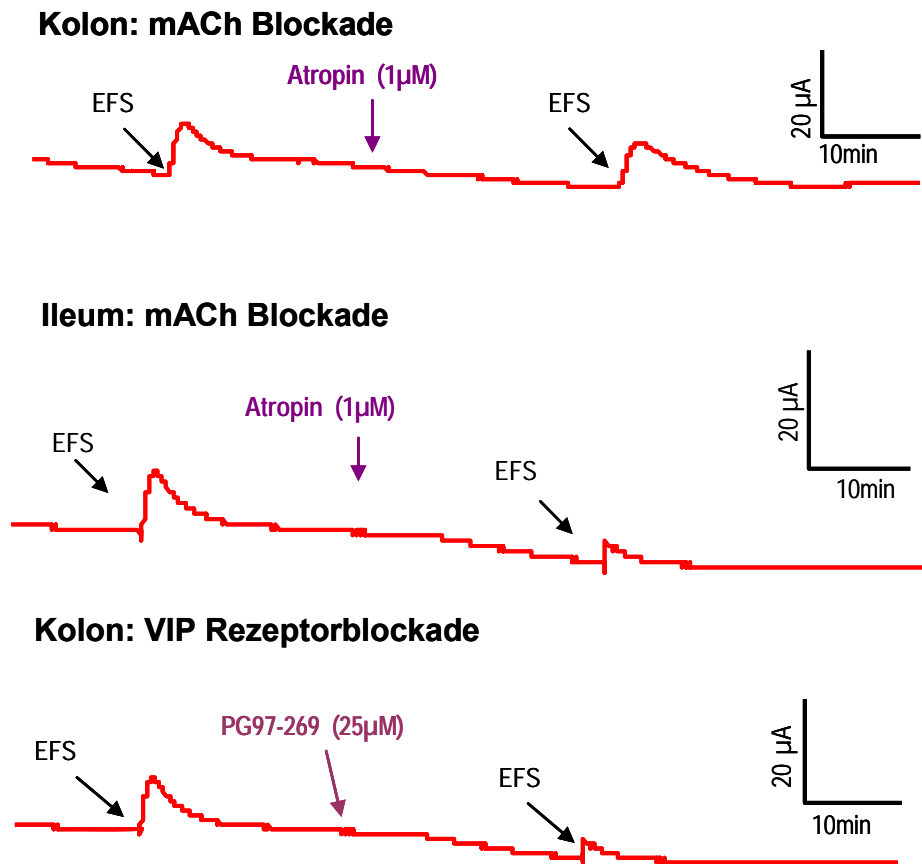
Abbildung 18: An der EFS Antwort beteiligte Kanäle, Transporter und Signalkaskaden. In Bumetanid, einem NKCC1-Cotransportblocker, Cl-freier Krebslösung und dem Adenylatzyklasehemmer MDL12330A sind die EFS-Antworten signifikant reduziert. In dem epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanalblocker Amilorid nimmt die Antwort zu. In Piroxicam, einem Prostaglandinsynthesehemmer, bleibt die Antwort unverändert. Für die Untersuchungen mit Bumetanid, MDL 12330A und Piroxicam wurden nur Dickdarmresektate verwendet. (\* markieren signifikante Unterschiede, p-Werte siehe Text)

## Transmitter des enterischen Nervensystems

Acetylcholin (Ach) ist ein pro-sekretorischer Transmitter, der primär von Sekretomotoneuronen des enterischen Nervensystems ausgeschüttet wird. Die pro-sekretorische Wirkung von Acetylcholin scheint im humanen Darm Regionen abhängig zu sein. Die Blockade muskarinerg Acetylcholinrezeptoren (m-Ach) durch Atropin ( $1 \mu\text{M}$

## Ergebnisse

serosal) hatte im Dünndarm eine stärkere reduzierende Wirkung als im Dickdarm (Abbildung 19).

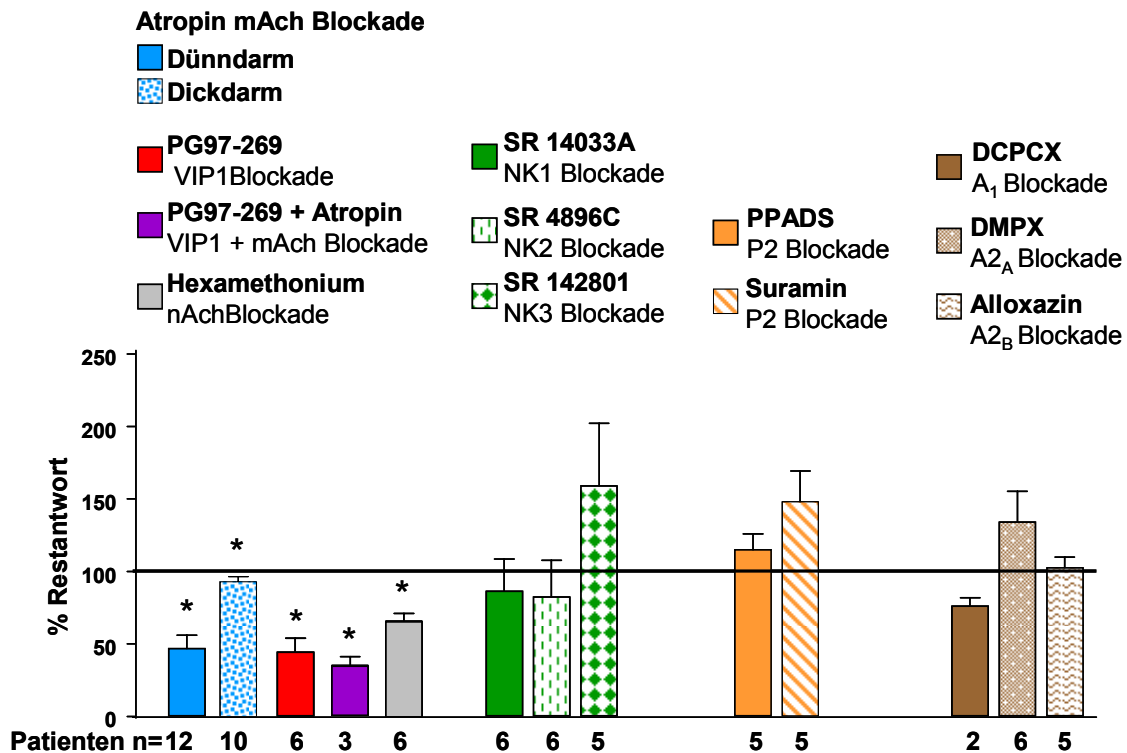


**Abbildung 19:** Einfluss von Atropin und des VIP-Antagonisten PG97-269 auf die neural stimulierte Sekretion. Im humanen Dickdarm scheint VIP, nicht aber Acetylcholin, der primärer Transmitter bei der neural stimulierten Sekretion zu sein. Im Gegensatz dazu ist im humanen Dünndarm die cholinerge Komponente stärker ausgeprägt.

Im Dünndarm wurde die EFS-Antwort in Atropin von  $33,8 \pm 6,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $20,1 \pm 5,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n=12$  Patienten,  $p \leq 0,001$  Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) auf etwa 50% reduziert. Im Dickdarm wurde die EFS-Antwort lediglich um 7%, von  $33,3 \pm 3,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $29,5 \pm 2,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , abgeschwächt ( $n=10$  Patienten,  $p=0,045$  gepaarter t-Test). Das Alter der Patienten war mit  $63 \pm 6$  Jahre für die Dünndarmpräparate und  $70 \pm 2$  Jahre für die Dickdarmpräparate vergleichbar. Im Dickdarm spielt VIP als pro-sekretorischer Transmitter scheinbar eine größere Rolle als Acetylcholin, da die EFS-Antwort nach serosaler Zugabe des  $\text{VIP}_1$  Rezeptorantagonisten PG 97-269 ( $25 \mu\text{M}$  serosal) auf 44% reduziert wurde (Abbildung 19 und 20). Die EFS-Antwort wurde signifikant von  $30,7 \pm 4,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $12,5 \pm 2,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  reduziert ( $n=6$  Patienten,  $p=0,031$  Wilcoxon-

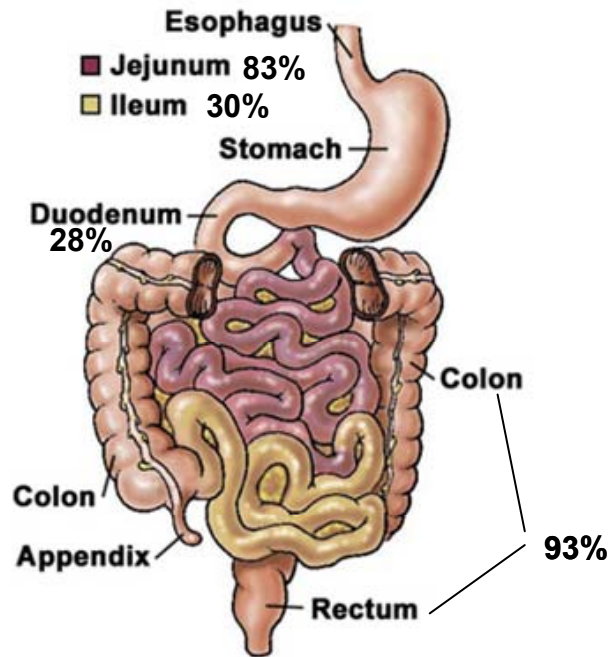


Vorzeichen-Rang-Test). Durch die Kombination von Atropin und PG 97-269 konnte eine geringe additive Wirkung erzielt werden. Mit einer Reduktion von  $29,4 \pm 1,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $10,0 \pm 1,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  betrug die Restantwort hier 34% (n=3 Patienten nur Dickdarmresektate,  $p=0,012$  gepaarter t-Test) (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Transmitter des enterischen Nervensystems sind an der EFS-Antwort beteiligt. Die EFS-Antwort wird im Dün- und Dickdarm durch Atropin reduziert, allerdings scheint die cholinerge Komponente im Dünndarm eine größere Rolle zu spielen. Blockade des  $\text{VIP}_1$  Rezeptors reduziert die EFS-Antwort im Dickdarm signifikant, die Kombination von Atropin und PG97-269 hat im Dickdarm einen additiven Effekt. Die Blockade nikotinerger (n-Ach) Rezeptoren führt im Dickdarm zu einer abgeschwächten EFS-Antwort. Antagonisten der Neurokinin (NK) Rezeptoren 1-3 hatten keinen Einfluss auf die EFS-Antwort im Dickdarm. Purinerge (P2) Rezeptoren und  $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_{2\text{A}}$  und  $\text{A}_{2\text{B}}$ -Rezeptoren sind an EFS-Antwort in Dün- und Dickdarm nicht beteiligt (p-Werte siehe Text, \* markieren signifikante Unterschiede).

Die Atropinsensitivität war innerhalb der verschiedenen Dünndarmregionen sehr unterschiedlich: Im Duodenum betrug die Restantwort durchschnittlich 28% (n= 3 Patienten), im Jejunum 83% (n= 3 Patienten) und im Ileum 30% (n= 4 Patienten). Im Dickdarm hingegen konnte keine regionenabhängige Veränderung der Atropinsensitivität festgestellt werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Atropinsensitivität der EFS-Antwort in Abhängigkeit von der Region im Humandarm. Die Abbildung zeigt die durchschnittliche Restantwort der EFS-Antwort in Atropin. Mit Ausnahme des Jejunums dominiert im Dünndarm die cholinerge Komponente.

Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren scheinen ebenfalls an der neural vermittelten Epithelantwort im Humandarm beteiligt zu sein, da die EFS-Antworten in Hexamethonium (200  $\mu\text{M}$ , serosal) von  $30,9 \pm 5,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $20,8 \pm 5,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  reduziert wurden ( $n= 6$  Patienten,  $p= 0,006$  gepaarter t-Test) (Abbildung 20).

ATP ist bei exogener Applikation ein pro-sekretorischer Transmitter im humanen enterischen Nervensystem (Riegler et al., 2000). Bei der EFS-Antwort scheint jedoch keine purinerge Komponente vorzuliegen. Weder in Gegenwart von PPADS (50 $\mu\text{M}$ , serosal) noch Suramin (100 $\mu\text{M}$  serosal), beides P2 Rezeptorblocker, war die Antwort mit  $30,2 \pm 4,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bzw.  $40,1 \pm 6,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  im Vergleich zu den Kontrollantworten von  $27,3 \pm 4,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bzw.  $27,5 \pm 3,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  verändert (PPADS:  $n= 5$  Patienten, Dünn- und Dickdarmresektate,  $p=0,221$  gepaarter t-Test; Suramin:  $n= 5$ , Dünn- und Dickdarmresektate,  $p= 0,095$  gepaarter t-Test) (Abbildung 20).

Adenosin hat im enterischen Nervensystem eine inhibitorische Wirkung, indem es die Ausschüttung aktivierender Transmitter blockiert (Christofi, 2008), aber auch eine pro-sekretorische Wirkung auf das Epithel (Riegler et al., 2000). Mit Alloxazin, einem  $A_{2B}$ -Rezeptorblocker (1 $\mu\text{M}$ , serosal), DMPX, einem  $A_{2A}$ -Rezeptorblocker (10 $\mu\text{M}$ , serosal) und DCPCX, einem  $A_1$ -Rezeptorblocker (1 $\mu\text{M}$ , serosal) wurde getestet, ob die EFS-Antworten eine Adenosin vermittelte Komponente besitzen. In Alloxazine blieb die Antwort

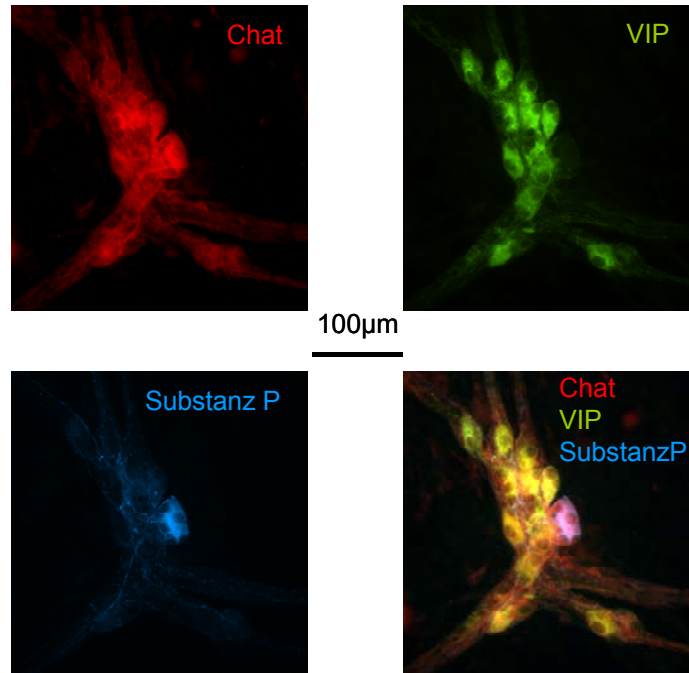
## Ergebnisse

unverändert ( $30,6 \pm 9,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $30,3 \pm 9,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ;  $n=5$  Patienten, Dünn- und Dickdarmresektate,  $p=0,855$  gepaarter t-Test). Mit DMPX zeigt sich eine leichte Erhöhung von  $22,6 \pm 5,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $28,6 \pm 7,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n=6$  Patienten, Dünn- und Dickdarmresektate,  $p=0,212$  gepaarter t-Test) und nach DCPCX Gabe zeigt sich hingegen eine geringe Abnahme von  $29,5 \pm 9,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $21,7 \pm 5,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n=2$  Patienten, nur Dickdarmresektate,  $p=0,303$  gepaarter t-Test) (Abbildung 20).

Substanz P ist ein weiterer pro-sekretorischer Transmitter, dessen Wirkung nach exogener Applikation im humanen Darm hauptsächlich über NK1 und NK2-Rezeptoren vermittelt wird (Lecci et al., 2006; Tough et al., 2003). Eine Blockade der NK-Rezeptoren mit SR140333A ( $1 \mu\text{M}$ , NK1 Antagonist), SR 4896C ( $1 \mu\text{M}$ , NK2 Antagonist) oder SR142801 ( $1 \mu\text{M}$ , NK3 Antagonist) im Dickdarm hatte keinen Einfluss auf die EFS-Antworten (SR140333A:  $16,5 \pm 3,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $21,9 \pm 3,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $n=6$  Patienten  $p=0,208$  gepaarter t-Test; SR4896C:  $23,1 \pm 2,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $18,1 \pm 5,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$   $n=6$  Patienten,  $p=0,477$  gepaarter t-Test; SR142801:  $23,7 \pm 11,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $17,8 \pm 5,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$   $n=5$  Patienten gepaarter t-Test) (Abbildung 20).

Immunhistochemisch konnte nachgewiesen werden, dass die Nervenzellen des SMP des humanen Kolons immunreaktiv (IR) für den cholinergen Marker Acetylcholintransferase (ChAT), VIP und Substanz P (SP) sind, wobei Acetylcholin und VIP bzw. Acetylcholin und SP zum Teil co-lokalisiert sind (Abbildung 22). In einer weiteren Analyse wurde die Anzahl der ChAT-IR, VIP-IR und SP-IR Nervenzellen im humanen Kolon und Ileum von je 5 Patienten ermittelt (Tabelle 3). Im humanen Kolon waren mehr Nervenzellen ChAT-IR und VIP-IR als im Ileum. Das Verhältnis ChAT-IR zu VIP-IR Nervenzellen war im Kolon geringer als im Ileum. Dies bedeutet, dass im Kolon verhältnismäßig mehr VIPerge als cholinerge Nervenzellen existieren. Ebenso war die Anzahl der Nervenzellen, die sowohl ChAT als auch VIP exprimieren im Kolon höher als im Ileum. Die Anzahl SP-IR Nervenzellen war in beiden Regionen nahezu gleich, ebenso die Anzahl der Zellen die sowohl ChAT als auch SP-IR waren. Das mittlere Alter der beiden untersuchten Patientengruppen betrug 73 Jahre für das Ileum und 68 Jahre für Kolon.

## Ergebnisse



**Abbildung 22:** Immunhistochemischer Nachweis von Cholinacetyltransferase (CHAT), VIP und Substanz P. Die Nervenzellen des SMP im humanen Dickdarm exprimieren CHAT (als cholinergem Marker), VIP und Substanz P, zum Teil sind CHAT und Substanz P oder CHAT und VIP colokalisiert.

**Tabelle 3:** Anzahl CHAT/+, VIP/+ und SP/+ Zellen in Ganglien des SMP im humanen Dünndarm und Dickdarm

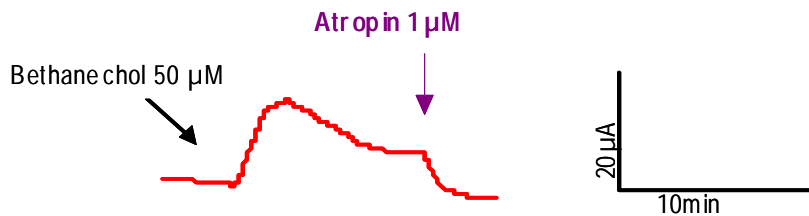
Nervenzellen positiv für	Ileum Patienten/Ganglien 5/52	Kolon Patienten/Ganglien 5/51
<b>ChAT/-</b>	4,9±0,5	8,1±1,2
<b>VIP/-</b>	2,0±0,3	5,9±0,6
<b>Verhältnis CHAT/VIP</b>	2,5	1,4
<b>ChAT/VIP</b>	0,7±0,3	4,2±1,3
<b>SP/-</b>	1,5±0,4	1,1±0,2
<b>ChAT/SP</b>	1,5±0,4	1,1±0,2
<b>VIP/SP</b>	0	0
<b>ChAT/VIP/SP</b>	0	0

Zum Nachweis der Funktionsfähigkeit der muskarinergen Rezeptoren wurden Darmpräparate des humanen Kolons mit dem muscarinergen Rezeptoragonist Bethanechol stimuliert. Wie die Abbildung 23 zeigt kam es nach Zugabe von Bethanechol zu einer

## Ergebnisse

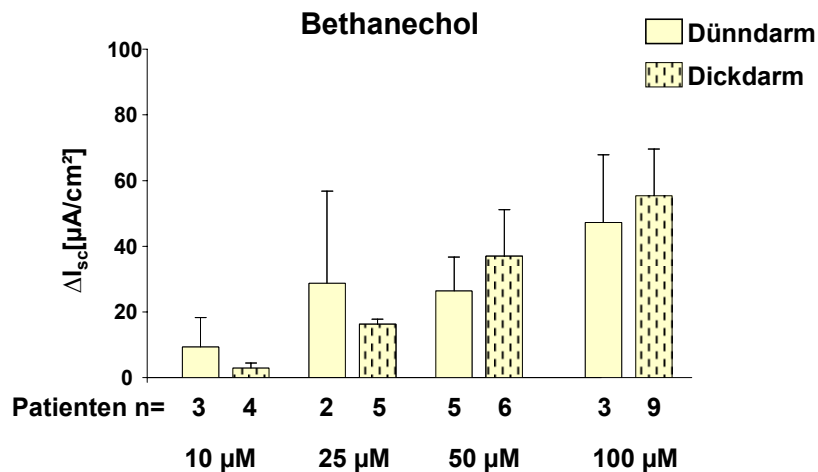
massiven Steigerung des Kurzschluss-Stromes, der durch Zugabe von Atropin deutlich reduziert wurde.

### Kolo n: mACh Aktivierung



**Abbildung 23:** Aktivierung der mACh-Rezeptoren durch Bethanechol. Im humanen Kolon erzeugt Bethanechol, ein spezifischer muskarinerges Rezeptoragonist, reproduzierbare Antworten, die durch Atropin blockierbar sind.

Die Sensitivität der muskarinergen Ach-Rezeptoren im Dünndarm und Dickdarm wurde durch eine Dosis-Wirkungskurve von Bethanechol überprüft. Die Applikation von 10µM, 25µM, 50µM und 100µM erhöhte den gemessenen Kurzschluss-Strom im Dünndarm um  $9,3 \pm 9,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $28,7 \pm 28,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $26,3 \pm 10,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  und  $47,3 \pm 20,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (n=2-6 Patienten).

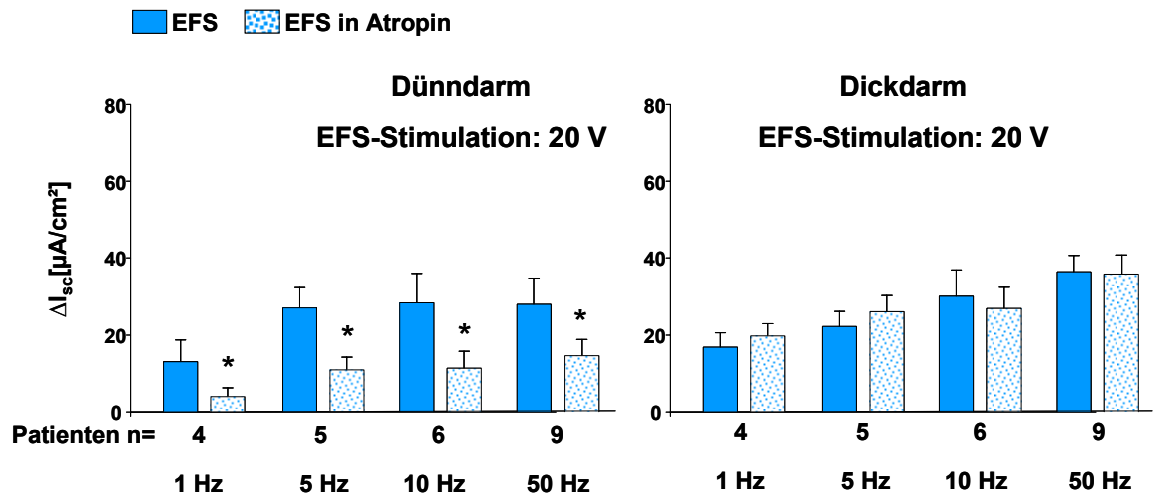


**Abbildung 24:** Der spezifische muskarinerges Rezeptoragonist Bethanechol führt dosisabhängig zu einer in Dünndarm und Dickdarm vergleichbaren Sekretionssteigerung. Trotz geringerer Atropinsensitivität der EFS-Antwort im humanen Kolon scheint die Sensitivität der muskarinergen Rezeptoren im Dünndarm und Dickdarm vom Menschen vergleichbar zu sein.

Im Dickdarm konnten vergleichbare Werte gemessen werden:  $2,8 \pm 1,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $16,3 \pm 1,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $37,0 \pm 14,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  und  $55,4 \pm 14,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (n= 4-9 Patienten) (Abbildung 24). Die Bethanecholantwort ließ sich in allen verwendeten Konzentrationen im humanen

## Ergebnisse

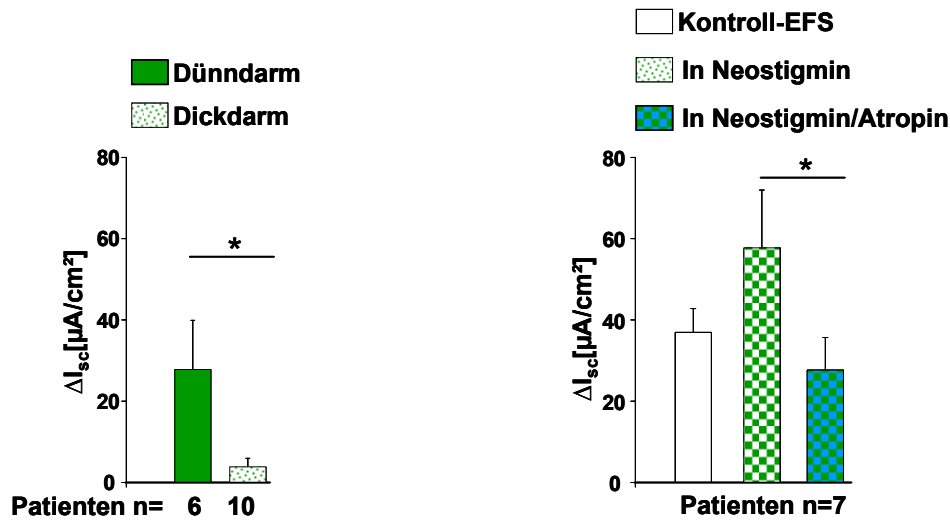
Kolon durch Atropin (1 $\mu$ M) vollständig blockieren (n=14, Daten nicht dargestellt). Diese Ergebnisse zeigen, dass die geringe Atropinsensitivität der EFS-Antworten im Dickdarm nicht auf eine geringe Sensitivität der epithelialen muskarinergen Acetylcholinrezeptoren zurückzuführen sind.



**Abbildung 25:** Atropin-Sensitivität der EFS-Antwort bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen im humanen Dünndarm und Dickdarm. Mit steigender Hertzzahl nimmt die EFS-Antwort im Dünndarm und Dickdarm zu. Atropin reduziert die EFS-Antwort im Dünndarm bei allen Stimulationsfrequenzen. Im Gegensatz dazu ist die EFS-Antwort im Dickdarm für alle Stimulationsfrequenzen Atropin-insensitiv (\* markieren signifikante Unterschiede, p-Werte siehe Text).

Um zu testen, ob die beobachtete geringe Atropinsensitivität im humanen Kolon von der verwendeten Stimulationsfrequenz abhängt, wurden Darmpräparate von Dünndarm und Dickdarm mit 1 Hz, 5 Hz, 10 Hz und 50 Hz stimuliert. Die anderen Stimulationsparameter blieben unverändert. Im Dünndarm war die EFS-Antwort für alle Stimulationsfrequenzen Atropin-sensitiv (Abbildung 25). Bei 1 Hz betrug die EFS-Antwort in Atropin im Dünndarm  $3,9 \pm 2,3 \mu A/cm^2$  vs.  $13,1 \pm 5,7 \mu A/cm^2$  (n=6 Patienten, p= 0,047 gepaarter t-Test), für 5 Hz  $10,9 \pm 3,3 \mu A/cm^2$  vs.  $27,1 \pm 5,4 \mu A/cm^2$  (n= 6 Patienten, p= 0,031 gepaarter t-Test), für 10 Hz  $11,4 \pm 4,5 \mu A/cm^2$  vs.  $28,5 \pm 7,5 \mu A/cm^2$  (n= 7 Patienten p= 0,007 gepaarter t-Test) und für 50 Hz  $14,6 \pm 4,3 \mu A/cm^2$  vs.  $28,0 \pm 6,7 \mu A/cm^2$  (n= 6 Patienten, p= 0,029 gepaarter t-Test). Im Dickdarm hingegen waren die EFS-Antworten bei keiner der verwendeten Stimulationsfrequenzen durch Atropin reduziert (1 Hz:  $19,8 \pm 3,2 \mu A/cm^2$  vs.  $16,9 \pm 3,8 \mu A/cm^2$  n= 6 Patienten; 5 Hz:  $26,2 \pm 4,2 \mu A/cm^2$  vs.  $22,3 \pm 3,9 \mu A/cm^2$  n= 6

**(A) Änderung des basalen  $I_{sc}$  in Dünndarm- und Dickdarm durch Neostigmin**      **(B) Änderung EFS-Antwort des Dickdarms durch Neostigmin und Atropin**



**Abbildung 26:** Änderung des basalen Kurzschluss-Stromes  $I_{sc}$  und der EFS-Antwort nach Hemmung der Acetylcholinesterase durch Neostigmin ( $1\mu M$ ). In Dünndarmpräparaten induziert Neostigmin im Vergleich zum Dickdarm einen massiven Anstieg des basalen Kurzschluss-Stromes  $I_{sc}$  (A). Im Dickdarm wird die EFS-Antwort in Neostigmin Atropin ( $1\mu M$ ) sensitiv (B). (\* markieren signifikante Unterschiede, p-Werte siehe Text).

Patienten; 10Hz:  $26,9 \pm 5,6 \mu A/cm^2$  vs.  $30,2 \pm 6,7 \mu A/cm^2$  n=7 Patienten; 50Hz:  $35,7 \pm 5,0 \mu A/cm^2$  vs.  $36,3 \pm 4,3 \mu A/cm^2$  n= 5 Patienten). Die Sekretion war bei allen Stimulationsfrequenzen TTX sensitiv und damit nerval vermittelt (n=2, Daten nicht dargestellt).

Neostigmin ist ein Cholinesterasehemmer und verzögert den Abbau von Acetylcholin. Die Zugabe von Neostigmin führte in Dünndarmpräparaten zu einem Anstieg der Basislinie um  $27,8 \pm 12,1\mu A/cm^2$  (n=6 Patienten). Im Dickdarm hingegen war der Einfluss von Neostigmin auf die Basislinie mit einem durchschnittlichen Anstieg von  $3,8 \pm 2,1\mu A/cm^2$  (n=10Patienten, p= 0,039 t-Test) signifikant geringer (Abbildung 26A). Dies lässt den Schluss zu, dass die basale Ausschüttung von Acetylcholin im Dünndarm höher ist als im Dickdarm.

In 7 Darmpräparaten des Kolons wurde nach der 1. Kontrollstimulation Neostigmin ( $1\mu M$ ) serosal appliziert und erneut stimuliert. Danach wurde mit Atropin ( $1\mu M$ ) der muskarinerge Rezeptor blockiert und eine 3. Stimulation durchgeführt. Die EFS-Antworten der Dickdarmpräparate waren in Neostigmin im Vergleich zur Kontrollstimulation von  $36,9 \pm 5,8\mu A/cm^2$  auf  $57,7 \pm 14,2\mu A/cm^2$  erhöht. Die EFS-Antworten in Neostigmin und Atropin waren im Vergleich zur EFS in Neostigmin

signifikant um etwa 50% auf  $27,7 \pm 8,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  reduziert ( $p=0,009$  gepaarter t-Test) (Abbildung 26B).

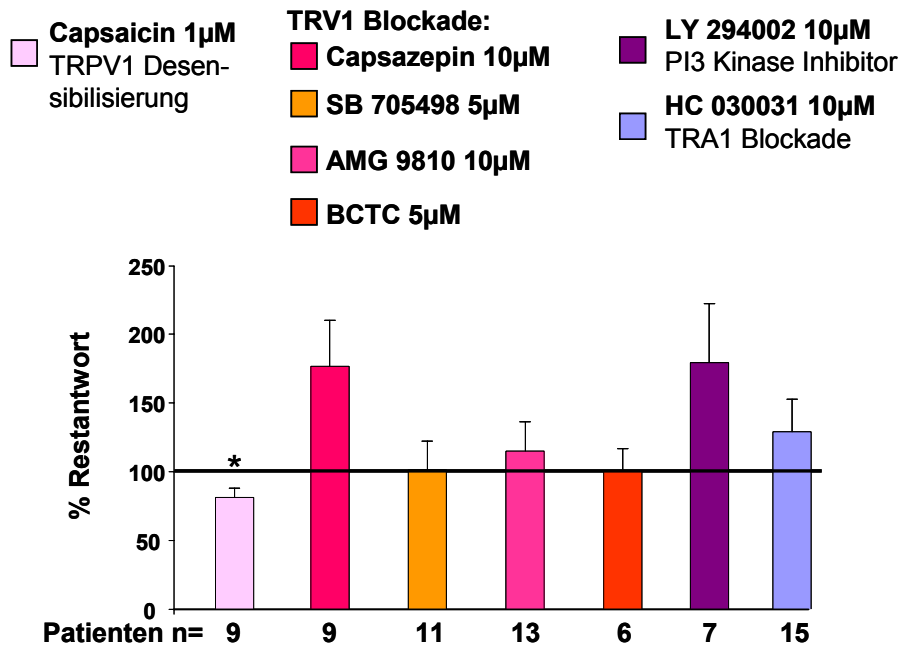
Die Studien zur Identifizierung der cholinergen Komponente legen den Schluss nahe, dass im Dickdarmpräparat die EFS induzierte Ausschüttung von Acetylcholin geringer ist als in Dünndarmpräparaten.

### **Beteiligung der TRP Kanäle an der neural stimulierten Sekretion**

Extrinsische viszerale Afferenzen der Darm-Hirn-Achse können modulierend auf die Sekretion des Darmes wirken (Weber et al., 2001). Auf den extrinsischen Afferenzen werden verschiedene TRP Kanäle, insbesondere TRPV1 und TRPA1 exprimiert (Blackshaw et al., 2010). Die Präparate von Dün- und Dickdarm wurden mit  $1 \mu\text{M}$  Capsaicin desensibilisiert oder mit den TRPV1-Blockern Capsazepin ( $10 \mu\text{M}$  serosal), SB 705498 ( $5 \mu\text{M}$ , serosal), AMG 9810 ( $10 \mu\text{M}$ , serosal) oder BCTC ( $1 \mu\text{M}$ , serosal), dem Phosphatidylinositol 3 (PI3)Kinase Inhibitor Ly294003 ( $10 \mu\text{M}$ , serosal) bzw. dem TRPA1 Kanalblocker HC 030031 ( $10 \mu\text{M}$ , serosal) inkubiert. Durch die Capsaicin induzierte Desensibilisierung war die EFS-Antwort von  $32,7 \pm 5,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf  $26,5 \pm 4,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  reduziert ( $n=9$  Patienten,  $p=0,013$  gepaarter t-Test). Weder die TRPV1 Kanalblocker, der PI3 Inhibitor, noch der TRPA1 Kanalblocker hatten einen Einfluss auf die EFS-Antwort (Capsazepin:  $21,4 \pm 5,6$  vs.  $29,8 \pm 4,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$   $n=9$  Patienten; SB 705498:  $38,8 \pm 8,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $37,2 \pm 14,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$   $n=11$  Patienten, AMG 9810:  $29,6 \pm 9,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $31,5 \pm 7,15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$   $n=13$  Patienten; BCTC:  $26,8 \pm 3,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $29,3 \pm 4,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$   $n=6$  Patienten; Ly294002:  $33,5 \pm 4,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $21,5 \pm 3,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$   $n=7$  Patienten; HC030031:  $41,4 \pm 5,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs.  $38,4 \pm 7,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$   $n=16$  Patienten). Auf den ersten Blick erscheint es widersprüchlich, dass Capsaicin Desensibilisierung, nicht aber TRPV1 Antagonisten, die elektrisch induzierte Sekretion verringern. Elektrische Stimulation aktiviert alle Nerven in dem Darmpräparat, enterische wie extrinsische Nervenfasern. Die Capsaicinbehandlung der Gewebe führt zu einer vollständigen Desensibilisierung der extrinsischen Afferenzen. Dies zeigt sich in dem Ausbleiben einer Capsaicin Antwort nach Capsaicinbehandlung des Gewebes (Daten nicht gezeigt). Die Ausschüttung der Transmitter an den peripheren Endungen der extrinsischen Afferenzen ist nach Capsaicin Desensibilisierung nicht mehr möglich. Die Behandlung der Gewebe mit den TRPV1 Blockern verändert jedoch weder die elektrischen noch die synaptische Integrität der extrinsischen Afferenzen. Die TRPV1 Blocker würden nur die Aktivierung der TRPV1 Kanäle durch ihre endogenen Liganden



verhindern. Elektrische Stimulation führt demnach nicht zur Freisetzung der TRPV1 aktivierenden endogenen Liganden.



**Abbildung 27:** Extrinsische viszerale Afferenzen sind an der Vermittlung der EFS-Antwort nicht beteiligt. Durch Capsaicin-induzierte Desensibilisierung der Afferenzen wird die EFS-Antwort im Dickdarm signifikant reduziert. Spezifische TRPV1 Blocker Capsazepin, SB 705498, AMG 9810 und BCTC haben ebenso wie der PI3Kinase Inhibitor und der TRPA1 Blocker HC 030031 keinen Einfluss auf die EFS-Antwort (\* markieren signifikante Unterschiede, p-Werte siehe Text).

## **Einfluss der verwendeten Blocker und Inhibitoren auf die basale Sekretionsleistung**

Während dieser Versuchsreihe wurde ermittelt, ob die verwendeten Substanzen den basalen Ionentransport des Epithels beeinflussen. Der basale Kurzschluss-Strom zeigte einen Abfall nach Zugabe des Nervenblockers TTX, des Blockers des NKCC1 Cotransporters Bumetanid, des Adenylatzyklasehemmers MDL 12330A und des Zyklooxygenaseinhibitors Piroxicam in den untersuchten Dickdarmpräparaten. (Tabelle 4). Der ENaC-Blocker Amilorid reduzierte den basalen  $I_{sc}$  im Dickdarm, im Dünndarm hatte die Blockade des Natriumkanals keine Auswirkung auf den basalen Ionentransport. Der basale Kurzschluss-Strom blieb unverändert nach Zugabe von Atropin (muskarinergem Rezeptorantagonist), PG 97-269 ( $VIP_1$ -Antagonist) und Hexamethonium (nikotinerger Rezeptorantagonist). Eine Blockade der Neurokinin-Rezeptoren, der  $P_2$ -Rezeptoren, und der Adenosinrezeptoren hatte ebenfalls keine Auswirkung auf den basalen Kurzschlussstrom. TRPV1 bzw. TRPA1 Blocker hatten keinen Einfluss auf den basalen

## Ergebnisse

epithelialen Ionentransport. Der PI3Kinase Inhibitor Ly 294002 führte zu einem signifikanten Abfall der Basislinie.

**Tabelle 4:** Änderung des basalen Tonus durch die verwendeten Substanzen:

Behandlung mit	Patienten	Gewebe	Änderung basaler $I_{sc}$ vor Zugabe ( $\mu A/cm^2$ )	Änderung basaler $I_{sc}$ nach Zugabe ( $\mu A/cm^2$ )
<b>TTX</b> 0,5 $\mu$ M	10	Dickdarm	-1,9 $\pm$ 1,1	-6,8 $\pm$ 1,5*
<b>Bumetanid</b> 100 $\mu$ M	8	Dickdarm	-0,4 $\pm$ 0,7	-19,2 $\pm$ 6,8*
<b>Amilorid</b> 10 $\mu$ M	9	Dickdarm	-3,6 $\pm$ 1,9	-27,6 $\pm$ 9,4 #
<b>Amilorid</b> 10 $\mu$ M	6	Dünndarm	0,2 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,6
<b>MDL 123330</b> 20 $\mu$ M	7	Dickdarm	-1,5 $\pm$ 2,3	-9,2 $\pm$ 2,3*
<b>Piroxicam</b> 10 $\mu$ M	9	Dickdarm	-1,5 $\pm$ 0,8	-5,3 $\pm$ 1,7*
<b>Atropin</b> 1 $\mu$ M	13	Dickdarm	-0,1 $\pm$ 1,7	-3,0 $\pm$ 1,2
<b>Atropin</b> 1 $\mu$ M	9	Dünndarm	-0,1 $\pm$ 0,6	-0,7 $\pm$ 0,4
<b>PG97-269</b> 25 $\mu$ M	7	Dickdarm	-2,1 $\pm$ 0,7	-3,7 $\pm$ 0,9
<b>Hexamethonium</b> 200 $\mu$ M	6	Dickdarm	-1,6 $\pm$ 1,3	-1,0 $\pm$ 0,6
<b>SR143330</b> 1 $\mu$ M	5	Dickdarm	-1,3 $\pm$ 3,8	-1,8 $\pm$ 4,7
<b>SR4896C</b> 1 $\mu$ M	5	Dickdarm	-0,5 $\pm$ 0,3	-0,3 $\pm$ 0,7
<b>SR142801</b> 1 $\mu$ M	4	Dickdarm	-3,8 $\pm$ 2,5	0,8 $\pm$ 0,8
<b>PPADS</b> 50 $\mu$ M	5	Dünn/Dickdarm	-0,9 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,5
<b>Suramin</b> 100 $\mu$ M	5	Dünn/Dickdarm	-1,8 $\pm$ 1,17	-1,1 $\pm$ 1,2
<b>DCPCX</b> 1 $\mu$ M	2	Dickdarm	-2,3 $\pm$ 0,3	-1,9 $\pm$ 0,3
<b>DMPX</b> 10 $\mu$ M	6	Dünn/Dickdarm	-2,3 $\pm$ 1,1	-0,1 $\pm$ 1,5 +
<b>Alloxazin</b> 1 $\mu$ M	5	Dünn/Dickdarm	-1,9 $\pm$ 0,9	-1,9 $\pm$ 1,2
<b>Capsazepin</b> 10 $\mu$ M	7	Dickdarm	0,2 $\pm$ 0,7	-2,0 $\pm$ 1,1
<b>SB 754098</b> 5 $\mu$ M	8	Dünn/Dickdarm	1,4 $\pm$ 2,1	-0,3 $\pm$ 0,7
<b>AMG9810</b> 10 $\mu$ M	7	Dünn/Dickdarm	-0,3 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 1,1
<b>BCTC</b> 1 $\mu$ M	8	Dünn/Dickdarm	-0,4 $\pm$ 0,9	-0,1 $\pm$ 0,9
<b>LY 294002</b> 10 $\mu$ M	7	Dünn/Dickdarm	-2,0 $\pm$ 0,9	-3,7 $\pm$ 0,7*
<b>HC 030031</b> 10 $\mu$ M	8	Dünn/Dickdarm	1,5 $\pm$ 1,4	1,0 $\pm$ 0,7

\*gepaarter t-Test  $p < 0,05$ ; # Wilcoxon-Rangsummen-Test  $p < 0,05$ ; + gepaarter t-Test  $p = 0,05$

### 3.1.7 Diskussion

In dieser Studie wurden erstmals grundlegende Eigenschaften neural vermittelter mukosaler Antworten und basaler Gewebswiderstände in einer großen Anzahl von humanen Darmpräparaten erhoben. Es zeigte sich, dass die verwendeten Techniken und die Ussingkammer Methode zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Die neural stimulierten Epithelantworten mittels elektrischer Feldstimulation und der basale Gewebswiderstand waren unabhängig vom Alter, Geschlecht und Erkrankung. Der basale Gewebswiderstand war im Dünndarm geringer als im Dickdarm. In den einzelnen Regionen von Dün- bzw. Dickdarm waren die EFS-Antworten und der basale Gewebswiderstand vergleichbar. Die EFS-Antworten wurden durch Transmitter des enterischen Nervensystems vermittelt; für eine Beteiligung extrinsischer Nerven (Darm-Hirn-Achse) gab es keine Hinweise. Es zeigte sich, dass im Dün- und Dickdarm unterschiedliche pro-sekretorische Transmitter ausgeschüttet werden. Im Dünndarm konnte eine starke cholinerge Komponente nachgewiesen werden, während im Dickdarm Acetylcholin eine untergeordnete Rolle spielte. Im Dickdarm schien dafür VIP der primäre pro-sekretorische Transmitter zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass der basale epitheliale Ionentransport unter neuronaler Kontrolle steht, dass aber Acetylcholin bei der Regulation des basalen epithelialen Ionentransports nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Die elektrische Feldstimulation ermöglicht eine Depolarisation aller Nerven in den Darmpräparaten, wodurch Transmitter ausgeschüttet werden, die an der Regulation des Ionentransports des Darmepithels beteiligt sind. Es gibt zahlreiche Untersuchungen über die neural vermittelten Epithelantworten am Meerschweinchen (Cooke et al., 2006; Xue et al., 2007), über neural vermittelte Epithelantworten im Humandarm liegen jedoch nur wenige Daten vor. In den 80er Jahren beschäftigten sich einige Untersuchungen mit den EFS induzierten Mechanismen im Humandarm mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen (Hubel et al., 1982; Hubel et al., 1987; Kuwahara et al., 1989).

*In vitro* Techniken mit humanen Resektaten ermöglichen Untersuchungen physiologischer Prozesse, die anders mit humanen Geweben nicht möglich wären. Klassische unbehandelte Kontrollgewebe, wie man sie aus Tierexperimenten oder Versuchen mit Zelllinien kennt, gibt es bei Studien mit humanen Geweben nicht. Die Gewebe wurden aufgrund einer Erkrankung operativ entfernt, eine Beeinträchtigung physiologischer Prozesse durch diese Erkrankungen ist daher nicht auszuschließen. Da aber ausschließlich makroskopisch unauffällige Gewebe für diese Untersuchungen verwendet wurden, konnte dieses Risiko

minimiert werden. Speziesabhängige Aktivierung von pro- oder anti-sekretorischen Signalkaskaden machen die Extrapolation der im Tierexperiment gewonnen Erkenntnisse auf den Mensch nicht ohne weiteres möglich. Auch Ergebnisse von humanen Epithelzelllinien sind nicht repräsentativ für Epithelantworten in nativem humanem Gewebe, da in den Zelllinien funktionell wichtige nervale Regulationsmechanismen fehlen. Die *in vitro* Untersuchung von humanen Resektaten ist daher wesentliche Grundlage für das Verständnis physiologischer Zusammenhänge und die Identifizierung neuer Targets zur Behandlung von Darmstörungen.

Die Integrität der epithelialen Barriere und Zellmembran bleibt bei Messungen von nativen Humanpräparaten in der Ussingkammer erhalten (Soderholm et al., 1998). Für pharmakologische Untersuchungen ist die Reproduzierbarkeit von nerval vermittelten Antworten von entscheidender Bedeutung. Wir konnten anhand einer Vielzahl von Präparaten aus den unterschiedlichsten Regionen des humanen Darms erstmals zeigen, dass die elektrische Feldstimulation zuverlässige *in vitro* Messungen bei Resektaten ermöglicht. Eine Stimulusstärke von 20V lieferte Antworten, die nahezu vollständig durch das Nervengift TTX blockierbar waren. Im Gegensatz zu Kuwahara et al., die bereits bei 20 V eine maximale Antwort beobachteten (Kuwahara et al., 1989), nahm die Amplitude der EFS in der vorliegenden Arbeit bis zu einer Stimulationsstärke von 80V stetig zu. Allerdings wurde mit höheren Voltzahlen auch nicht neuronales Gewebe stimuliert, da die TTX-Sensitivität mit steigender Voltzahl abnahm.

Erstmalig wurden nerval stimulierte Sekretionantworten und der basale Gewebswiderstand von einer sehr großen Anzahl von Humanpräparaten in Zusammenhang mit Darmregion, dem Alter, der Erkrankung und des Geschlechts gesetzt. Die gemessenen basalen Gewebswiderstände entsprechen den in der Literatur berichteten Werten (Hubel et al., 1982; Hubel et al., 1987; Kuwahara et al., 1989). Wie erwartet war der Gewebswiderstand im Dünndarm geringer als im Dickdarm, innerhalb der einzelnen Regionen im Dünn- bzw. Dickdarm konnten, trotz der großen Anzahl an untersuchten Präparaten, jedoch keine Unterschiede gefunden werden. Die Amplitude der EFS-Antworten war in Dünn- und Dickdarm vergleichbar. Die uns zur Verfügung stehenden Gewebepräparate stammten von Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 67 Jahren. Durch strukturelle und funktionelle Veränderungen nimmt im Alter die Prävalenz von Krankheiten zu. Auch im Darm treten altersbedingte Veränderungen auf, wie z.B. eine Änderung der Aufnahme von Nährstoffen (Meier et al., 2009) oder Obstipation (Gallagher et al., 2009). Insgesamt

scheint die sekretorische Leistung der isolierten Darmpräparate aber „altersresistent“ zu sein. Wir konnten bei den untersuchten Parametern keinen Einfluss des Alters feststellen. Dieses Ergebnis, dass auf der Auswertung von über 1000 Gewebepräparaten stammt, widerlegt damit die eher anekdotischen Berichte über altersbedingte Veränderungen der nerval induzierten Reflexe. Die Morphometrie im Darm des Menschen scheint sich im Alter nicht zu ändern (Lipski et al., 1992). Einige Untersuchungen berichten von verminderter Motilität, dies könnte sicherlich auf einen Verlust ChAT positiver Neurone im myenterischen Plexus zurückzuführen sein (Bernard et al., 2009). Im submukösen Plexus konnte kein Verlust an ChAT positiven Neuronen festgestellt werden (Bernard et al., 2009). Dieser Befund unterstreicht unsere Schlussfolgerung, dass die nerval induzierte Sekretionsleistung in isolierten Humandarmpräparaten mit zunehmendem Alter der Patienten nicht beeinträchtigt war.

Verschiedene Krankheiten scheinen bei Frauen häufiger aufzutreten, so z.B. Reizdarm (IBS) oder Obstipation (McCrea et al., 2009; Payne, 2004). Der basale Widerstand des Darms und die EFS-Antworten waren bei unseren untersuchten Resektaten bei Männer und Frauen gleich. Damit kann man, zumindest was die nerval induzierte sekretorische Leistung des Darms angeht, geschlechtsspezifisch auftretende sekretorische Fehlfunktionen nicht erklären.

Die von uns untersuchten Gewebe waren makroskopisch unauffällig. Die der Darmresektion zugrunde liegenden Krankheitsbilder hatten keinen Einfluss auf die sekretorische Leistung des Darms. In den drei häufigsten Kategorien maligne Tumore, Divertikulitis und Polypen unterschieden sich die Parameter für Sekretion und Gewebewiderstand nicht. Dies stimmt mit Befunden überein, dass der epitheliale Ionentransport bei Patienten mit Divertikulitis ebenso wenig wie die Gewebswiderstände verändert waren (Osbaek et al., 2007). Daraus kann allerdings nicht geschlossen werden, dass die pathologisch auffälligen Segmente vergleichbare Sekretionsleistung oder Gewebswiderstand gezeigt hätten.

## **Pharmakologische Untersuchungen**

Der basale Ionentransport scheint unter nervalem Einfluss zu stehen, da ein Abfall der Basislinie nach TTX Zugabe zu beobachten war. In vielen anderen Spezies konnte dieser Abfall ebenfalls beobachtet werden (Hirota et al., 2006). Für den humanen Dickdarm liegen widersprüchliche Ergebnisse zu der TTX Sensitivität des basalen Kurschlussstromes vor (Hubel et al., 1987; Keely et al., 1995; Kuwahara et al., 1989). Wir konnten keine

## Ergebnisse

Abhängigkeit der TTX Sensitivität von der Dickdarmregion feststellen, allerdings müssten hier größere n-Zahlen untersucht werden, um eventuell vorhandene geringe Unterschiede feststellen zu können.

Die EFS-Antwort wurde durch eine Sekretion von Chloridionen verursacht, da in chloridfreier Lösung die Antworten sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm reduziert waren. Kuwahara et al zeigten, dass bei nervaler Stimulation der ins Lumen gerichtete Chloridstrom zu nimmt (Kuwahara et al., 1989). Für eine starke Chloridkomponente der EFS-Antwort spricht auch die Reduktion in dem Schleifendiuretikum Bumetanid. Durch Bumetanid wird der NKCC1 Cotransporter blockiert, wodurch weniger Chloridionen in die Zelle gelangen und demzufolge auch weniger Chloridionen die Epithelzelle verlassen können (Baird et al., 2008). Der Abfall der Basislinie nach Bumetanid zeigt, dass auch im unstimulierten Zustand Chloridionen kontinuierlich ins Lumen sezerniert werden. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Berichten überein, die im unstimulierten Zustand sowohl eine Chloridionenabsorption als auch -sekretion messen konnten (Kuwahara et al., 1989). Natriumabsorption spielt im Dickdarm im unstimulierten Zustand eine wichtige Rolle (Keely et al., 1995; Kuwahara et al., 1989). Dies zeigte sich auch in unseren Versuchen, da durch Amilorid die Basislinie in Dickdarmpräparaten stark abfiel. An der nerval induzierten Antwort scheinen Natriumionen im Dickdarm eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Auch bei Kuwahara et al. änderten sich die gemessenen luminalen oder serosalen Natriumströme im Dickdarm nach elektrischer Stimulation kaum (Kuwahara et al., 1989). Wir konnten im Dünndarm eine signifikante Zunahme der EFS-Antwort nach Amilorid feststellen. Welche Mechanismen hierfür verantwortlich sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Prostaglandine scheinen bei der nerval induzierten Sekretion beim Menschen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Der basale Ionentransport scheint jedoch unter der Kontrolle von Prostaglandinen zu stehen, da durch Piroxicam ein Abfall der Basislinie zu beobachten war. Die Abnahme war jedoch nicht so stark wie in der Literatur berichtet (Keely *et al.*, 1995). Der Einfluss von Prostaglandinen auf den basalen Ionentransport konnte auch bei der Ratte gezeigt werden (Mosa et al., 2008).

Die nerval induzierte Sekretion und der basale Ionentransport, wird im Darm über Aktivierung der Adenylatzyklase vermittelt, da nach Behandlung MDL 123330A die Basislinie abfiel und in die EFS Antwort stark inhibiert wurde. cAMP ist nicht nur in der Epithelzelle (Greger, 2000), sondern auch in enterischen Nervenzellen ein second

messenger (Nemeth et al., 1986), so dass hier eine Addition des inhibitorischen Effekts zu vermuten ist. In der Epithelzelle konnte gezeigt werden, dass die cholinerg stimulierte Ionensekretion im humanen Dickdarm auch eine Koaktivierung durch cAMP benötigt (Mall et al., 1998). Ob die sich cAMP abhängige Komponente zwischen den Darmregionen, in denen die nerval induzierte Sekretion primär über cholinerge oder nicht-cholinerge Transmitter vermittelt wird, quantitativ unterscheidet, muss noch untersucht werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass im humanen Ileum durch Zugabe von Acetylcholin der cAMP-Spiegel nicht verändert wird (Isaacs et al., 1976).

Die Atropinsensitivität der nerval induzierten Sekretion war regionenabhängig. Im Dünndarm scheint, mit Ausnahme vom Jejunum, die cholinerge Komponente zu dominieren, während im Dickdarm die nicht-cholinerge Komponente überwog. Die Atropinsensitivität im humanen Darm wird in der Literatur kontrovers berichtet. Im Ileum konnte eine 70%ige Reduktion gezeigt werden (Hubel et al., 1982), im linken humanen Kolon war die Antwort durch Atropin kaum vermindert (Kuwahara et al., 1989) und im sigmoiden Kolon wurde die EFS-Antwort um etwa 50% verringert (Hubel et al., 1987). Bei unseren Untersuchungen konnten wir keine Unterschiede in der Atropinsensitivität in den einzelnen Regionen des Kolons feststellen. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von Ergebnissen im Meerschweinchen. Hier reduzierte Atropin in Dün- und Dickdarmpräparaten die nerval induzierte Sekretion um ca. 50% (Cooke HJ et al., 1983; Kuwahara et al., 1988). Die Blockade des VIP<sub>1</sub>-Rezeptors im humanen Dickdarm durch den selektiven Antagonisten PG97-269 (Banks et al., 2005) reduzierte die nerval induzierte Sekretion um etwa 50%. Daraus kann geschlossen werden, dass VIP im humanen Kolon der primäre Transmitter der nicht-cholinergen Komponente ist. Außer Acetylcholin und VIP müssen aber noch weitere pro-sekretorische Signalmoleküle an der nerval stimulierten Antwort beteiligt sein, da in Atropin und PG97-269 keine totale Blockade der nerval induzierten Antwort auftrat. Welchen Anteil VIP an der prosekretorischen Antwort im Dünndarm hat, muss noch untersucht werden. Im Ileum konnte mit PG97-269 die Antwort der nerval stimulierten Sekretion um 64% reduziert werden, allerdings wurde hier mit nur 1 Hz stimuliert und die Anzahl der untersuchten Präparate war sehr gering (Banks et al., 2005).

Immunhistochemisch konnten wir ChAT-IR, VIP-IR und SP-IR Zellen im SMP des Dün- und Dickdarm nachweisen. Im Vergleich zum Dünndarm war die VIP-Expression im Dickdarm höher. Dieses Ergebnis stimmt mit dem funktionellen Befund der dominanten

nicht-cholinergen, VIP vermittelten Sekretionsantwort im Dickdarm überein. Zum anderen sind im humanen Dickdarm nach unseren Ergebnissen ChAT und VIP häufiger in Nervenzellen co-lokalisiert als im Ileum. Die Co-lokalisation von ChAT-IR und VIP-IR Zellen wurde auch für das humane Rektum gezeigt (Anlauf et al., 2003; Schneider et al., 2001). Regionale quantitative Unterschiede in der Expression konnten auch bei der Maus festgestellt werden. Im submukösen Plexus des Dickdarms der Maus sind 20% Chat-IR Zellen, im Dünndarm hingegen 40% ChAT-IR (Sang et al., 1998). Beim Schwein unterscheidet sich sogar die Anzahl der ChAT-IR Zellen zwischen äußerem und innerem SMP (85% versus 20%) (Hirota et al., 2006).

Acetylcholin bindet in unseren Präparaten an epitheliale muskarinerge und nervale nikotinerge Rezeptoren. Der muskarinerge Rezeptor ist ein metabotroper G-gekoppelter Rezeptor, der in 5 Subtypen  $m_1$ - $m_5$  vorkommt. Bindungsstudien und pharmakologische Studien weisen daraufhin, dass humane Epithelzellen hauptsächlich  $m_3$ -Rezeptoren und einen geringeren Anteil an  $m_1$ -Rezeptoren exprimieren (Reynolds et al., 2007).

Acetylcholin wird durch die Acetylcholinesterase (AChE) abgebaut. Der starke Anstieg der Basislinie im Dünndarm nach Neostigmin könnte daraufhinweisen, dass im unstimulierten Zustand im Dünndarm relativ mehr Acetylcholin vorhanden ist als im Dickdarm. Sine et al. zeigten, dass das humane Kolon die höchste AChE-Aktivität aufweist (Sine et al., 1991). Wenn im Dickdarm größere Mengen Ach ausgeschüttet werden und diese durch AChE schnell abgebaut werden, müsste Neostigmin einen größeren Einfluss auf die Basislinie im Dickdarm haben. Dies war allerdings nicht der Fall. In den einzelnen Regionen des Dickdarms scheint die AChE Aktivität ähnlich zu sein, allerdings konnte eine verminderte AChE Aktivität in Zusammenhang mit Kolorektalenkarzinomen festgestellt werden (Montenegro et al., 2006). Bei 80% der von uns mit Neostigmin untersuchten Resektaten handelte es sich um Kolorektalkarzinom. Wir konnten keinen Unterschied zu den Sigmadivertikulitis-Resektaten feststellen. Durch Hemmung der Acetylcholinesterase wird die nerval induzierte Sekretion im Dickdarm Atropin sensitiv, ein weiterer Hinweis darauf, dass  $m_3$ -Rezeptoren auch im Dickdarm funktionsfähig sind. Dies wird durch die Untersuchungen mit dem muskarinergen Agonisten Bethanechol zusätzlich belegt. Sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm konnte durch Bethanechol eine vergleichbare Sekretionsantwort induziert werden. Die Bethanechol induzierte Sekretionsantwort konnte durch Atropin fast vollständig blockiert werden. All diese Befunde sprechen für funktionsfähige muskarinerge Rezeptoren im



humanen Dickdarm, die sich auch nicht in ihrer Sensitivität von muskarinergen Rezeptoren im Dünndarm unterscheiden. Die ausgeprägte nicht-cholinerge Sekretion im Dickdarm konnte für alle Stimulationsfrequenzen zwischen 1-50Hz bestätigt werden; im Dünndarm waren die nerval induzierten Sekretionsantworten in allen Frequenzbereichen Atropin sensitiv. Höher frequente Stimuli begünstigen die Ausschüttung von Neuropeptiden. Falls im Dickdarm die Acetylcholin induzierte EFS-Antwort in den höheren Stimulifrequenzen durch Neuropeptidausschüttung überlagert wird, müsste die Atropinsensitivität in den niedrigeren Frequenzbereichen zunehmen. Dies wurde durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt. Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so scheint im humanen Dickdarm Acetylcholin in geringeren Mengen ausgeschüttet zu werden als im Dünndarm. Die physiologische Bedeutung dieser Befunde muss noch geklärt werden.

Hexamethonium führte bei anderen Spezies zu einem Abfall der basalen Sekretionsleistung (Hirota et al., 2006), nicht so im humanen Darm. Die nerval stimulierte Sekretion scheint hingegen zum Teil über nikotinerge Rezeptoren vermittelt zu werden. Dies spricht dafür, dass die elektrische Stimulation nicht nur enterische Sekretomotoneurone, sondern ebenfalls enterische Interneurone stimuliert. Interneurone aktivieren Sekretomotoneurone über nikotinerge Rezeptoren (Smith et al., 2007). Ein Einfluss präganglionärer parasympathischer Nervenfasern kann nicht ausgeschlossen werden, obwohl deren Dichte im Vergleich zu cholinergen enterischen Nervenfasern sehr gering ist.

Substanz P wirkt im humanen Darm als pro-sekretorischer Transmitter durch Aktivierung von NK1 und NK2 Rezeptoren (Tough et al., 2003). Sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm konnten immunhistochemisch SP-IR Zellen nachgewiesen werden. Substanz P scheint jedoch an der EFS-Antwort im humanen Darm nicht beteiligt zu sein, da eine Blockade der NK1, NK2 oder NK3 Rezeptoren keinen Einfluss auf die Antwort hatte.

Exzitatorische purinerge Rezeptoren ( $A_2$ , P2X und zum Teil P2Y) als auch inhibitorische purinerge Rezeptoren ( $A_1$  und P2Y<sub>12</sub>) sind Teil sekretorischer Reflexkreise (Christofi, 2008). Sie werden sowohl auf den Nerven als auch auf den Epithelzellen exprimiert (Christofi, 2008; Kunzelmann et al., 2001). Der basale Kurzschluss-Strom wurde weder durch P1 noch P2 Rezeptorblockade verändert. An der nerval induzierten Antwort scheint weder Adenosin noch ATP beteiligt zu sein, obwohl exogene Zugabe von ATP oder Adenosin im humanen Darm pro-sekretorische Wirkung haben (Christofi, 2008; Riegler et al., 2000). Bindet endogenes Adenosin an A1-Rezeptoren wirkt es inhibitorisch auf die sekretorische Aktivität des Darms. Eine Erhöhung der EFS Antwort nach Blockade von

## Ergebnisse

A1-Rezeptoren (Wunderlich et al., 2008) konnte in unseren Versuchen nicht festgestellt werden. Die Erhöhung der EFS-Antwort in dem A1-Rezeptorblocker wurde von dieser Arbeitsgruppe nur nach Stimulation mit 20 Hz und nicht nach 10 Hz festgestellt.

### **3.2 Serotonin aktiviert Neurone im humanen submukösen Plexus über 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren (Publikation: Appendix 1)**

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist eines der wichtigsten Gewebehormone und Neurotransmitter. Im Darm wird Serotonin von den Interneuronen des enterischen Nervensystems und den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut (Mukosa) ausgeschüttet. Mechanische, chemische oder auch elektrische Stimulation der Mukosa führen zur Ausschüttung von Serotonin (Cooke et al., 2006). 5-HT beeinflusst die Motilität (Bertrand et al., 2000) und die Sekretion des Darms (Cooke et al., 2006) und spielt eine entscheidende Rolle in den Reflexkreisen des enterischen Nervensystems (Hansen, 2003). Untersuchungen weisen daraufhin, dass Störungen im Serotonin-Metabolismus ein möglicher Faktor bei der Pathogenese von Magen-Darm-Erkrankungen sein könnten. Störungen der Motilität und der Sekretion sind Symptome, über die Reizdarmpatienten klagen (Drossman et al., 2002). Aus Untersuchungen im Tiermodell weiß man, dass dem 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor eine entscheidende Rolle für die Regulation der Sekretion und Motilität zukommt (Foxy-Orenstein et al., 1996). Ob 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren in den Reflexkreisen beim Menschen eine Rolle spielen ist unbekannt.

Mit der Neuroimaging Methode ist es möglich Membranpotentialänderung von Nervenzellen durch einen spannungssensitiven Farbstoff zu messen. Mit dieser Methode wurden 24 Präparate des submukösen Plexus von 21 Patienten (10 Männer, 11 Frauen; Durchschnittsalter 62 Jahre) untersucht. 33 der 50 untersuchten Ganglien zeigten eine exzitatorische Antwort nach der Applikation von 5-HT oder den selektiven 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoragonisten 2-Methyl-5-HT (Appendix1, Fig. 1D,E). Bei nicht spontan aktiven Zellen fand eine sofortige Entladung von Aktionspotentialen statt, bei spontan aktiven wurde die Frequenz der Aktionspotentiale erhöht. Die mittlere Frequenz der Aktionspotentiale betrug nach Applikation von 5-HT bzw. 2-Methyl-5-HT bei den nicht spontan aktiven Nervenzellen  $6,4 \pm 4,3$  Hz (11 Nervenzellen von 4 Patienten) bzw.  $4,3 \pm 2,4$  Hz (12 Neurone von 2 Patienten). Es reagierten ähnlich viele Zellen pro Ganglion auf die Applikation von 5-HT und 2-Methyl-5-HT (37% bzw. 32% 5 Patienten, 32 Ganglien, 197 Neurone). Es zeigten sich ebenfalls keine geschlechtsspezifischen oder regionenabhängigen Unterschiede nach der Applikation von Serotonin oder 2-Methyl-5-HT. Durch Tropicsetron, einem 5-HT<sub>3</sub> Rezeptorblocker, konnte die Serotonin induzierte Aktivierung in den meisten Nervenzellen vollständig geblockt werden. Bei einigen

## Ergebnisse

Nervenzellen ergab sich nur eine Reduzierung der Aktionspotentialfrequenz auf 40%. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die exzitatorische Wirkung von Serotonin im humanen SMP primär über 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren und nur zu einem geringen Teil über metabotrope 5-HT Rezeptoren vermittelt wird.

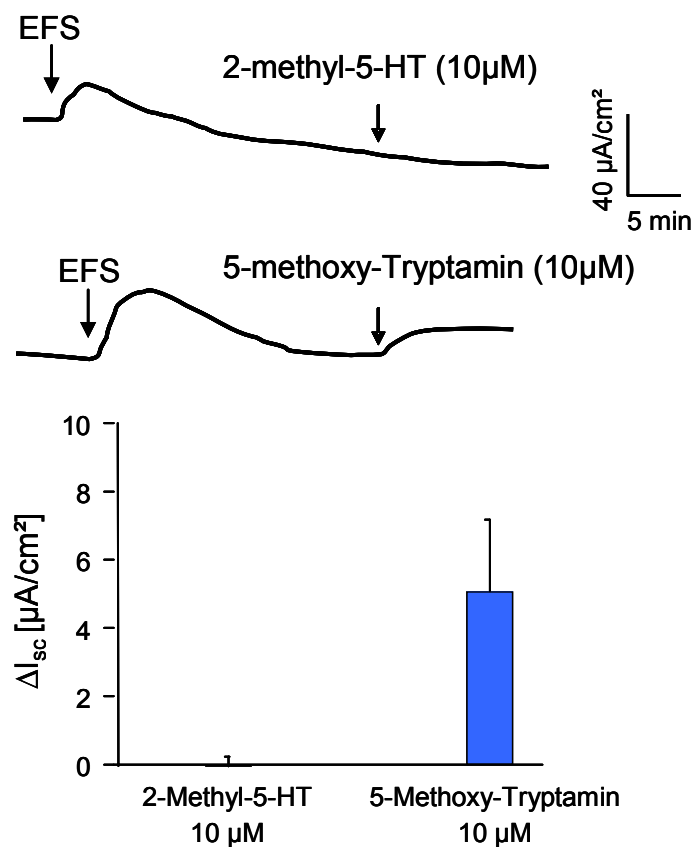
Zweifach-Färbungen mit anti-HuC/HuD als neuronalen Marker und MSD-3A und AP86/3 als spezifische Antikörper der 5-HT<sub>3A</sub> bzw. 5-HT<sub>3B</sub> Rezeptoruntereinheiten zeigten, dass die 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub> Untereinheiten immer gemeinsam exprimiert werden (Appendix 1, Fig. 3A-D). Dies lässt den Schluss zu, dass heteromere 5-HT<sub>3A/3B</sub> Untereinheiten im humanen SMP exprimiert werden. Zusätzlich konnte die Expression der 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub> Untereinheiten durch reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion in Präparaten von Muskel/myenterischen Plexus, Mukosa und Submukosa/Mukosa nachgewiesen werden (Appendix 1, Fig. 4).

Obwohl nahezu alle Neurone des SMP 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub> positiv waren, wurde etwa nur ein Drittel der Neuronen durch 5-HT bzw. den Agonisten erregt. Dies lässt sich zum einen methodisch erklären, da mit der Neuroimaging Methode nur Antworten gemessen werden können, die zu Aktionspotentialen führen. Unterschwellige Aktivierungen durch 5-HT, wie sie durch intrazelluläre Ableitungen in enterischen Nerven beim Meerschweinchen bereits nachgewiesen wurden, können nicht detektiert werden (Michel et al., 1997). Zum anderen lässt der immunhistochemische Nachweis keine Schlussfolgerung über die Funktionsfähigkeit der Rezeptoren zu. So konnten auf einer bestimmten Neuronengruppe im enterischen Nervensystem des Meerschweinchen nikotinerge Rezeptoren nachgewiesen werden, von denen die Mehrheit nicht auf Nikotin reagierte (Kirchgessner et al., 1998; Neunlist et al., 1999; Nurgali et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass sich homomere 5-HT<sub>3A</sub> und heteromere 5-HT<sub>3A/B</sub> Rezeptoren sowohl in ihren biophysikalischen als auch biochemischen Eigenschaften unterscheiden (Brady et al., 2001). Die Expression beider Untereinheiten auf den Neuronen lässt jedoch keinen Rückschluss auf die quantitative Verteilung von homomeren oder heteromeren 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren zu.

Der Einfluss von 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren auf sekretorische Reflexkreise im humanen Darm wurde mit der Ussingkammer Voltage Clamp Methode gemessen. Untersucht wurden 27 Mukosa/Submukosa Präparate von 11 Patienten (7 Männer, 4 Frauen). Die Vitalität des Gewebes wurde mit elektrischer Feldstimulationen (EFS) vor der Zugabe bestimmt. Die serosale Zugabe von 2-Methyl-5-HT (10µM, serosal) hatte keinen Einfluss auf den basalen Kurzschluss-Strom (n=4 Patienten). Die nerval induzierte Sekretion wurde

## Ergebnisse

ebenfalls nicht durch 2-Methyl-5-HT beeinflusst (Appendix1, Fig.2A). Im Gegensatz dazu führte die serosale Zugabe von 2-Methyl-5HT in Mukosa/Submukosa Präparaten vom proximalen Colon des Meerschweinchens zu einer massiven Zunahme des Kurzschlussstromes. Ein Einfluss von 2-Methyl-5-HT auf die neural stimulierte Sekretion wurde auch im Meerschweinchenkolon nicht beobachtet (Appendix1, Fig.2B). Bei weiteren 18 Präparaten von 7 Patienten wurde nach der Gabe des 5-HT<sub>3</sub> Agonisten der nikotinergen Rezeptoragonist DMPP appliziert, um nachzuweisen, dass die Präparate prinzipiell auf Aktivierung ionotroper Rezeptoren reagieren. In allen untersuchten Geweben führte DMPP zu einer massiven Sekretionssteigerung (Appendix1, Fig.2C).



**Abbildung 28:** Serotonin führt zu einer erhöhten Sekretion durch Aktivierung von 5-HT<sub>4</sub>, nicht aber 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren. Der 5HT<sub>4</sub> Rezeptoragonist 5-Methoxy-tryptamin jedoch nicht der 5HT<sub>3</sub> Rezeptoragonist 2-Methyl-5HT führt zu einem signifikanten Anstieg der Sekretion (serosale Applikation). Durch 5-Methoxytryptamin wurde der I<sub>sc</sub> um  $4,5 \pm 1,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  erhöht (n=9 Patienten, p=0,021 gepaarter t-Test). 2-Methyl-5-HT führte zu keiner Veränderung des I<sub>sc</sub> ( $-0,1 \pm 0,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , n=11 Patienten).

Entgegen der in vielen Übersichtsarbeiten vertretenen Vorstellung wird die Serotonin induzierte Sekretionserhöhung im humanen Darm nicht über 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren vermittelt. Dies zeigt wiederum die Spezies-Problematik, da in diesen Übersichtsarbeiten Ergebnisse

## Ergebnisse

im Meerschweinchenkolon auf das Humankolon übertragen wurden. Die Beteiligung von 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren wurde mit dem selektiven 5HT<sub>4</sub>-Rezeptoragonist 5-Methoxy-Tryptamin untersucht (9 Patienten, mittleres Alter 72 Jahre, 4 Männer und 5 Frauen). Der 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoragonist führte in 12 der 15 Mukosa/Submukosa Präparaten zu einer signifikanten Erhöhung des Kurzschluss-Stromes (Abbildung 28).

Der Befund, dass der 5HT<sub>3</sub> Agonist 2-Methyl-5-HT im Humankolon keine Änderung des basalen Kurzschluss-Stromes bewirkte, jedoch der 5HT<sub>4</sub>-Rezeptoragonist, stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein (Kellum et al., 1999). Im Gegensatz hierzu sind 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren bei Meerschweinchen und Ratte prominent an der Chloridsekretion beteiligt, denn bei diesen Spezies führte 2-Methyl-5-HT zu einer starken Erhöhung der Sekretion (Budhoo et al., 1996; Hendriks et al., 1989; Stoner et al., 2000)

Wir konnten zeigen, dass 5HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf den Neuronen des humanen submukösen Plexus exprimiert werden und an der exzitatorischen Antwort auf Serotonin beteiligt sind. Allerdings scheinen die Serotonin induzierten Sekretionsantworten nicht über 5HT<sub>3</sub> Rezeptoren vermittelt zu werden, da der 5-HT<sub>3</sub>-Agonist 2-Methyl-5-HT keine Änderung der Sekretion bewirkte. Das funktionelle Korrelat der ausgeprägten exzitatorischen Wirkung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf SMP Nervenzellen bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

### **3.3 Das pflanzliche Kombinationspräparat STW5 (Iberogast®) hat im humanen Darm eine pro-sekretorische Wirkung (Publikation: Appendix 2)**

STW5 (hydroethanolisches Extrakt des Phytopharmakons Iberogast®) ist eine fixe Kombination aus pflanzlichen Extrakten. Hauptkomponente ist der alkoholische Frischpflanzenauszug der Bitteren Schleifenblume (*Iberis amara*) und acht Extrakte aus Angelikawurzel (*Angelicae radix*), Kamillenblüte (*Matricariae flos*), Kümmelfrüchte (*Carvi fructus*), Mariendistel Früchte (*Cardui mariae fructus*), Melissenblätter (*Melissae folium*), Pfefferminzblätter (*Menthae piperitae folium*), Schöllkraut (*Chelidonii herba*) und Süßhorzwurzel (*Liquiritiae radix*). Iberogast weist ein weites Wirkspektrum auf. Das pflanzliche Kombinationspräparat beeinflusst die Magenmotilität (Hohenester et al., 2004) und weist anti-inflammatorische (Khayyal et al., 2006) und antioxidative (Germann et al., 2006) Eigenschaften auf. Dieses weite Wirkspektrum ist vermutlich auf eine synergistische Wirkung der Einzelextrakte zurückzuführen (Wegener et al., 2006). Mehrere klinische Studien belegen gute Ergebnisse bei der Behandlung von Reizmagenpatienten (funktionelle Dyspepsie) (Melzer et al., 2004; von Arnim et al., 2007). Eine symptomatische Verbesserung konnte auch bei Reizdarmpatienten festgestellt werden (Madisch et al., 2004). Die Wirkung und Wirkmechanismen von Iberogast im humanen Darm insbesondere auf die Sekretion sind bisher unbekannt.

Das Reizdarmsyndrom (engl.: irritable bowel syndrome, IBS) ist eine multifaktorielle, chronische Erkrankung des Darmtraktes, gekennzeichnet durch Völlegefühl, Schmerzen, Blähungen und Stuhlnunregelmäßigkeiten. Es gibt Patienten bei denen Obstipation dominiert, bei anderen überwiegt die Durchfallsymptomatik, bei einer dritten Gruppe treten Obstipation und Durchfall alternierend auf (Drossman et al., 2002). Die genaue Ursache der Erkrankung ist nicht bekannt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass bei dieser Erkrankung viszerale Hypersensitivität (Azpiroz et al., 2007), postinfektiöse Adaptationsvorgänge (Spiller et al., 2006), mikroskopische Veränderungen in der Darmwand (Liu et al., 2006), Entzündungen der Mukosa (Spiller, 2004) oder auch eine gestörte intestinale Barriere (Piche et al., 2009) eine Rolle spielen könnten. Unabhängig von den zugrunde liegenden Pathomechanismen zeigen die Patienten motorische und sekretorische Funktionsstörungen.

## Ergebnisse

Mit der Ussingkammer Voltage Clamp Methode wurde der Effekt von STW5 auf 317 Mukosa/Submukosa Präparate von 79 Patienten (mittleres Alter  $69 \pm 13$  Jahre) untersucht. Sekretionsuntersuchungen wurden auch an der Epithelzelllinie T84 durchgeführt. Sowohl in den Mukosa/Submukosa Präparaten als auch in der Zelllinie führte die serosale Applikation von STW5 zu einer konzentrationsabhängigen Sekretionssteigerung (Appendix2, Fig1). Die durch mukosale Zugabe induzierte Sekretionssteigerung zeigte ebenfalls eine dosisabhängige Wirkung, diese war jedoch im Vergleich zur serosalen Gabe sowohl bei den Humanpräparaten als auch in der Epithelzelllinie geringer.

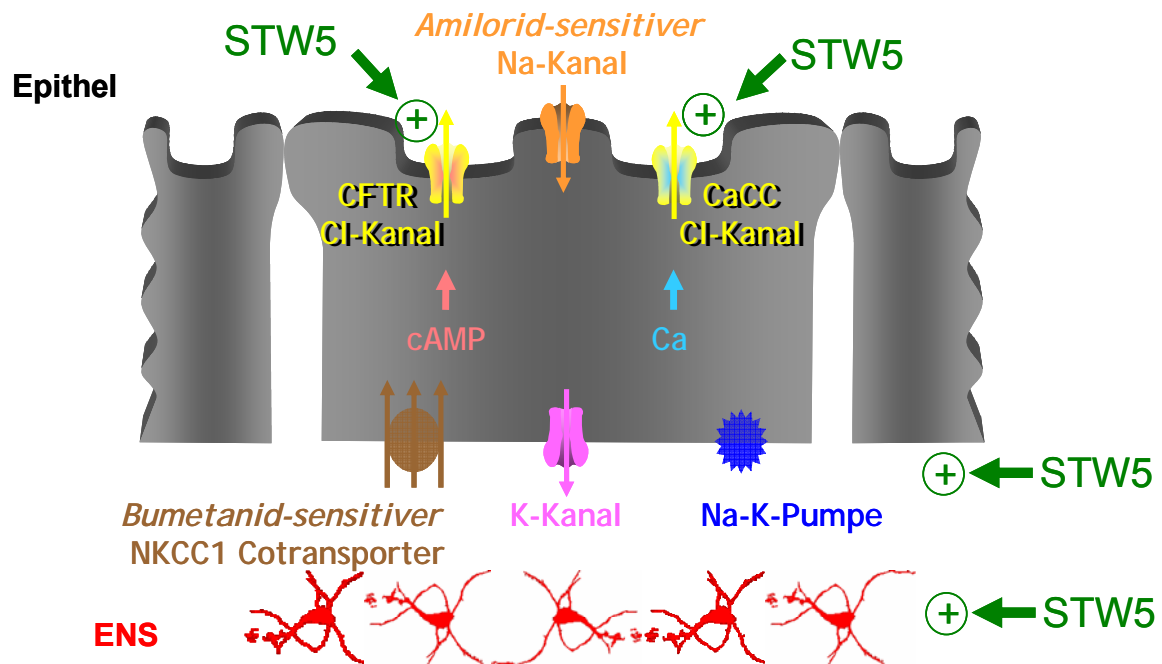
Für die pharmakologischen Untersuchungen wurde STW5 sowohl bei den Humanpräparaten als auch bei der Zelllinie in einer Konzentration von  $512 \mu\text{g/ml}$  serosal appliziert. Bei den Humanpräparaten und in den T84 Zellen induzierte STW5 eine Steigerung der Chloridsekretion, an der der basolaterale NKCC1 Cotransporter beteiligt war (Appendix2, Fig3). Des Weiteren konnte eine Aktivierung apikaler Chloridkanäle nachgewiesen werden und zwar sowohl des cAMP aktivierten CFTR Kanals, als auch des Ca aktivierten CaCC Kanals. STW5 scheint keinen Einfluss auf die Natriumabsorption zu haben, da keine Beteiligung des epithelialen ENaC Kanals nachweisbar war.

Die sekretionsfördernde Wirkung von STW5 in den T84 Zellen basierte zum Teil auf einer direkten epithelialen Wirkung. Versuche mit dem Nervengift TTX in nativen Geweben zeigten, dass die Wirkung von STW5 auch eine nervale Komponente aufweist. In allen untersuchten Konzentrationen war die Sekretionsantwort in TTX deutlich verringert (Appendix 2, Fig2A).

Mit der Neuroimaging Methode konnte gezeigt werden, dass STW5 Neurone des SMP aktivieren kann. STW5 ( $512\mu\text{g/ml}$ ) wurde direkt auf SMP Neurone appliziert (3 Patienten, 4 Ganglien). 27 von 46 Neuronen zeigten nach Applikation eine signifikante Aktivitätssteigerung und feuerten Aktionspotentiale (Appendix 2, Fig.2B).

Der pro-sekretorische Effekt von STW5 ist auf unterschiedliche Wirkmechanismen sowohl auf epithelialer als auch auf nervaler Ebene zurückzuführen. Die induzierte Chloridsekretion beruhte auf einer Aktivierung der apikalen CFTR und CaCC Kanäle (Abbildung 29). Durch die Beteiligung beider Chloridkanäle könnte Iberogast ein viel versprechendes pro-sekretorisches Therapeutikum bei Krankheiten sein, bei denen einer der Chloridkanäle defekt ist, wie z.B. bei Mukoviszidose. Ob STW5 die Chloridkanäle direkt aktiviert, muss noch untersucht werden, die pro-sekretorische Wirkung bei mukosaler Gabe könnte ein Hinweis dafür sein.





**Abbildung 29:** Möglicher Wirkmechanismus von STW5. STW5 induziert eine Chloridsekretion, die sowohl neural als auch epithelial vermittelt wird. Der Wirkmechanismus führt zur Aktivierung des cAMP abhängigen CFTR Kanals und des kalziumabhängigen CaCC Kanals.

Die Aktivierung von Neuronen im SMP führt zur Ausschüttung von Transmittern, die eine Chloridsekretion über CFTR und CaCC Kanäle stimulieren (Xue et al., 2007). Die in unseren Untersuchungen festgestellte Aktivierung der Nerven steht im Widerspruch zu der hemmende Wirkung von STW5 auf extrinsische Afferenzen (Liu et al., 2004). Nach einer 2-stündigen Inkubation mit Iberogast zeigte sich im Tiermodell eine Abnahme der Mechano- und Chemosensitivität der viszerale Afferenzen. Es ist unbekannt, ob diese Unterschiede durch die unterschiedlichen Methoden oder durch unterschiedliche Wirkweisen von Iberogast auf enterische Nervenzellen und viszerale Afferenzen verursacht werden. Eine Hemmung der viszerale Afferenzen würde erklären, warum Reizdarmpatienten nach Behandlung mit Iberogast von einer schmerzlindernden Wirkung berichten (Madisch et al., 2004). Die pro-sekretorische Wirkung von Iberogast könnte gerade bei Reizdarmpatienten mit Obstipation zu einer Symptomverbesserung führen. In klinischen Studien mit den Medikamenten Linaclotide und Lubiprostone, die beide die intestinale Sekretion erhöhen, kam es ebenfalls zu einer Verbesserung der gastrointestinalen Symptome von Reizdarmpatienten mit Obstipation (Andresen et al., 2007; Johanson et al., 2008). Iberogast verbesserte die IBS Symptomatik und den Schmerzscore bei allen IBS Patienten, und zwar unabhängig von ihrem primären Stuhlverhalten (Obstipation-dominant, Diarrhö-dominant oder alternierend) (Madisch et

al., 2004). Die klinische Wirksamkeit bei Obstipations-dominantem Reizdarm lässt sich durch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene pro-sekretorische Wirkung erklären. Allerdings erscheint es unwahrscheinlich, dass dieser Wirkmechanismus auch die klinische Wirksamkeit bei Durchfall-dominantem Reizdarm erklärt. Vorstellbar wäre jedoch, dass durch die erhöhte Sekretion luminal akkumulierende noxische Substanzen verdünnt werden und damit eine Symptomverbesserung selbst bei Durchfall-dominantem Reizdarm ermöglicht. Potentiell noxische bzw. pathologisch relevante Substanzen im Darmlumen von Reizdarmpatienten sind sehr wahrscheinlich, da bei diesen Patienten erhöhte Proteaseaktivität (Cenac et al., 2007), veränderte Mikrobiota (Collins et al., 2009) und gering gradige Entzündungen (Bercik et al., 2005) der Schleimhaut beschrieben wurden. Es bleibt zu klären, inwieweit die muskeltonisierenden, muskelrelaxierenden (Ammon et al., 2006; Sibaev et al., 2006), anti-inflammatorischen (Schempp et al., 2006) und anti-nozizeptiven Wirkungen (Liu et al., 2006) zur klinischen Wirksamkeit von Iberogast beitragen.

### **3.4 Schwefelwasserstoff ist ein neuer pro-sekretorischer Neumodulator im Darm vom Meerschweinchen und Mensch (Publikation: Appendix 3)**

Schwefelwasserstoff ist vor allem bekannt als übel riechendes, toxisches Gas. Schwefelwasserstoff entsteht aber auch in Geweben von Säugetieren während des Cysteinestoffwechsels, durch die Enzyme Cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE) und Cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) (Stipanuk, 2004). In den letzten Jahren gibt es eine wachsende Anzahl von Untersuchungen, die zeigen, dass Schwefelwasserstoff unterschiedlichste physiologische Funktionen hat. So unterschiedlich die Funktionen sind, genau so mannigfaltig scheinen auch die Wirkmechanismen von Schwefelwasserstoff zu sein (Lowicka et al., 2007). Schwefelwasserstoff ist inzwischen als dritter gasförmiger Modulator, neben NO und CO, etabliert (Wang, 2002).

Bis zum Beginn unserer Projekte war die Wirkung von H<sub>2</sub>S im humanen Darm, insbesondere die beteiligten Mechanismen unbekannt. Wir waren daran interessiert, die Wirkung von H<sub>2</sub>S auf die sekretorische Aktivität und die Erregbarkeit von enterischen Nervenzellen zu untersuchen.

Immunhistochemisch konnten wir zeigen, dass nahezu 100% der Nervenzellen des submukösen und des myenterischen Plexus des Meerschweinchen CSE exprimieren (Appendix3, Fig.1). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich im myenterischen Plexus des Meerschweinchenmagens. Außerhalb der Ganglien waren noch interstielle Cajalzellen (ICC) CSE positiv. Ein ähnlich hoher Prozentsatz von Nervenzellen war im submukösen Plexus des humanen Kolon CSE positiv. Alle CSE positiven Zellen im submukösen und myenterischen Plexus vom Meerschweinchen und im submukösen Plexus im humanen Kolon waren ebenfalls immunreaktiv für CBS und vice versa. Allerdings scheinen die ICC Zellen CBS nicht zu exprimieren. Im myenterischen Plexus des humanen Kolon war eine quantitative Analyse nicht möglich, da eine verlässliche und reproduzierbare Färbung hier weder mit CSE noch mit CBS Antikörpern möglich war. Diese Befunde erweitern die Ergebnisse früherer Studien, die CSE und CBS in der Darmwand lokalisieren konnten (Hosoki et al., 1997). Mit unserer Studie wurden erstmals die CSE und CBS exprimierenden Zellpopulationen in der Darmwand identifiziert.

Mit der Ussingkammer Voltage Clamp Methode wurde die Wirkung von Schwefelwasserstoff auf Mukosa/Submukosa Präparate des Meerschweinchenkolons und

## Ergebnisse

des humanen Dick- und Dünndarms untersucht. Nach serosaler, jedoch nicht nach mukosaler Applikation des Schwefelwasserstoffdonors NaHS (Natriumhydrogensulfat) (200-1000 $\mu$ M) konnten wir eine konzentrationsabhängige, transiente Erhöhung des Kurzschluss-Stromes messen (Appendix 3, Figure2C). Da NaHS in wässriger Lösung dissoziiert und nur etwa 20% als H<sub>2</sub>S vorliegt (Dombkowski et al., 2004), lagen die von uns verwendeten Konzentrationen im physiologischen Bereich. Im Gehirn des Menschen konnte eine H<sub>2</sub>S Konzentration von etwa 160  $\mu$ M (Goodwin et al., 1989), im Plasma der Ratte von mehr als 300 $\mu$ M (Chunyu et al., 2003) und im Kolonlumen von ca. 1mM (Deplancke et al., 2003) gemessen werden. Eine toxische Wirkung des H<sub>2</sub>S kann ausgeschlossen werden, da elektrisch induzierte Sekretionsantworten vor und nach Zugabe von H<sub>2</sub>S sowohl im Meerschweinchengewebe als auch im Humangewebe unverändert waren.

Die Bumetanid Sensitivität des gemessenen Stromes legte den Schluss nahe, dass H<sub>2</sub>S die Chloridsekretion erhöht. Auch der endogene H<sub>2</sub>S-Donor L-Cystein verursachte einen vorübergehenden Anstieg des I<sub>sc</sub> (Appendix3, Fig.2D). Sowohl im Meerschweinchen als auch im Humangewebe führte eine mehrfache Gabe von NaHS und L-Cystein zu einer Desensibilisierung der Antwort (Appendix3, Fig.2A).

Wir verfolgten zunächst die Hypothese, dass die H<sub>2</sub>S induzierte Sekretion über eine direkte Aktivierung der Epithelzellen vermittelt wird. Dazu verwendeten wir die Epithelzelllinie T84. Hier führte weder die apikale noch die basolaterale Gabe zu einer Sekretion.

Studien an Mukosa/Submukosa Präparaten ergaben eine Hemmung der NaHS induzierten Sekretion durch das Nervengift Tetrodotoxin. Dieses Ergebnis zeigte, dass sowohl im Meerschweinchen als auch im humanen Gewebe Nerven am Wirkmechanismus beteiligt sein müssen. Diese Hypothese wurde durch Aktivitätsmessung im Plexus submucosus bestätigt (Neuroimaging mit spannungssensitivem Farbstoff). Die Perfusion von NaHS führte in ca. ¼ der Nervenzellen zu einer Aktivierung mit erhöhter Aktionspotentialladung (Appendix3, Fig.3A, B). Wir postulierten auf Grund dieses Ergebnisses, dass H<sub>2</sub>S direkt enterische Moto- oder Interneurone aktiviert. Überraschend war daher das Ergebnis, dass NaHS in enterische Nervenzellen in Primärkultur keine Wirkung zeigte.

Weitere pharmakologische Studien an Mukosa/Submukosa Präparaten ergaben, dass TRPV1 exprimierende Nerven eine entscheidende Rolle spielen müssen, da die pro-sekretorische NaHS Antwort nach Defunktionalisierung durch Capsaicin vollständig

blockiert und durch den TRPV1 Blocker Capsazepin signifikant reduziert wurde (Appendix3, Fig.2E). TRPV1 Rezeptoren sind ausschließlich auf viszeralem Afferenzen, nicht aber im enterischen Nervensystem, lokalisiert. In Übereinstimmung mit diesem Befund zeigte sich dann, dass die NaHS induzierte Aktivierung enterischer Nervenzellen ebenfalls Capsaicin sensitiv war.

L-Cystein ist ein Substrat der CSE und CBS und führte ebenfalls zu einer NaHS abhängigen Sekretion. Die L-Cystein induzierten Sekretionsantworten konnten sowohl mit PAG, einem CBS Inhibitor, als auch mit AOAA, einem CSE Inhibitor, oder durch die Kombination beider Inhibitoren signifikant reduziert werden. Dies lässt vermuten, dass endogener Schwefelwasserstoff für die gemessene Sekretionserhöhung verantwortlich ist. Die Capsaicinsensitivität der L-Cystein induzierten Sekretionsantwort zeigte, dass TRPV1 exprimierende extrinsische Afferenzen an der NaHS-Antwort beteiligt sind (Appendix3, Fig.2E). Grundsätzlich wurde eine Beteiligung von TRPV1 an der mukosalen Sekretion in verschiedenen Tiermodellen gezeigt (Cooke et al., 1997; Vanner et al., 2004; Weber et al., 2001).

Da  $K_{ATP}$  Kanäle als ein mögliches Target von Schwefelwasserstoff beschrieben wurden (Distritti et al., 2006; Tang et al., 2005), sollte die Beteiligung dieser Kanäle an der NaHS induzierten Antwort untersucht werden. Eine Inkubation mit dem  $K_{ATP}$  Kanal Antagonisten Glibenclamide (10  $\mu$ M serosal) zeigte keinen Einfluss auf die NaHS induzierten Antworten der Nervenzellen (Appendix3, Fig.3B). Die Sekretionsantworten waren nach Behandlung mit Glibenclamide im Meerschweinchengewebe reduziert. Dieser Effekt lässt sich damit erklären, dass die Epithelzellen  $K_{ATP}$  Kanäle exprimieren und diese entscheidend am Sekretionsmechanismus der Epithelzelle beteiligt sind (McNamara et al., 1999; Schultheiss et al., 1998).

Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass  $H_2S$  ein pro-sekretorischer Modulator ist, dessen Wirkmechanismus auf der Aktivierung von TRPV1 Kanälen basiert.  $H_2S$  hatte, zumindest in den verwendeten Konzentrationen keine direkte Wirkung auf die Epithelzellen oder enterischen Nervenzellen. Wir formulierten daher die Hypothese, dass  $H_2S$  über die Aktivierung von TRPV1 exprimierenden extrinsischen Afferenzen enterische Sekretomotoneurone stimuliert. Evidenzen für diese Hypothese werden in der folgenden Publikation näher beschrieben.

### **3.5 Untersuchung des pro-sekretorischen Wirkmechanismus von Schwefelwasserstoff im Humandarm und Meerschweinchenkolon (Publikation: Appendix 4)**

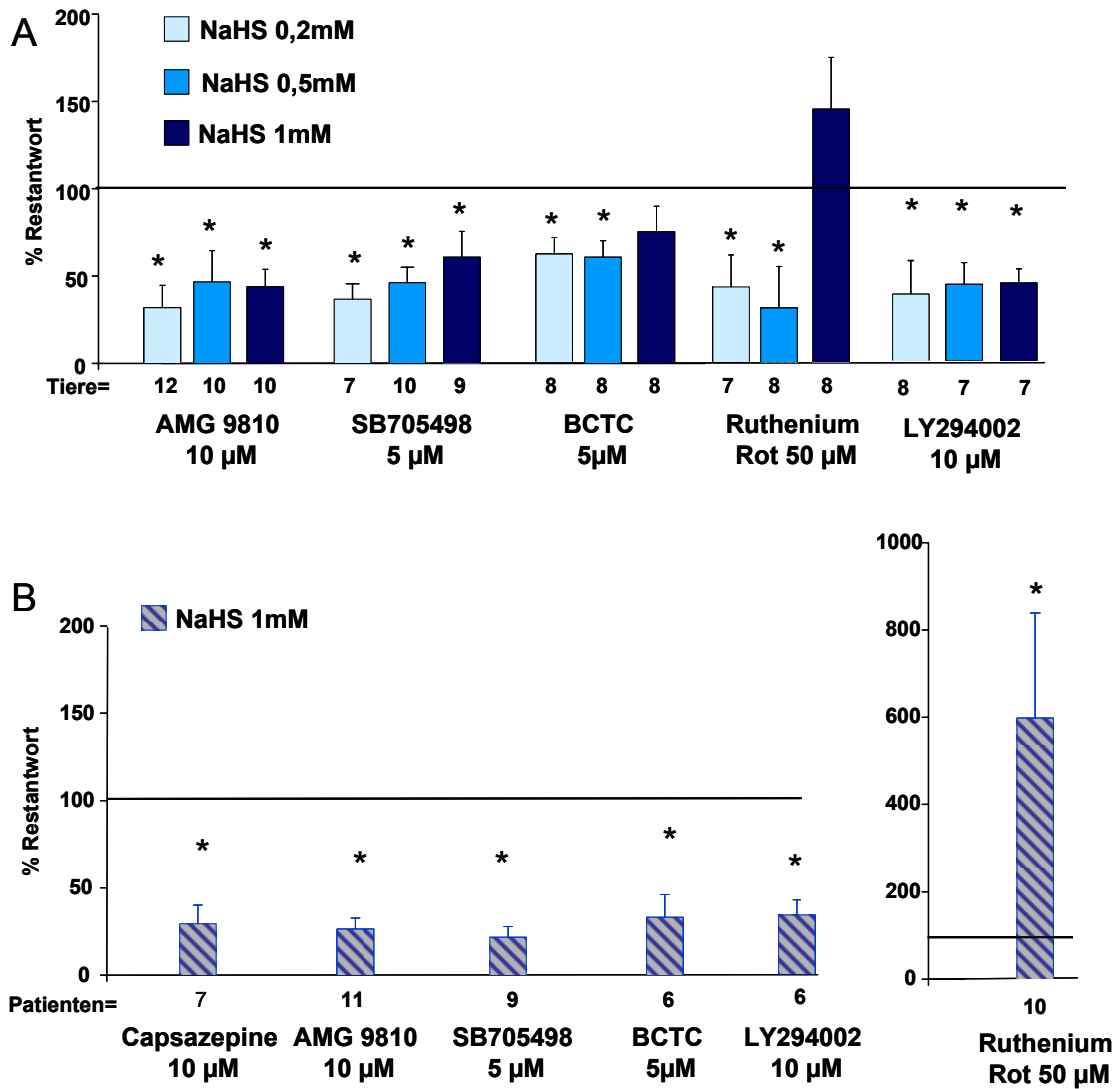
Diese Publikation beschreibt die für die pro-sekretorische Wirkung von H<sub>2</sub>S verantwortlichen Signalmechanismen. Die bisherigen Untersuchungen identifizierten TRPV1 Kanäle als eines der Targets (Schicho et al., 2006). Die stärkste Evidenz für diese Schlussfolgerung war die fast vollständige Blockade der prosekretorischen Wirkung von H<sub>2</sub>S nach Defunktionalisierung der TRPV1 Kanäle durch Präinkubation des Gewebes mit Capsaicin. Dies lässt die Möglichkeit offen, dass H<sub>2</sub>S extrinsische Afferenzen auch ohne direkte Beteiligung von TRPV1 aktiviert. Zumindest im Meerschweinchendarm wurde die pro-sekretorische Wirkung durch den TRPV1 Antagonisten Capsazepin reduziert (Schicho et al., 2006). Entsprechende Befunde fehlten für die Wirkung im Humandarm. Darüber hinaus sollte die Wirksamkeit chemisch nicht verwandter TRPV1 Antagonisten untersucht werden. Des Weiteren sollte in dieser Studie geklärt werden, ob, wie in der vorangegangenen Studie postuliert (Schicho et al., 2006), die TRPV1 Aktivierung zu einer Ausschüttung des sensorischen Transmitters Substanz P und zu einer nachfolgenden Aktivierung enterischer, cholinergischer Sekretomotorone führt.

Im Verlaufe dieser Studie wurden zusätzliche Targets für H<sub>2</sub>S in anderen Organen identifiziert. H<sub>2</sub>S inhibiert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT) Signalkaskade und scheint somit eine anti-inflammatorische Wirkung im Pankreas zu haben (Tamizhselvi et al., 2009). Darüber hinaus hatte Schwefelwasserstoff in einem Mausmodell pro-nozizeptive Wirkung über Aktivierung von T-Typ Kalziumkanälen (Kawabata et al., 2007; Matsunami et al., 2009). H<sub>2</sub>S aktivierte TRPA1 in HEK Zellen und H<sub>2</sub>S sensitive TRPA1 Kanäle scheinen bei der sensorischen Innervation der Harnblase eine Rolle zu spielen (Streng et al., 2008). Daher haben wir zusätzlich die Beteiligung der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT) Signalkaskade, von L- und T-Typ Kalziumkanäle, der TRPA1 Kanäle und von intrazellulären kalziumabhängigen Signalwegen an der NaHS induzierten Sekretion untersucht.

Unsere Kooperationspartner aus Sheffield führten zur gleichen Zeit Untersuchungen zur Wirkung von H<sub>2</sub>S auf viszerale extrinsische Afferenzen der Maus durch (siehe 3.6). Die Ergebnisse zeigten speziesabhängige Wirkmechanismen, da offensichtlich TRPV1 Kanäle

## Ergebnisse

bei der Aktivierung extrinsischer Afferenzen der Maus nur sekundär eine Rolle spielten, H<sub>2</sub>S schien vielmehr direkt TRPC bzw. TRPM Kanäle zu aktivieren. Aus diesem Grund wurde die Beteiligung von TRPC und TRPM Kanälen an der NaHS induzierten Sekretion untersucht



**Abbildung 30:** Einfluss der TRPV1 Blocker AMG 9810, SB 705498, BCTC und Ruthenium Rot sowie dem PI3K Blocker Ly294002 auf die NaHS induzierte Sekretion im Meerschweinchendarm (A) und Humandarm (B). AMG 9810 und SB705498 reduzierten die NaHS-Antworten In BCTC und Ruthenium Rot waren nur Antworten nach 0.2 und 0.5mM NaHS im Meerschweinchenkolon signifikant reduziert (A). Im Humandarm reduzierten alle TRPV1 Blocker die NaHS induzierte Antwort. Der Porenblocker Ruthenium Rot potenzierte die NaHS-Antwort im Humandarm (B) (\*markieren signifikante Unterschiede).

Mit der Ussingkammer Voltage Clamp Methode wurde der Kurzschluss-Strom von Mukosa/Submukosa Präparaten vom Kolon des Meerschweinchen und humanen

## Ergebnisse

Darmresektaten gemessen. Es erfolgte ebenfalls eine direkte Ableitung der extrinsischen Afferenzen des Meerschweinchenjenums.

Wir konnten Hinweise finden, dass TRPV1 Rezeptoren am Wirkmechanismus von Schwefelwasserstoff beteiligt sind. Im Kolon vom Meerschweinchen wurde NaHS in den Konzentrationen 0,2mM, 0,5mM und 1mM verwendet (Abbildung 30A).

Die selektiven TRPV1 Blocker AMG 9810 und SB 705498 reduzierten die H<sub>2</sub>S Antwort. Der selektive TRPV1 Blocker BCTC und der unspezifische TRPV1 Blocker Ruthenium Rot reduzierten nur die durch 0,2mM und 0,5mM H<sub>2</sub>S induzierte Sekretion (Abbildung 30A). Die Versuche im humanen Gewebe wurden mit einer NaHS Konzentration von 1mM durchgeführt. Alle drei spezifischen TRPV1 Blocker reduzierten im Humangewebe signifikant die NaHS-Antwort. In Ruthenium Rot wurde die Antwort signifikant potenziert (Abbildung 30B).

Da die Aktivierung von TRPV1 Kanälen mit der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) verbunden ist (Stein et al., 2006; Zhuang et al., 2004), wurde getestet, ob der PI3K Inhibitor LY 294002 einen Einfluss auf die NaHS induzierte Sekretionsantwort hat. Wie die Abbildung 30 zeigt, wurden sowohl im Meerschweinchen- als auch im Humangewebe die Antworten durch den PI3K Inhibitor reduziert.

TRPV1 Rezeptoren werden durch wiederholte Gabe von Capsaicin desensibilisiert. In der vorangegangenen Studie beobachteten wir auch eine Desensibilisierung der NaHS induzierten Sekretion (Schicho et al., 2006). Durch Kreuz-Desensibilisierung im Humandarm konnten wir zeigen, dass die Capsaicin Antwort nach einer Vorbehandlung mit NaHS reduziert war, nicht aber die NaHS Antwort nach einer Vorbehandlung mit Capsaicin.

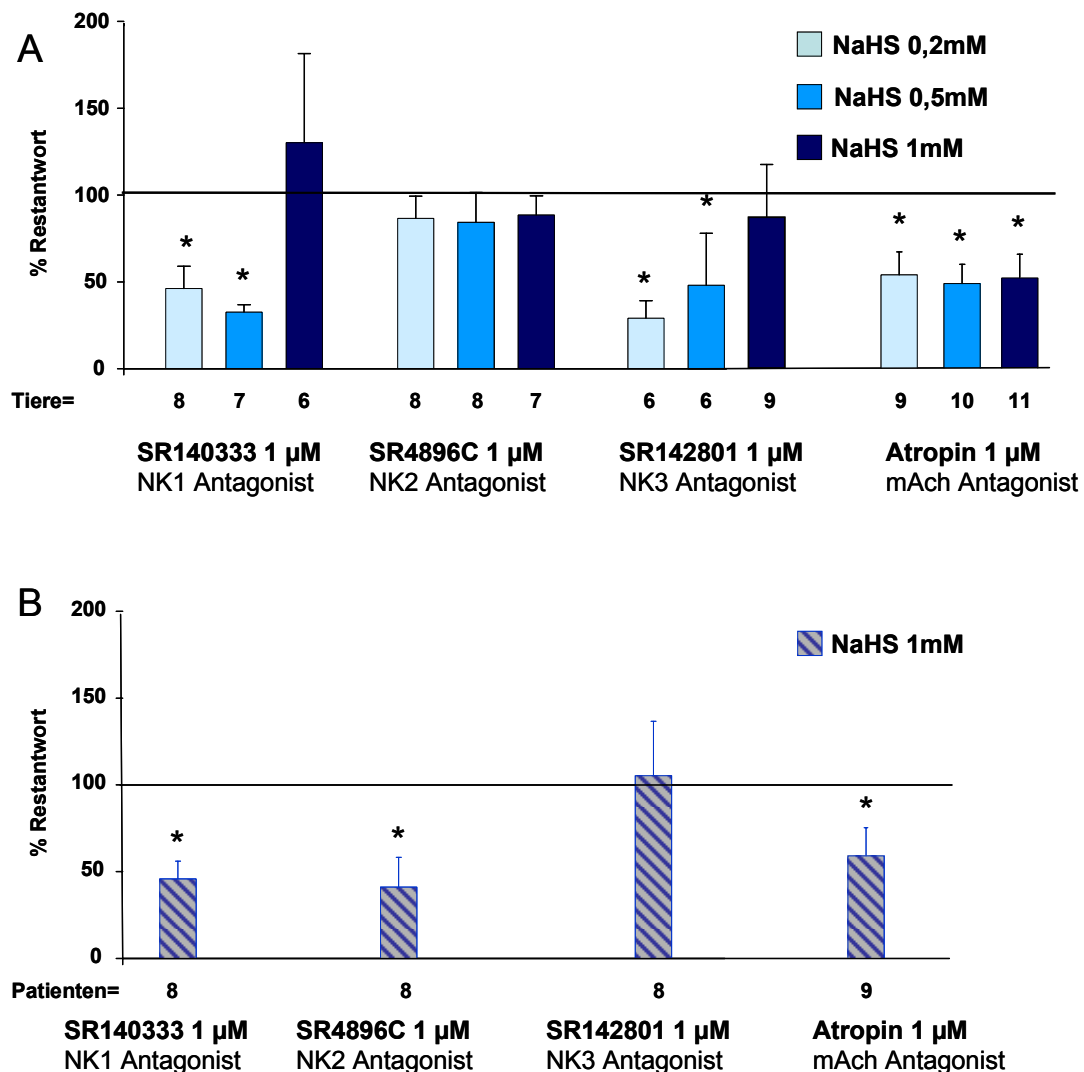
Die Ableitung der Aktivitäten der extrinsischen Afferenzen bestätigte die Annahme, dass die Wirkung von Schwefelwasserstoff im Meerschweinchendarm über TRPV1 Kanäle vermittelt wird. Sowohl Capsazepin als auch der PI3K Inhibitor reduzierten die NaHS induzierte nervale Aktivität.

Eine Aktivierung extrinsischer Afferenzen sollte zur Ausschüttung ihres Transmitters Substanz P führen, welches wiederum cholinerge Sekretomotoneurone im enterischen Nervensystem aktiviert (Frieling et al., 1999). Falls diese Hypothese zutrifft, müsste die NaHS induzierte Sekretion durch Blockade der durch Substanz P aktivierten Neurokinin (NK) Rezeptoren und durch Blockade muskarinerg Acetylcholinrezeptoren inhibiert werden. Die folgenden Ergebnisse bestätigten diese Annahme. Beim Meerschweinchen



## Ergebnisse

waren die Antworten nach Gabe von 0,2mM und 0,5mM NaHS sowohl nach NK1 als auch nach NK3 Rezeptorblockade reduziert. Der NK2 Rezeptorantagonist hatte keine Wirkung. Im Humangewebe waren die NaHS Antworten nach NK1 und NK2 Rezeptorblockade, jedoch nicht durch Vorbehandlung mit einem NK3 Rezeptorantagonisten, reduziert. Atropin reduzierte sowohl im Meerschweinchen als auch im Humangewebe die NaHS induzierte Antwort (Abbildung 31)



**Abbildung 31:** Einfluss von NK-Rezeptorantagonisten und Atropin auf die NaHS induzierte Sekretion im Meerschweinendarm (A) und Humandarm (B). Im Meerschweinchenkolon führte die Blockade der NK1 und NK3 Rezeptoren zu einer Reduktion der NaHS induzierten Sekretion (0,2 und 0,5mM). Atropin reduzierte ebenfalls die NaHS induzierte Sekretion (A). Im Humandarm führte die NK1 und NK2 Blockade sowie Atropin zu einer Hemmung der NaHS induzierten Sekretion (B) (\*markieren signifikante Unterschiede).

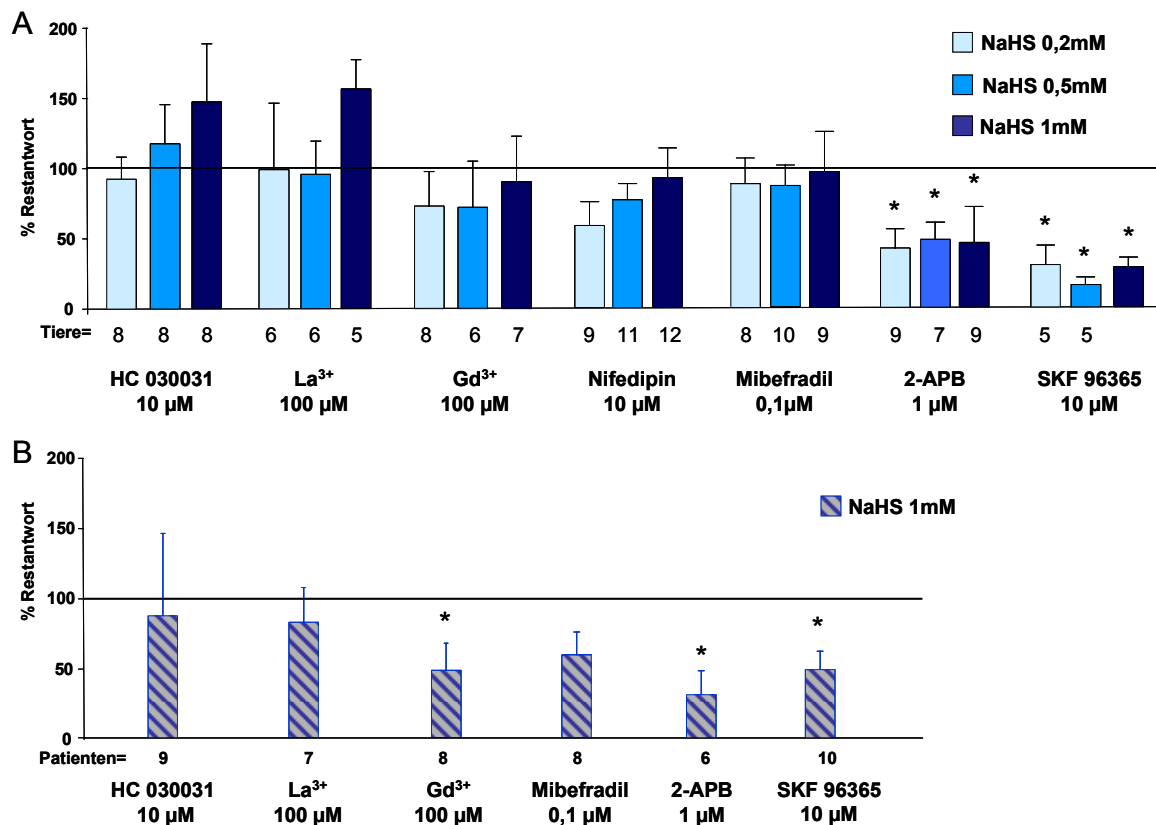
Die extrinsischen Afferenzen exprimieren neben TRPV1 auch andere TRP Kanäle, insbesondere TRPA1 (Blackshaw et al., 2010). Der selektive TRPA1 Blocker HC 030031 (McNamara et al., 2007) hatte weder im Meerschweinchen- noch im Humandarm einen

## Ergebnisse

Einfluss auf die NaHS Antwort.  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  als Blocker von TRPC1-7, TRPV4-6 und TRPM1-3 (Alexander et al., 2008) hatten keinen Einfluss auf die NaHS induzierte Sekretion im Meerschweinchendarm. Während  $\text{La}^{3+}$  auch im Humandarm keine Wirkung auf die NaHS Antwort hatte, wurde die NaHS induzierte Sekretion durch  $\text{Gd}^{3+}$  signifikant reduziert (Abbildung 32).

Die NaHS induzierte Sekretion wurde weder durch Nifedipin (L-Typ-Kalziumblocker) noch durch Mibefradil (T-Typ Kalziumkanalblocker) beeinflusst, so dass wir die Beteiligung von L- und T-Typ Kalziumkanälen ausschließen können (Abbildung 32).

SKF 96365 ist ein SOC Blocker und 2-APB ist ein IP3 Blocker, beide werden auch als TRPC Kanalblocker verwendet (Alexander et al., 2008). Sowohl im Meerschweinchen als auch im Humangewebe waren die  $\text{H}_2\text{S}$  induzierten Sekretionsantworten durch beide Blocker signifikant reduziert (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Einfluss des TRPA1-Blocker HC 030031, der TRPC1-7, TRPV4-6 und TRPM1-3 Blocker Lanthan und Gadolinium, des L-Typ-Kalziumkanalblockers Nifedipin, des T-Typ Kalziumkanalblockers Mibefradil, des IP3-Blocker 2-APB und des SOC-Blockers SKF 96365 auf die NaHS induzierte Sekretion im Meerschweinchendarm (A) und im Humandarm (B). Die verwendeten TRP Blocker, T und L-Typ Kalziumkanalblocker hatten im Meerschweinchendarm keinen Einfluss auf die NaHS induzierte Sekretion. 2-APB und SKF 96365 reduzierten die NaHS induzierte Sekretion im Meerschweinchendarm (A). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich im humanen Darm, allerdings reduzierte hier Gadolinium die Sekretionsantwort signifikant (B) (\*markieren signifikante Unterschiede).

## Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass TRPV1 Rezeptoren für die pro-sekretorische Wirkung von H<sub>2</sub>S im Meerschweinchen- und Humandarm eine zentrale Rolle spielen. An der Signalkaskade sind beim Meerschweinchen NK1 und NK3 Rezeptoren sowie mACh Rezeptoren beteiligt, im humanen Darm NK1, NK2 und ebenfalls mACh Rezeptoren. Sowohl SOC Kanäle als der IP3-Signalweg scheinen zusätzlich involviert zu sein. Für die Beteiligung von TRPC, TRPA1 oder TRPM Kanälen gab es im Meerschweinchen- und Humandarm keine Hinweise.

Die verwendeten spezifischen TRPV1 Blocker gehören zur Gruppe A der TRPV1 Blocker, da sie sowohl die Capsaicin- als auch die Protonenaktivierung von TRPV1 blockieren (Gavva et al., 2005; Loftus, 2004). Die Reduktion der NaHS induzierten Sekretionsantworten durch diese spezifischen, chemisch jedoch nichtverwandten TRPV1 Blocker zeigte, dass TRPV1 Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen müssen. Die Verringerung der NaHS induzierten Aktivität viszeraler extrinsischer Afferenzen durch Capsazepin unterstützt diese Schlussfolgerung zusätzlich.

Anders als die oben genannten spezifischen Gruppe A TRPV1 Antagonisten, inhibiert Ruthenium Rot TRPV1 Kanäle, in dem es die Pore blockiert (St Pierre et al., 2009). In niedrigen Konzentrationen wird die H<sub>2</sub>S Antwort durch Ruthenium Rot reduziert. Ruthenium Rot kann auch eine exzitatorische Wirkung auf TRPV1 Rezeptoren haben (St Pierre et al., 2009). Es könnte daher sein, dass in den höheren Konzentrationen die exzitatorische Wirkung von Ruthenium Rot die inhibitorische überlagert. Dies könnte die Potenzierung der H<sub>2</sub>S Antwort im Humandarm durch Ruthenium Rot erklären.

TRPV1 ist ein polymodaler Rezeptor, der durch zahlreiche Liganden aktiviert und desensibilisiert werden kann (Lipecka et al., 2002). Die Aktivierungsregionen sind vermutlich unterschiedliche nur zum Teil überlappende Regionen des Kanals (Tominaga et al., 2004). Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass Schwefelwasserstoff entweder TRPV1 direkt stimuliert oder indirekt über Signalkaskaden wirkt, die mit einer Aktivierung von TRPV1 Rezeptoren verbunden sind. Wird TRPV1 direkt aktiviert, so hat H<sub>2</sub>S vermutlich mehr als nur eine Angriffsstelle. Eine ist vermutlich die Capsaicinbindungsstelle, die anderen sind mit der Capsaicin abhängigen Aktivierung eng verknüpft. Diese Schlussfolgerung wird unterstützt durch die starke Reduktion der NaHS Antwort durch kompetitive TRPV1 Antagonisten. Durch H<sub>2</sub>S Desensibilisierung wurde die Capsaicin Antwort verringert, durch Capsaicingabe jedoch nicht die H<sub>2</sub>S Antwort. Dies lässt

## Ergebnisse

vermuten, dass  $\text{H}_2\text{S}$  TRPV1 über weitere Targets aktiviert, die nicht mit der Capsaicinbindungsstelle identisch sind.

Der SOC Blocker SKF96365 und der IP3 Blocker 2-APB reduzierten die NaHS induzierte Sekretion sowohl im Meerschweinchen- als auch im Humandarm. An der  $\text{H}_2\text{S}$  induzierten Wirkung scheinen daher intrazelluläre Kalziumabhängige Signalkaskaden beteiligt zu sein. Ob diese der TRPV1 Aktivierung vor- oder nachgeschaltet sind, muss noch untersucht werden. Sowohl SKF96365 als auch 2-APB werden auch als TRPC Antagonisten verwendet. Da aber weder  $\text{La}^{3+}$  noch  $\text{Gd}^{3+}$ , die NaHS induzierte Sekretion inhibierten, scheint eine Beteiligung von TRPC unwahrscheinlich. Allerdings können wir eine TRPC Beteiligung im Humandarm nicht ganz ausschließen, da  $\text{Gd}^{3+}$  die NaHS induzierte Sekretion reduzierte. Die Beteiligung von T-Typ Kalziumkanälen, wie für die pro-nozizeptiven Wirkung von NaHS beschrieben (Kawabata et al., 2007), kann für die pro-sekretorische Wirkung ausgeschlossen werden. Es gab keine Hinweise auf eine Beteiligung von TRPA1 Kanälen an der prosekretorischen Wirkung von NaHS.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass Schwefelwasserstoff neben Protonen und Hitze ein weiterer endogener TRPV1 Aktivator sein könnte.

### **3.6 Schwefelwasserstoff aktiviert mechanosensitive afferente Fasern via TRP-Kanal induzierte Ausschüttung von ATP**

#### **(Publikation: Appendix 5)**

Unsere Kooperationspartner in Sheffield beschäftigten sich mit der Wirkung von H<sub>2</sub>S auf viszerale Afferenzen der Maus und des Meerschweinchens. Ziel dieses gemeinsamen Projektes war es, speziesspezifische Mechanismen der Aktivierung viszeraler Afferenzen durch H<sub>2</sub>S zu untersuchen (Schemann et al., 2009a). Hierzu wurden sowohl funktionelle Studien mit Ableitung von Nervenaktivitäten und Sekretionsmessungen mit der Ussingkammer Voltage Clamp Methode als auch Expressionsstudien und immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

Im Darm der Maus konnte gezeigt werden, dass enterische Nervenzellen CSE und CBS exprimieren (Linden et al., 2008) (Appendix5, Figure1). Erste Versuche bestätigten unsere Hypothese, dass H<sub>2</sub>S viszerale Afferenzen in der Maus aktiviert. Die Aktivierung der Afferenzen konnte durch den CBS Inhibitor Hydroxylamine gehemmt werden (Appendix5, Fig.2). Weiterführende Studien zeigten jedoch zu unserer Überraschung, dass die H<sub>2</sub>S Wirkung im Maudarm unabhängig von TRPV1 war. Die NaHS Applikation erhöhte nämlich konzentrationsabhängig die Entladungsfrequenz der Neurone sowohl in Wildtyp als auch in TRPV1 k.o. Mäusen (Appendix5, Figure1). Sekretionsuntersuchungen mit der Ussingkammer zeigten, dass NaHS in der Maus eine pro-sekretorische Wirkung hat. Die Antworten zeigten jedoch keine Desensibilisierung bei wiederholter Gabe und wurden weder durch das Nervengift TTX noch Capsaicin Desensibilisierung gehemmt (Appendix5, Fig.4). Diese Ergebnisse zeigten speziesspezifische Unterschiede in den molekularen Targets von H<sub>2</sub>S, da die NaHS induzierte Aktivierung viszeraler Afferenzen vom Meerschweinchen durch den TRPV1 Antagonist Capsazepin blockiert wurde (siehe 3.5 und Appendix4)

Welche Rolle purinerge Mechanismen an der NaHS induzierten Wirkung spielen, wurde zum einen mit einer quantitativen Bestimmung des ATP-Gehalts mittels eines Luciferin-Luciferase-Assay an Darmsegmenten der Maus durchgeführt. Es zeigte sich, dass Konzentrationen bis 100 µM NaHS die Freisetzung von ATP erhöhen, während höhere Konzentrationen die Freisetzung reduzieren. Es zeigte sich auch, dass die Mehrzahl (77 von 94) der mechanosensitiven Nervenfasern sowohl auf ATP als auch NaHS mit einer Erhöhung der Entladungsfrequenz reagierten. (Appendix5, Fig.3 ). Durch Inkubation mit

## Ergebnisse

PPADS, einem P2-Rezeptorantagonisten und A317491, einem selektiven P2X<sub>3</sub> und P2X<sub>2/3</sub> Rezeptorantagonist wurden sowohl die ATP als auch die NAHS induzierten Antworten reduziert.

Nach Gabe des nicht selektiven TRPV1 Blockers Ruthenium Rot sowie durch Gadolinium und 2-APB, beides nicht selektive TRPC Blocker, wurde die Aktivierung der extrinsischen Afferenzen durch NaHS fast vollständig gehemmt (Appendix5, Fig.2).

In HEK-Zellen wurden die Rezeptoren P2X (2,3,2/3,4,7), 5-HT<sub>3</sub> und TRPV(1-3) exprimiert und Patch Clamp oder Fluo-4-Calcium-Imaging durchgeführt. NaHS führte in keiner der transfizierten Zellen zu einer Aktivierung, während die jeweiligen Agonisten der Rezeptoren Signale erzeugten (Appendix5, Fig.5). Ein Screening verschiedener TRPC und TRPM Kanäle zeigte, dass TRPM2 und TRPM4B vermutlich durch NaHS aktiviert werden; die Antworten konnten durch La<sup>3+</sup> und Gd<sup>3+</sup> reduziert werden (Appendix5, Fig.6). Um zu testen, ob die Aktivierung durch NaHS auf einer reduzierenden Wirkung beruht, in dem es wie z.B. Thioredoxin die Schwefelbindungen spaltet, wurden reduzierende Agentien verwendet. Die TRPM2 und TRPM4 exprimierenden Zellen zeigten jedoch keine Antworten auf diese Agentien.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass Schwefelwasserstoff viszerale extrinsische Afferenzen im Mausmodell aktiviert, diese Aktivierung involviert purinerge Mechanismen und TRP Kanäle, nicht jedoch TRPV1. Dies scheint im Widerspruch zu unseren Befunden im Meerschweinchen- und Humandarm zu stehen, da hier TRPV1 eine zentrale Rolle einnimmt. Allerdings können wir nicht schlussfolgern, dass H<sub>2</sub>S direkt TRPV1 aktiviert. Vielmehr postulieren wir, dass H<sub>2</sub>S TRPV1 assoziierte bzw. abhängige Signalkaskaden beeinflusst. Es ist bekannt, dass TRPV1 in Expressionsmodelle anders reagiert als in nativen Geweben (St Pierre et al., 2009). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass NaHS TRPV1 in HEK Zellen nicht aktiviert. Darüber hinaus ist bekannt, dass Punktmutationen des humanen TRPV1 selektiv die Sensitivität für Capsaicin, Hitze und Protonen beeinflussen können (Park et al., 2007). Geringste Modifikationen im TRPV1 können daher das Aktivierungsmuster dramatisch beeinflussen. Speziesspezifische Sequenzinhomologien wären eine weitere Erklärung. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da in HEK Zellen der humane TRPV1 exprimiert wurde.

In Darmpräparaten von Mensch und Meerschweinchen erzeugte H<sub>2</sub>S TTX- und Capsaicinsensitive Sekretionsantworten. Die Aktivierung viszeraler Afferenzen im Meerschweinchen war ebenfalls TRPV1 vermittelt. Die Ergebnisse im Mausmodell

zeigten, dass H<sub>2</sub>S unterschiedliche, spezieabhängige Wirkmechanismen hat, da bei der Maus H<sub>2</sub>S zunächst ATP freisetzt, welches dann viszerale Afferenzen aktiviert. Dies stimmt mit früheren Befunden überein, dass ATP viszerale Afferenzen *in vivo* und *in vitro* stimuliert (Kirkup et al., 1999; Wynn et al., 2003). Eine direkte Aktivierung purinerge Rezeptoren durch NaHS kann auf Grund der fehlenden Aktivierung der P2X exprimierenden HEK Zellen ausgeschlossen werden. Es bleibt unklar, welche Zellen im Maudarm auf NaHS mit einer ATP Freisetzung reagieren. Ein offensichtlicher Kandidat wäre die EC-Zelle. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die NaHS induzierte Sekretion im Maudarm nicht durch den purinergen Rezeptorblocker PPADS gehemmt wurde (Appendix5, Figure4). Die pro-sekretorische Wirkung von NaHS im Maudarm scheint primär auf einer direkten Aktivierung von Epithelzellen über einen noch unbekannt Mechanismus zu beruhen. Eine direkte Aktivierung von Epithelzellen durch NaHS wurde auch kürzlich im Rattendarm beschrieben und auf die Aktivierung intrazellulärer Kalziumabhängiger Signalwege zurückgeführt (Hennig et al., 2009).

In Maudarm wird die H<sub>2</sub>S Wirkung nicht über TRPV1 vermittelt. Die Ergebnisse mit den unspezifischen TRP Blockern Ruthenium Rot, 2-APB, La<sup>3+</sup> und Gd<sup>3+</sup> lassen aber vermuten, dass Kanäle der TRPC und TRPM Familie am Wirkmechanismus beteiligt sind.

## 4 Literaturverzeichnis

Literatur

1. Abe, K. und Kimura, H.: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience* 1-2-1996; 16: 1066 - 1071.
2. Akbar, A., Yiangou, Y., Facer, P., Walters, J. R., Anand, P., und Ghosh, S.: Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut* 2008; 57: 923 - 929.
3. Alexander, S. P., Mathie, A., und Peters, J. A.: Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153 Suppl 2: S1 - 209.
4. Ambudkar, I. S.: TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochem.Soc.Trans.* 2007; 35: 96 - 100.
5. Ammon, H. P., Kelber, O., und Okpanyi, S. N.: Spasmolytic and tonic effect of Iberogast((R)) (STW 5) in intestinal smooth muscle. *Phytomedicine*. 2006; 13 Suppl 1: 67 - 74.
6. Andresen, V., Camilleri, M., Busciglio, I. A., Grudell, A., Burton, D., McKinzie, S., Foxx-Orenstein, A., Kurtz, C. B., Sharma, V., Johnston, J. M., Currie, M. G., und Zinsmeister, A. R.: Effect of 5 days linaclotide on transit and bowel function in females with constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; 133: 761 - 768.
7. Anlauf, M., Schafer, M. K., Eiden, L., und Weihe, E.: Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J.Comp Neurol.* 21-4-2003; 459: 90 - 111.
8. Appendino, G., Minassi, A., Pagani, A., und Ech-Chahad, A.: The role of natural products in the ligand deorphanization of TRP channels. *Curr.Pharm.Des* 2008; 14: 2 - 17.
9. Archampong, E. Q., Harris, J., und Clark, C. G.: The absorption and secretion of water and electrolytes across the healthy and the diseased human colonic mucosa measured in vitro. *Gut* 1972; 13: 880 - 886.
10. Auerbach, L.: Über einen Plexus myentericus, einen bisher unbekanntem ganglionären Apparat im Darmkanal der Wirbeltiere. Verlag von E.Morgenstern, Breslau 1862
11. Azpiroz, F., Bouin, M., Camilleri, M., Mayer, E. A., Poitras, P., Serra, J., und Spiller, R. C.: Mechanisms of hypersensitivity in IBS and functional disorders. *Neurogastroenterology and Motility* 2007; 19: 62 - 88.
12. Baird, A. W., Skelly, M. M., O'Donoghue, D. P., Barrett, K. E., und Keely, S. J.: Bradykinin regulates human colonic ion transport in vitro. *British Journal of Pharmacology* 2008; 155: 558 - 566.
13. Banks, M. R., Farthing, M. J., Robberecht, P., und Burleigh, D. E.: Antisecretory actions of a novel vasoactive intestinal polypeptide (VIP) antagonist in



- human and rat small intestine. *British Journal of Pharmacology* 2005; 144: 994 - 1001.
14. Barrett, K. E.: New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv.Physiol Educ.* 2008; 32: 25 - 34.
  15. Barrett, K. E. and Keely, S. J.: Integrative physiology and pathophysiology of intestinal electrolyte secretion. In: L.R.Johnson: *Physiology of the gastrointestinal Tract*, pp 1931 - 1954. 2006 Academic press,
  16. Bautista, D. M., Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I., and Julius, D.: TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 24-3-2006; 124: 1269 - 1282.
  17. Beattie, D. T. und Smith, J. A.: Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 2008; 377: 181 - 203.
  18. Bercik, P., Verdu, E. F., und Collins, S. M.: Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? *Gastroenterol.Clin.North Am.* 2005; 34: 235 - vii.
  19. Bernard, C. E., Gibbons, S. J., Gomez-Pinilla, P. J., Lurken, M. S., Schmalz, P. F., Roeder, J. L., Linden, D., Cima, R. R., Dozois, E. J., Larson, D. W., Camilleri, M., Zinsmeister, A. R., Pozo, M. J., Hicks, G. A., und Farrugia, G.: Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterology and Motility* 2009; 21: 746 - e46.
  20. Berthoud, H. R., Blackshaw, L. A., Brookes, S. J., und Grundy, D.: Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterology and Motility* 2004; 16 Suppl 1: 28 - 33.
  21. Bertrand, P. P., Kunze, W. A., Bornstein, J. C., Furness, J. B., und Smith, M. L.: Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *American Journal of Physiology* 1997; 273: G422 - 35.
  22. Bertrand, P. P., Kunze, W. A., Furness, J. B., und Bornstein, J. C.: The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. *Neuroscience JID - 7605074* 2000; 101: 459 - 469.
  23. Beyak M.J., Bulmer, D. C., Jiang, W., Keating C., Rong W., and Grundy, D.: Extrinsic sensory afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. In: L.R.Johnson: *Physiology of the gastrointestinal Tract*, 685 - 726. Academic press,
  24. Blackshaw, L. A., Brierley, S. M., und Hughes, P. A.: TRP channels: new targets for visceral pain. *Gut* 2010; 59: 126 - 135.
  25. Blackshaw, L. A., Brookes, S. J., Grundy, D., und Schemann, M.: Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterology and Motility* 2007; 19: 1 - 19.

## Literatur

26. Brady, C. A., Stanford, I. M., Ali, I., Lin, L., Williams, J. M., Dubin, A. E., Hope, A. G., und Barnes, N. M.: Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT<sub>3A</sub> receptors versus heteromeric 5-HT<sub>3A/3B</sub> receptors. *Neuropharmacology* 2001; 41: 282 - 284.
27. Budhoo, M. R., Harris, R. P., und Kellum, J. M.: 5-Hydroxytryptamine-induced Cl<sup>-</sup> transport is mediated by 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in the rat distal colon. *Eur.J Pharmacol* 7-3-1996; 298: 137 - 144.
28. Burleigh, D. E. und Borman, R. A.: Short-circuit current responses to 5-hydroxytryptamine in human ileal mucosa are mediated by a 5-HT<sub>4</sub> receptor. *European Journal of Pharmacology* 7-9-1993; 241: 125 - 128.
29. Caterina, M. J.: Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent. *Pain* 2003; 105: 5 - 9.
30. Caterina, M. J.: Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2007; 292: R64 - R76.
31. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., und Julius, D.: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 23-10-1997; 389: 816 - 824.
32. Cenac, N., Andrews, C. N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N. W., Sharkey, K. A., Ferraz, J. G., Shaffer, E., und Vergnolle, N.: Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J.Clin.Invest* 2007; 117: 636 - 647.
33. Chan, C. L., Facer, P., Davis, J. B., Smith, G. D., Egerton, J., Bountra, C., Williams, N. S., und Anand, P.: Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. *Lancet* 1-2-2003; 361: 385 - 391.
34. Chizh, B. A., O'Donnell, M. B., Napolitano, A., Wang, J., Brooke, A. C., Aylott, M. C., Bullman, J. N., Gray, E. J., Lai, R. Y., Williams, P. M., und Appleby, J. M.: The effects of the TRPV1 antagonist SB-705498 on TRPV1 receptor-mediated activity and inflammatory hyperalgesia in humans. *Pain* 2007; 132: 132 - 141.
35. Christofi, F. L.: Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic.Signal.* 2008; 4: 213 - 236.
36. Chunyu, Z., Junbao, D., Dingfang, B., Hui, Y., Xiuying, T., und Chaoshu, T.: The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 21-3-2003; 302: 810 - 816.
37. Clapham, D. E.: TRP channels as cellular sensors. *Nature* 4-12-2003; 426: 517 - 524.
38. Clavel, T. und Haller, D.: Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. *Curr.Issues Intest.Microbiol.* 2007; 8: 25 - 43.

## Literatur

39. Collins, S. M., Denou, E., Verdu, E. F., und Bercik, P.: The putative role of the intestinal microbiota in the irritable bowel syndrome. *Dig.Liver Dis.* 2009; 41: 850 - 853.
40. Cooke HJ, Shonnard K, Highison G, und Wood JD: Effects of neurotransmitter release on mucosal transport in guinea pig ileum. *American Journal of Physiology* 1983; 245: 745 - 750.
41. Cooke, H. J.: "Enteric Tears": Chloride Secretion and Its Neural Regulation. *News Physiol Sci.* 1998; 13: 269 - 274.
42. Cooke, H. J. and Christofi, F. L.: Enteric neural regulation of mucosal secretion. In: L.R.Johnson: *Physiology of the gastrointestinal Tract*, 737 - 762. Academic press,
43. Cooke, H. J., Sidhu, M., Fox, P., Wang, Y. Z., und Zimmermann, E. M.: Substance P as a mediator of colonic secretory reflexes. *Am.J.Physiol* 1997; 272: G238 - G245.
44. Corey, D. P., Garcia-Anoveros, J., Holt, J. R., Kwan, K. Y., Lin, S. Y., Vollrath, M. A., Amalfitano, A., Cheung, E. L., Derfler, B. H., Duggan, A., Geleoc, G. S., Gray, P. A., Hoffman, M. P., Rehm, H. L., Tamasauskas, D., und Zhang, D. S.: TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 9-12-2004; 432: 723 - 730.
45. Deplancke, B., Finster, K., Graham, W. V., Collier, C. T., Thurmond, J. E., und Gaskins, H. R.: Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in mice. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2003; 228: 424 - 433.
46. Distrutti, E., Sediari, L., Mencarelli, A., Renga, B., Orlandi, S., Antonelli, E., Roviezzo, F., Morelli, A., Cirino, G., Wallace, J. L., und Fiorucci, S.: Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 2006; 316: 325 - 335.
47. Dombkowski, R. A., Russell, M. J., und Olson, K. R.: Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2004; 286: R678 - R685.
48. Drossman, D. A., Camilleri, M., Mayer, E. A., und Whitehead, W. E.: AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 2108 - 2131.
49. Foxx-Orenstein, A. E., Kuemmerle, J. F., und Grider, J. R.: Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea pig intestine. *Gastroenterology* 1996; 111: 1281 - 1290.
50. Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Stolz, S., Philipp, S. E., Weissgerber, P., und Flockerzi, V.: Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J.Physiol* 15-8-2005; 567: 59 - 66.
51. Frieling, T., Dobрева, G., Weber, E., Becker, K., Rupprecht, C., Neunlist, M., und Schemann, M.: Different tachykinin receptors mediate chloride secretion in

- the distal colon through activation of submucosal neurones. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1999; 359: 71 - 79.
52. Furness, J. B.: *The enteric nervous system*. Blackwell publishing, 2006
  53. Gallagher, P. und O'Mahony, D.: Constipation in old age. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 2009; 23: 875 - 887.
  54. Gallego, D., Clave, P., Donovan, J., Rahmati, R., Grundy, D., Jimenez, M., und Beyak, M. J.: The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterology and Motility* 2008; 20: 1306 - 1316.
  55. Galligan, J. J.: Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system. *Curr.Opin.Pharmacol* 2002; 2: 623 - 629.
  56. Gavva, N. R., Klionsky, L., Qu, Y., Shi, L., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, T. J., Viswanadhan, V. N., Toth, A., Pearce, L. V., Vanderah, T. W., Porreca, F., Blumberg, P. M., Lile, J., Sun, Y., Wild, K., Louis, J. C., und Treanor, J. J.: Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J.Biol.Chem.* 7-5-2004; 279: 20283 - 20295.
  57. Gavva, N. R., Tamir, R., Klionsky, L., Norman, M. H., Louis, J. C., Wild, K. D., und Treanor, J. J.: Proton activation does not alter antagonist interaction with the capsaicin-binding pocket of TRPV1. *Molecular Pharmacology* 2005; 68: 1524 - 1533.
  58. Geibel, J. P.: Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu.Rev.Physiol* 2005; 67: 471 - 490.
  59. Germann, I., Hagelauer, D., Kelber, O., Vinson, B., Laufer, S., Weiser, D., und Heinle, H.: Antioxidative properties of the gastrointestinal phytopharmaceutical remedy STW 5 (Iberogast((R))). *Phytomedicine.* 2006; 13 Suppl 1: 45 - 50.
  60. Gershon, M. D. und Tack, J.: The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 2007; 132: 397 - 414.
  61. Goodwin, L. R., Francom, D., Dieken, F. P., Taylor, J. D., Warenycia, M. W., Reiffenstein, R. J., und Dowling, G.: Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J.Anal.Toxicol.* 1989; 13: 105 - 109.
  62. Greffrath, W.: [The capsaicin receptor. "TRPing" transduction for painful stimuli]. *Schmerz.* 2006; 20: 219 - 225.
  63. Greger, R.: Role of CFTR in the colon. *Annual Review of Physiology* 2000; 62: 467 - 491.
  64. Grundy, D. und Schemann, M.: Enteric nervous system. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2007; 23: 121 - 126.
  65. Hansen, M. B.: Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res* 2003; 52: 1 - 30.

## Literatur

66. Hendriks, R., Bornstein, J. C., und Furness, J. B.: Evidence for two types of 5-hydroxytryptamine receptor on secretomotor neurons of the guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 1989; 339: 409 - 414.
67. Hennig, B. und Diener, M.: Actions of hydrogen sulphide on ion transport across rat distal colon. *British Journal of Pharmacology* 2009; 158: 1263 - 1275.
68. Hens, J., Vanderwinden, J. M., De Laet, M. H., Scheuermann, D. W., und Timmermans, J. P.: Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. *J Neurochem* 2001; 76: 464 - 471.
69. Hirota, C. L. und McKay, D. M.: Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *British Journal of Pharmacology* 2006; 149: 463 - 479.
70. Hirst, G. D., Johnson, S. M., und van Helden, D. F.: The slow calcium-dependent potassium current in a myenteric neurone of the guinea-pig ileum. *J Physiol* 1985; 361: 315 - 337.
71. Hohenester, B., Ruhl, A., Kelber, O., und Schemann, M.: The herbal preparation STW5 (Iberogast) has potent and region-specific effects on gastric motility. *Neurogastroenterology and Motility* 2004; 16: 765 - 773.
72. Holzer, P., Michl, T., Danzer, M., Jovic, M., Schicho, R., und Lippe, I. T.: Surveillance of the gastrointestinal mucosa by sensory neurons. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52: 505 - 521.
73. Hosoki, R., Matsuki, N., und Kimura, H.: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28-8-1997; 237: 527 - 531.
74. Hubel, K. A., Renquist, K., und Shirazi, S.: Ion transport in human cecum, transverse colon, and sigmoid colon in vitro. Baseline and response to electrical stimulation of intrinsic nerves. *Gastroenterology* 1987; 92: 501 - 507.
75. Hubel, K. A. und Shirazi, S.: Human ileal ion transport in vitro: changes with electrical field stimulation and tetrodotoxin. *Gastroenterology* 1982; 83: 63 - 68.
76. Isaacs, P. E., Corbett, C. L., Riley, A. K., Hawker, P. C., und Turnberg, L. A.: In vitro behavior of human intestinal mucosa. The influence of acetyl choline on ion transport. *J.Clin.Invest* 1976; 58: 535 - 542.
77. Johanson, J. F., Drossman, D. A., Panas, R., Wahle, A., und Ueno, R.: Clinical trial: phase 2 study of lubiprostone for irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 2008; 27: 685 - 696.
78. Jordt, S. E., Tominaga, M., und Julius, D.: Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 5-7-2000; 97: 8134 - 8139.

## Literatur

79. Kawabata, A., Ishiki, T., Nagasawa, K., Yoshida, S., Maeda, Y., Takahashi, T., Sekiguchi, F., Wada, T., Ichida, S., und Nishikawa, H.: Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain* 2007; 132: 74 - 81.
80. Keely, S. J. und Barrett, K. E.: Regulation of chloride secretion. Novel pathways and messengers. *Annals New York Academy of Sciences* 2000; 915: 67 - 76.
81. Keely, S. J., Stack, W. A., O'Donoghue, D. P., und Baird, A. W.: Regulation of ion transport by histamine in human colon. *European Journal of Pharmacology* 12-6-1995; 279: 203 - 209.
82. Kellum, J. M., Albuquerque, F. C., Stoner, M. C., und Harris, R. P.: Stroking human jejunal mucosa induces 5-HT release and Cl(-) secretion via afferent neurons and 5-HT(4) receptors. *American Journal of Physiology* 1999; 277: G515 - G520.
83. Kellum, J. M., Budhoo, M. R., Siriwardena, A. K., Smith, E. P., und Jebrailli, S. A.: Serotonin induces Cl- secretion in human jejunal mucosa in vitro via a nonneural pathway at a 5-HT4 receptor. *American Journal of Physiology* 1994; 267: G357 - 63.
84. Khayyal, M. T., Seif-el-Nasr, M., el Ghazaly, M. A., Okpanyi, S. N., Kelber, O., und Weiser, D.: Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast((R))) and its components against ulcers and rebound acidity. *Phytomedicine*. 2006; 13 Suppl 1: 56 - 66.
85. Kimberg, D. V., Field, M., Johnson, J., Henderson, A., und Gershon, E.: Stimulation of intestinal mucosal adenylyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. *J.Clin.Invest* 1971; 50: 1218 - 1230.
86. Kimura, H.: Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 7-1-2000; 267: 129 - 133.
87. Kirchgessner, A. L. und Liu, M. T.: Immunohistochemical localization of nicotinic acetylcholine receptors in the guinea pig bowel and pancreas. *Journal of Comparative Neurology* 1998; 390: 497 - 514.
88. Kirkup, A. J., Booth, C. E., Chessell, I. P., Humphrey, P. P., und Grundy, D.: Excitatory effect of P2X receptor activation on mesenteric afferent nerves in the anaesthetised rat. *J.Physiol* 15-10-1999; 520 Pt 2: 551 - 563.
89. Kirkup, A. J., Brunsdon, A. M., und Grundy, D.: Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. I. Receptors on visceral afferents. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2001; 280: G787 - G794.
90. Kockerling, A. und Fromm, M.: Origin of cAMP-dependent Cl- secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. *Am.J.Physiol* 1993; 264: C1294 - C1301.
91. Kunzelmann, K., Schreiber, R., und Boucherot, A.: Mechanisms of the inhibition of epithelial Na(+) channels by CFTR and purinergic stimulation. *Kidney Int.* 2001; 60: 455 - 461.

## Literatur

92. Kuwahara, A., Cooke, H. J., Carey, H. V., Mekhjian, H., Ellison, E. C., und McGregor, B.: Effects of enteric neural stimulation on chloride transport in human left colon in vitro. *Digestive Diseases and Sciences* 1989; 34: 206 - 213.
93. Kuwahara, A. und Radowicz-Cooke, H. J.: Epithelial transport in guinea-pig proximal colon: influence of enteric neurones. *Journal of Physiology* 1988; 395:271-84: 271 - 284.
94. Lecci, A., Capriati, A., Altamura, M., und Maggi, C. A.: Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK2 receptors in human. *Auton.Neurosci.* 30-6-2006; 126-127: 232 - 249.
95. Li, L., Hsu, A., und Moore, P. K.: Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation--a tale of three gases! *Pharmacology and Therapeutics* 2009; 123: 386 - 400.
96. Linden, D. R., Levitt, M. D., Farrugia, G., und Szurszewski, J. H.: Endogenous Production of H(2)S in the Gastrointestinal Tract: Still in Search of a Physiological Function. *Antioxid.Redox.Signal.* 21-9-2009
97. Linden, D. R., Sha, L., Mazzone, A., Stoltz, G. J., Bernard, C. E., Furne, J. K., Levitt, M. D., Farrugia, G., und Szurszewski, J. H.: Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues. *J.Neurochem.* 2008; 106: 1577 - 1585.
98. Lipecka, J., Bali, M., Thomas, A., Fanen, P., Edelman, A., und Fritsch, J.: Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C805 - C816.
99. Lipski, P. S., Bennett, M. K., Kelly, P. J., und James, O. F.: Ageing and duodenal morphometry. *J.Clin.Pathol.* 1992; 45: 450 - 452.
100. Liu, C. Y., Muller, M. H., Glatzle, J., Weiser, D., Kelber, O., Enck, P., Grundy, D., und Kreis, M. E.: The herbal preparation STW 5 (Iberogast) desensitizes intestinal afferents in the rat small intestine. *Neurogastroenterology and Motility* 2004; 16: 759 - 764.
101. Liu, J. P., Yang, M., Liu, Y. X., Wei, M. L., und Grimsgaard, S.: Herbal medicines for treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2006: CD004116
102. Loftus, E. V.: Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504 - 1517.
103. Lowicka, E. und Beltowski, J.: Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol.Rep.* 2007; 59: 4 - 24.
104. Madisch, A., Holtmann, G., Plein, K., und Hotz, J.: Treatment of irritable bowel syndrome with herbal preparations: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centre trial. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 1-2-2004; 19: 271 - 279.

## Literatur

105. Mall, M., Bleich, M., Schlein, M., Khr, J., Seydewitz, H. H., Brandis, M., Greger, R., und Kunzelmann, K.: Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *American Journal of Physiology* 1998; 275: G1274 - 81.
106. Mancardi, D., Penna, C., Merlino, A., Del Soldato, P., Wink, D. A., und Pagliaro, P.: Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1787: 864 - 872.
107. Matsunami, M., Tarui, T., Mitani, K., Nagasawa, K., Fukushima, O., Okubo, K., Yoshida, S., Takemura, M., und Kawabata, A.: Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut* 2009; 58: 751 - 761.
108. Mazzuoli, G. und Schemann, M.: Multifunctional rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN) in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *Journal of Physiology-London* 1-10-2009; 587
109. McCrea, G. L., Miaskowski, C., Stotts, N. A., Macera, L., und Varma, M. G.: A review of the literature on gender and age differences in the prevalence and characteristics of constipation in North America. *J.Pain Symptom.Manage.* 2009; 37: 737 - 745.
110. McNamara, B., Winter, D. C., Cuffe, J. E., O'Sullivan, G. C., und Harvey, B. J.: Basolateral K<sup>+</sup> channel involvement in forskolin-activated chloride secretion in human colon. *J.Physiol* 15-8-1999; 519 Pt 1: 251 - 260.
111. McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M., und Fanger, C. M.: TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 14-8-2007; 104: 13525 - 13530.
112. Meier, J. und Sturm, A.: The intestinal epithelial barrier: does it become impaired with age? *Digestive Diseases* 2009; 27: 240 - 245.
113. Meissner, G.: Über die Nerven der Darmwand. *Z.Ration.Med.N.F.* 1857; 8: 364 - 366.
114. Melzer, J., Rosch, W., Reichling, J., Brignoli, R., und Saller, R.: Meta-analysis: phytotherapy of functional dyspepsia with the herbal drug preparation STW 5 (Iberogast). *Aliment.Pharmacol.Ther.* 2004; 20: 1279 - 1287.
115. Michel, K., Sann, H., Schaaf, C., und Schemann, M.: Subpopulations of gastric myenteric neurons are differentially activated via distinct serotonin receptors: projection, neurochemical coding, and functional implications. *Journal of Neuroscience* 1997; 17: 8009 - 8017.
116. Montenegro, M. F., Ruiz-Espejo, F., Campoy, F. J., Munoz-Delgado, E., de la Cadena, M. P., Rodriguez-Berrocal, F. J., und Vidal, C. J.: Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma. *Cell Mol.Life Sci.* 2006; 63: 2175 - 2182.
117. Mosa, A. S., Hansen, M. B., Tilotta, C. M., und Bindsløv, N.: EP4 and EP2 receptor subtypes involved in colonic secretion in rat. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* 2008; 103: 214 - 221.



## Literatur

118. Nemeth, P. R., Palmer, J. M., Wood, J. D., und Zafirov, D. H.: Effects of forskolin on electrical behaviour of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Journal of Physiology* 1986; 376: 439 - 450.
119. Neunlist, M., Dobрева, G., und Schemann, M.: Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *Journal of Physiology* 1999; 517: 533 - 546.
120. Neunlist, M., Michel, K., Reiche, D., Dobрева, G., Huber, K., und Schemann, M.: Glycine activates myenteric neurones in adult guinea-pigs. *J Physiol* 2001; 536: 727 - 739.
121. Nilius, B. und Droogmans, G.: Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand.* 2003; 177: 119 - 147.
122. Nurgali, K., Furness, J. B., und Stebbing, M. J.: Correlation of electrophysiology, shape and synaptic properties of myenteric AH neurons of the guinea pig distal colon. *Auton.Neurosci* 31-1-2003; 103: 50 - 64.
123. Osbak, P. S., Bindslev, N., Poulsen, S. S., Kaltoft, N., Tilotta, M. C., und Hansen, M. B.: Colonic epithelial ion transport is not affected in patients with diverticulosis. *BMC.Gastroenterol.* 2007; 7: 37
124. Ousingsawat, J., Martins, J. R., Schreiber, R., Rock, J. R., Harfe, B. D., und Kunzelmann, K.: Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride transport. *J.Biol.Chem.* 16-10-2009; 284: 28698 - 28703.
125. Park, J. J., Lee, J., Kim, M. A., Back, S. K., Hong, S. K., und Na, H. S.: Induction of total insensitivity to capsaicin and hypersensitivity to garlic extract in human by decreased expression of TRPV1. *Neuroscience Letters* 10-1-2007; 411: 87 - 91.
126. Payne, S.: Sex, gender, and irritable bowel syndrome: making the connections. *Gend.Med.* 2004; 1: 18 - 28.
127. Pedersen, S. F., Owsianik, G., und Nilius, B.: TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 2005; 38: 233 - 252.
128. Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley, des, V, Dainese, R., Nano, J. L., Cremon, C., Stanghellini, V., de Giorgio, R., Galmiche, J. P., und Neunlist, M.: Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009; 58: 196 - 201.
129. Planells-Cases, R. und Jentsch, T. J.: Chloride channelopathies. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1792: 173 - 189.
130. Reynolds, A., Parris, A., Evans, L. A., Lindqvist, S., Sharp, P., Lewis, M., Tighe, R., und Williams, M. R.: Dynamic and differential regulation of NKCC1 by calcium and cAMP in the native human colonic epithelium. *J.Physiol* 15-7-2007; 582: 507 - 524.
131. Riegler, M., Castagliuolo, I., Wang, C., Wlk, M., Sogukoglu, T., Wenzl, E., Matthews, J. B., und Pothoulakis, C.: Neurotensin stimulates Cl<sup>-</sup> secretion

## Literatur

- in human colonic mucosa In vitro: role of adenosine. *Gastroenterology* 2000; 119: 348 - 357.
132. Sang, Q. und Young, H. M.: The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. *Anat.Rec.* 1998; 251: 185 - 199.
  133. Sawada, Y., Hosokawa, H., Hori, A., Matsumura, K., und Kobayashi, S.: Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Research* 30-7-2007; 1160: 39 - 46.
  134. Schemann, M. und Grundy, D.: Role of hydrogen sulfide in visceral nociception. *Gut* 2009a; 58: 744 - 747.
  135. Schemann, M. und Grundy, D.: Role of hydrogen sulfide in visceral nociception. *Gut* 2009b; 58: 744 - 747.
  136. Schemann, M. und Neunlist, M.: The human enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility* 2004; 16 Suppl 1: 55 - 59.
  137. Schempp, H., Weiser, D., Kelber, O., und Elstner, E. F.: Radical scavenging and anti-inflammatory properties of STW 5 (Iberogast((R))) and its components. *Phytomedicine*. 2006; 13 Suppl 1: 36 - 44.
  138. Schicho, R., Krueger, D., Zeller, F., Von Weyhern, C. W., Frieling, T., Kimura, H., Ishii, I., de Giorgio, R., Campi, B., und Schemann, M.: Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology* 2006; 131: 1542 - 1552.
  139. Schneider, J., Jehle, E. C., Starlinger, M. J., Neunlist, M., Michel, K., Hoppe, S., und Schemann, M.: Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterology and Motility* 2001; 13: 255 - 264.
  140. Schultheiss, G. und Diener, M.: K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> conductances in the distal colon of the rat. *General Pharmacology* 1998; 31: 337 - 342.
  141. Sibae, A., Yuece, B., Kelber, O., Weiser, D., Schirra, J., Goke, B., Allescher, H. D., und Storr, M.: STW 5 (Iberogast((R))) and its individual herbal components modulate intestinal electrophysiology of mice. *Phytomedicine*. 2006; 13 Suppl 1: 80 - 89.
  142. Sine, J. P., Ferrand, R., Cloarec, D., Lehur, P. A., und Colas, B.: Human intestine epithelial cell acetyl- and butyrylcholinesterase. *Mol.Cell Biochem.* 11-12-1991; 108: 145 - 149.
  143. Smith, T. K., Spencer, N. J., Hennig, G. W., und Dickson, E. J.: Recent advances in enteric neurobiology: mechanosensitive interneurons. *Neurogastroenterology and Motility* 2007; 19: 869 - 878.
  144. Soderholm, J. D., Hedman, L., Artursson, P., Franzen, L., Larsson, J., Pantzar, N., Permert, J., und Olaison, G.: Integrity and metabolism of human ileal mucosa in vitro in the Ussing chamber. *Acta Physiol Scand.* 1998; 162: 47 - 56.
  145. Spiller, R. und Campbell, E.: Post-infectious irritable bowel syndrome. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2006; 22: 13 - 17.

## Literatur

146. Spiller, R. C.: Inflammation as a basis for functional GI disorders. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 2004; 18: 641 - 661.
147. St Pierre, M., Reeh, P. W., und Zimmermann, K.: Differential effects of TRPV channel block on polymodal activation of rat cutaneous nociceptors in vitro. *Exp.Brain Res.* 2009; 196: 31 - 44.
148. Stein, A. T., Ufret-Vincenty, C. A., Hua, L., Santana, L. F., und Gordon, S. E.: Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J.Gen.Physiol* 2006; 128: 509 - 522.
149. Stipanuk, M. H.: Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu.Rev.Nutr.* 2004; 24: 539 - 577.
150. Stoner, M. C., Scherr, A. M., Lee, J. A., Wolfe, L. G., und Kellum, J. M.: Nitric oxide is a neurotransmitter in the chloride secretory response to serotonin in rat colon. *Surgery* 2000; 128: 240 - 245.
151. Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., und Patapoutian, A.: ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 21-3-2003; 112: 819 - 829.
152. Streng, T., Axelsson, H. E., Hedlund, P., Andersson, D. A., Jordt, S. E., Bevan, S., Andersson, K. E., Hogestatt, E. D., und Zygmunt, P. M.: Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *Eur.Urol.* 2008; 53: 391 - 399.
153. Szallasi, A., Cruz, F., und Geppetti, P.: TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol.Med.* 2006; 12: 545 - 554.
154. Tamizhselvi, R., Sun, J., Koh, Y. H., und Bhatia, M.: Effect of hydrogen sulfide on the phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B pathway and on caerulein-induced cytokine production in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 2009; 329: 1166 - 1177.
155. Tang, G., Wu, L., Liang, W., und Wang, R.: Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* 2005; 68: 1757 - 1764.
156. Teague, B., Asiedu, S., und Moore, P. K.: The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *British Journal of Pharmacology* 2002; 137: 139 - 145.
157. Thiagarajah J.R. and Verkman, A. S.: Water transport in the gastrointestinal tract. In: L.R.Johnson: *Physiology of the gastrointestinal Tract*, 1827 - 1846. Academic press,
158. Tominaga, M. und Caterina, M. J.: Thermosensation and pain. *J.Neurobiol.* 2004; 61: 3 - 12.

## Literatur

159. Tough, I. R., Lewis, C. A., Fozard, J., und Cox, H. M.: Dual and selective antagonism of neurokinin NK(1) and NK(2) receptor-mediated responses in human colon mucosa. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2003; 367: 104 - 108.
160. Tousova, K., Vyklicky, L., Susankova, K., Benedikt, J., und Vlachova, V.: Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol.Cell Neurosci.* 2005; 30: 207 - 217.
161. Trevisani, M., Patacchini, R., Nicoletti, P., Gatti, R., Gazzieri, D., Lissi, N., Zagli, G., Creminon, C., Geppetti, P., und Harrison, S.: Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *British Journal of Pharmacology* 2005; 145: 1123 - 1131.
162. Vanner, S. und MacNaughton, W. K.: Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. *Neurogastroenterology and Motility* 2004; 16 Suppl 1: 39 - 43.
163. Venkatachalam, K. und Montell, C.: TRP channels. *Annu.Rev.Biochem.* 2007; 76: 387 - 417.
164. Verkman, A. S. und Galiotta, L. J.: Chloride channels as drug targets. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2009; 8: 153 - 171.
165. Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., und Nilius, B.: The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 12-8-2004; 430: 748 - 754.
166. von Arnim, U., Peitz, U., Vinson, B., Gundermann, K. J., und Malfertheiner, P.: STW 5, a phytopharmakon for patients with functional dyspepsia: results of a multicenter, placebo-controlled double-blind study. *American Journal of Gastroenterology* 2007; 102: 1268 - 1275.
167. Wang, R.: Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 2002; 16: 1792 - 1798.
168. Ward, S. M., Bayguinov, J., Won, K. J., Grundy, D., und Berthoud, H. R.: Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol.* 6-10-2003; 465: 121 - 135.
169. Weber, E., Neunlist, M., Schemann, M., und Frieling, T.: Neural components of distension-evoked secretory responses in the guinea-pig distal colon. *J Physiol* 2001; 536: 741 - 751.
170. Wegener, T. und Wagner, H.: The active components and the pharmacological multi-target principle of STW 5 (Iberogast((R))). *Phytomedicine.* 2006; 13 Suppl 1: 20 - 35.
171. Wong, G. Y. und Gavva, N. R.: Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res.Rev.* 2009; 60: 267 - 277.
172. Wunderlich, J. E., Needleman, B. J., Chen, Z., Yu, J. G., Wang, Y., Grants, I., Mikami, D. J., Melvin, W. S., Cooke, H. J., und Christofi, F. L.: Dual purinergic synaptic transmission in the human enteric nervous system. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2008; 294: G554 - G566.

## Literatur

173. Wynn, G., Rong, W., Xiang, Z., und Burnstock, G.: Purinergic mechanisms contribute to mechanosensory transduction in the rat colorectum. *Gastroenterology* 2003; 125: 1398 - 1409.
174. Xue, J., Askwith, C., Javed, N. H., und Cooke, H. J.: Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface. *Auton. Neurosci.* 30-4-2007; 133: 55 - 63.
175. Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., und Wang, R.: The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.* 1-11-2001; 20: 6008 - 6016.
176. Zhuang, Z. Y., Xu, H., Clapham, D. E., und Ji, R. R.: Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *Journal of Neuroscience* 22-9-2004; 24: 8300 - 8309.

## 5. Zusammenfassung

Die sekretorische Aktivität der Darmschleimhaut (Mukosa) spielt eine wichtige Rolle bei der Verdauung, des Transportes und der Barriereeigenschaft des Darms. Die mukosale Sekretion steht unter anderem unter dem Einfluss von Nerven, die zum enterischen Nervensystem oder dem extrinsischen autonomen Nervensystem gehören. Daneben beeinflussen lokale, nicht nervale Mechanismen die mukosale Sekretion. Insbesondere die nervale Regulation der mukosalen Sekretion wurde fast ausschließlich im Meerschweinchen untersucht.

Die vorliegende Arbeit fasst verschiedene Projekte zusammen, die ein übergeordnetes Ziel hatten, nämlich einige der weitgehend unbekanntenen Regulationsmechanismen der mukosalen Sekretion im Humandarm zu untersuchen. Der erste Teil fasst die Studien über die grundlegenden Mechanismen der sekretorischen Aktivität des Humandarmes zusammen. Hierfür wurden funktionelle Untersuchungen mit der Ussingkammer Voltage Clamp Methode durchgeführt, um Signalkaskaden auf epithelialer und neuroepithelialer Ebene zu untersuchen. Exemplarisch wurde in dem nächsten Projekt der Einfluss von Serotonin, als eines der funktionell bedeutendsten Signalmoleküle im Darm, auf die Sekretion untersucht. Eine weitere Studie beschäftigte sich mit dem Wirkmechanismus eines zur Behandlung funktioneller Darmstörungen eingesetzten Phytopharmakons, insbesondere seinen Einfluss auf die mukosale Sekretion. Abschließend wird in drei Teilprojekten die Rolle von Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) als Neuromodulator im Maus-, Meerschweinchen- und Humandarm charakterisiert.

Alle Humanpräparate stammen aus der pathologisch unauffälligen Region von Darmresektaten, die auf Grund eines Karzinoms im Gastrointestinaltrakt, akuten oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Darmpolypen und Stenosen entnommen wurden. An über tausend Mukosa/Submukosa Präparaten von Dünn- und Dickdarm des Menschen wurden grundlegende Eigenschaften der durch elektrische Feldstimulation (EFS) nerval stimulierten Sekretionsantwort und des basalen Gewebswiderstandes bestimmt. Die EFS-Antworten und der basale Gewebswiderstand waren unabhängig von Geschlecht, Alter und Erkrankung der Patienten. Der basale Gewebswiderstand im Dünndarm war geringer als im Dickdarm. Die nerval stimulierten Antworten wurden durch Transmitter des enterischen Nervensystems vermittelt, während extrinsische Nerven der

Darm-Hirn-Achse an der EFS-Antwort nicht beteiligt waren. Als primäre pro-sekretorische Transmitter wurden Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) und Acetylcholin identifiziert. Die an der neural vermittelten Sekretion beteiligte cholinerge Komponente war, im Gegensatz zu Befunden in Tiermodellen, im humanen Dünn- und Dickdarm unterschiedlich ausgeprägt. Im humanen Dickdarm spielten die cholinerg vermittelten Mechanismen nur eine untergeordnete Rolle, während im Dünndarm, mit Ausnahme des Jejunums, die cholinerge Komponente dominierte. Die neural induzierte Sekretion wurde über Aktivierung epithelialer Chloridkanäle vermittelt.

Serotonin ist einer der wichtigsten Botenstoffe im Darm. Welche funktionelle Rolle Serotonin im humanen enterischen Nervensystem spielt, war weitgehend unbekannt. Wir konnten zeigen, dass Serotonin enterische Nerven durch Aktivierung postsynaptischer 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren erregt. Immunhistochemische Markierungen und Expressionsstudien zeigten, dass es sich um heteromere 5-HT<sub>3A/B</sub> Rezeptoren handelt. Anders als bei allen bisher untersuchten Tiermodellen besteht das funktionelle Korrelat der 5-HT<sub>3</sub> vermittelten Aktivierung submuköser Nervenzellen aber nicht in einer erhöhten Chloridsekretion. Serotonin führte zwar auch im Humandarm zu einer Sekretionssteigerung, an der jedoch primär 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren beteiligt waren.

Das Phytotherapeutikum Iberogast<sup>®</sup> wird erfolgreich zur Behandlung von Reizmagen und Reizdarm eingesetzt. Über die Wirkung von Iberogast<sup>®</sup> auf den Darm, im speziellen die Sekretion, gab es keine Untersuchungen. Wir konnten zeigen, dass Iberogast eine pro-sekretorische Wirkung im humanen Darm hat, die sowohl epithelial als auch neural vermittelt war. An der erhöhten Chloridsekretion waren der cAMP abhängige CFTR (Cystic fibrosis transmembrane regulator) und der Kalziumaktivierte CaCC Chloridkanal beteiligt.

H<sub>2</sub>S ist nicht nur ein übel riechendes Gas, sondern neben NO und CO der dritte „Gasotransmitter“. Als solcher beeinflusst H<sub>2</sub>S zahlreiche physiologische Organfunktionen und seine Rolle in der Pathophysiologie von Entzündungen, kardiovaskulären Erkrankungen und neuralen Störungen wird zunehmend realisiert. Bis zu unseren Untersuchungen war die Wirkung von H<sub>2</sub>S im humanen Darm unbekannt. Wir konnten zeigen, dass H<sub>2</sub>S eine pro-sekretorische Wirkung in Darmpräparaten des Menschen, Meerschweinchens und der Maus hatte. In Darmpräparaten von Mensch und Meerschweinchen erzeugte Schwefelwasserstoff Tetrodotxin- und Capsaicin sensitive Sekretionsantworten. Dieser Befund deutete auf die zentrale Rolle von Nerven,

## Zusammenfassung - Summary

insbesondere TRPV1 (transient receptor potential receptor Vanilloid1) exprimierenden viszerale Afferenzen, für die H<sub>2</sub>S Wirkung hin. Dementsprechend konnte die pro-sekretorische H<sub>2</sub>S Wirkung durch Defunktionalisierung viszeraler Afferenzen mit Capsaicin und Applikation von vier selektiven TRPV1 Antagonisten verhindert werden. Umfangreiche pharmakologische Studien zeigten, dass die pro-sekretorische H<sub>2</sub>S Antwort neben einer TRPV1 Aktivierung auch durch die Stimulation intrazellulärer Kalziumabhängiger und Phosphatidylinositol3 Kinase vermittelter Signalwege zustande kommt. Die Ergebnisse im Mausmodell zeigten, dass H<sub>2</sub>S unterschiedliche, spezieabhängige Wirkmechanismen hat, obwohl H<sub>2</sub>S auch im Maudarm eine pro-sekretorische Wirkung hatte. Im Maudarm führt H<sub>2</sub>S zu einer ATP-abhängigen Aktivierung viszeraler Afferenzen. Die pro-sekretorische H<sub>2</sub>S Wirkung im Maudarm scheint primär auf einer direkten Aktivierung von Epithelzellen zu beruhen



## 6. Summary

Mucosal secretion in the intestine plays an important role in digestion, transport and barrier functions. Secretion is controlled by nerves belonging to the intrinsic enteric nervous system or extrinsic efferent and afferent nerves. In addition, local non-neural mechanisms influence secretion. Almost all what we know about neural regulation of mucosal functions is based on studies performed in guinea-pigs.

This thesis summarises studies aimed to reveal the vastly unknown regulation of mucosal secretion in the human intestine. The first part deals with basic mechanisms of mucosal secretion in the human gut recorded with the Ussing chamber voltage clamp technique. These studies describe signalling pathways at the epithelial and neuroepithelial level. The next project investigated the pro-secretory mode of action of serotonin which is one of the most important signalling molecules in the gut. The action profile of herbal drug used to treat functional gut disorders was investigated in the third project. Last but not least, three separate studies dealing with the neuromodulator role of hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) and its mode of action in the mouse, guinea-pig and human gut are summarised.

All human tissue used in his study were macroscopically normal samples from resected gut areas. The reasons for surgery were: carcinoma, acute or chronic inflammation, polyps and stenosis. Basal secretion and nerve induced (EFS) secretion as well as tissue resistance was measured in over thousand mucosa/submucosa preparations from small and large intestine. It is noteworthy that nerve evoked secretion and tissue resistance was independent of age, gender and underlying diseases. As expected the basal tissue resistance was lower in the small than large intestine. The nerve evoked secretion was mediated by transmitters of the enteric nervous system without appreciable contribution of extrinsic nerves. The main pro-secretory transmitters were vasoactive intestinal peptide (VIP) and acetylcholine. In particular the cholinergic component showed region specific contributions to the nerve mediated secretory response. While a cholinergic component were clearly revealed in the small intestine, except in the jejunum, nerve induced secretion in the large intestine had a strong VIPergic and an almost negligible cholinergic component. The transmitters activated epithelial chloride channels.

Serotonin is one of the most important signalling molecules in the gut. However, its action in the human gut, in particular its neural effects and its influence on secretion are

unknown. We could show with neuroimaging and expression studies that serotonin activates enteric neurons via postsynaptic heteromeric 5-HT<sub>3A/B</sub> receptors. In contrast to studies performed in animal models, activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors did not cause secretion in the human intestine. Serotonin also caused an increased secretion in the human intestine which, however, was mimicked by a 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists.

The herbal drug Iberogast<sup>®</sup> is successfully used to treat functional dyspepsia and irritable bowel syndrome. We wanted to study its secretory action profile to provide mechanistic insights into its clinical use. Iberogast<sup>®</sup> very potently enhanced secretion, an effect mediated by its direct activation of epithelial cells as well as by its stimulatory effect on enteric nerves. Interestingly, this drug enhanced secretion by activation of cAMP dependent CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) channels as well as calcium dependent chloride channels.

Today, H<sub>2</sub>S is considered as one of the three gasomediators, besides nitric oxide and carbon monoxide. As such it influences a huge variety of physiological organ functions but is at the same time involved in the pathophysiology of inflammatory, cardiovascular and neural disorders. Its effect on intestinal functions was poorly studied. We discovered a pro-secretory action of H<sub>2</sub>S in the human, guinea-pig and mouse intestine. In the human and guinea-pig intestine this effect was neurally mediated because it was blocked by the neurotoxin tetrodotoxin and by defunctionalisation of capsaicin sensitive extrinsic fibers. This result suggested a crucial role for TRPV1 (transient receptor potential receptor vanilloid 1) expressing visceral afferents. This was supported by the finding that four selective but chemically distinct TRPV1 antagonists inhibited the H<sub>2</sub>S induced secretion. Extensive pharmacological interventions revealed in addition a role for intracellular calcium as well as phosphatidylinositol 3 kinase dependent signalling pathways. The results in the mouse intestine highlighted species specific mode of actions of H<sub>2</sub>S. The pro-secretory effect of H<sub>2</sub>S in the mouse intestine was very likely a direct activation of epithelial cells while the excitatory effect on visceral afferents involved ATP signalling rather than activation of TRPV1.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AChE	.....	Acetylcholinesterase
ATP	.....	Adenosintriphosphat
CaCC	.....	Kalzium-aktivierte Chloridkanäle
cAMP	.....	cyklisches Adenosinmonophosphat
CBS	.....	Cystathionine-β-synthase
CFTR	.....	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	.....	cyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	.....	Calcitonin gene related peptide
ChAT	.....	Cholinacetyltransferase
CIC	.....	spannungsabhängige Chloridkanäle
CO	.....	Kohlenmonoxid
CSE	.....	Cystathionine-γ-lyase
DAG	.....	Diacylglycerol
EC Zellen	.....	enterochromaffine Zellen
ENaC	.....	epitheliale Natriumkanäle
ENS	.....	enterisches Nervensystem
EPAN	.....	extrinsische primäre afferente Neurone
GALT	.....	gut associated lymphoid tissue
H <sub>2</sub> S	.....	Schwefelwasserstoff
IBS	.....	irritable bowel syndrome
ICC	.....	interstitielle Zellen von Cajal
IP3	.....	Inositoltriphosphat
IPAN	.....	intrinsische primär afferente Neurone
IR	.....	immunoreaktiv
Isc	.....	Kurzschluss-Strom
M-Zellen	.....	microfold Zellen
NaHS	.....	Natriumhydrogensulfat
NK	.....	Neurokinin
NKCC1	.....	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter
NO	.....	Stickstoffmonoxid
PI3K	.....	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	.....	Protinkinase A
SMP	.....	Plexus submucosus
SOC	.....	store operated Kalziumkanäle
SP	.....	Substanz P
TRP	.....	Transient Receptor potential
TRPA	.....	Transient receptor potential Ankyrin
TRPC	.....	Transient receptor potential kanonisch
TRPM	.....	Transient receptor potential Melastatin
TRPP	.....	Transient receptor potential Polycystin
TRPV	.....	Transient receptor potential Vanilloid.
TTX	.....	Tetrodotoxin
VIP	.....	Vasoactives intestinales Peptid
ZNS	.....	zentrales Nervensystem

# Appendix 1

K. Michel, F. Zeller, R. Langer, H. Nekarda, D. Kruger, T.J. Dover, C. A. Brady,  
N.N. Barnes, M. Schemann

Serotonin excites neurons in the human submucous plexus via 5-HT<sub>3</sub> receptors  
Gastroenterology 2005; 128:1317-1326

## **Contributions**

**D. Krueger:** study design of Ussing chamber experiments, generation and analysis of data on serotonin induced secretion, drafting the manuscript.

K. Michel: generation and analysis of Neuroimaging data, drafting the manuscript

T.J. Dover, C.A. Brady, N.N. Barnes: 5-HT<sub>3</sub> receptor expression studies.

F. Zeller, R. Langer, H. Nekarda: tissue supply.

M. Schemann: study design, grant support, manuscript editing.

## Serotonin Excites Neurons in the Human Submucous Plexus via 5-HT<sub>3</sub> Receptors

KLAUS MICHEL,\* FLORIAN ZELLER,† RUPERT LANGER,§ HJALMAR NEKARDA,¶ DAGMAR KRUGER,\* TERRI J. DOVER,|| CATHERINE A. BRADY,|| NICHOLAS M. BARNES,|| and MICHAEL SCHEMANN\*

\*Department of Human Biology, Technische Universität Munich, Freising; †Department of Surgery, Clinical Center Freising, Freising;

§Department of Pathology, Technische Universität München, Munich, Germany; ||Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Department of Pharmacology, Division of Neuroscience, The Medical School, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom; and

¶Department of Surgery, Technische Universität Munich, Munich, Germany

**Background & Aims:** Serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) is a key signaling molecule in the gut. Recently, the neural 5-HT<sub>3</sub> receptor received a lot of attention as a possible target in functional bowel diseases. Yet, the 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated changes in properties of human enteric neurons is unknown. **Methods:** We used a fast imaging technique in combination with the potentiometric dye 1-(3-sulfonatopropyl)-4-[β[2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium betaine to monitor directly the membrane potential changes in neurons of human submucous plexus from surgical specimens of 21 patients. An Ussing chamber technique was used to study 5-HT<sub>3</sub> receptor involvement in chloride secretion. **Results:** Local microejection of 5-HT directly onto ganglion cells resulted in a transient excitation of enteric neurons characterized by increased spike discharge. This response was mimicked by the 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, 2-methyl-5-HT, and blocked by the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, tropisetron. The proportions of 5-HT-responsive nerve cells per ganglion ranged from 25.5% ± 18.4% in the duodenum to 54.2% ± 46.9% in the colon. Interestingly, 2-methyl-5-HT did not evoke chloride secretion in the human intestine but it did in the guinea-pig intestine. Specific 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunit immunoreactivity as well as 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> receptor-specific messenger RNA were detected in the tissue samples. Based on co-labeling with the pan-neuronal marker HuC/D we conclude that submucous nerve cells potentially express heteromeric 5-HT<sub>3A/B</sub> receptors. **Conclusions:** We show that 5-HT excited human enteric neurons via 5-HT<sub>3</sub> receptors, which may comprise both 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunits.

Serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) is one of the key signaling molecules in the gut and is released from interneurons in the enteric nervous system and, more importantly, from an endocrine cell type in the mucosa, the enterochromaffin cell. 5-HT can be released in response to several stimuli such as mechanical distortion, mucosal stroking, or electrical stimulation of en-

teric neurons.<sup>1-3</sup> On release, 5-HT activates enteric neurons to affect motor responses in the gut.<sup>2,4,5</sup> In the guinea pig, modulation of peristaltic activity by 5-HT involves neural 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, and/or 5-HT<sub>1P</sub> receptors.<sup>2</sup> The crucial role of 5-HT for transmission within enteric circuits and initiation of normal reflex activity<sup>6-9</sup> has been expanded by studies that suggested impairment of serotonergic mechanisms as one of the factors in the pathogenesis of gut diseases. Thus, it has been reported that the number of enterochromaffin cells together with the amount of released 5-HT is increased in guinea pigs with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis.<sup>10</sup> Mice lacking the high-affinity serotonin transporter show altered motility patterns frequently associated with diarrhea,<sup>11</sup> although in some animals diarrhea occasionally alternated with constipation. These changes in motility and secretion are reminiscent of the symptoms in patients with irritable bowel syndrome. It therefore may be relevant to the present study that high affinity 5-HT transporter-deficient mice have altered expression and functions of 5-HT<sub>3</sub> receptors reflected by changes in 5-HT<sub>3</sub> receptor affinity and desensitization.<sup>12</sup>

By extrapolation from animal studies, a central role for serotonin in the human gut is likely and the 5-HT<sub>3</sub> receptor in particular has been proposed as an attractive target for treatment of functional bowel disorders.<sup>9,13</sup> Indeed, 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists are very effective in relieving symptoms associated with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome such as abdominal pain,

**Abbreviations used in this paper:** CCD, charge coupled device; Di-8-ANEPPS, 1-(3-sulfonatopropyl)-4-[β[2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium betaine; DMPP, 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; Isc, short-circuit current; NK, neurokinin; RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS-T, Tris-buffered saline and .1% Tween 20; TX100, Triton X-100.

© 2005 by the American Gastroenterological Association

0016-5085/05/\$30.00

doi:10.1053/j.gastro.2005.02.005

increased stool frequency, and changed stool consistency.<sup>14,15</sup> The increased number of enterochromaffin cells in postinfectious irritable bowel syndrome patients<sup>16</sup> further implicates a role for 5-HT in irritable bowel syndrome pathogenesis.

Although 5-HT<sub>3</sub> receptors are involved in the initiation and/or transmission of muscle and secretory reflex activity in the guinea-pig gut, they do not appear to be crucial for the peristaltic reflex in healthy humans<sup>17</sup> and 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated effects, if present at all, are not characterized in the human enteric nervous system.

To address this lack of knowledge, the aim of this study was to investigate, at a cellular level, 5-HT effects and in particular the 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated responses in the human submucous plexus using our recently established multisite optical recording technique in combination with voltage-sensitive dyes as the method to monitor neural activity at a single cell level in the human enteric nervous system.<sup>18</sup> In addition, we performed immunohistochemical studies to show the presence of 5-HT<sub>3</sub> receptor subunits and used Ussing chamber techniques to evaluate 5-HT<sub>3</sub>-mediated changes in mucosal chloride secretion.

## Materials and Methods

### Tissue Samples

Human tissue samples of small and large bowel were obtained from 28 patients undergoing surgery in the Departments of Surgery at the Medical Clinic in Freising and the Medical Clinic of the Technische Universität in München. Diagnoses that led to the surgery were as follows: carcinoma of the small or large bowel (19 patients), polyposis (1 patient), diverticulitis (3 patients), Crohn's disease (1 patient), ovarian cancer (2 patients), pancreatic carcinoma (1 patient), and ulcerative colitis (1 patient). All procedures were approved by the ethics committee of the Technische Universität München (project approval 744/02).

### Tissue Preparation

The multisite optical recording technique method was described previously in detail.<sup>18,19</sup> After removal from the patient the tissue was placed in cold oxygenated sterile Krebs solution containing (in mmol/L): 117 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, and 11 glucose (all chemicals from Sigma, Steinheim, Germany). It then was transported rapidly to the laboratory for experiments. The tissue was cut along the mesenteric border and pinned flat, mucosa down, in a dissection dish containing ice-cold sterile oxygenated Krebs solution that was exchanged every 10 minutes. The tissue was dissected by carefully removing the mucosa and the muscle layers under a dissection microscope to obtain preparation of the inner submucous plexus. The final tissue sizes were 5 × 10 mm and they were

pinned onto a Sylgard ring (Dow Corning, Midland, MI) that was placed in a recording chamber with a 42-mm diameter glass bottom (130- to 170- $\mu$ m thickness; Sauer, Reutlingen, Germany) and was perfused continuously with 37°C Krebs solution gassed with Carbogen (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>; Linde Gas, Unterschleissheim, Germany) equilibrated at pH 7.4. Some preparations were kept overnight in organ culture. For this purpose the preparations were pinned onto the Sylgard rings, transferred to a sterile Petri dish, and then washed in sterile Krebs solution (3 × 10 min) under a laminar-flow workbench. After this, the preparation was covered with culture medium (Dulbecco's modified Eagle medium/F12, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 IU/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 2.75  $\mu$ g/mL amphotericin B, 20  $\mu$ g/mL gentamicin, 2.1 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>; all from Sigma) and placed on a rocking tray in an atmosphere of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator.

The tissue chamber was mounted onto an epifluorescence Olympus IX 50 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a 150 W xenon arc lamp (Osram, Munich, Germany) that was connected to a stabilized power supply (OptiQuip, Highlands Mills, NY). Controlled illumination of the preparation was achieved by a software-operated shutter (Uniblitz D122; Vincent Associates, New York, NY). In the majority of experiments, illumination periods of 1.3–4 seconds were used. Individual ganglia were stained with the fluorescent voltage-sensitive dye 1-(3-sulfonatopropyl)-4-[ $\beta$ [2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium betaine (Di-8-ANEPPS; Molecular Probes Mobitec, Göttingen, Germany) by local pressure application through a microejection pipette loaded with 20  $\mu$ mol/L Di-8-ANEPPS. Di-8-ANEPPS was solubilized in Krebs solution containing pluronic F-127 (final concentration in the spritz pipette .014%; Molecular Probes) dissolved in dimethyl sulfoxide (final concentration .125% in the spritz pipette; Sigma, Deisenhofen, Germany). The glass pipette was manipulated in close contact to the ganglia and pressure ejection (2 psi) pulses of 400 ms to 1.2 seconds were used to apply the dye. During the staining period it was possible to follow and to assess the progress of the labeling by briefly illuminating the ganglion. In a previous study in which we combined intracellular and optical recording we found that dye staining the nerve cells did not change their electrical or synaptic properties.<sup>19</sup> Di-8-ANEPPS-stained neurons were visualized with 40× or 100× oil immersion objectives (40×: UAPO/340, 100×: SPlanApo100; both from Olympus) by using a filter cube equipped with a 545- ± 15-nm excitation interference filter, a 565-nm dichroic mirror, and a 590-nm barrier filter (Olympus).

We used fast neuroimaging methods based on multisite optical recording techniques to monitor membrane potential changes directly in all ganglion cells at a single cell level. The fluorescent images of the ganglia were acquired and processed by the Neuro-CCD (charge coupled device) system (RedShirtImaging, Fairfield, CT). The Neuro-CCD system consists of a CCD camera with a resolution of 70 × 70 pixels and the software for acquisition, processing, and storage of the data.

Frames were acquired at frequencies of up to 1.6 kHz. To reduce noise and minimize the effects of bleaching, the data of individual pixels were filtered with a band pass of 3–300 Hz. By using the 40× objective a spatial resolution of 22 μm<sup>2</sup> was achieved. The multisite optical recording technique set-up measured the fluorescence intensity in arbitrary units and calculated the relative change in fluorescence, which was related linearly to changes in the membrane potential  $V_m$ .<sup>19,20</sup> To ensure proper staining and viability of the neurons it was possible to stimulate interganglionic fiber tracts with a 25-μm Teflon-coated platinum electrode connected to a stimulator (Grass S88; Grass-Telefactor, West Warwick, RI) with a constant voltage isolation unit (Grass SIU-5). Electrical pulses had durations of 300 μs and amplitudes varying between 1 and 6 V. 5-HT (Sigma) or the 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 2-methyl-5-HT (Tocris/Biotrend, Cologne, Germany) were applied to single ganglia by pressure ejection (2 psi, 100–800 ms) from microejection pipettes that were placed close to the ganglion (80–100 μm) with the help of a micromanipulator. The concentration of 5-HT and 2-methyl-5-HT in the pipette was 1 mmol/L. 5-HT and 2-methyl-5-HT solutions were made freshly from frozen aliquots just before experiments (10 mmol/L stock dissolved in Krebs solution). In some experiments the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist tropisetron (gift of Sandoz Pharma (now Novartis), Basel, Switzerland) was used in the superfusing Krebs solution at a concentration of .1 μmol/L. Equilibration time after beginning the superfusion with tropisetron containing Krebs solution was at least 8 minutes.

To analyze the proportions of 5-HT- or 2-methyl-5-HT-sensitive or -nonsensitive cells we counted the dye-labeled neuronal cell bodies per ganglion. Individual cells can be visualized because the dye incorporates into the membrane revealing the outline of individual cell bodies. The overlay of signals and ganglion image allowed us to analyze the response of individual cells (see Figure 1).

### Ussing Chamber Experiments

To test the effect of 2-methyl-5-HT on chloride secretion in intact submucosa/mucosa preparations from human intestine we used the Ussing chamber technique. The preparations were mounted in Ussing chambers with a recording area of 1.08 cm<sup>2</sup>. Mucosal and serosal sides were bathed separately in Krebs solution. The solution was maintained at 37°C and continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The transepithelial potential difference was measured by Krebs-agar bridges on each side of the tissue, which were connected to calomel half cells. A pair of Ag/AgCl electrodes was connected to a voltage clamp apparatus (VCC 600; Physiologic Instruments, Houston, TX) that compensated for the solution resistance between the electrodes. The tissue could be stimulated electrically by electrodes made from aluminum foil, which were placed on either side of the tissue. The stimulating electrodes were connected to a constant voltage stimulator (Grass SD-9). Stimulation was achieved by delivering a train of pulses to the tissue (stimulation parameters were as follows:

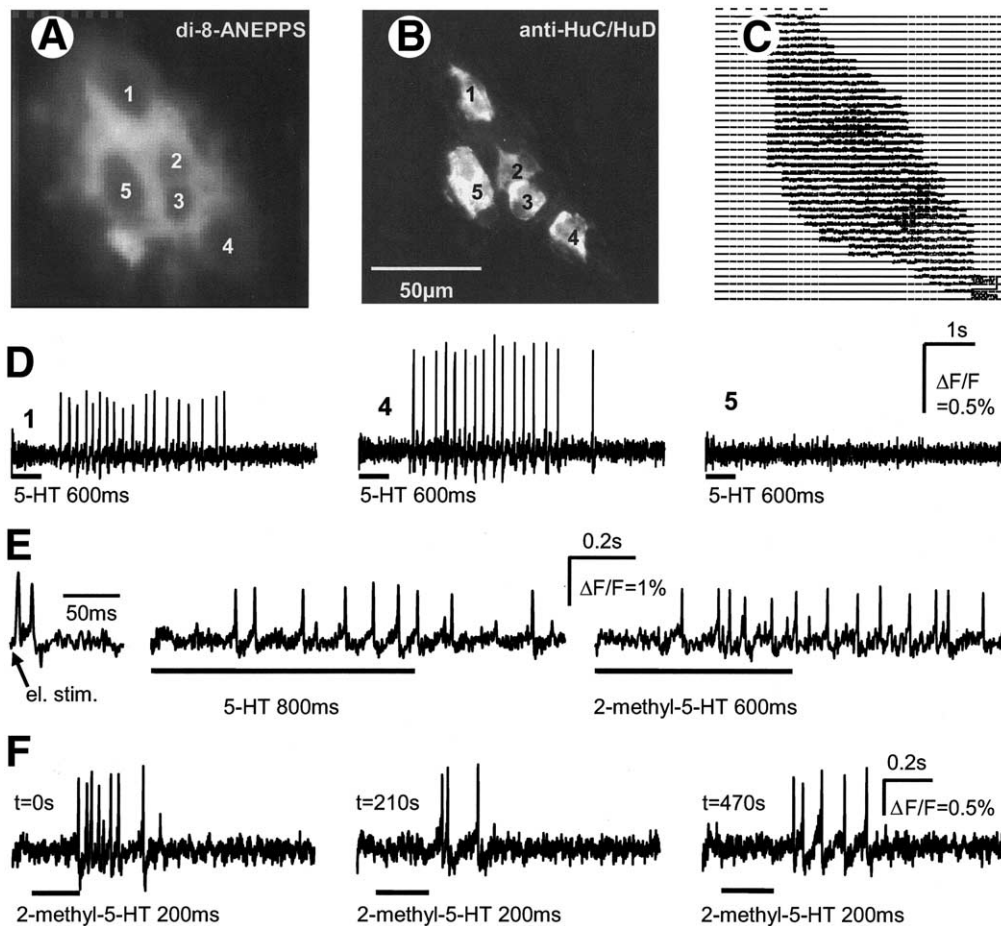
pulse amplitude, 16 V; pulse frequency, 10 Hz; pulse duration, 1 ms; train duration, 10 s). 2-methyl-5-HT or 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide (DMPP; Sigma) were added to the serosal side of the preparation. Before starting the actual measurements the tissues were allowed to equilibrate for at least 30 minutes. Control experiments were performed with mucosa/submucosa preparations from the proximal guinea pig colon.

### Immunohistochemistry

Tissue specimens were fixed overnight at room temperature in a solution containing 4% paraformaldehyde and .2% picric acid in .1 mol/L phosphate buffer and then washed (3 × 10 min) in phosphate buffer. Until further processing the samples were stored at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS) containing .1% NaN<sub>3</sub>. Whole-mount preparations containing the inner submucous plexus first were incubated in PBS (1 hour, room temperature; buffer changed every 10 min) followed by incubation (1 hour, room temperature) in PBS plus Triton X-100 (TX100; .3%) and normal goat serum (3%). For the immunohistochemical detection of 5-HT<sub>3</sub> receptor antibodies against the 5-HT<sub>3B</sub> subunit (AP86/3) or the 5-HT<sub>3A</sub> subunit (MSD-3A) were used (for specificity see text and<sup>21–23</sup>). The antibody against the 5-HT<sub>3B</sub> subunit is directed against an extracellular sequence that does not contain the DEMR motif that causes the cross-reactivity of other 5-HT<sub>3</sub> receptor antibodies with pre-prosomatostatin.<sup>24</sup> Because both antibodies were generated in rabbits, it was not possible to perform double-labeling experiments. The tissue was incubated in PBS/TX100 and normal goat serum (3%) (and bovine serum albumin 5% for the incubation with the anti-5-HT<sub>3A</sub> subunit antibody) containing the primary antibodies at a dilution of 1:2500 for anti-5-HT<sub>3B</sub> or 1:1000 for anti-5-HT<sub>3A</sub>. After washing in PBS/TX100, the tissue was incubated with goat anti-rabbit immunoglobulin G conjugated to AlexaFluor 568 at a concentration of 1:300. After washing, the tissue was stained with the mouse anti-human neuronal protein HuC/HuD antibody (mouse anti Hu, A21271; Molecular Probes Mobitec), which served as a general neuronal marker (see earlier for staining protocol). To label the HuC/D antibody we used donkey anti-mouse Cy2 as a secondary antibody (1:200; Dianova, Hamburg, Germany). After the final washing, the tissues were mounted on coverslips. For the inspection of the tissue an Olympus microscope (BX61 WI; Olympus) with appropriate filter blocks was used. The microscope was equipped with a SIS Fview II CCD camera and the analySIS 3.1 software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) for image acquisition and analysis.

### Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Three preparations from 3 patients were separated into 3 layers, namely the mucosal, submucosa including submucous plexus, and muscle layers including the myenteric plexus, and immediately snap frozen in liquid nitrogen. RNA from gut



**Figure 1.** 5-HT had an excitatory effect on a subset of human submucous neurons. (A) Fluorescent image of a submucous ganglion taken with the CCD camera from the NeuroCCD system at a resolution of  $70 \times 70$  pixels. Individual neurons of the ganglion can be distinguished by the strong staining of the outer membrane; all cell bodies are numbered from 1 to 5. (B) Cell counts were verified by staining with the pan-neuronal HuC/D, which labeled 5 neuronal cell bodies. The change in fluorescence intensity is shown in D for 3 of these neurons. (C) Position of the CCD detectors in  $2 \times 2$  binned mode, which was used for the measurement. In this graph the signals of the CCD detectors are shown in an extremely condensed mode. The outline of the ganglion shown in A can be seen. Because with this magnification many detectors record the activity of 1 nerve cell the data from the detectors that monitor the activity of individual neurons were binned to give the traces shown in D. (D) The expanded traces from CCD signals show the responses of neurons 1, 4, and 5 to pressure applications of 600 ms 5-HT (black bar). Two neurons showed a discharge of action potentials, whereas neuron 5 showed no effect. (E) Responses of the same neuron to single-pulse electrical stimulation of interganglionic fiber tracts, 5-HT, and 2-methyl-5-HT. Electrical stimulation evoked 2 responses: the first signal is a compound action potential arising from nerve fibers and the second response is a fast excitatory postsynaptic potential-triggered action potential. A pressure application of 5-HT (800 ms) or 2-methyl-5-HT (600 ms) onto the same neuron revealed similar responses (action potential discharge) that lasted throughout the recording period of 1.26 s. (F) The transient rapidly desensitizing 5-HT<sub>3</sub>-mediated response. The first application of 2-methyl-5-HT evoked a response that lasted for 288 ms discharging 7 action potentials. Partial recovery occurred 210 s after the first application with a response duration of 187 ms discharging 3 action potentials. Recovery of the response 470 s after the first application with a response duration of 313 ms discharging 5 action potentials.

tissue (approximately 30 mg) or HEK293 cells ( $5 \times 10^6$ ) was harvested using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Southampton, UK), according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from  $\sim 1.5$ – $3 \mu\text{g}$  of RNA extracted from human gut tissue, using the reverse-transcriptase ImPromII,  $.5 \mu\text{g}$  of oligo deoxythymidine, 20 U RNasin ribonuclease inhibitor, and 2.5 mmol/L  $\text{MgSO}_4$  (all from Promega) according to the manufacturer's instructions. cDNA amplification by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was achieved using Biomate Red (Bioline, London, UK) with 50 pmol of h5-HT<sub>3A</sub> or

h5-HT<sub>3B</sub> forward and reverse primers (h5-HT<sub>3A</sub> forward: 5'-gcagcagcccgtgctctgcttg-3', reverse: 5'-gggactttgtctgtgctt-3'; h5-HT<sub>3B</sub> forward: 5'-tggtcaagaccagtgtg-3', reverse: 5'-tagctt-tggaagagcagctcg-3') with 1  $\mu\text{L}$  of cDNA as a template. Thermal cycling was performed as follows: an initial denaturation step of 94°C for 15 minutes, 50 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds (1 min for h5-HT<sub>3B</sub>), and 72°C for 1 minute, followed by a final extension step of 72°C for 10 minutes (B. Niesler, personal communication and Niesler et al<sup>25</sup>). Reactions subsequently were analyzed by agarose gel (1% wt/vol) electrophoresis.



### Immunohistochemistry With HEK293 Cells

Formaldehyde-fixed HEK293 cells, adhered to microscope slides, were washed extensively (in PBS) at room temperature. Cells then were incubated in PBS/TX100 (the presence of the detergent, TX100, would allow antibody to penetrate the intracellular compartment) for 1 hour at room temperature before incubation in PBS/normal goat serum (3%)/TX100 (.3%) for a further hour at room temperature before incubation in primary antibody (1:500 of either MSD-3A or AP86/3, which recognize the h5-HT<sub>3A</sub> and h5-HT<sub>3B</sub> receptor subunits, respectively) diluted in PBS/normal goat serum (3%)/TX100 (.3%) overnight at 4°C. The cells then were washed extensively in PBS/TX100 (.3%) before incubation in secondary antibody (1:200 goat anti-rabbit fluorescein-labeled; Vector Laboratories, Peterborough, UK) in PBS/normal goat serum (3%)/TX100 (.3%) for 2 hours at room temperature. Cells then were mounted after extensive washing and viewed with an epifluorescence microscope. Images were captured using a digital camera with Lucia (Nikon, Kingston upon Thames, UK) software.

### Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis/Western Blotting

Membrane preparations were made of untransfected HEK 293 cells, HEK 293 cells stably transfected with the 5-HT<sub>3A</sub> cDNA and/or the 5-HT<sub>3B</sub> cDNA, or human gut tissue. Briefly, cells or tissue were resuspended in protease inhibitor solution (50 mmol/L Tris, pH 7.6, plus 10 µg/mL each of leupeptin, aprotinin, pepstatin, 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride) and homogenized (Polytron; Kinematika, Basel, Switzerland) for 10 seconds on full power, before centrifugation (4°C; 22,000 × g; 10 min). After removal of the supernatant, the pellets were resuspended in Tris-protease inhibitor solution and recentrifuged. The resulting pellet then was resuspended in 10 mmol/L Tris/1% sodium dodecyl sulfate (SDS) for storage at -80°C.

Before SDS polyacrylamide gel electrophoresis, the membrane preparations were defrosted and equal volumes of 2 × reducing buffer (.5 mol/L Tris, 20% glycerol, 200 mmol/L dithiothreitol, and bromophenol blue) were added. The samples then were sonicated (3 min), boiled for 5 minutes, and centrifuged (1 min, 13,000 × g).

Electrophoresis was performed on a .75-mm acrylamide gel (acrylamide: bisacrylamide 37.5:1, Protogel, National Diagnostics, East Riding of Yorkshire, UK; 3.5% stacking gel, 10% resolving gel) using a Bio-Rad Mini Protean II gel electrophoresis system (BioRad, Hemel Hempstead, UK). Proteins initially were separated at 60 V until the leading dye front reached the top of the resolving gel. The voltage then was increased to 120 V until the gel had run to completion.

After SDS polyacrylamide gel electrophoresis separation of proteins, a Semi-Dry Transfer Cell (75 mA, 1 hour; Biometra, Goettingen, Germany) was used to transfer protein from the gel to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon Millipore Corporation, Watford, UK). The polyvinylidene diflu-

oride membrane was washed in Tris-buffered saline and .1% Tween 20 (TBS-T) for 5 minutes before being placed in 5% dried skimmed milk (Marvel dried milk; Premier Foods, St. Albans, UK)/TBS-T for 3 hours to reduce nonspecific binding of the antibodies. This was followed by a brief wash in TBS-T before incubation in AP86/3 (1:500 in 5% Marvel/TBS-T) for at least 12 hours at 4°C.

After extensive washing in TBS-T, the polyvinylidene difluoride membrane was incubated in a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1000 in 5% Marvel/TBS-T) for 1 hour, followed by extensive washing in TBS-T. The immunoreactivity was visualized by incubation of the polyvinylidene difluoride membrane with a commercial peroxidase substrate (SuperSignal Chemiluminescent; Pierce Biotechnology, Rockford, IL) for 3 minutes before exposure to ECL Hyperfilm (Amersham, Piscataway, NJ). The film then was developed by using standard photographic procedures.

### Data Analysis and Statistics

The total number of neurons for each ganglion was determined by visual inspection of images from the Di-8-ANEPPS-stained ganglion. These images were taken from the ganglion during the experiment with the CCD camera at the highest possible resolution (70 × 70 pixels). During the analysis of the optical data, traces of all detectors of the CCD camera were projected onto the corresponding image of the ganglion. Signals from individual nerve cells then were obtained by manually binning the detectors that recorded activity from that particular cell. For each ganglion, the percentage of nerve cells responding to the application of 5-HT or 2-methyl-5-HT was calculated. For most of the analyses these values then were averaged per patient. All data are expressed as mean ± SD if not otherwise indicated. To detect differences between the different bowel regions a 1-way analysis of variance was performed (Systat 10.2; Systat Software Inc., Erkrath, Germany). For the dose-response analysis a 1-way repeated-measures analysis of variance was used. A *P* value of .05 or less was considered statistically significant.

## Results

### Neuroimaging

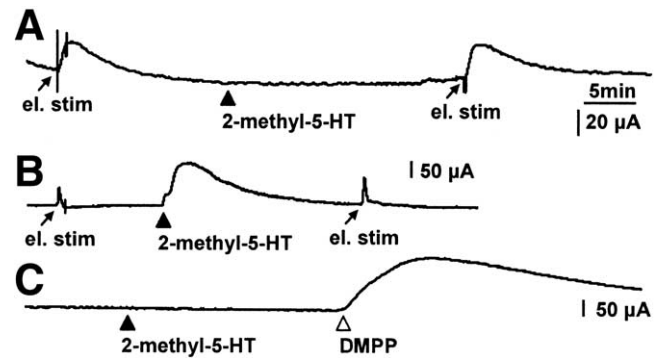
Experiments were performed on 24 preparations from 21 patients (10 men, 11 women; mean age: 62.3 ± 15.7 years; range, 31–89 years). A total of 50 ganglia containing 421 nerve cells were analyzed. The mean number of nerve cells per ganglion was 8.4 ± 6.1 (range, 1–40).

Application of 5-HT or the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 2-methyl-5-HT to ganglion cells in the submucous plexus resulted in an excitatory response in 33 of 50 ganglia (Figure 1). Only in 2 preparations from 2 patients (4 ganglia, 31 neurons) were we unable to evoke any responses to 5-HT or 2-methyl-5-HT. The response consisted of an immediate discharge of action potentials

in 1 or more nerve cells of the ganglia or an increase in spike discharge in spontaneously active nerve cells. To keep dye bleaching to a minimum we used multiple relatively short recording periods of 1.256 seconds that yielded reproducible responses in most preparations. By using longer recording periods of several seconds in preparations from 3 patients we were able to evaluate the total duration of the response. In these preparations the mean duration of the 5-HT response was  $3.1 \pm .9$  seconds (8 neurons, 2 patients) to microinjection pulses of 400- to 800-ms duration (Figure 1). The duration of the response to 2-methyl-5-HT was determined in 2 neurons from 1 patient and was  $1.4 \pm .1$  s. The frequency of action potential discharge in response to the application of 5-HT or 2-methyl-5-HT was  $6.4 \pm 4.3$  Hz (11 neurons, 4 patients) and  $4.3 \pm 2.4$  Hz (12 neurons, 2 patients), respectively, and was not significantly different. None of these 23 nerve cells that were used for this analysis showed action potential discharge before drug application. The rate of action potential discharge increased with longer duration of 5-HT or 2-methyl-5-HT pressure application, suggesting a dose-dependent effect. During a recording period of 1.2 seconds the number of action potentials after a 200-ms, 400-ms, 600-ms, and 800-ms pressure application was  $4.5 \pm 2.8$ ,  $5.2 \pm 4.6$ ,  $6.9 \pm 4.5$ , and  $8.8 \pm 5.4$ , respectively (based on 25 neurons from 8 ganglia in 7 preparations).

There was no significant difference in the proportion of neurons responding to 5-HT or 2-methyl-5-HT. The relative number of neurons per ganglion responding to 5-HT was  $36.8\% \pm 31.6\%$  (based on 18 patients, 32 ganglia, 224 neurons) and  $32.2\% \pm 24.6\%$  for 2-methyl-5-HT (based on 5 patients, 18 ganglia, 197 neurons). Detailed analysis of the distribution revealed that in relatively high percentages of ganglia (32%) none of the neurons responded to 5-HT or 2-methyl-5-HT.

Both substances evoked transient rapidly desensitizing responses with similar time courses (Figure 1). There was no significant difference in the proportion of 5-HT-responsive neurons between male and female patients (male,  $42.5\% \pm 33\%$ , 10 patients; female,  $32\% \pm 29.6\%$ , 11 patients,  $P = .45$ ). No significant differences in the proportion of 5-HT-responsive nerve cells were found between the different gut regions ( $P = .57$ ). The proportion of neurons responding to 5-HT was  $25.5\% \pm 18.4\%$  for the duodenum (2 patients),  $36.1\% \pm 13.6\%$  for the ileum (3 patients),  $54.2\% \pm 46.9\%$  for the colon (not further specified) (5 patients),  $17.9\% \pm 20.3\%$  for the colon sigmoideum (3 patients), and  $38.0\% \pm 24.8\%$  for the rectum (7 patients). In 1 preparation of the cecum (1 patient), 4.8% of the neurons responded to the application of 5-HT.

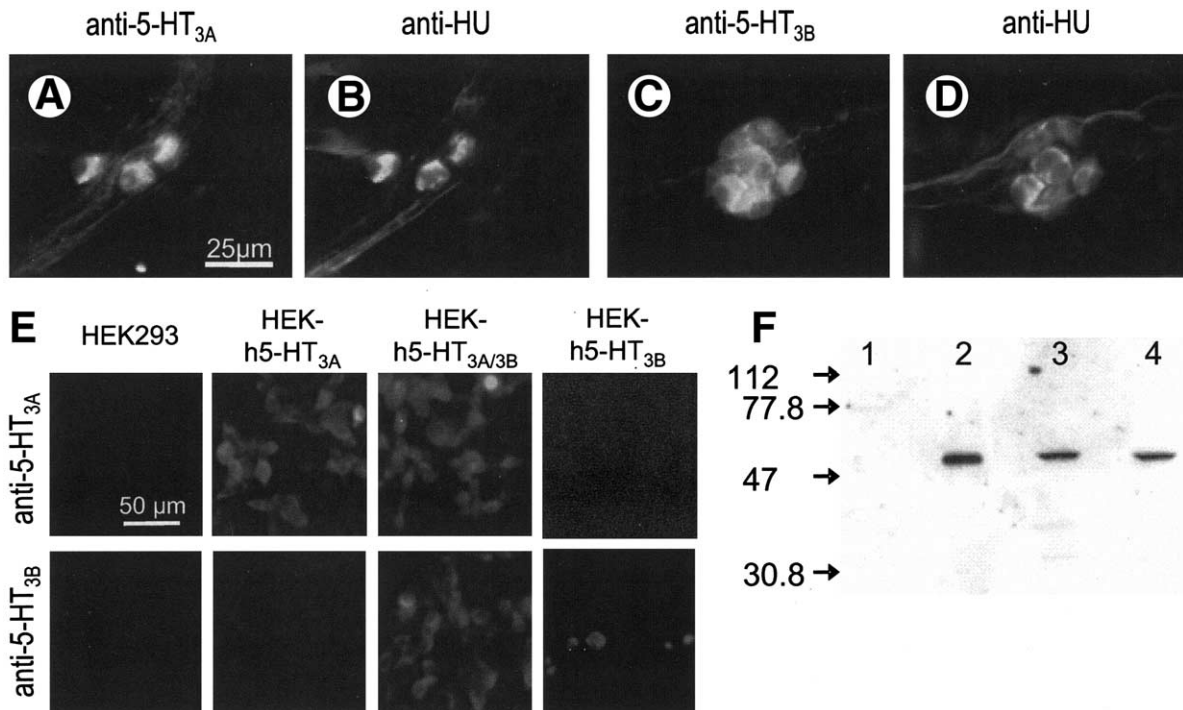


**Figure 2.** 5-HT<sub>3</sub> receptor activation did not evoke an increase in Isc (chloride secretion) in human mucosa/submucosa preparations (Ussing chamber experiment). (A) Serosal application of 10  $\mu\text{mol/L}$  2-methyl-5-HT (▲) had no effect on Isc in a human colon preparation whereas electrical stimulation of the preparation (arrows) before and after 2-methyl-5-HT evoked a transient increase in Isc, showing the viability of the preparation. (B) In contrast, serosal application of 10  $\mu\text{mol/L}$  2-methyl-5-HT (▲) onto guinea pig proximal colon evoked a prominent increase in Isc. The tissue also was stimulated electrically before and after the application of 2-methyl-5-HT (arrows). Note the different scale bars for Isc in A and B. (C) A human colon preparation did not respond to 2-methyl-5-HT (▲) but showed a prominent increase in Isc after addition of the nicotinic agonist DMPP (Δ).

The 5-HT response was mimicked by the 5-HT<sub>3</sub> agonist 2-methyl-5-HT (Figure 1). The effect of the 5-HT<sub>3</sub>-receptor blocker tropisetron<sup>3,26</sup> supports the involvement of 5-HT<sub>3</sub> receptors. Tropisetron at a concentration of .1  $\mu\text{mol/L}$  was applied to 4 ganglia in 4 preparations for a total of 26 neurons. Of these 26 neurons, 13 responded to 5-HT with a discharge of action potentials and this activation was blocked totally by tropisetron in 9 neurons. In the remaining 4 neurons the number of 5-HT-evoked action potentials was decreased significantly to  $40\% \pm 18\%$  by tropisetron.

### Ussing Chamber Experiments

Ussing chamber measurements were performed in 27 muscle-stripped mucosa-submucosa preparations from 11 patients (7 men, 4 women; 10 large intestine, 1 small intestine). Activation of the submucous plexus by field stimulation evoked a transient increase in short-circuit current (Isc) of  $12.8 \pm 5.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n = 4$ ). Serosal application of up to 10  $\mu\text{mol/L}$  2-methyl-5-HT evoked no change in Isc ( $\Delta\text{Isc} = -.06 \pm .28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $n = 11$ , mean  $\pm$  SEM), whereas parallel experiments on preparations of the guinea pig proximal colon showed a clear increase in Isc after the addition of 2-methyl-5-HT (Figure 2). In 18 preparations from 7 patients 2-methyl-5-HT (10  $\mu\text{mol/L}$ ) and the nicotinic agonist DMPP (10  $\mu\text{mol/L}$ ) were given consecutively. In all of these experiments DMPP evoked a marked increase of Isc ( $42.8 \pm 19.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $n = 7$ , mean  $\pm$  SEM) (Figure 2).



**Figure 3.** Immunohistochemical demonstration of the 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunits. (A) Immunolabeling of a ganglion in the human submucous plexus with an antibody against the 5-HT<sub>3A</sub> subunit. (B) The same ganglion as in A stained with an antibody against the human neuronal protein HuC/HuD, which labels all neurons. All anti-HuC/HuD-positive neurons are immunoreactive for the 5-HT<sub>3A</sub> antibody. (C) Immunolabeling of another human submucous ganglion with an antibody against the 5-HT<sub>3B</sub> subunit. (D) The same ganglion as in C stained with anti-HuC/HuD. All anti-HuC/HuD-positive neurons are immunoreactive for the 5-HT<sub>3B</sub> antibody. Scale bar in A applies also for B–D. (E) Ability of antibody MSD-3A (1:500) and AP86/3 (1:500) to recognize selectively the h5-HT<sub>3A</sub> and h5-HT<sub>3B</sub> subunit, respectively, in HEK293 cells stably expressing the h5-HT<sub>3A</sub> subunit (HEK-5-HT<sub>3A</sub>) or both the h5-HT<sub>3A</sub> and h5-HT<sub>3B</sub> subunits (HEK-5-HT<sub>3A/3B</sub>) or HEK293 cells transiently transfected with the h5-HT<sub>3B</sub> subunit (HEK-h5HT<sub>3B</sub>) or untransfected HEK293 cells (HEK293). All pictures for a given primary antibody result from the same exposure. Typical fields are displayed from a single experiment that was repeated 3 times. Scale bar applies to all panels. (F) Detection of h5-HT<sub>3B</sub>-like immunoreactivity by SDS polyacrylamide gel electrophoresis/Western blot. Lane 1, HEK293 cells stably expressing with h5-HT<sub>3A</sub> subunit (5.0 μg protein); lane 2, HEK293 cells stably expressing both the h5-HT<sub>3A</sub> and h5-HT<sub>3B</sub> subunits (5.0 μg protein); lane 3, large intestine (13.0 μg protein); lane 4, small intestine (13.8 μg protein). Data shown are from a single representative experiment that was repeated 3 times.

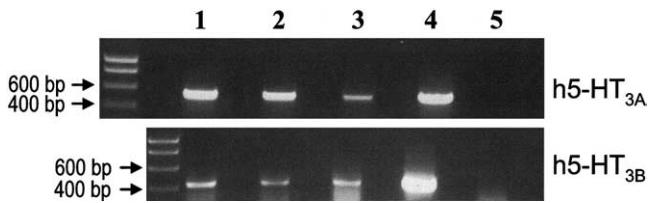
### Immunocytochemistry and RT-PCR

Both the MSD-3A and AP86/3 antibodies have been used previously to label the 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> subunits, respectively.<sup>21–23</sup> Furthermore, additional data reported herein further verified the specificity of these antibodies. Thus, in immunocytochemical studies, MSD-3A and AP86/3 only detected immunoreactivity in HEK293 cells transfected with the h5-HT<sub>3A</sub> and h5-HT<sub>3B</sub> subunits, respectively (Figure 3). In addition, AP86/3 recognized a single band of an appropriate estimated molecular weight after SDS polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting of HEK293 cells heterologously expressing the h5-HT<sub>3B</sub> subunit, but not just the h5-HT<sub>3A</sub> subunit; a comparable immunoreactive band was evident with the human gut tissue preparations (Figure 3). Similar to others,<sup>23</sup> we were unable to use successfully the antibody MSD-3A for Western blot studies using tissue or whole-cell samples.

Double-labeling experiments were performed with anti-HuC/HuD as a general neuronal marker and antibodies directed either against the 5-HT<sub>3A</sub> subunit or the 5-HT<sub>3B</sub> subunit.

Because both receptor antibodies were generated in rabbits, this prevented co-labeling for 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> subunits. Individual labeling of both receptor subunits revealed that all anti-HuC/HuD-positive nerve cells in the submucous plexus also were immunoreactive for both the 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> subunits, suggesting the expression of heteromeric 5-HT<sub>3A/3B</sub> subunits in the human submucous plexus (Figure 3).

In addition to using antibodies to show expression of the 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> subunits within the gut tissue, RT-PCR using specific primers for either the h5-HT<sub>3A</sub> or h5-HT<sub>3B</sub> subunit transcripts generated specific products of the appropriate size when using templates derived from the human gut samples or



**Figure 4.** Detection of h5-HT<sub>3A</sub> and h5-HT<sub>3B</sub> mRNA by RT-PCR. RT-PCR products resolved on 1% agarose gels using primers specific for h5-HT<sub>3A</sub> subunit (top) and h5-HT<sub>3B</sub> subunit (bottom) transcripts. Lane 1, muscle layers/myenteric plexus; lane 2, mucosa; lane 3, submucosa/submucous plexus; lane 4, HEK293 cells stably expressing the h5-HT<sub>3A</sub> subunit (top) or HEK293 cells stably expressing the h5-HT<sub>3A</sub> and h5-HT<sub>3B</sub> subunits (bottom); lane 5, no template. Results shown for each reaction are from a single representative experiment repeated at least 3 times (predicted size of RT-PCR products; h5-HT<sub>3A</sub> 555 bp and h5-HT<sub>3B</sub> 445 bp are consistent with the sizes resulting from HyperLadder I (Bioline, London, UK); far left lane for each gel).

appropriate cell lines heterologously expressing the subunits (Figure 4).

## Discussion

With this study we showed the presence of functional 5-HT<sub>3</sub> receptors that on activation excited neurons in the human submucous plexus. This conclusion is based on the finding that the 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, 2-methyl-5-HT, mimicked the excitatory 5-HT response, and that a selective concentration of the 5-HT<sub>3</sub> antagonist, tropisetron, antagonized the response to 5-HT. The tropisetron-insensitive component of the 5-HT response that was detected in a few enteric nerve cells suggests the involvement of additional 5-HT receptor subtypes. 5-HT<sub>3</sub> receptors already have been shown electrophysiologically in myenteric and submucous neurons of other species.<sup>12,27–31</sup> The duration of 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated excitation in human enteric neurons is comparable with data obtained in guinea pig.<sup>32</sup>

One striking result in human submucosa/mucosa preparations was that we had no notable effect of 2-methyl-5-HT on chloride secretion. This is in contrast to findings in guinea pigs or rats for which activation of neuronal 5-HT<sub>3</sub> receptors increased chloride secretion.<sup>33–35</sup> In principle, activation of ligand-gated ion channels was possible because the nicotinic agonist DMPP readily increased chloride secretion in the same tissues. Our results in the human colon agree with a previous study that could not show any involvement of 5-HT<sub>3</sub> receptors in chloride secretion in the human jejunum.<sup>36</sup> Although we may exclude an involvement of 5-HT<sub>3</sub> receptors in chloride secretion we cannot rule out a possible effect on secretion or absorption of other ions.

Although a 5-HT<sub>3</sub>-mediated increase in spike discharge was detected in one third of submucous neurons

we found positive staining for 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunits in virtually all neurons of the submucous plexus. Such discrepancies are not uncommon and have been reported previously in guinea-pig enteric nerve cells where neurokinin (NK)-1-evoked responses did not correlate with NK-1 receptor immunohistochemistry.<sup>37</sup> Because with the multisite optical recording technique we reliably only show responses that lead to the generation of action potentials we may miss small-amplitude depolarizations not associated with action potentials. Such subthreshold 5-HT<sub>3</sub>-mediated responses have been encountered using intracellular studies on guinea-pig enteric neurons<sup>32,38</sup> and, therefore, we may have underestimated the proportion of human enteric neurons responding to 5-HT. Another explanation for the discrepancy between our immunohistochemical and electrophysiologic data may be that not all of the receptors shown immunohistochemically are functional. This possibility would be supported by the finding that although nicotinic acetylcholine receptors have been shown immunohistochemically on Dogiel type II neurons in the guinea pig enteric nervous system, the majority of these neurons did not receive nicotinic input.<sup>39–41</sup> Because the immunohistochemical demonstration of 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> subunits in our preparations yielded only qualitative data we cannot comment on the density of receptor subunits on different neuron populations in our preparations. Although both subunits appear to be present in all neurons, differences in the expression profile might occur. Further support for the expression of both the h5-HT<sub>3A</sub> and h5-HT<sub>3B</sub> subunits in the gut tissue came from our RT-PCR studies using selective primers for each subunit.

The immunohistochemical demonstration of both 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunits, potentially forming heteromeric 5-HT<sub>3A/B</sub> receptors in our preparations of the human submucous plexus, is in line with the high degree of co-expression of the 2 subunits in other peripheral neurons such as rat superior cervical and nodose ganglia.<sup>42</sup> It is likely that the co-expression of the 2 receptor subunits in the human submucous plexus has functional implications that need to be investigated further when substances with selectivity for either subunit become available. A recent study in mice has shown that one of the determinants for the function of 5-HT<sub>3</sub> receptors is the amount of coexpression of 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> subunits. In knockout mice that lack the high-affinity 5-HT transporter the expression of 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunits is down-regulated, thus leading to faster desensitization and lower affinity of 5-HT<sub>3</sub> receptors to serotonin.<sup>12</sup> For human 5-HT<sub>3</sub> receptors it has been shown that homomeric 5-HT<sub>3A</sub> and heteromeric 5-HT<sub>3A/B</sub> receptors

differ in their biophysical and biochemical properties.<sup>43–45</sup>

In summary, we have shown the presence of 5-HT<sub>3</sub> receptors on a considerable proportion of human submucous neurons and found strong evidence for the involvement of heteromeric 5-HT<sub>3A/B</sub> receptors in the excitatory 5-HT response. Ussing chamber measurements, however, showed no involvement of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the mediation of chloride secretion.

## References

- Bülbring E, Crema A. The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa. *J Physiol (Lond)* 1959;146:18–28.
- Foxx-Orenstein AE, Kuemmerle JF, Grider JR. Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea pig intestine. *Gastroenterology* 1996;111:1281–1290.
- Pan H, Gershon MD. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J Neurosci* 2000;20:3295–3309.
- Bertrand PP, Kunze WA, Furness JB, Bornstein JC. The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. *Neuroscience* 2000;101:459–469.
- Hicks GA, Coldwell JR, Schindler M, Ward PA, Jenkins D, Lynn PA, Humphrey PP, Blackshaw LA. Excitation of rat colonic afferent fibres by 5-HT(3) receptors. *J Physiol* 2002;544:861–869.
- Bulbring E, Lin RC. The effect of intraluminal application of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on peristalsis; the local production of 5-HT and its release in relation to intraluminal pressure and propulsive activity. *J Physiol* 1958;140:381–407.
- Bulbring E, Crema A. Observations concerning the action of 5-hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. *Br J Pharmacol* 1958;13:444–457.
- Cooke HJ, Sidhu M, Wang YZ. Activation of 5-HT<sub>1P</sub> receptors on submucosal afferents subsequently triggers VIP neurons and chloride secretion in the guinea-pig colon. *J Auton Nerv Syst* 1997;66:105–110.
- Hansen MB. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res* 2003;52:1–30.
- Linden DR, Chen JX, Gershon MD, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. *Am J Physiol* 2003;285:G207–G216.
- Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, Gershon MD. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J Neurosci* 2001;21:6348–6361.
- Liu MT, Rayport S, Jiang Y, Murphy DL, Gershon MD. Expression and function of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the enteric neurons of mice lacking the serotonin transporter. *Am J Physiol* 2002;283:G1398–G1411.
- Gershon MD. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13(Suppl 2):15–30.
- Camilleri M. Management of the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2001;120:652–668.
- Talley NJ. Serotonergic neuroenteric modulators. *Lancet* 2001;358:2061–2068.
- Dunlop SP, Jenkins D, Spiller RC. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1578–1583.
- Bjornsson ES, Chey WD, Ladabaum U, Woods ML, Hooper FG, Owyang C, Hasler WL. Differential 5-HT<sub>3</sub> mediation of human gastrocolonic response and colonic peristaltic reflex. *Am J Physiol* 1998;275:G498–G505.
- Schemann M, Michel K, Peters S, Bischoff SC, Neunlist M. Cutting-edge technology. III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. *Am J Physiol* 2002;282:G919–G925.
- Neunlist M, Peters S, Schemann M. Multisite optical recording of excitability in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 1999;11:393–402.
- Kao WY, Davis CE, Kim YI, Beach JM. Fluorescence emission spectral shift measurements of membrane potential in single cells. *Biophys J* 2001;81:1163–1170.
- Monk SA, Desai K, Brady CA, Williams JM, Lin L, Princivalle A, Hope AG, Barnes NM. Generation of a selective 5-HT<sub>3B</sub> subunit-recognising polyclonal antibody; identification of immunoreactive cells in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 2001;41:1013–1016.
- Kia HK, Miquel MC, McKernan RM, Laporte AM, Lombard MC, Bourgoin S, Hamon M, Verge D. Localization of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat spinal cord: immunohistochemistry and in situ hybridization. *Neuroreport* 1995;6:257–261.
- Turton S, Gillard NP, Stephenson FA, McKernan RM. Antibodies against the 5-HT<sub>3A</sub> receptor identify a 54 kDa protein affinity-purified from NCB20 cells. *Mol Pharmacol* 1993;3:161–171.
- Mazzia C, Hicks GA, Clerc N. Neuronal location of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor-like immunoreactivity in the rat colon. *Neuroscience* 2003;116:1033–1041.
- Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 2003;310:101–111.
- Burks TF. Neurotransmission and neurotransmitters. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. Volume 1. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994:211–242.
- Johnson DS, Heinemann SF. Detection of 5-HT<sub>3R-A</sub>, a 5-HT<sub>3</sub> receptor subunit, in submucosal and myenteric ganglia of rat small intestine using in situ hybridization. *Neurosci Lett* 1995;184:67–70.
- Bertrand PP, Kunze WA, Bornstein JC, Furness JB, Smith ML. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am J Physiol* 1997;273:G422–G435.
- Surprenant A, Crist J. Electrophysiological characterization of functionally distinct 5-hydroxytryptamine receptors on guinea-pig submucous plexus. *Neuroscience* 1988;24:283–295.
- Mawe GM, Branchek TA, Gershon MD. Peripheral neural serotonin receptors: identification and characterization with specific antagonists and agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:9799–9803.
- Schemann M. 5-Hydroxytryptamine-mediated response in myenteric neurons of the guinea pig gastric corpus: effect of ICS 205-903 and cisapride. *J Gastrointest Motil* 1991;3:255–262.
- Michel K, Sann H, Schaaf C, Schemann M. Subpopulations of gastric myenteric neurons are differentially activated via distinct serotonin receptors: projection, neurochemical coding, and functional implications. *J Neurosci* 1997;17:8009–8017.
- Hendriks R, Bornstein JC, Furness JB. Evidence for two types of 5-hydroxytryptamine receptor on secretomotor neurons of the guinea-pig ileum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989;339:409–414.
- Stoner MC, Scherr AM, Lee JA, Wolfe LG, Kellum JM. Nitric oxide is a neurotransmitter in the chloride secretory response to serotonin in rat colon. *Surgery* 2000;128:240–245.

35. Budhoo MR, Harris RP, Kellum JM. 5-Hydroxytryptamine-induced Cl-transport is mediated by 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 1996;298:137–144.
36. Kellum JM, Albuquerque FC, Stoner MC, Harris RP. Stroking human jejunal mucosa induces 5-HT release and Cl(-) secretion via afferent neurons and 5-HT(4) receptors. *Am J Physiol* 1999; 277:G515–G520.
37. Moore BA, Vanner S, Bunnett NW, Sharkey KA. Characterization of neurokinin-1 receptors in the submucosal plexus of guinea pig ileum. *Am J Physiol* 1997;273:G670–G678.
38. Wade PR, Wood JD. Actions of serotonin and substance P on myenteric neurons of guinea-pig distal colon. *Eur J Pharmacol* 1988;148:1–8.
39. Kirchgessner AL, Liu MT. Immunohistochemical localization of nicotinic acetylcholine receptors in the guinea pig bowel and pancreas. *J Comp Neurol* 1998;390:497–514.
40. Neunlist M, Dobrova G, Schemann M. Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *J Physiol (Lond)* 1999;517:533–546.
41. Nurgali K, Furness JB, Stebbing MJ. Correlation of electrophysiology, shape and synaptic properties of myenteric AH neurons of the guinea pig distal colon. *Auton Neurosci* 2003;103:50–64.
42. Morales M, Wang SD. Differential composition of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. *J Neurosci* 2002;22:6732–6741.
43. Brady CA, Stanford IM, Ali I, Lin L, Williams JM, Dubin AE, Hope AG, Barnes NM. Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT<sub>3A</sub> receptors versus heteromeric 5-HT<sub>3A/3B</sub> receptors. *Neuropharmacology* 2001;41:282–284.
44. Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA. A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Nature* 2003;424:321–324.
45. Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass CA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW, Erlander MG. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT(3A) receptor are specifically modified by a 5-HT(3B) receptor subunit. *J Biol Chem* 1999;274: 30799–30810.

---

Received January 8, 2004. Accepted February 2, 2005.

Address requests for reprints to: Professor Michael Schemann, Technische Universität Munich, Department of Human Biology, Hochfeldweg 2, D-85350 Freising-Weihenstephan, Germany. e-mail: schemann@wzw.tum.de; fax: (49) 8161-71-5785.

Supported by DFG Sche 267/5-1, 5-2, and the Wellcome Trust.

The authors thank Dr. McKernan from Merck Sharp & Dohme Research Laboratories for the generous supply of the 5-HT<sub>3A</sub> antibody. The authors also thank Sebastian Hoff for the preparation of some human tissues.

# Appendix 2

D. Krueger, L. Gruber, S. Buhner, F. Zeller, R.Langer, S. Seidl, K. Michel, M. Schemann

The multi-herbal drug STW5 (Iberogast®) has prosecretory action in the human intestine

Neurogastroenterol Motil 2009; 21:1203-e110

## **Contributions**

**D. Krueger:** study design of Ussing chamber experiments, generation and analysis of data on Iberogast induced secretion in human tissue and T84 cell line, drafting the manuscript, grant support.

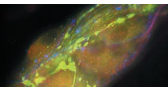
L. Gruber: help with Ussing chamber experiments in T84 cell line

S. Buhner: Neuroimaging studies

K. Michel: help with statistics

F. Zeller, R. Langer, S. Seidl: tissue supply.

M. Schemann: study design, grant support, manuscript editing.



## The multi-herbal drug STW 5 (Iberogast<sup>®</sup>) has prosecretory action in the human intestine

D. KRUEGER,\* L. GRUBER,\* S. BUHNER,\* F. ZELLER,† R. LANGER,‡ S. SEIDL,‡ K. MICHEL\* & M. SCHEMANN\*

\*Department of Human Biology, Technische Universität München, München, Germany

†Department of Surgery, Clinical Centre Freising, Freising, Germany

‡Department of Pathology, Technische Universität München, München, Germany

**Abstract** There is growing evidence that STW 5 (Iberogast<sup>®</sup>, fixed combination of hydroethanolic herbal extracts), besides being effective in functional dyspepsia, also improves symptoms in irritable bowel syndrome (IBS). Clinical data indicate that modulation of mucosal secretion is a promising approach to treat intestinal disorders associated with IBS. We therefore explored the effect of STW 5 on secretion in the human intestine and the mechanisms by which it acts. The Ussing chamber technique was used to measure mucosal secretion in human intestinal mucosa/submucosa preparations and in human epithelial cell line T84. In addition, we recorded STW 5 effects on human enteric neurons with voltage sensitive dye imaging. In human tissue and T84 cells STW 5 induced a dose-dependent increase in ion secretion that was significantly reduced by the Na–K–Cl cotransporter blocker bumetanide, the adenylate cyclase inhibitor MDL-12 330, the non-specific and selective cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibitors glibenclamide and CFTR<sub>inh</sub>-172, respectively, and the blocker of calcium dependent Cl<sup>-</sup> channels (ClCa) SITS (4-acetamido-4-isothiocyanatostilbene-2,2-disulphonic acid). It was unaffected by amiloride, a blocker of epithelial Na<sup>+</sup> channels. In human tissue, the nerve blocker tetrodotoxin significantly suppressed the STW 5 response. STW 5 evoked an increased spike discharge in 51% of human submucous neurons. Results suggest that STW 5 is a secretagogue in the human intestine by direct epithelial actions and through activation of

enteric neurons. The prosecretory effect is due to increased epithelial Cl<sup>-</sup> fluxes via CFTR and Ca-dependent ClCa channels. STW 5 may be a novel option to treat secretory disorders associated with IBS and constipation.

**Keywords** chloride secretion, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, enteric nervous system, human intestine, Iberogast.

### INTRODUCTION

STW 5 (Iberogast<sup>®</sup>) is a fixed combination of a fresh plant extract from bitter candytuft and drug extracts from greater celandine herb, angelica root, lemon balm leaves, peppermint leaves, caraway fruit, liquorice root, chamomile flower and milk thistle fruit. Several studies reported that all extract components contribute in a synergistic manner to the overall efficacy of the drug (for review).<sup>1</sup> STW 5 is best known for its beneficial effect in functional dyspepsia.<sup>2,3</sup> The inhibitory and excitatory action of STW 5 on motility of the proximal and distal stomach, respectively, may contribute to symptom relief in functional dyspepsia.<sup>4–6</sup>

Studies in experimental models demonstrated a broad action profile of STW 5 including modulation of muscle activity in the stomach,<sup>4</sup> radical scavenging,<sup>7</sup> anti-inflammatory<sup>8</sup> and antioxidative properties.<sup>9</sup> These actions very likely depend on local and systemic effects of STW 5 supported by the good bioavailability of lead substances characteristic for each of the extracts.<sup>10</sup> As for other multi-herbal drug preparations, the concept of multitargeting may improve treatment options for gut diseases that are associated with multifactorial disorders.<sup>11</sup> This is supported by clinical studies, which demonstrated that STW 5 improved the overall symptom score in irritable bowel (IBS) patients.<sup>12,13</sup> However, there are no data attempting to explore the mode of action of STW 5 in the intestine

#### Address for correspondence

Professor Michael Schemann, Human Biology, Technische Universität München, Hochfeldweg 2, D-85350 Freising-Weihenstephan, Germany.

Tel: 49 8161 71 5483; fax: 49 8161 71 5785;

e-mail: schemann@wzw.tum.de

Received: 25 September 2008

Accepted for publication: 3 November 2008



except for its motility modulating effects in rat and guinea-pig ileum *in vitro*.<sup>14</sup> STW 5 exhibits spasmolytic effects in precontracted but, at higher concentrations, it increases smooth muscle tone in relaxed muscle preparations. Sensori-motor dysfunctions in IBS include altered epithelial secretion very likely involving disturbed enteric network activity.<sup>15</sup> Recent studies demonstrated that linaclotide and lubiprostone, both of which increase fluid secretion, improve symptoms in constipation predominant IBS<sup>16,17</sup> and chronic constipation.<sup>18,19</sup> They also emphasized the potential of increasing fluid secretion for a novel approach to IBS treatment.<sup>16,17</sup>

We therefore hypothesized that STW 5 may modulate intestinal functions in humans and wanted to characterize its effect on secretion in the human intestine and in the human epithelial cell line T84. Furthermore, it was our aim to provide mechanistic insights into its mode of epithelial action.

## MATERIAL AND METHODS

### Tissue samples

Human tissue samples of small and large bowel were obtained from 79 patients (age, mean  $\pm$  SD: 68.8  $\pm$  12.6; 37 male, 42 female) undergoing surgery at the Medical Clinics in Freising and Munich. Diagnoses that led to the surgery were as follows: carcinoma (61 patients), diverticulitis of the sigmoid colon (10 patients), colon polyps (five patients), ileus (two patients) and unspecified bleeding (one patient). Samples were taken from macroscopically unaffected areas as determined by visual inspection of the pathologist (RL). Experiments were performed in 317 tissue preparations (275 colon, 11 rectum, 24 ileum and seven duodenum).

After removal, specimens were placed in cold, oxygenated, sterile Krebs solution and immediately transferred to the laboratory. All procedures were approved by the ethics committee of the Technische Universität München (project approval 1746/07). Segments were carefully dissected in ice-cold Krebs solution to obtain mucosa/submucosa preparations containing the submucous plexus.

### Human epithelial cell line T84

T84 cells (ECACC, Salisbury, UK) were seeded on Millipore filters (Bedford, MA, USA) with 0.45  $\mu$ m pore size, and incubated at 37 °C and 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (Carbogen) in Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's Nutrient Mixture F-12, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 IU mL<sup>-1</sup>

penicillin, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> streptomycin, 2.75  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> amphotericin B (all from Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) to attain a monolayer. The medium was replaced daily. After 12–14 days, filters were mounted in Ussing chambers for ion-transport studies.

### Ussing chamber experiments

To test the effects of STW 5 on ion transport in intact human mucosa/submucosa preparations and T84 cells, we used the Ussing voltage clamp technique (Easy Mount chambers, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA).<sup>20</sup> The tissue specimens were mounted into plexiglas Ussing chambers. The exposed tissue area was 0.5 cm<sup>2</sup>. Mucosal and serosal sides were bathed separately in 5 mL Carbogen-bubbled Krebs solution maintained at 37 °C. The experiments were performed employing the 4-electrode Ussing technique as previously described in detail.<sup>20</sup> The set-up allowed simultaneous measurements of up to eight mucosa/submucosa preparations dissected from one specimen. Parameters were the transepithelial, active electrogenic transport (short-circuit current,  $I_{sc}$ ) expressed in  $\mu$ A cm<sup>-2</sup>; the values were corrected for bath resistance. Positive  $I_{sc}$  indicated a net anion current from the serosa to the lumen. The tissue was electrically stimulated by silver electrodes placed on either side of the tissue and connected to a constant voltage stimulator (Grass SD-9; Astro-Med Inc., West Warwick, RI, USA). Neural stimulation of the tissue was achieved by delivering a train of pulses with supramaximal stimulus parameters: pulse amplitude, 20 V; pulse frequency 10 Hz; pulse duration 1 ms; train duration 10 s [electrical field stimulation (EFS)]. STW 5 and other drugs were either added to the serosal bathing solution (basolateral application) or the mucosal bathing solution (apical application). Before starting the actual measurements, the tissues were allowed to equilibrate for at least 30 min. No change of the pH (7.4) in the Krebs solution was observed with any of the drugs used in this study.

### Neuroimaging technique

The multisite optical recording technique (MSORT) is a fast imaging technique using a potentiometric dye that allows us to record action potential discharge in the human submucous plexus and has been previously described in detail.<sup>21</sup> Samples from the specimens also used for Ussing experiments were dissected to obtain preparations of the inner submucous plexus (5  $\times$  10 mm final size), then placed in a recording chamber and continuously perfused with Carbogen-gassed

37 °C Krebs solution (pH 7.4). Individual ganglia were stained with the fluorescent voltage sensitive dye Di-8-ANEPPS [1-(3-sulphonatopropyl)-4-[beta[2-(di-*n*-octylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium betaine (Molecular Probes Mobitec, Göttingen, Germany). Controlled illumination of the preparation did not exceed 5 s to avoid dye bleaching. Signals were acquired with a frequency of 1.6 kHz and processed by an array of 464 photodiodes (RedShirt Imaging, Decatur, GA, USA). The MSORT setup measures relative changes in fluorescence ( $\Delta F/F$ ) which are linearly related to changes in membrane potential.<sup>22</sup> The photodiode system is an AC-coupled system which allowed the recordings of action potential with the compromise that slowly developing, small amplitude changes in membrane potential are not detected. Dye staining of the nerve cells does not change their electrophysiological properties.<sup>22</sup>

STW 5 was applied to single submucous ganglia by pressure ejection from micropipettes (20 psi, 200 ms duration, approximately 200  $\mu\text{m}$  distance to the ganglion). According to previously published calibration curves,<sup>21</sup> the pipettes were filled with 5120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  STW 5 to achieve a concentration of about 512  $\mu\text{g mL}^{-1}$  at the ganglion level.

### Drugs and solutions

STW 5, the lyophilized liquid of Iberogast<sup>®</sup>, was provided by Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH Darmstadt, Germany. It was dissolved in Krebs buffer and added to the mucosal or serosal bathing solution yielding final concentrations ranging from 128 to 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The concentrations are well below the amount of 51.3 mg of STW 5 provided by one therapeutic serving of 20 drops (equivalent to 1 mL). The Krebs solution contained (in mmol L<sup>-1</sup>): 117 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub> and 11 glucose (all from Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Stock solutions of amiloride, 4-acetamido-4-isothiocyanatostilbene 2 (SITS), bumetanide, forskolin, glibenclamide, MDL-12 330 (all from Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) and CFTR<sub>inh</sub>-172 (Calbiochem Merck, Darmstadt, Germany) were prepared in 100% dimethyl sulphoxide. Tetrodotoxin (TTX; Tocris Cookson, Bristol, UK) was dissolved in water. At the final concentrations used none of the solvents had any effect on the transport properties of the tissues.

### Data analysis and statistics

Di-8-ANEPPS incorporates into the outer membrane revealing the outline of individual cell bodies. The

overlay of signals and ganglion image allowed us to analyse the response of individual cells.<sup>20</sup> The total number of neurones for each ganglion was determined by visual inspection of images from the Di-8-ANEPPS stained ganglion.

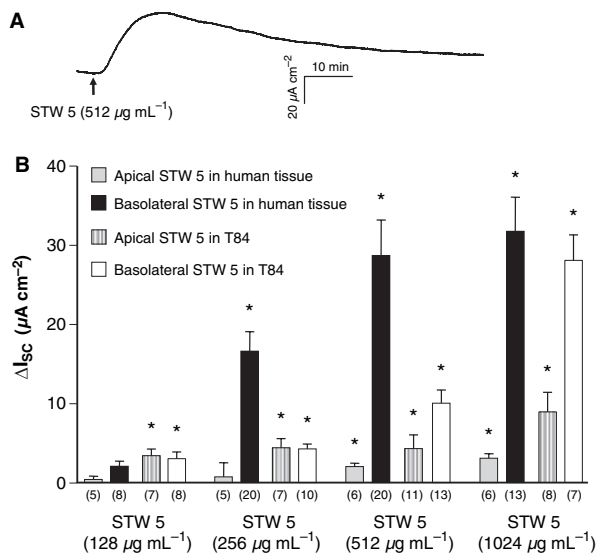
For Ussing chamber experiments, the statistical values are based on the number of patients (for experiments with human tissue) or filters (for experiments with T84). For the dose-dependent effects, we calculated the maximum increase in  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) which was tested with Student's paired *t*-test (SIGMASTAT 3.1; Systat Software Inc, Erkrath, Germany). Each dose was tested in a different tissue rather than cumulative applications in one tissue. The same test was used to test for differences in spike discharge of individual neurons. The data are illustrated as mean  $\pm$  standard error of means (SEM). The median effective concentrations (EC<sub>50</sub>) were calculated with SIGMASTAT Software using Hill equation curve fit function.

Blockers were added to the mucosa/submucosa preparations 20 min before STW 5 application. For each blocker, a separate tissue from a directly adjacent region served as a control for STW 5 effects in untreated preparations. STW 5 was applied at the same time to the control tissue and the pretreated tissue. The non-normally distributed data are expressed as their median together with the 10th, 25th, 75th and 90th percentiles and tested with the Mann–Witney Rank Sum test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Effect of STW 5 on intestinal secretion and activity of submucous neurons

Basolateral application of STW 5 to human intestinal tissues led to dose-dependent increase in  $I_{sc}$  with an EC<sub>50</sub> of 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 1). For 256, 512 and 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  STW 5, this increase was significant. In the same tissues, we recorded the response to EFS, which evoked nerve-mediated secretion. We found that the increase in  $I_{sc}$  evoked by 256, 512 and 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  STW 5 was 146%, 205% and 224%, respectively, greater than the EFS-evoked increase. The STW 5 response peaked after  $9.9 \pm 0.7$  min ( $n = 57$ ) independent of the concentration used and slowly declined to pre-STW 5 levels with mean durations of  $20.4 \pm 2.7$  min at 256  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $n = 10$ ),  $25.8 \pm 3.3$  min at 512  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $n = 14$ ) and  $29.6 \pm 4.1$  min at 1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $n = 10$ ). Apical application of STW 5 also evoked an increase in  $I_{sc}$  with an EC<sub>50</sub> of



**Figure 1** STW 5 evokes an increase in ion secretion in human tissue and in the epithelial cell line T84. Panel A shows the long lasting increase in short circuit current ( $I_{sc}$ ) after basolateral application (addition to the serosal bath) of STW 5 in human tissue; time of application is marked by the arrow. Panel B shows the dose-dependent increase in  $I_{sc}$  after basolateral and apical (addition to the mucosal bath) application in human tissue and in T84 cells. Numbers in parenthesis below the bars indicate the number of tissues (equal to number of patients) studied. Asterisks mark significant changes.

555  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 1). However, the effect was smaller and less robust than after basolateral STW 5 application.

The EFS evoked increase in  $I_{sc}$  was not changed by any of the STW 5 concentrations ( $21.3 \pm 2.8 \mu\text{A cm}^{-2}$  vs  $23.6 \pm 3.2 \mu\text{A cm}^{-2}$  measured after 1 h STW 5 incubation;  $P = 0.678$ ;  $n = 41$ ). However, two findings revealed a strong nerve-mediated component of the STW 5 response. Firstly, tetrodotoxin ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) significantly suppressed the STW 5-evoked increase in  $I_{sc}$  by  $75 \pm 11\%$  at  $256 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $68 \pm 12\%$  at  $512 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $76 \pm 12\%$  at  $1024 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 2A). Secondly, STW 5 had an excitatory action on human submucous neurons. Direct application of STW 5 onto colonic submucous ganglia via the ejection pipette elicited action potential discharge (Fig. 2B) in 27 of 46 neurons with  $51 \pm 18\%$  STW 5-responsive neurons per ganglion (four ganglia, three tissues and three patients). The spike frequency significantly increased from zero (all responsive neurons were quiescent) to  $2.4 \pm 0.2$  Hz.

The results so far suggested that STW 5 had a prosecretory action by direct effects on the epithelium and by activation of enteric neurons.

We further confirmed the direct epithelial effects by experiments in T84 cells. Basolateral application of

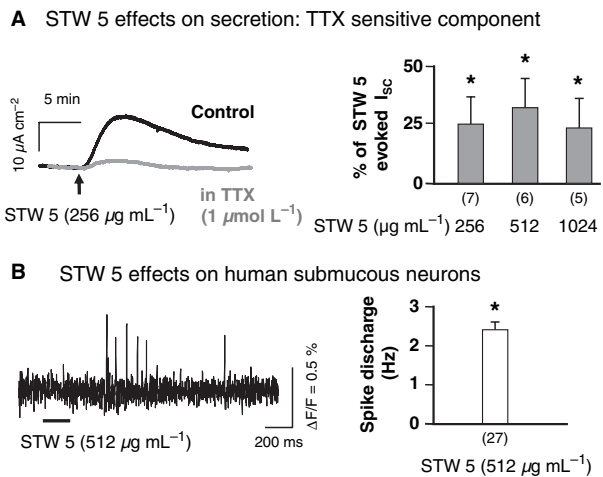
STW 5 led to a dose-dependent significant increase in  $I_{sc}$  with an  $\text{EC}_{50}$  of  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 1). The STW 5 response peaked after  $9.4 \pm 0.6$  min ( $n = 36$ ) independent of the concentration used and slowly declined to pre-STW 5 levels with mean durations of  $25.9 \pm 7.3$  min at  $128 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $n = 3$ ),  $25.2 \pm 5.0$  min at  $256 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $n = 7$ ),  $33.6 \pm 4.4$  min at  $512 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $n = 9$ ) and  $31.7 \pm 3.4$  min at  $1024 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $n = 6$ ). Apical application also caused a significant but smaller increase in  $I_{sc}$  with an  $\text{EC}_{50}$  of  $4241 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 1).

### Pharmacology of the STW 5 induced increases in $I_{sc}$

To further characterize the mode of action of basolateral application of STW 5, we applied specific blockers of ion channels and transporters in human mucosa/submucosa preparations and T84 cells. Due to the limited availability of human tissue, we performed these experiments with  $512 \mu\text{g mL}^{-1}$  STW 5 only, a concentration which produced robust responses in both models. The small response to apical application prevented a detailed evaluation of its pharmacology.

We first wanted to identify the ion flux responsible for the increase in  $I_{sc}$ . There are basically two possibilities: increase in  $\text{Cl}^{-}$  secretion or enhanced  $\text{Na}^{+}$  absorption. In human tissue and T84 cells blockade of the basolateral Na-K-2Cl cotransporter with bumetanide reduced the response to STW 5 by 70% ( $P = 0.015$ ) and 85% ( $P = 0.001$ ), respectively (Fig. 3). Pre treatment of human tissue and T84 cells with apically applied amiloride, a blocker of epithelial Na channels (ENaC), had no influence on the STW 5 response ( $P = 0.878$  and  $0.635$ ; Fig. 3). As ENaC is differentially expressed along the gut, the experiments with amiloride were all performed in colonic tissue. The efficacy of amiloride was confirmed by the expected decrease in baseline  $I_{sc}$  by  $38 \pm 19 \mu\text{A cm}^{-2}$  ( $n = 8$ ). These results indicated that the STW 5 induced increase in  $I_{sc}$  was due to an increased  $\text{Cl}^{-}$  secretion and not to an enhanced  $\text{Na}^{+}$  absorption.

The two most prominent candidates responsible for  $\text{Cl}^{-}$  secretion are the cAMP-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and the  $\text{Ca}^{++}$ -dependent  $\text{Cl}^{-}$  channels ClCa. Involvement of CFTR was supported by the observation that apical application of the unspecific CFTR blocker glibenclamide reduced the response to STW 5 by 42% ( $P = 0.038$ ) and 68% ( $P = 0.001$ ) in human tissue and T84 cells, respectively (Fig. 3). Strong cAMP dependency was also evident because basolateral application of the adenylate cyclase inhibitor MDL-12 330 suppressed the STW 5 response by 70% ( $P = 0.001$ ) and



**Figure 2** STW 5 evoked increase in ion secretion in human tissue is partly mediated by activation of enteric nerves. Panel A shows on the left side a control STW 5 evoked increase in  $I_{sc}$ . In a different tissue from the same patient the nerve blocker tetrodotoxin (TTX) suppressed this response. As shown on the right side TTX decreased the response at all concentrations. Panel B shows that STW 5 directly activates human submucous neurons. The bar below the trace indicates the 200 ms application of STW 5. Shortly after application the neuron fired action potential discharge (sharp upward deflections). This effect was significant (see right side). Asterisks mark significant differences and the numbers in parenthesis indicate the number of tissues (equal to number of patients) studied.

51% ( $P = 0.023$ ) in human tissue and T84 cells, respectively (Fig. 3). To further confirm the involvement of CFTR channels, we used the highly specific CFTR channel blocker CFTR<sub>inh</sub>-172.<sup>23</sup> In native tissue, the potency of CFTR<sub>inh</sub>-172 is limited by the relatively low negative membrane potential, which reduces cytoplasmic accumulation of CFTR<sub>inh</sub>-172.<sup>23</sup> Therefore, we tested the efficacy of CFTR<sub>inh</sub>-172 by applying the cAMP activator forskolin ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) at the end of the experiments. In eight of 12 experiments, CFTR<sub>inh</sub>-172 significantly reduced the forskolin-induced increase in  $I_{sc}$  by 43% ( $P = 0.031$ ). In these tissues, CFTR<sub>inh</sub>-172 also reduced the STW 5 evoked response by 32% ( $P = 0.022$ ; Fig. 3). CFTR<sub>inh</sub>-172 suppressed the forskolin response in all 12 experiments with T84 cells by 64% ( $P = 0.009$ ) and at the same time reduced the STW 5-induced increase in  $I_{sc}$  by 59% ( $P = 0.003$ , Fig. 3).

Both in human tissue and in T84 none of the CFTR inhibitors fully blocked the response. To test the involvement of ClCa channels, we used apical application of SITS which reduced the response to STW 5 by 42% ( $P = 0.03$ ) and 43% ( $P = 0.001$ ) in human tissue and T84 cells, respectively (Fig. 3).

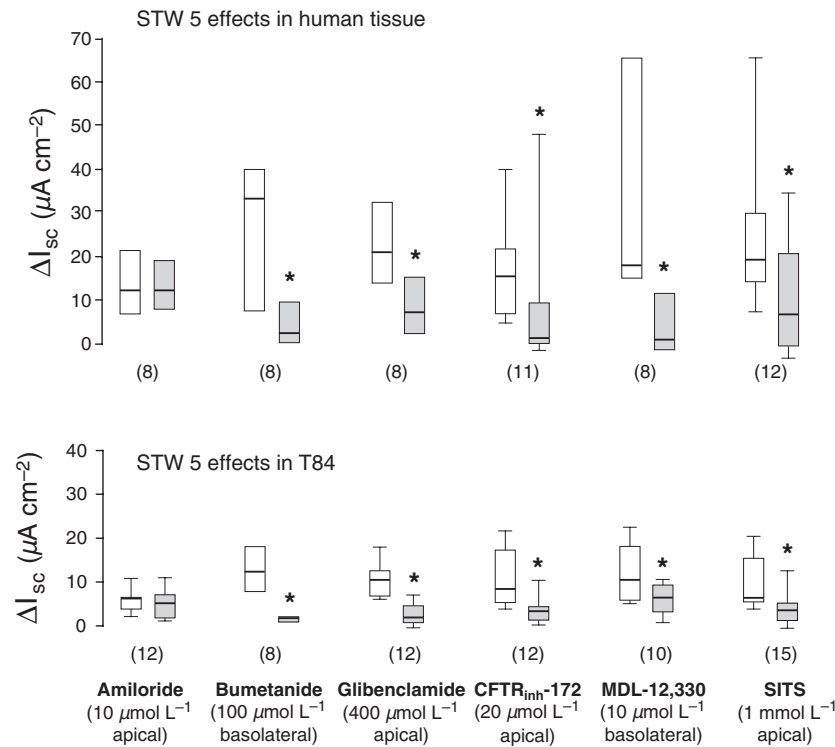
The conclusion from the above experiments was that the STW 5 increased  $\text{Cl}^-$  secretion was due to an activation of both CFTR and ClCa channels.

## DISCUSSION

Our study revealed that STW 5 acts as a secretagogue in the human intestine through an epithelial and a nerve-mediated action. The increased secretion is caused by activation of cAMP and calcium-dependent  $\text{Cl}^-$  channels. This action profile may help to understand its beneficial effect in IBS patients<sup>12</sup> and should stimulate further clinical studies with STW 5 in gut disorders that are associated with, or caused by, impaired secretion.

This is the first study demonstrating effects of STW 5 on intestinal epithelial transport functions. We did not attempt to identify which of the individual extracts in STW 5 or which of their phytochemical components are responsible for the prosecretory effect for two main reasons. Firstly, it was the mother compound (STW 5) that was effective in patients.<sup>12,13</sup> Secondly, we have previously shown that the effects of STW 5 on gastric motility are a result of the combined action of several components because each individual extract had an effect on motility.<sup>5</sup> This was also reported for the effects of STW 5 and its components on electrical smooth muscle activity in the intestine.<sup>23</sup> However, we cannot discount the possibility that only few extracts or even a single component is involved in the prosecretory action of STW 5. Therefore, the effects of individual extracts on mucosal secretion need to be investigated in future studies.

The prosecretory effect of STW 5 is due to multiple modes of action including stimulation of transporters and channels on epithelial cells and activation of enteric neurons. The direct epithelial effects are supported by the STW 5 responses in T84 cells and by the occurrence of a TTX-insensitive secretory component in human tissue. The bumetanide sensitivity suggests that STW 5 strongly activates basolateral  $\text{Cl}^-$  influx which represents the main driving force for luminal  $\text{Cl}^-$  secretion through apical CFTR and ClCa channels. Consequently, STW 5 evoked secretion was also suppressed by blockers of the CFTR and ClCa channels. The involvement of both  $\text{Cl}^-$  channels may prove to be of clinical relevance as STW 5 would increase secretion even under conditions where one of the channels may be down-regulated. Whether STW 5 can directly activate the apical  $\text{Cl}^-$  channels remains to be shown but its prosecretory action upon apical application would be in agreement with such a mode of action.



**Figure 3** Both in human tissue and in T84 cells, STW 5 evoked increase in  $I_{sc}$  is due to increased  $Cl^-$  secretion involving the basolateral Na–K–2Cl transporter (bumetanide sensitivity), the cAMP-dependent CFTR channel (sensitivity to glibenclamide, MDL-12 330 and CFTR<sub>inh</sub>-172) and the  $Ca^{++}$  dependent CaCl channel (SITS sensitivity). The epithelial Na channel ENaC is not involved (amiloride insensitivity). For the action of all inhibitors (grey bars) separate tissues from the same patient served as control (white bars). Asterisks mark significant differences between control STW 5 responses and STW 5 responses in pretreated tissues. The numbers in parenthesis indicate the number of tissues (equal to number of patients) or wells studied.

The strong TTX sensitivity of the STW 5 evoked secretion and the finding that STW 5 activated human submucous neurons highlight the prominent role of enteric nerves. The activation of enteric nerves will lead to enhanced release of transmitters which are known to activate  $Cl^-$  secretion via CFTR and ClCa channels.<sup>24,25</sup> The most likely reason for the finding that the EFS was not potentiated by STW 5, despite its activation of enteric neurons, is that we used stimulus parameters which already produced supramaximal stimulation.

Although the response to a single STW 5 application was long lasting, we did observe a slow decline with time. There are two possible explanations: firstly, biochemical and/or metabolic inactivation of STW 5 or secondly, run-down of signalling cascades. The latter is an often encountered phenomenon under *in vitro* conditions. For example, even carbachol and forskolin would evoke a transient increase in chloride secretion (own unpublished data).

While we found that acute application of STW 5 caused an excitatory action in neurons of the submucous plexus others described a decreased mechano- and

chemosensitivity of visceral afferents after animals have been pretreated with STW 5 for 2 h.<sup>26</sup> Whether the differences are due to the different application protocols (acute in our study vs 2 h pretreatment in the study on visceral afferents) or rather suggest differential actions of STW 5 on visceral afferents vs enteric neurons remains unknown. It is tempting to speculate that the improved IBS symptom and abdominal pain score after STW 5 treatment<sup>12</sup> may be explained by the differential actions which would lead to decreased pain threshold by inhibiting visceral afferents and at the same time normalized intestinal functions by activating enteric nerves.

Although speculative at this stage the prosecretory effect of STW 5 may provide some mechanistic insights into its favourable effect in IBS patients.<sup>12</sup> It is obvious that enhanced secretion may improve symptoms in constipation predominant IBS. This has also been shown in trials with linaclotide and lubiprostone, both of which improve gastrointestinal symptoms in IBS constipation and are known to increase intestinal secretion.<sup>16,17</sup> It is noteworthy that the clinical study with STW 5 reported

an improved IBS symptom and abdominal pain score in all IBS subgroups – constipation, diarrhoea and alternating IBS.<sup>12</sup> It is conceivable that a secretion enhancing drug may dilute luminal threats, thus help to maintain and restore intestinal barrier functions which altogether may contribute to symptom relieve. Above all, it is likely that other STW 5 actions, such as modulation of muscle activity,<sup>14,27</sup> anti-inflammatory properties<sup>7</sup> and inhibition of nociceptive pathways<sup>26</sup> contribute to its clinical efficacy.

In the IBS trial, patients took 20 drops Iberogast® (corresponding to 51.3 mg mL<sup>-1</sup> STW 5) three times daily.<sup>12</sup> It is difficult to assess how the concentrations used in our study can be extrapolated to the clinical situation as colonic concentrations of STW 5 or its components after oral intake have not been determined. We believe that our result have functional relevance as the smallest effective concentration was 200th of one therapeutic serving. Moreover, besides local actions of STW 5 in the colon an additional systemic effect appears likely.<sup>10</sup> Preliminary reports demonstrating efficacy of STW 5 in treatment of experimental colitis would support a systemic mode of action.<sup>28,29</sup> Based on our results in the Ussing chamber, topical and systemic actions are conceivable as apical and basolateral application were effective. Nevertheless, the results of our study would favour a predominant action of STW 5 on the basolateral epithelium and enteric nerves.

## ACKNOWLEDGMENT

Part of this work has been published in abstract form.<sup>30</sup>

## REFERENCES

- Wegener T, Wagner H. The active components and the pharmacological multi-target principle of STW 5 (Iberogast). *Phytomedicine* 2006; **13**(Suppl. 5): 20–35.
- Melzer J, Rösch W, Reichling J, Brignoli R, Saller R. Meta-analysis: phytotherapy of functional dyspepsia with the herbal drug preparation STW 5 (Iberogast). *Aliment Pharmacol Ther* 2004; **20**: 1279–87.
- von Arnim U, Peitz U, Vinson B, Gundermann KJ, Malferteiner P. STW 5, a phytopharmakon for patients with functional dyspepsia: results of a multicenter, placebo-controlled double-blind study. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 1268–75.
- Hohenester B, Rühl A, Kelber O, Schemann M. The herbal preparation STW 5 (Iberogast) has potent and region-specific effects on gastric motility. *Neurogastroenterol Motil* 2004; **16**: 765–73.
- Schemann M, Michel K, Zeller F, Hohenester B, Rühl A. Region-specific effects of STW 5 (Iberogast) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. *Phytomedicine* 2006; **13**(Suppl. 5): 90–9.
- Pilichiewicz AN, Horowitz M, Russo A *et al.* Effects of Iberogast on proximal gastric volume, antropyloroduodenal motility and gastric emptying in healthy men. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 1276–83.
- Schempp H, Weiser D, Kelber O, Elstner EF. Radical scavenging and anti-inflammatory properties of STW 5 (Iberogast) and its components. *Phytomedicine* 2006; **13**(Suppl. 5): 36–44.
- Khayyal MT, Seif-El-Nasr M, El-Ghazaly MA, Okpanyi SN, Kelber O, Weiser D. Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast) and its components against ulcers and rebound acidity. *Phytomedicine* 2006; **13**(Suppl. 5): 56–66.
- Germann I, Hagelauer D, Kelber O *et al.* Antioxidative properties of the gastrointestinal phytopharmaceutical remedy STW 5 (Iberogast). *Phytomedicine* 2006; **13**(Suppl. 5): 45–50.
- Kelber O, Wittwer A, Lapke C *et al.* Ex vivo/in vitro absorption of STW 5 (Iberogast) and its extract components. *Phytomedicine* 2006; **13**(Suppl. 5): 107–13.
- Wagner H. Multitarget therapy – the future of treatment for more than just functional dyspepsia. *Phytomedicine* 2006; **13**(Suppl. 5): 122–9.
- Madisch A, Holtmann G, Plein K, Hotz J. Treatment of irritable bowel syndrome with herbal preparations: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; **19**: 271–9.
- Liu JP, Yang M, Liu YX, Wei ML, Grimsgaard S. Herbal medicines for treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; **1**: CD004116.
- Ammon HP, Kelber O, Okpanyi SN. Spasmolytic and tonic effect of Iberogast (STW 5) in intestinal smooth muscle. *Phytomedicine* 2006; **13**(Suppl. 5): 67–74.
- Larsson MH, Simrén M, Thomas EA, Bornstein JC, Lindström E, Sjövall H. Elevated motility-related transmucosal potential difference in the upper small intestine in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2008; **19**: 812–20.
- Andresen V, Camilleri M, Busciglio IA *et al.* Effect of 5 days linaclotide on transit and bowel function in females with constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; **133**: 761–8.
- Johanson JF, Drossman DA, Panas R, Wahle A, Ueno R. Clinical trial: phase 2 study of lubiprostone for irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; **27**: 685–96.
- Harris LA, Crowell MD. Linaclotide, a new direction in the treatment of irritable bowel syndrome and chronic constipation. *Curr Opin Mol Ther* 2007; **9**: 403–10.
- Lacy BE, Levy LC. Lubiprostone: a novel treatment for chronic constipation. *Clin Interv Aging* 2008; **3**: 357–64.
- Schicho R, Krueger D, Zeller F *et al.* Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology* 2006; **131**: 1542–52.
- Breunig E, Michel K, Zeller F, Seidl S, Weyhern CW, Schemann M. Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. *J Physiol* 2007; **583**: 731–42.
- Neunlist M, Peters S, Schemann M. Multisite optical recording of excitability in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 1999; **11**: 393–402.
- Thiagarajah JR, Broadbent T, Hsieh E, Verkman AS. Prevention of toxin-induced intestinal ion and fluid

- secretion by a small-molecule CFTR inhibitor. *Gastroenterology* 2004; **126**: 511–9.
- 24 Xue J, Askwith C, Javed NH, Cooke HJ. Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface. *Auton Neurosci* 2007; **133**: 55–63.
  - 25 Schultheiss G, Siefjediers A, Diener M. Muscarinic receptor stimulation activates a Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> conductance in rat distal colon. *J Membr Biol* 2005; **204**: 117–27.
  - 26 Liu CY, Müller MH, Glatzle J *et al.* The herbal preparation STW 5 (Iberogast) desensitizes intestinal afferents in the rat small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2004; **16**: 759–64.
  - 27 Sibaev A, Yucece B, Kelber O *et al.* STW 5 (Iberogast) and its individual herbal components modulate intestinal electrophysiology of mice. *Phytomedicine* 2006; **13**(Suppl. 5): 80–9.
  - 28 Abdel-Aziz H, Wadie W, Khayyal MT, Kelber O, Okpanyi S, Weiser D. Pharmacological evidence for the anti-inflammatory effect of STW 5 in colonic inflammation in vivo. *Planta Med* 2007; **72**: 992 (abstract).
  - 29 Abdel-Aziz H, Wadie W, Kelber O, Vinson B, Weiser D, Khayyal MT. Anti-inflammatory effect of STW 5 in colonic inflammation in vivo. *Gut* 2007; **56**: A154.
  - 30 Schemann M, Krueger D, Gruber L *et al.* Action profile of the phytomedicine STW 5 suggests novel indications. *Neurogastroenterol Motil* 2008; **20**(Suppl. 1): 95.

# Appendix 3

R. Schicho\*, D. Krueger\*, F. Zeller, C.W. Hann von Weyhern, T. Frieling, H. Kimura, I. Ishii, R. de Giogio, B. Campi, M. Schemann.

\* gleichrangige Erstautoren

Hydrogen sulphide is a novel prosecretory neuromodulator in the guinea-pig and human colon

Gastroenterology 2006; 131:1542-1552

## **Contributions**

**D. Krueger:** study design of Ussing chamber experiments, generation and analysis of data on hydrogen sulphide induced secretion, co-design of Neuroimaging studies, drafting the manuscript.

R. Schicho: Neuroimaging data, co-drafting the manuscript

F. Zeller, C.W. Hann von Weyhern : tissue supply.

H. Kimura, I. Ishii: provided CSE and CBS antibodies

R. De Giogio, B. Campi: support with Ca-imaging.

M. Schemann: study design, grant support, manuscript editing.

T. Frieling: valuable intellectual input.



## Hydrogen Sulfide Is a Novel Prosecretory Neuromodulator in the Guinea-Pig and Human Colon

RUDOLF SCHICHO,\* DAGMAR KRUEGER,\* FLORIAN ZELLER,† CLAUS WERNER HANN VON WEYHERN,§ THOMAS FRIELING,|| HIDEO KIMURA,¶ ISAO ISHII,# ROBERTO DE GIORGIO,\*\* BARBARA CAMPI,†† and MICHAEL SCHEMANN\*

\*Department of Human Biology, §Department of Pathology, Technical University Munich, Munich, Germany; †Clinical Center, Freising, Germany; \*\*Department of Internal Medicine & Gastroenterology, University of Bologna, Bologna, Italy; ||Clinical Center, Krefeld, Germany; ††Department of Clinical & Experimental Medicine, Section of Pharmacology, University of Ferrara, Ferrara, Italy; ¶National Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan; and the ‡Department of Molecular and Cellular Neurobiology, Gunma University, Japan

**Background & Aims:** Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) has been suggested as a novel gasomediator. We explored its unknown neuromodulatory role in human and guinea-pig colon.

**Methods:** We used immunohistochemistry to detect H<sub>2</sub>S-producing enzymes cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) and cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) in enteric neurons, Ussing chambers to measure mucosal ion secretion, and neuroimaging with voltage- and Ca<sup>++</sup>-sensitive dyes to record H<sub>2</sub>S effects on guinea-pig and human enteric neurons. **Results:** More than 90% of guinea-pig and human submucous and myenteric neurons were colabeled for CSE and CBS. Myenteric interstitial cells of Cajal were CSE-immunoreactive. The exogenous H<sub>2</sub>S donor NaHS (0.2–2.5 mmol/L) concentration-dependently increased chloride secretion in human and guinea-pig submucosa/mucosa preparations, but not in the colonic epithelial cell line T84. The secretory response was reduced significantly by tetrodotoxin (0.5  $\mu$ mol/L), capsaicin desensitization (10  $\mu$ mol/L), and the transient receptor potentials vanilloid receptor 1 antagonist capsazepine (10  $\mu$ mol/L). The endogenous H<sub>2</sub>S donor L-cysteine also induced secretion that was diminished significantly by capsaicin desensitization, the CBS inhibitor amino-oxyacetic acid, and the CSE inhibitor propargylglycine. NaHS increased spike discharge in 23% of guinea-pig and 36% of human submucous neurons, but had no effect on Ca<sup>++</sup> mobilization in cultured guinea-pig enteric neurons. This excitatory response was reduced significantly by capsaicin desensitization and capsazepine, but not by glibenclamide (10  $\mu$ mol/L). **Conclusions:** The presence of H<sub>2</sub>S-producing enzymes in human and guinea-pig enteric neurons, the excitatory action on enteric neurons, and the prosecretory effects of NaHS suggest H<sub>2</sub>S as a novel gut-signaling molecule. Its action mainly involves transient receptor potentials vanilloid receptor 1 receptors on extrinsic afferent terminals, which in turn activate enteric neurons.

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is generally known as a toxic gas of the terrestrial and aquatic environment but also is found in mammalian tissue, where it is generated during cysteine metabolism.<sup>1,2</sup> Relatively high levels of H<sub>2</sub>S occur in human and rat brain and rat serum, which is an indication that this molecule could have physiologic relevance.<sup>3–5</sup> This also is reflected by the suggestion that H<sub>2</sub>S may be the third gaseous transmitter in addition to nitric oxide and carbon monoxide.<sup>6,7</sup> In particular, 2 pyridoxal-5'-phosphate-dependent en-

zymes, which take part in the trans-sulfuration of cysteine, are responsible for the production of H<sub>2</sub>S, that is, cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) and cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS).<sup>2</sup> In the central nervous system, H<sub>2</sub>S has been shown to be generated by CBS and to act as a modulator of N-methyl-D-aspartate receptor currents and long-term potentiation.<sup>8</sup> CSE is prevalent in vascular smooth muscle,<sup>5,9</sup> where H<sub>2</sub>S opens ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (K<sub>ATP</sub>) channels or interacts with other vasoactive gaseous mediators to relax smooth muscle.<sup>5,9–11</sup> Despite growing interest in H<sub>2</sub>S-mediated functions, there are only few reports on H<sub>2</sub>S involvement in functions of the gastrointestinal tract. Teague et al<sup>12</sup> showed that H<sub>2</sub>S causes relaxation of smooth muscle in rabbit and guinea-pig ileum, an effect that was not dependent on nitric oxide. Under pathophysiologic conditions, H<sub>2</sub>S even may exert beneficial effects in the gut. In a rat model of colorectal distention, treatment with H<sub>2</sub>S attenuated nociception and these effects were mediated by K<sub>ATP</sub> channels and nitric oxide.<sup>13</sup> In addition, acetylsalicylic acid-induced gastric mucosal injury was attenuated by H<sub>2</sub>S treatment, indicating an important role of H<sub>2</sub>S in the regulation of gastric microcirculation.<sup>14</sup> Other data have suggested that H<sub>2</sub>S stimulates capsaicin-sensitive sensory afferent fibers in the urinary bladder<sup>15,16</sup> and transient receptor potentials vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the lung.<sup>17</sup>

Gut functions, including mucosal secretion, are regulated by the enteric nervous system in close cooperation with terminal endings of extrinsic efferent or afferent nerve fibers.<sup>18–21</sup> We hypothesize that H<sub>2</sub>S plays a neuromodulatory role, not only in the brain, but also in the enteric nervous system of human beings and guinea pig. To provide evidence for this notion, we focused on the following aspects. First, we asked the question whether enteric neurons contain the enzymatic machineries to synthesize H<sub>2</sub>S. Second, we investigated the effects of the exogenous H<sub>2</sub>S donor NaHS on ion secretion in submucosa/mucosa preparations and T84 cells, a human colonic epithelial cell line.

**Abbreviations used in this paper:** AOAA, amino-oxyacetic acid; CBS, cystathionine  $\beta$ -synthase; CCD, charge-coupled device; CSE, cystathionine  $\gamma$ -lyase; H<sub>2</sub>S, hydrogen sulfide; ICC, interstitial cells of Cajal; IR, immunoreactivity; Isc, short-circuit current; K<sub>ATP</sub>, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel; NSE, neuron-specific enolase; PAG, D,L-propargylglycine; TRPV1, transient receptor potentials vanilloid receptor 1; TTX, tetrodotoxin citrate.

© 2006 by the AGA Institute  
0016-5085/06/\$32.00  
doi:10.1053/j.gastro.2006.08.035

L-cysteine was used as a substrate for the H<sub>2</sub>S-producing enzymes to investigate whether stimulation of endogenous H<sub>2</sub>S production would have an effect on mucosal ion secretion. Third, using neuroimaging with voltage- and Ca<sup>2+</sup>-sensitive dyes we directly recorded the effects of NaHS on the neuronal activity in submucous plexus neurons from guinea pig and human beings and on the activity of cultured enteric neurons, respectively.

## Materials and Methods

### Tissue Samples

Segments from different regions of the bowel from male guinea pigs (Dunkin-Hartley, 300–500 g; Charles River, Kisslegg, Germany) were removed quickly after killing the animals by cervical dislocation and exsanguination. The procedures used in this study are in accordance with the German ethical guidelines for animal experiments. Segments were dissected in ice-cold Krebs solution to obtain the longitudinal muscle-myenteric plexus and submucous plexus preparations. Tissue samples of the large bowel were taken from 21 patients (ages, 44–90 y; mean age, 72.9 ± 12.2 y; 10 men, 11 women) undergoing surgery at the Departments of Surgery at the University Hospital of the Technical University Munich and the Clinical Centre in Freising for the following diseases: carcinoma of the large bowel (17 patients), diverticulitis of the sigmoid colon (2 patients), pancreatitis (1 patient), and sigmoid polyp (1 patient). Specimens from nonafflicted bowel regions were used for our experiments.

After removal of the sample during surgery the tissue was placed in cold, oxygenated, sterile Krebs solution and immediately transferred to the laboratory. All procedures were approved by the ethics committee of the Technical University Munich (project approval 1512/06).

### Immunohistochemistry

For multiple-labeling studies, guinea-pig and human tissues were fixed overnight at room temperature in a solution containing 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 mol/L phosphate buffer, followed by several washes (3 × 10 min) in phosphate buffer. Whole-mount preparations containing the inner submucous and the myenteric plexus first were incubated in phosphate-buffered saline (PBS) (1 h, room temperature; buffer changed every 10 min) followed by incubation (1 h, room temperature) in PBS plus Triton X-100 (0.3%) and normal goat serum (3%) to block nonspecific binding. The tissue then was incubated for 24 hours at room temperature in solution containing the primary antibodies diluted in PBS/Triton X-100 and normal goat serum (3%). Three antibodies were used to test whether enteric neurons are able to produce H<sub>2</sub>S. A rabbit anti-CSE (1:5000–10,000)<sup>22</sup> and a commercially available mouse anti-CSE antibody (1:1000; ABNOVA, Taipei, Taiwan) were applied to detect CSE. Both antibodies were specified by pre-absorption controls with human recombinant CSE protein at a concentration of 1 μmol/L (ABNOVA). A mouse anti-CBS antibody (1:500; ABNOVA) was applied to detect CBS and was tested for its specificity by pre-absorption with CBS recombinant protein (1 μmol/L; ABNOVA). Staining was absent after CSE and CBS antibodies were pre-absorbed with the respective proteins. The specificity of the other primary antibodies has been described previously<sup>23</sup>: rabbit anti-neuron-

specific enolase (NSE) (1:4000; Polysciences, Eppenheim, Germany); mouse anti-HuC/D (1:200; Molecular Probes, Göttingen, Germany); rabbit anti-c-Kit (1:100; Oncogene, Darmstadt, Germany). After washing in PBS/Triton X-100, samples were exposed to the species-specific secondary antibodies (Cy2- and Cy3-labeled anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). After a final wash, preparations were mounted on slides. Additional controls were performed by leaving out the primary antibodies during the staining procedure. For the inspection of the tissue, an Olympus microscope (BX61 WI; Olympus) with appropriate filter blocks was used. The microscope was equipped with an SIS Fview II charge-coupled device (CCD) camera and an analysis 3.1 software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) for image acquisition, processing and editing.

### Ussing Chamber Experiments

To test the effects of the H<sub>2</sub>S donors NaHS and L-cysteine on ion secretion in intact submucosa/mucosa preparations of distal guinea-pig and human colon we used Ussing chamber techniques (Easy Mount chambers, Physiologic Instruments, San Diego, CA). The area of the recording chamber was 0.5 cm<sup>2</sup>. Mucosal and serosal sides were bathed separately in 5 mL Krebs solution. The bath was maintained at 37°C and continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (Carbogen). The transepithelial potential difference was measured by a pair of Ag/AgCl electrodes, connected to a voltage clamp apparatus (VCC 600; Physiologic Instruments) that compensated for the solution resistance between the electrodes. The current electrodes were placed on each side of the tissue. Each electrode was inserted in a pipette tip, connected to the Krebs solution in the chamber via a 3-mol/L KCl-filled agar bridge (Easy Mount Electrode Set P2020, Physiologic Instruments). Chloride secretion was measured as short-circuit current (I<sub>sc</sub>) and expressed in μA cm<sup>-2</sup>. Positive I<sub>sc</sub> indicated a net anion current from the serosa to the lumen. The tissue was electrically stimulated by silver electrodes placed on either side of the tissue and connected to a constant voltage stimulator (Grass SD-9; Grass-Telefactor). Neural stimulation of the tissue was achieved by delivering a train of pulses with supramaximal stimulus parameters (for guinea pig: pulse amplitude, 6 V; pulse frequency, 10 Hz; pulse duration, 0.5 ms; train duration, 10 s; for human: pulse amplitude, 20 V; pulse frequency, 10 Hz; pulse duration, 1 ms; train duration, 10 s). NaHS and other drugs were added to the serosal side of the preparation. Before starting the actual measurements, the tissues were allowed to equilibrate for at least 30 minutes. As also reported by other groups, no change of the pH (7.4) in the Krebs solution was observed with any of the NaHS concentrations used in this study (200 μmol/L to 2.5 mmol/L).<sup>17,24</sup>

### Neuroimaging Studies

The multisite optical recording technique used in this study has already been described in detail.<sup>25–27</sup> Guinea-pig and human bowel segments were cut along the mesenteric border and pinned flat in a dissection dish, continually perfused with ice-cold oxygenated Krebs solution. The mucosa and muscle layers were carefully removed under a dissection microscope to obtain a preparation of the inner submucous plexus. The final tissue with a size of 5 × 10 mm was pinned onto a Sylgard ring (Dow Corning, Midland, MI) and placed into a recording cham-

ber with a 42-mm diameter glass bottom (130- to 170- $\mu\text{m}$  thickness; Sauer, Reutlingen, Germany). The recording chamber was continuously perfused with 37°C warm Krebs solution and gassed with 5%  $\text{CO}_2$  and 95%  $\text{O}_2$  (pH 7.4). The neuroimaging method allowed us to monitor membrane potential changes directly in all ganglion cells at a single cell level. Individual ganglia were stained with the fluorescent voltage sensitive dye di-8-ANEPPS [1-(3-sulphonatopropyl)-4-( $\beta$  (2-(di-*n*-octylamino)-6-naphthyl) vinyl) pyridinium betaine; Molecular Probes] by local pressure application through a microejection pipette (1–2 psi for 200–800 ms). The pipette was loaded with Krebs solution, containing 20  $\mu\text{mol}$  di-8-ANEPPS dissolved in dimethyl sulfoxide (final concentration, 0.125%) and pluronic F-127 (final concentration 0.014%; Molecular Probes). Fluorescent images of the ganglia were acquired and processed by a Neuro-CCD system (RedShirtImaging, Decatur, GA). The Neuro-CCD system consists of a CCD camera with a resolution of 70  $\times$  70 pixels and the software for acquisition, processing, and storage of the data. Frames were acquired at a frequency of 1.6 kHz and signals were filtered with a band pass of 3–300 Hz. By using the 100 $\times$  objective, a spatial resolution of 4  $\mu\text{m}^2$  was achieved. The neuroimaging set-up measured the fluorescence intensity in arbitrary units and calculated the relative change in fluorescence, which was related linearly to changes in the membrane potential.<sup>28,29</sup> To ensure viability of the neurons, interganglionic fiber tracts were stimulated with a 25- $\mu\text{m}$  Teflon-coated platinum electrode, connected to a stimulator (Grass S88; Grass-Telefactor, West Warwick, RI) with a constant voltage isolation unit (Grass SIU-5; Grass-Telefactor). Single electric pulses had durations of 300  $\mu\text{s}$  and amplitudes varied between 2 and 6 V. NaHS and other drugs were freshly dissolved in gassed Krebs solution (37°C; pH 7.4) and applied to the submucous plexus by adding them to the perfusing Krebs solution.

### *Ca<sup>2+</sup> Imaging in Cultured Guinea-Pig Myenteric Neurons*

Tissue from 3 guinea pigs (300–350 g; Charles River, Como, Italy) was used. After death, the whole small bowel and proximal colon from each animal were dissected, thoroughly washed with Krebs solution, and processed according to previously validated protocols that were used to isolate and culture myenteric neurons.<sup>30,31</sup> Briefly, longitudinal muscle–myenteric plexus preparations were digested in an enzymatic solution, containing 1 mg/mL protease and 1.25 mg/mL collagenase (Sigma, Deisenhofen, Germany). After a 30-minute incubation at 37°C, the suspension was placed on ice and centrifuged at 200  $\times$  g. Ganglia were picked up and plated on culture dishes. After a few days, neuronal explants were inspected with an inverted microscope (Nikon Eclipse TS100; Nikon Instruments Inc., Melville, NY) to verify whether they started forming a ganglion-to-ganglion network, resembling the enteric nervous system. The culture medium was changed every second day and consisted of medium 199, enriched with 10% fetal calf serum, 50 ng/mL of 7S nerve growth factor, and antibiotics (ie, penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100  $\mu\text{g}$ /mL, and gentamycin 50  $\mu\text{g}$ /mL). All reagents were purchased from Gibco BRL Laboratories (Gaithersburg, MD). The culture chambers were kept in an incubator at 37°C and were gassed continuously with a mixture of 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Seven to 10 days after plating, myenteric neurons were loaded with Fura-2-AM-ester

(3  $\mu\text{mol}$ /L) in  $\text{Ca}^{2+}$  buffer solution that had the following composition (mmol/L): 1.4  $\text{CaCl}_2$ ; 5.4 KCl, 0.4  $\text{MgSO}_4$ , 135 NaCl, 5 D-glucose, 10 HEPES with 0.1% bovine serum albumin, at pH 7.4, for 40 minutes at 37°C. Cells were washed twice with the  $\text{Ca}^{2+}$  buffer solution and transferred to a chamber on the stage of a Nikon Eclipse TE300 microscope. The dye was excited at 340 and 380 nm to indicate relative changes in intracellular calcium by the F340/F380 ratio recorded with a dynamic image analysis system (Laboratory Automation 2.0; RCS, Florence, Italy). Different concentrations of NaHS (200–1000  $\mu\text{mol}$ /L), or the respective vehicle, were added to the chamber. To obtain the maximum influx of calcium, at the end of each experiment, the ionophore ionomycin (5  $\mu\text{mol}$ /L) was injected into the experimental chamber. A calibration curve with buffer, containing Fura-2-AM-ester and determinant concentrations of free  $\text{Ca}^{2+}$ , was used to convert the data obtained from the F340/F380 ratio to intracellular calcium.

### *Experiments Using the T84 Cell Line*

**Cell culture.** T84 cells (ECACC, Salisbury, England) were seeded on Millipore filters (Bedford, MA) with 0.45- $\mu\text{m}$  pore size, and incubated at 37°C and 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  in Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's Nutrient Mixture F-12 (Sigma), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, to attain a monolayer. The medium was replaced daily. After 10 days, filters were mounted in Ussing chambers for ion-transport studies.

### *Drugs and Solutions*

All chemicals, unless otherwise stated, were purchased from Sigma. Krebs solution for Ussing chamber and neuroimaging experiments contained (in mmol/L): 117 NaCl, 4.7 KCl, 1.2  $\text{MgCl}_2$  6  $\text{H}_2\text{O}$ , 1.2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25  $\text{NaHCO}_3$ , 2.5  $\text{CaCl}_2$  2  $\text{H}_2\text{O}$ , and 11 glucose. Stock solutions of tetrodotoxin citrate (TTX; Tocris, Bristol, UK), bumetanide, and NaHS were made in Krebs solution. Stock solutions of capsaicin, capsazepine (Alexis, Lausen, Switzerland), and glibenclamide were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide and diluted further with Krebs solution. L-cysteine hydrochloride was dissolved in Krebs solution and NaOH to yield a pH of 7.4.<sup>9</sup> Because L-cysteine is an agonist of N-methyl-D-aspartate receptors, all experiments using L-cysteine were performed in the presence of the N-methyl-D-aspartate-receptor antagonist D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APS, 100  $\mu\text{mol}$ /L; Tocris). The CBS inhibitor aminoxyacetic acid (AOAA) was dissolved in NaOH containing Krebs solution. The CSE inhibitor D,L-propargylglycine (PAG) was dissolved in Krebs solution.<sup>9,12</sup> All reagents were freshly prepared immediately before the experiments. Solvents alone were without effect in Ussing chamber and neuroimaging experiments.

### *Data Analysis and Statistics*

The anti-NSE or anti-HuC/D antibodies were used as pan-neuronal markers to determine the total number of cell bodies (3 guinea pigs/23–29 ganglia each; 3 patients/25–29 ganglia each). The proportions of CSE- and CBS-labeled neurons were expressed relative to the number of NSE or anti-HuC/D-positive cells per ganglion, which represented 100%. For neuroimaging studies, the total number of neurons for each ganglion was determined by visual inspection of images from the di-8-ANEPPS-stained ganglion, as previously described.<sup>25</sup>

The images of the ganglion were taken during the experiment with a CCD camera at the highest possible resolution (70 × 70 pixels). During the analysis of the optical data, traces of all detectors of the CCD camera were projected onto the corresponding image of the ganglion. Signals from individual nerve cells were obtained by spatial averaging of the detectors that recorded activity from that particular cell. To detect significant differences between treatments, a 1-way analysis of variance test (ANOVA), a Kruskal-Wallis 1-way ANOVA on ranks, followed by a post hoc Dunnett's or Dunn's multiple comparison test, run on SigmaStat Software (Systat Software Inc., Point Richmond, CA), were performed. Normally distributed data were expressed as mean ± standard error of mean. Nonnormally distributed data were expressed as their median together with the 10th, 25th, 75th, and 90th percentiles. *P* values less than .05 were considered statistically significant. The median effective concentrations were calculated with IGOR Pro 5 Software (WaveMetrics Inc., Portland, OR), using Hill equation curve fit function. Calculation of the statistical values in the neuroimaging studies are based on the number of individual neurons within a treatment group. In the Ussing chamber experiments, the statistical values are based on the number of animals or patients (*n* values).

## Results

### *Presence of H<sub>2</sub>S-Producing Enzymes in Human and Guinea-Pig Enteric Nervous Systems*

Double-labeling with the pan-neuronal markers anti-HuC/D or anti-NSE in guinea-pig and human submucous and guinea-pig myenteric plexus showed that both CSE antibodies labeled nerve cell bodies in the enteric nervous system and that the staining pattern for both CSE antibodies was identical (Figure 1). In guinea-pig colon and ileum, CSE was, on average, present in 99.7% ± 0.1% and 99.4% ± 0.2% of nerve cells per submucosal ganglion (Figure 1A-C) and in 95.7% ± 1.3% and 96.6% ± 2.1% of nerve cells per myenteric ganglion (Figure 1H), respectively. In the myenteric plexus of guinea-pig stomach, 97% ± 0.2% of nerve cells per ganglion showed CSE-immunoreactivity (IR). We noticed CSE-IR cells that were located at the level of the myenteric plexus, but outside of the ganglia. Double-labeling with Kit antibody identified these CSE-positive cells as interstitial cells of Cajal (ICC) (Figure 1F). In human colon, CSE-IR was found, on average, in 96% ± 0.4% of nerve cells/submucosal ganglion (Figure 1D and E). All ganglion cells in guinea-pig and human submucous and guinea-pig myenteric plexus that were immunoreactive for CSE also were positive for CBS, and vice versa (Figure 1C). This was not true for ICC, which showed only faint or no CBS-IR (Figure 1G). In contrast to the finding in guinea pigs, the CSE and CBS antibodies did not reveal reliable and reproducible staining in human myenteric ganglia; a quantitative assessment was therefore not feasible.

### *H<sub>2</sub>S Donors NaHS and L-Cysteine Increase Mucosal Ion Secretion in Guinea-Pig and Human Colon But Not in the T84 Epithelial Cell Line*

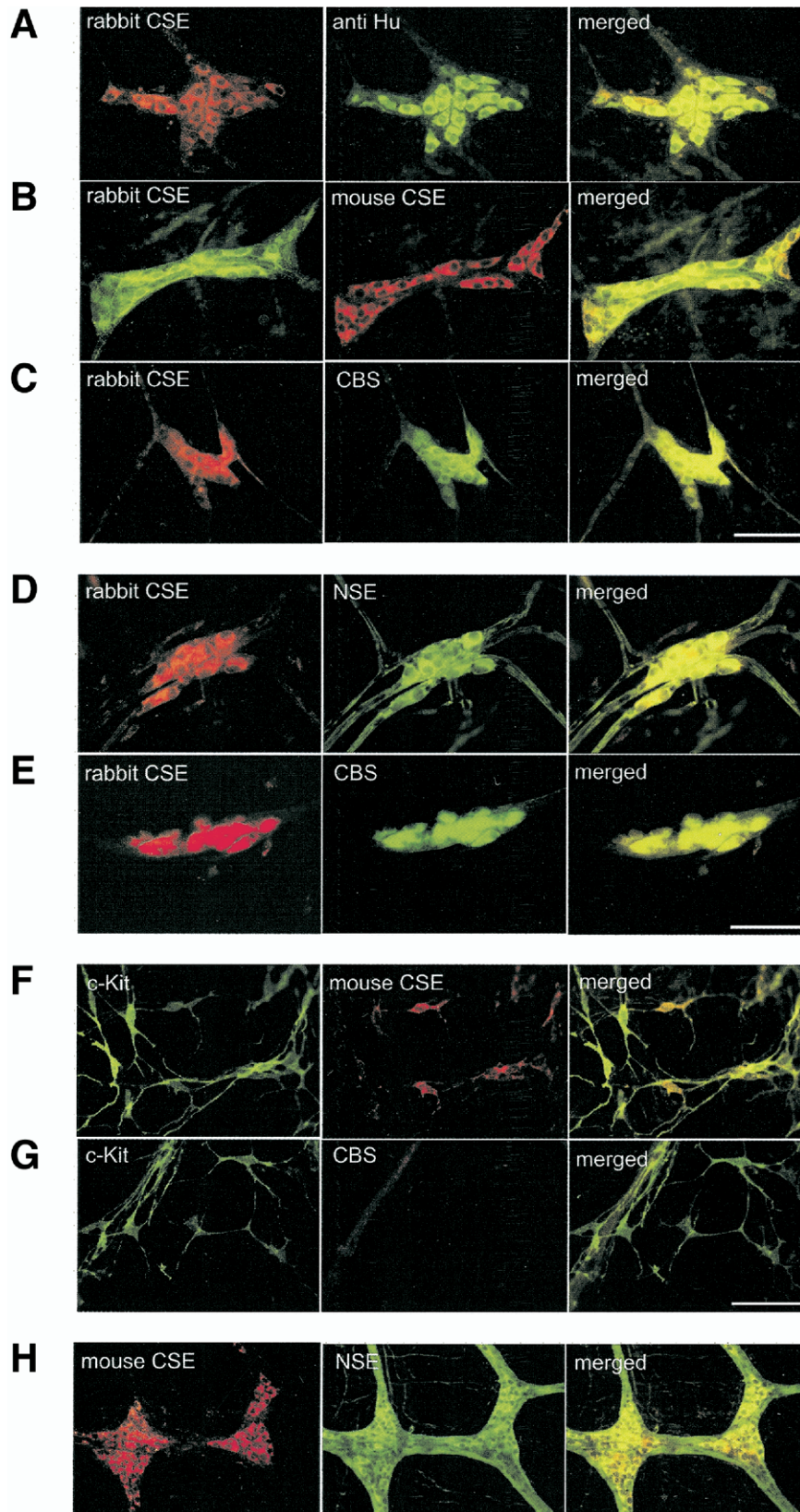
**Studies in guinea-pig tissue.** Total tissue conductance was 18.7 ± 2.1 milli Siemens (mS) cm<sup>-2</sup> in guinea-pig

colon (*n* = 37). Serosal application of NaHS (200 μmol/L to 1 mmol/L) concentration-dependently (median effective concentration = 0.34 mmol/L) increased the *I*<sub>sc</sub> in guinea-pig colon (Figure 2C; *n* = 14-19). For all concentrations, the secretory response was transient, peaked after 90 ± 13 seconds, lasted for 250 ± 31 seconds, and returned to baseline levels even in the continuous presence of NaHS, indicating strong desensitization (*n* = 15). Successive application of NaHS therefore resulted in a dramatic decrease of the response (Figure 2A), and hence dose-response curves and pharmacologic studies on NaHS responses had to be performed in different preparations. Responses to electrical field stimulation did not change after NaHS application independent of the concentrations used (311 ± 22.8 vs 303 ± 22 μA cm<sup>-2</sup>; *n* = 14-27). We also evaluated whether the measured *I*<sub>sc</sub> derived from chloride secretion and conducted experiments with bumetanide (100 μmol/L), a loop diuretic that inhibits Cl<sup>-</sup> secretion when added to the serosal side.<sup>32</sup> In guinea-pig tissue, bumetanide significantly reduced the *I*<sub>sc</sub> evoked by 500 μmol/L NaHS, from 18.4 ± 3.9 to 7.4 ± 2.4 μA cm<sup>-2</sup> (*n* = 6), indicating that the NaHS-evoked increase in *I*<sub>sc</sub> is largely caused by secretion of chloride ions. To test whether nerves contributed to the secretory response, 0.5 μmol/L TTX was added to the serosal chamber 20 minutes before the application of NaHS; a preparation from the adjacent segment acted as a control. At this concentration, TTX totally blocked the responses to electrical field stimulation. TTX caused a significant decrease of the *I*<sub>sc</sub> at all NaHS concentrations (Figure 2E). Pretreatment of the tissue with 10 μmol/L capsaicin, which fully desensitizes capsaicin-sensitive extrinsic primary afferent nerves,<sup>19</sup> reduced the NaHS-induced (500 μmol/L) secretion by about 98% (Figure 2E). The inhibition was slightly less pronounced when tissue was pretreated with TRPV1 antagonist capsazepine (10 μmol/L), which caused an 85% reduction of the response to NaHS (Figure 2E). A significant decrease in *I*<sub>sc</sub> from 22 ± 3.4 to 7.4 ± 0.8 μA cm<sup>-2</sup> also was observed in the presence of glibenclamide (10 μmol/L; *n* = 5).

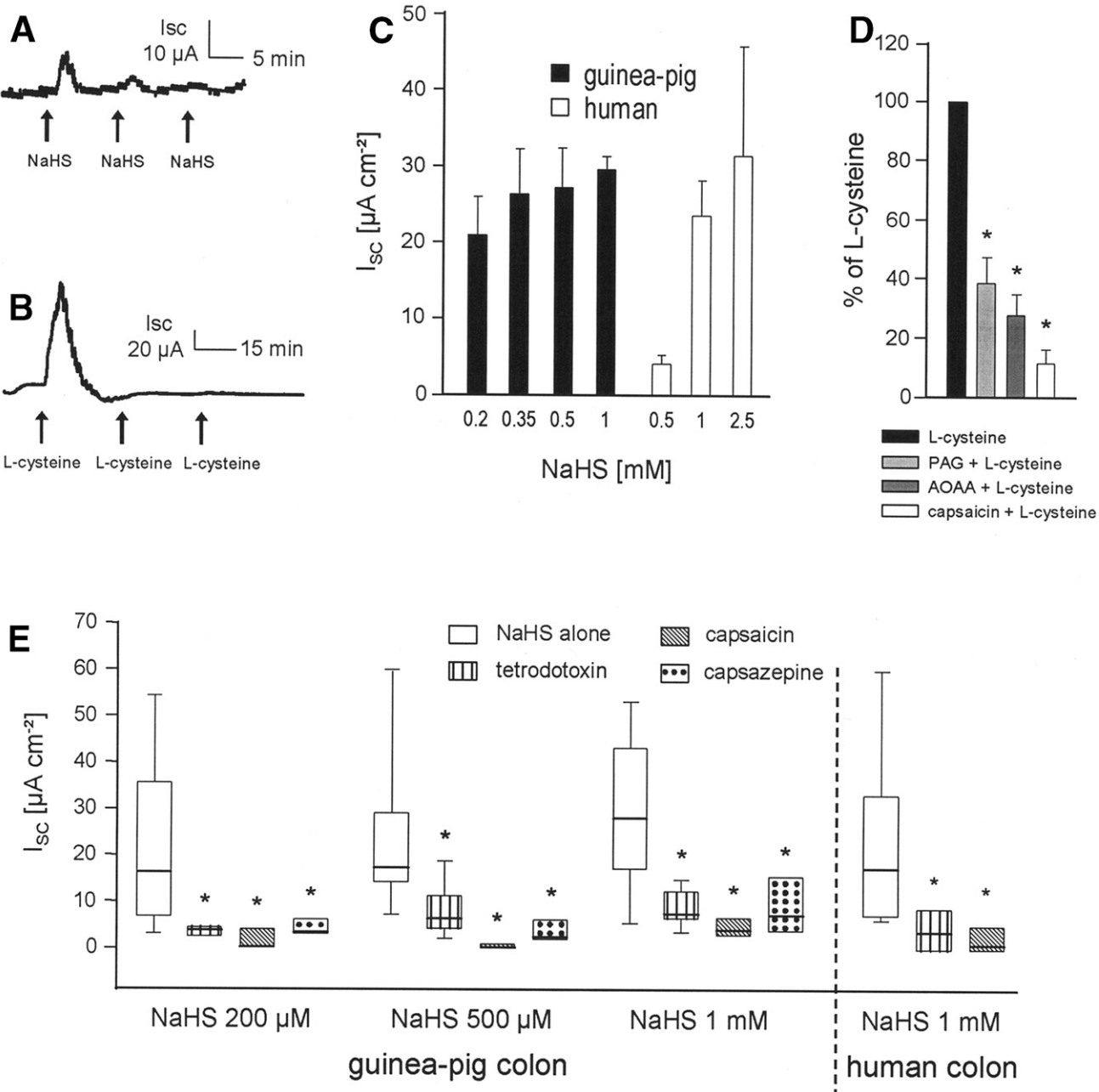
Similar to NaHS, the endogenous H<sub>2</sub>S donor L-cysteine (1 mmol/L) evoked a transient secretory response in guinea-pig distal colon (95.4 ± 32 μA cm<sup>-2</sup>; *n* = 13). The response was practically absent when L-cysteine was applied for a second or third time, indicating desensitization (Figure 2B), but lasted longer (630 ± 80 s) and peaked later (after 200 ± 38 s) than the secretory response to NaHS (*n* = 8). Similar to NaHS, L-cysteine did not change the response to electrical field stimulation (283.9 ± 34.2 vs 251.2 ± 27.9 μA cm<sup>-2</sup>). As in the experiments with NaHS, defunctionalization of extrinsic afferents with 10 μmol/L capsaicin significantly reduced L-cysteine-evoked ion secretion (Figure 2D).

L-cysteine has been used previously to generate endogenous H<sub>2</sub>S.<sup>9</sup> To prove that endogenous H<sub>2</sub>S also is involved in L-cysteine effects observed in Ussing chamber experiments, we used the CSE and CBS enzyme blockers PAG and AOAA, respectively. Pre-incubation of tissue with PAG (2 mmol/L) and AOAA (1 mmol/L) for 1 hour significantly reduced the secretory response by 61% and 72%, respectively (Figure 2D, *n* = 9). In 3 other experiments, PAG failed to affect L-cysteine-evoked ion secretion.

We also tested the effects of PAG and AOAA on the secretory response induced by electrical field stimulation. The electrical field stimulation (EFS)-evoked secretion was not changed by 2 mmol/L PAG (268.8 ± 27.1 vs 261.6 ± 28.5 μA cm<sup>-2</sup>; *n* = 9), 1 mmol/L AOAA (266.1 ± 25.9 vs 275.5 ± 26.9 μA cm<sup>-2</sup>; *n* =



**Figure 1.** The expression of CSE and CBS is shown in enteric neurons of guinea-pig colon, human colon, and myenteric interstitial cells of Cajal guinea-pig ileum. (A) In the guinea-pig submucous plexus, colocalization studies showed that CSE-IR is present in all HU-IR neurons. (B) Rabbit and mouse CSE antibodies label identical neurons. (C) CSE-IR and CBS-IR are found in the same neurons. (D) In human submucous plexus, CSE-IR is present in all NSE-IR neurons. (E) CSE-positive neurons entirely overlap with CBS-positive neurons in a human submucous ganglion. (F) Kit-IR ICC in guinea-pig myenteric plexus also are CSE-IR but not (G) CBS-IR. (H) Double-labeling with NSE shows neuronal expression of CSE in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. Scale bars = 100  $\mu$ m.



**Figure 2.** In Ussing chamber experiments, the H<sub>2</sub>S donors NaHS and L-cysteine induced chloride secretion in guinea-pig and human submucosa/mucosa preparations. (A) NaHS (200 μmol/L) and (B) L-cysteine (1 mmol/L) both evoked a transient increase of I<sub>sc</sub>; repeated applications (arrows) led to a decrease in secretory response and finally to full desensitization. (C) Concentration-dependent increase in I<sub>sc</sub> after NaHS application is shown in guinea pig (■, n = 14–19) and human colon (□, n = 4–15). (D) In the guinea pig, L-cysteine caused an increase in I<sub>sc</sub> that was reduced significantly by PAG (2 mmol/L), AOAA (1 mmol/L), and capsaicin desensitization (10 μmol/L) (all n = 9). Unlike the quite robust effect of NaHS, the magnitude of the secretory responses after L-cysteine application varied extensively between experiments. We therefore used L-cysteine-evoked responses of adjacent tissue from the same preparation as controls. The control values were set at 100%, and the responses to L-cysteine in the presence of PAG, AOAA, or capsaicin then were expressed as the percentage increase in I<sub>sc</sub> relative to the control values and tested in an unpaired design. ■, L-cysteine; □, PAG + L-cysteine; ▨, AOAA + L-cysteine; □, capsaicin + L-cysteine. (E) The neurotoxin TTX (0.5 μmol/L), the TRPV1 blocker capsazepine (10 μmol/L), and capsaicin desensitization (10 μmol/L) significantly reduced NaHS-induced I<sub>sc</sub> responses in guinea pig (n = 4–19) and human tissue (n = 4–15). □, NaHS alone; ▨, TTX; ▨, capsaicin; ▨, capsazepine. \*Significant differences for NaHS effects in TTX, capsaicin, and capsazepine vs NaHS alone or for effects of L-cysteine in PAG, AOAA, and capsaicin vs L-cysteine alone. Data are expressed as means ± standard error of mean or as medians and their percentiles (see Materials and Methods section).

BASIC-ALIMENTARY TRACT

9), or by a combination of both ( $291.1 \pm 25.7 \mu\text{A cm}^{-2}$  vs  $271.7 \pm 29.7 \mu\text{A cm}^{-2}$ ;  $n = 5$ ). There are 2 possible explanations for the lack of inhibitory effects of the 2 enzyme blockers. First, electrical stimulation efficiently activates all nerves and a modulatory effect of  $\text{H}_2\text{S}$  is not revealed with such a strong and global stimulus. Second, electrical field stimulation does not release sufficient amounts of  $\text{H}_2\text{S}$  to pharmacologically identify an  $\text{H}_2\text{S}$ -mediated component.

**Studies in human tissue.** Comparable results were found in human tissue. Total tissue conductance was  $13 \pm 0.8 \text{ mS cm}^{-2}$  in human colon ( $n = 21$ ). In submucosa/mucosa preparations of the colon, serosal application of NaHS evoked a transient and concentration-dependent secretory response (median effective concentration =  $0.68 \text{ mmol/L}$ ). Responses to electrical field stimulation did not change after NaHS application, independent of the concentrations used ( $29.3 \pm 3.0$  vs  $33.6 \pm 3.8 \mu\text{A cm}^{-2}$ ;  $n = 5-21$ ). Similar to the guinea pig, bumetanide ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) significantly reduced the NaHS-evoked ( $1 \text{ mmol/L}$ ) response from  $59.5 \pm 18.8$  to  $11.4 \pm 5.3 \mu\text{A cm}^{-2}$  ( $n = 6$ ). Also, L-cysteine ( $1 \text{ mmol/L}$ ) induced a prominent secretion in the human colonic mucosa/submucosa preparations ( $31 \pm 8.9 \mu\text{A cm}^{-2}$ ;  $n = 5$ ). Because of the limited availability of human tissues, we focused our pharmacologic studies on the question as to how TTX and capsaicin affect the secretory response to  $1 \text{ mmol/L}$  NaHS. Again, control responses and treatment effects had to be assessed in separate tissues from the same patient in an unpaired design. As in guinea-pig tissue, the NaHS-evoked secretory response consisted of a nerve-mediated component because it was reduced significantly by  $0.5 \mu\text{mol/L}$  TTX (Figure 2E). In addition, the NaHS-evoked increase in ion secretion also was reduced significantly after pretreatment with  $10 \mu\text{mol/L}$  capsaicin (Figure 2E). Likewise, glibenclamide ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) significantly decreased the *I*<sub>sc</sub> from  $40$  to  $3.8 \mu\text{A cm}^{-2}$  ( $n = 5$ ).

**Studies in epithelial cell line T84.** To test whether NaHS may act directly on colonic epithelia,  $1 \text{ mmol/L}$  of NaHS was applied to the human colonic epithelial cells T84, which were grown on permeable filters ( $n = 8$ ) and mounted in the Ussing chambers. The addition of NaHS up to  $1 \text{ mmol/L}$  did not cause any secretory responses whereas forskolin ( $20 \mu\text{mol/L}$ ), used as an internal control, induced an increase in the *I*<sub>sc</sub> ( $18.8 \pm 2.2 \mu\text{A cm}^{-2}$ ;  $n = 8$ ).

In summary, these findings suggested that the NaHS-evoked secretory response in guinea-pig and human colon had a prominent neurally mediated component and in particular involved activation of TRPV1. We therefore performed experiments to test the hypothesis that NaHS-induced TRPV1 activation would lead to activation of enteric neurons by directly recording the effect of NaHS on their action potential discharge.

### *H<sub>2</sub>S Donor NaHS Excites Neurons in the Human and Guinea-Pig Submucous Plexus*

Neuroimaging studies were performed on submucous ganglia of guinea-pig and human colon. Initially, we tried to apply NaHS locally via a microejection pipette that was positioned close to the ganglion. This approach did not yield any response, indicating that there were no immediate effects of NaHS on enteric neurons. We therefore added  $500 \mu\text{mol/L}$  of NaHS to the perfusing Krebs solution to expose the neurons for longer periods to NaHS. Neuroimaging approaches with fluorescent dyes allow only limited recording periods to avoid signal

attenuation caused by dye bleaching. We performed preliminary experiments to find out that neuronal excitation started to occur after 1 minute of perfusion with NaHS. However, the spike discharge increased further and was more robust and reliable after 3 minutes of NaHS perfusion. Consequently, a time point of 3 minutes was chosen for the optical measurements. The difference in the timing of the responses (spike discharge vs secretion) was a result of the experimental design. In the Ussing chamber set-up, NaHS was applied directly to the chamber and therefore could reach equilibrium almost instantaneously, whereas in the neuroimaging set-up, NaHS was added to the perfusing solution and an equilibrium was reached later because of the additional time needed to exchange the volume in the recording chamber. Perfusion of  $500 \mu\text{mol/L}$  NaHS in guinea-pig colonic submucous ganglia led to discharge of action potentials in  $23.3\% \pm 6.7\%$  of the neurons (86 neurons, 6 ganglia, 6 animals; Figure 3A) and a significant increase in spike frequency (medians,  $2.12$  vs  $0.53 \text{ Hz}$ ; Figure 3B). The remaining cells did not show any response. Pretreatment of the preparations with  $10 \mu\text{mol/L}$  capsaicin for 30 minutes led to a decrease in the proportion of NaHS-responding cells (10 of 57 neurons, 5 ganglia, 5 animals) and, more importantly, to a significant inhibition in NaHS-evoked spike discharge. The frequency of NaHS-induced action potential discharge was decreased by more than 50% to a median of  $1.06 \text{ Hz}$ . Application of  $10 \mu\text{mol/L}$  capsazepine, 30 minutes before NaHS application, also strongly diminished NaHS-induced spike discharge. Only 13 of 70 cells (4 ganglia, 3 animals) responded with action potentials and their frequency was decreased significantly by more than 75% to a median of  $0.53 \text{ Hz}$ . Application of  $10 \mu\text{mol/L}$  glibenclamide, 20 minutes before NaHS application, failed to block the excitatory effects of NaHS on submucous neurons (median,  $2.12 \text{ Hz}$ , Figure 3B).

Comparable findings were obtained from submucous plexus neurons of human tissue (Figure 3B). Perfusion with  $500 \mu\text{mol/L}$  NaHS evoked an increase in spike discharge in  $36.5\% \pm 11.6\%$  (55 cells, 4 ganglia, 3 patients). Action potential frequency significantly increased to  $2.12 \text{ Hz}$ . Pretreatment with  $10 \mu\text{mol/L}$  capsaicin for 30 minutes significantly decreased the NaHS-evoked spike discharge by 75% to a median of  $0.53 \text{ Hz}$  (33 cells, 3 ganglia, 3 patients).

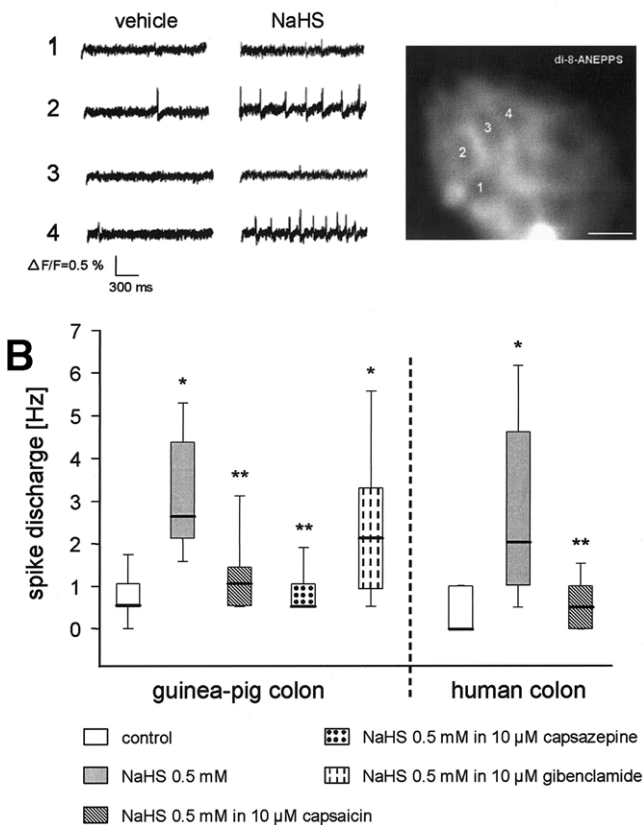
### *H<sub>2</sub>S Donor NaHS Does Not Evoke Calcium Mobilization in Isolated Cultured Enteric Neurons*

Our data suggested that TRPV1 receptors on extrinsic afferents are involved in an NaHS-evoked increase in spike discharge of enteric neurons. To strengthen this hypothesis we tested if NaHS would have a direct effect on isolated enteric neurons. NaHS was applied on cultured guinea-pig myenteric neurons and calcium influx was measured ( $n = 24$ ). No change in intracellular calcium was recorded with any of the NaHS concentrations used ( $200 \mu\text{mol/L}$ ,  $500 \mu\text{mol/L}$ , and  $1 \text{ mmol/L}$ ). As an internal control, ionomycin ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) elicited calcium influx with an increase in fluorescence ratio F340/F380 of  $2.16 \pm 0.18$ , indicating neuronal viability.

## Discussion

The major findings of this study were as follows: first, a vast majority of guinea-pig and human enteric neurons ex-

### A Neuronal activity in guinea-pig submucous plexus



**Figure 3.** Neuroimaging with the voltage-sensitive dye di-8-ANEPPS revealed that neurons in guinea-pig and human submucous ganglia were stimulated by NaHS. (A) Signals from 4 cells (1–4) of a guinea-pig submucous ganglion before and during perfusion of 500  $\mu\text{mol/L}$  NaHS. In the presence of NaHS, cells 2 and 4 respond with action potential discharge whereas cells 1 and 3 remain quiet. Cell 2 shows one spontaneously occurring action potential during vehicle perfusion (Krebs solution). A fluorescent image of the ganglion was taken by the CCD camera and is shown on the right side (scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ). Note that individual cells can be recognized by strong labeling of their cell membrane with di-8-ANEPPS. The relative change in fluorescence indicates relative changes in fluorescence. (B) Box plots show significant increase of action potential frequency in submucous ganglion cells of the guinea-pig and human colon during perfusion with 500  $\mu\text{mol/L}$  NaHS. This response is reduced significantly by either capsaicin desensitization (10  $\mu\text{mol/L}$ ) or by application of the TRPV1 antagonist capsazepine (10  $\mu\text{mol/L}$ ), but not by the K<sub>ATP</sub> channel blocker glibenclamide (10  $\mu\text{mol/L}$ ). \*Significant differences between NaHS or glibenclamide + NaHS vs control. \*\*Significant differences between capsaicin or capsazepine vs NaHS. □, Control; ■, NaHS 0.5 mmol/L; ▨, NaHS 0.5 mmol/L in 10  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin; ▩, NaHS 5 mmol/L in 10  $\mu\text{mol/L}$  capsazepine; ▧, NaHS 5 mmol/L in 10  $\mu\text{mol/L}$  glibenclamide.

pressed CSE and CBS, providing evidence that enteric neurons are able to synthesize H<sub>2</sub>S. Second, H<sub>2</sub>S acts as a secretagogue in guinea-pig and human colon. This effect involved activation of capsaicin-sensitive nerve fibers and TRPV1, which also is supported by the lack of an NaHS effect on isolated cultured enteric neurons. Third, we showed that L-cysteine, an endogenous substrate of cellular H<sub>2</sub>S production,<sup>2</sup> also evoked ion secretion in colonic mucosa, and this effect was inhibited by the CSE and CBS blockers PAG and AOAA, respectively.

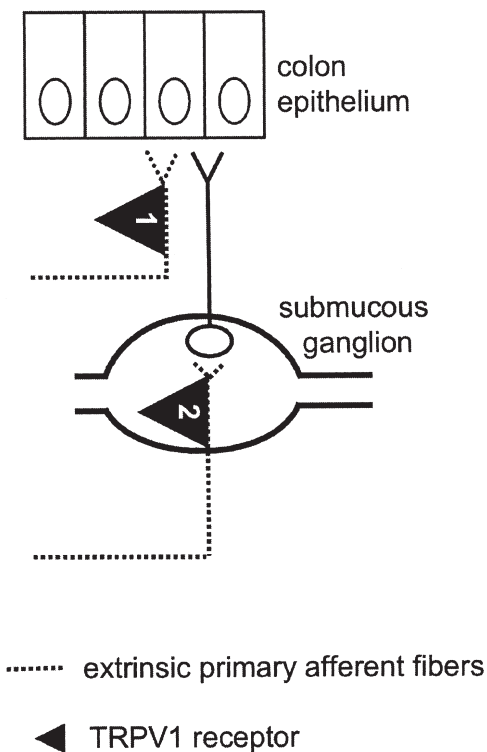
Transcripts of the H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes CSE and CBS have been detected previously in the gut wall, where they are responsible for H<sub>2</sub>S production.<sup>9</sup> A detailed localization of these enzymes, however, has not yet been evaluated.<sup>9,13,14</sup> We showed that almost all enteric neurons express CSE and CBS and that the enteric nervous system therefore could be one source of H<sub>2</sub>S in the gut wall. Furthermore, the co-expression of CSE and CBS in enteric neurons might be an indication that they are involved equally in the production of H<sub>2</sub>S, unlike in the brain where expression and activity of CSE is reported to be low.<sup>22,33</sup> Another finding was that ICC represents a potential source of H<sub>2</sub>S, very likely synthesized by CSE, rather than by CBS. It is noteworthy that ICCs also have been shown to express heme oxygenase-2, an enzyme responsible for the synthesis of another gaseous transmitter—carbon monoxide.<sup>34</sup> Future studies need to address the relevance of CSE-produced H<sub>2</sub>S for the signaling within the ICC network and for ICC muscular junctions. Compared with the nitric oxide-producing enzyme nitric oxide synthase (NOS),<sup>35</sup> CSE-IR and CBS-IR were more abundant in the enteric nervous system and more comparable with the wide distribution of heme oxygenase-2.<sup>36</sup>

In Ussing chamber experiments, NaHS dose-dependently evoked transient increases in I<sub>sc</sub>, which reflects increased ion secretion in guinea-pig and human tissue.<sup>20,25</sup> The bumetanide sensitivity strongly suggested activation of chloride secretion. The present study, similar to previous ones, used the hydrosulfide ion provided by NaHS solutions (200  $\mu\text{mol/L}$  to 2.5 mmol/L) to produce H<sub>2</sub>S. It has been reported that at physiological pH and at 37°C, the proportion of H<sub>2</sub>S in an NaHS solution is about 18.5%.<sup>24</sup> Thus, the H<sub>2</sub>S concentrations used in our study ranged from 37 to 462.5  $\mu\text{mol/L}$ . Based on these calculations and considerations, the effective concentrations of H<sub>2</sub>S in our experiments were within the range of H<sub>2</sub>S levels described in human brain ( $\leq 160$   $\mu\text{mol/L}$ )<sup>3</sup> and rat plasma ( $\leq 300$   $\mu\text{mol/L}$ ).<sup>4</sup> We also used NaHS concentrations for our study that were similar to those used by other groups.<sup>12</sup> The final effective H<sub>2</sub>S concentration in our experiments was very likely even smaller because of diffusion barrier in the tissue and evaporation of H<sub>2</sub>S from the solution, both phenomena that were not possible to quantify. We have no evidence for any toxic effects of H<sub>2</sub>S because, even at the highest concentrations used, we have not seen any effect on the field stimulation-evoked secretory response. In addition, direct recording from enteric neurons revealed that only a portion of neurons responded to NaHS, making an unspecific effect of H<sub>2</sub>S unlikely.

We used L-cysteine as a substrate for CSE and CBS to stimulate endogenous H<sub>2</sub>S production.<sup>2</sup> Similar to NaHS, L-cysteine also increased secretion, which was reduced by the CBS inhibitor AOAA and the CSE inhibitor PAG. This is strong evidence that endogenous H<sub>2</sub>S may be responsible for the L-cysteine-induced secretion seen in our experiments. The 2 blockers have been used previously to inhibit CBS and CSE activity in rat ileum homogenates,<sup>9,37</sup> fully supporting our results.

Our data suggest that H<sub>2</sub>S acts as a prosecretory modulator and that this effect is mediated by TRPV1 receptors on extrinsic primary afferent terminals, which in turn activate enteric neurons that provide the final secretomotor pathway to the mucosa (Figure 4). This concept is supported by the following findings. It is known that electrolyte secretion in colonic mucosa is regulated by intrinsic secretomotor neurons and capsaicin-sen-





**Figure 4.** Proposed model of action of H<sub>2</sub>S in the human and guinea-pig distal colon. H<sub>2</sub>S-induced secretion involves activation of TRPV1 (1, 2) on extrinsic afferent terminals that innervate enteric ganglia or terminate at the epithelial level. The result is an activation of enteric nerves and an increase in secretion.

sitive extrinsic primary afferents.<sup>19,21</sup> These 2 nerve populations interact to form reflex pathways.<sup>38</sup> It also has been shown that capsaicin-sensitive terminals expressing TRPV1 innervate a subset of enteric neurons in the submucous plexus and that acute application of capsaicin activates these terminals, which then activate enteric secretomotor neurons.<sup>19,39,40</sup> In accordance with these functional data, TRPV1 receptors have been localized to extrinsic primary afferents that send off collaterals to the mucosa and to myenteric and submucous ganglia, where they form basket-like endings.<sup>41,42</sup> In these studies,<sup>41,42</sup> no TRPV1 expression has been observed in enteric neurons. Similar to capsaicin, secretion evoked with NaHS and L-cysteine showed a strong desensitization phenomenon. NaHS-evoked secretion in our study was attenuated markedly in guinea-pig and human tissue by capsaicin desensitization or capsazepine, a potent TRPV1 antagonist.<sup>43</sup> This suggests that TRPV1 receptors on extrinsic afferent nerve endings must play a pivotal role in H<sub>2</sub>S-mediated ion secretion. That TRPV1 may be involved in effects of H<sub>2</sub>S has been reported already for other organs. For example, H<sub>2</sub>S induces contraction of rat detrusor muscle and neurogenic inflammation in guinea-pig airways via TRPV1 activation.<sup>16,17</sup> A strong involvement of enteric neurons is suggested by the finding that NaHS evoked spike discharge in enteric neurons, a response that also was sensitive to TRPV1 antagonism. The main component of activation of enteric neurons by NaHS must therefore be indirect and requires prior activation of extrinsic primary afferents. On the basis of these findings, we suggest that the NaHS-induced secretory response was medi-

ated at the ganglionic level of the enteric nervous system via extrinsic primary afferents (Figure 4). It is unlikely that H<sub>2</sub>S had a direct prosecretory effect on colonic epithelium because NaHS did not evoke chloride secretion in the human colonic epithelial cell line T84. Direct activation of enteric neurons by H<sub>2</sub>S should play a minor role, if any, because NaHS did not evoke Ca<sup>2+</sup> mobilization in isolated cultured enteric neurons.

Based on the result that the nerve conduction blocker TTX was slightly less potent than defunctionalization of capsaicin-sensitive nerves, it is conceivable that a small part of the NaHS response may be owing to activation of TRPV1 localized on extrinsic terminals closely apposing epithelial cells. TTX would not be expected to block activation at the neuroepithelial junction formed by extrinsic capsaicin-sensitive terminals, but does block activation of enteric secretomotor neurons. Another explanation could be that NaHS activated a small population of neurons with TTX-resistant action potentials.<sup>44,45</sup>

It is known that K<sub>ATP</sub> channels mediate some inhibitory effects of H<sub>2</sub>S in vivo and in vitro.<sup>10,13</sup> Because the effects in our study all were excitatory, involvement of K<sub>ATP</sub> channels appears unlikely from the first. Nevertheless, we tested the possibility that these channels may play a role in the NaHS-induced secretion and nerve activity. According to our neuroimaging studies, the K<sub>ATP</sub> channel antagonist glibenclamide was unable to block the excitatory effect of NaHS in enteric neurons. This agrees with studies showing that 10 μmol/L glibenclamide did not change the basal or distention-evoked discharge rate of vagal mechanosensitive endings in guinea-pig esophagus.<sup>46</sup> The finding that glibenclamide reduced NaHS-evoked ion secretion is rather an epiphenomenon because the effect can be explained by the expression of K<sub>ATP</sub> channels on colonic epithelial cells and their potent involvement in chloride secretion, independent of the secretagogue studied.<sup>47-49</sup> Thus, the effect of glibenclamide on NaHS-induced secretion in our study is a result of the strong inhibitory effect of glibenclamide on chloride secretion in general. Further support for this conclusion is the failure of NaHS to evoke any secretion in the colonic epithelial cell line T84.

The interaction of H<sub>2</sub>S with the TRPV1 receptor may be relevant in the diseased gut. TRPV1 is an integrator of several painful stimuli and is thought to play a crucial role in intestinal sensory and motor disorders.<sup>50</sup> Its expression is increased in inflammatory bowel disease and rectal hypersensitivity.<sup>51,52</sup> Overexpression of TRPV1 and enhanced production of H<sub>2</sub>S may acutely boost neuronal activity and mucosal secretion. On the other hand, chronically high H<sub>2</sub>S levels may result in less activity as a result of pronounced desensitization of the capsaicin-sensitive extrinsic afferents. There is increasing evidence that H<sub>2</sub>S is involved in chronic inflammation of the bowel and even colon cancer.<sup>53,54</sup> It is tempting to speculate on the involvement of H<sub>2</sub>S in functional bowel diseases, where hypersensitivity and postinflammatory plasticity are key features.

In summary, exogenous (application of NaHS) and endogenous (application of L-cysteine) H<sub>2</sub>S has prosecretory actions by activating TRPV1 on extrinsic primary afferent terminals, which in turn activate enteric neurons. In support of this conclusion, H<sub>2</sub>S had no direct effects on cultured enteric neurons or on the epithelial cell line T84. We propose H<sub>2</sub>S as a novel signaling molecule relevant for regulation of mucosal ion secretion.

## References

1. Guidotti TL. Hydrogen sulphide. *Occup Med (Lond)* 1996;46:367–371.
2. Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 2004;24:539–577.
3. Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, Taylor JD, Warencya MW, Reiffenstein RJ, Dowling G. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J Anal Toxicol* 1989;13:105–109.
4. Chunyu Z, Junbao D, Dingfang B, Hui Y, Xiuying T, Chaoshu T. The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:810–816.
5. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K<sub>ATP</sub> channel opener. *EMBO J* 2001;20:6008–6016.
6. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002;16:1792–1798.
7. Boehning D, Snyder SH. Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:105–131.
8. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 1996;16:1066–1071.
9. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:527–531.
10. Tang G, Wu L, Liang W, Wang R. Direct stimulation of K<sub>ATP</sub> channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2005;68:1757–1764.
11. Zhao W, Wang R. H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol* 2002;283:H474–H480.
12. Teague B, Asiedu S, Moore PK. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol* 2002;137:139–145.
13. Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E, Roviezzo F, Morelli A, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating K<sub>ATP</sub> channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:325–335.
14. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sante M, Morelli A, Cirino G, Wallace JL. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* 2005;129:1210–1224.
15. Patacchini R, Santicoli P, Giuliani S, Maggi CA. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 2004;142:31–34.
16. Patacchini R, Santicoli P, Giuliani S, Maggi CA. Pharmacological investigation of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) contractile activity in rat detrusor muscle. *Eur J Pharmacol* 2005;509:171–177.
17. Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, Gatti R, Gazzieri D, Lissi N, Zagli G, Creminon C, Geppetti P, Harrison S. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *Br J Pharmacol* 2005;145:1123–1131.
18. Furness JB. The enteric nervous system. Oxford: Blackwell Publishing, 2005.
19. Weber E, Neunlist M, Schemann M, Frieling T. Neural components of distention-evoked secretory responses in the guinea-pig distal colon. *J Physiol* 2001;536:741–751.
20. Cooke HJ, Sidhu M, Fox P, Wang YZ, Zimmermann EM. Substance P as a mediator of colonic secretory reflexes. *Am J Physiol* 1997;272:G238–G245.
21. Vanner S, MacNaughton WK. Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16(Suppl 1):39–43.
22. Ishii I, Akaoshi N, Yu XN, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J* 2004;381:113–123.
23. Rühl A, Hoppe S, Frey I, Daniel H, Schemann M. Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system. *J Comp Neurol* 2005;490:1–11.
24. Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am J Physiol* 2004;286:R678–R685.
25. Michel K, Zeller F, Langer R, Nekarda H, Kruger D, Dover TJ, Brady CA, Barnes NM, Schemann M. Serotonin excites neurons in the human submucosal plexus via 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Gastroenterology* 2005;128:1317–1326.
26. Schemann M, Michel K, Peters S, Bischoff SC, Neunlist M. Cutting-edge technology. III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. *Am J Physiol* 2002;282:G919–G925.
27. Schemann M, Michel K, Ceregrzyn M, Zeller F, Seidl S, Bischoff SC. Human mast cell mediator cocktail excites neurons in human and guinea-pig enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2005;17:281–289.
28. Neunlist M, Peters S, Schemann M. Multisite optical recording of excitability in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 1999;11:393–402.
29. Kao WY, Davis CE, Kim YI, Beach JM. Fluorescence emission spectral shift measurements of membrane potential in single cells. *Biophys J* 2001;81:1163–1170.
30. Hanani M, Xia Y, Wood JD. Myenteric ganglia from the adult guinea-pig small intestine in tissue culture. *Neurogastroenterol Motil* 1994;6:103–118.
31. De Giorgio R, Bovara M, Barbara G, Canossa M, Sarnelli G, De Ponti F, Stanghellini V, Tonini M, Cappello S, Pagnotta E, Nobile-Orazio E, Corinaldesi R. Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility. *Gastroenterology* 2003;125:70–79.
32. Heintze K, Stewart CP, Frizzell RA. Sodium-dependent chloride secretion across rabbit descending colon. *Am J Physiol* 1983;244:G357–G365.
33. Heinonen K. Studies on cystathionase activity in rat liver and brain during development. Effects of hormones and amino acids in vivo. *Biochem J* 1973;136:1011–1015.
34. Miller SM, Farrugia G, Schmalz PF, Ermilov LG, Maines MD, Szurszewski JH. Heme oxygenase 2 is present in interstitial cell networks of the mouse small intestine. *Gastroenterology* 1998;114:239–244.
35. Schemann M, Schaaf C, Mader M. Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *J Comp Neurol* 1995;353:161–178.
36. Miller SM, Reed D, Sarr MG, Farrugia G, Szurszewski JH. Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol Motil* 2001;13:121–131.
37. Zhao W, Ndisang JF, Wang R. Modulation of endogenous production of H<sub>2</sub>S in rat tissues. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:848–853.
38. Vanner S, Surprenant A. Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am J Physiol* 1996;271:G223–G230.
39. Frieling T, Dobrev G, Weber E, Becker K, Rupprecht C, Neunlist M, Schemann M. Different tachykinin receptors mediate chloride secretion in the distal colon through activation of submucosal neurones. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999;359:71–79.

40. Vanner S, MacNaughton WK. Capsaicin-sensitive afferent nerves activate submucosal secretomotor neurons in guinea pig ileum. *Am J Physiol* 1995;269:G203–G209.
41. Schicho R, Florian W, Liebmann I, Holzer P, Lippe IT. Increased expression of TRPV1 receptor in dorsal root ganglia by acid insult of the rat gastric mucosa. *Eur J Neurosci* 2004;19:1811–1818.
42. Ward SM, Bayguinov J, Won KJ, Grundy D, Berthoud HR. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 2003;465:121–135.
43. Savidge J, Davis C, Shah K, Colley S, Phillips E, Ranasinghe S, Winter J, Kotsonis P, Rang H, McIntyre P. Cloning and functional characterization of the guinea pig vanilloid receptor 1. *Neuropharmacology* 2002;43:450–456.
44. Beyak MJ, Ramji N, Krol KM, Kawaja MD, Vanner SJ. Two TTX-resistant Na<sup>+</sup> currents in mouse colonic dorsal root ganglia neurons and their role in colitis-induced hyperexcitability. *Am J Physiol* 2004;287:G845–G855.
45. Rugiero F, Mistry M, Sage D, Black JA, Waxman SG, Crest M, Clerc N, Delmas P, Gola M. Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current and NaV1.9 subunit in myenteric sensory neurons. *J Neurosci* 2003;23:2715–2725.
46. Zagorodnyuk VP, Chen BN, Costa M, Brookes SJ. 4-aminopyridine- and dendrotoxin-sensitive potassium channels influence excitability of vagal mechano-sensitive endings in guinea-pig oesophagus. *Br J Pharmacol* 2002;137:1195–1206.
47. Schultheiss G, Diener M. K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> conductances in the distal colon of the rat. *Gen Pharmacol* 1998;31:337–342.
48. Huang Y, Wong PY. Inhibitory effect of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel regulators on forskolin-stimulated short-circuit current across the isolated mucosa of the rat colon. *J Cell Physiol* 1996;168:678–683.
49. McNamara B, Winter DC, Cuffe JE, O'Sullivan GC, Harvey BJ. Basolateral K<sup>+</sup> channel involvement in forskolin-activated chloride secretion in human colon. *J Physiol* 1999;519:251–260.
50. Geppetti P, Trevisani M. Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br J Pharmacol* 2004;141:1313–1320.
51. Yiangou Y, Facer P, Dyer NH, Chan CL, Knowles C, Williams NS, Anand P. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet* 2001;357:1338–1339.
52. Chan CL, Facer P, Davis JB, Smith GD, Egerton J, Bountra C, Williams NS, Anand P. Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. *Lancet* 2003;361:385–391.
53. Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 2006;131:259–271.
54. Rose P, Moore PK, Ming SH, Nam OC, Armstrong JS, Whiteman M. Hydrogen sulfide protects colon cancer cells from chemopreventative agent beta-phenylethyl isothiocyanate induced apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:3990–3997.

---

Received February 10, 2005. Accepted August 3, 2006.

Address requests for reprints to: Professor Michael Schemann, Technical University Munich, Department of Human Biology, Hochfeldweg 2, D-85350 Freising-Weißenstephan, Germany. e-mail: schemann@wzw.tum.de; fax: (49) 8161-71-5785.

R.S. and D.K. contributed equally to this article.

Supported by the German Research Foundation (DFG Sche 267/6-1).

The authors would like to thank Birgit Kuch and Marlene Redl for excellent technical assistance.

# Appendix 4

D. Krueger, M. Foerster, K. Mueller, F. Zeller, J. Slotta-Huspenina, J. Donovan, D. Grundy, M. Schemann

Signalling mechanisms involved in the intestinal prosecretory actions of hydrogen sulphide

In Revision bei Neurogastroenterol Motil

## **Contributions**

**D. Krueger:** study design of Ussing chamber experiments, generation and analysis of data on mode of action of hydrogen sulphide in human and guinea-pig tissue, drafting the manuscript.

M. Foerster, K. Mueller: help with Ussing chamber experiments in guinea-pig tissue.

F. Zeller, J. Slotta-Huspenina: tissue supply.

J. Donovan, D. Grundy: recordings from visceral afferents

M. Schemann: study design, grant support, manuscript editing.



# neurogastroenterology & motility

## Signalling mechanisms involved in the intestinal pro-secretory actions of hydrogen sulphide.

Journal:	<i>Neurogastroenterology and Motility</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Krueger, Dagmar; Technische Universität München, Human Biology Foerster, Marianne Mueller, Kerstin Zeller, Florian Slotta-Huspenina, Julia Donovan, Jemma Grundy, David Schemann, Michael; Technische Universität München, Human Biology
Key Words:	hydrogen sulfide signalling, mucosal secretion, TRP channels, visceral afferents

1  
2  
3 **Signalling mechanisms involved in the intestinal pro-secretory**  
4 **actions of hydrogen sulphide.**  
5  
6  
7

8  
9 **Dagmar Krueger**<sup>1</sup>, **Marianne Foerster**<sup>1</sup>, **Kerstin Mueller**<sup>1</sup>, **Florian Zeller**<sup>2</sup>, **Julia Slotta-**  
10 **Huspenina**<sup>3</sup>, **Jemma Donovan**<sup>4</sup>, **David Grundy**<sup>4</sup>, **Michael Schemann**<sup>1</sup>.  
11  
12

13  
14 *Short title:* H<sub>2</sub>S signalling mechanisms  
15  
16

17  
18 1 Human Biology, Technische Universität München, Freising, Germany  
19

20 2 Surgery, Clinic Freising, Freising, Germany  
21

22 3 Pathology, Clinic Rechts der Isar, Technische Universität München, München, Germany  
23

24 4 Department of Biomedical Science, The University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom  
25  
26

27 **Word counts: 4517**  
28  
29

30 *Correspondence to:*  
31

32 Prof. Michael Schemann  
33

34 Human Biology, Technische Universität München,  
35

36 Liesel-Beckmann-Strasse 4  
37

38 D-85350 Freising-Weihenstephan, Germany  
39

40 Phone: \*\*49 8161 71 5483; Fax: \*\*49 8161 71 5785; e-mail: [schemann@wzw.tum.de](mailto:schemann@wzw.tum.de)  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Abstract

**Background:** H<sub>2</sub>S actions in the gut involve neural activation. This study aimed to reveal the signalling mechanisms responsible for the pro-secretory effect of H<sub>2</sub>S by using TRPV1 and unselective TRP blockers and inhibitors of other signalling cascades hitherto described to be targeted by H<sub>2</sub>S outside the gut.

**Methods:** Ussing chamber voltage clamp technique was used to study actions of the H<sub>2</sub>S donor NaHS on secretion in guinea-pig and human intestine. NaHS effects on guinea-pig primary afferents were also evaluated.

**Key Results:** NaHS evoked secretion was significantly reduced in guinea-pig and human tissue by the selective TRPV1 blockers capsazepine, AMG9801, SB705498, BCTC, the Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) inhibitor LY294002, the store operated calcium channel blocker SKF96365, the inositol triphosphate blocker 2-APB, and atropine but not by the TRPA1 blocker HC030031 or L- and T-type calcium channel antagonists. The unselective TRP blockers Gd<sup>3+</sup> and La<sup>3+</sup> had no effects while ruthenium red reduced NaHS effects in guinea-pig tissue. The NaHS response was inhibited by neurokinin-1 and 3 receptor blockers in guinea-pig and neurokinin-1 and 2 receptor blockade in human tissue. While NaHS desensitized the tissue to capsaicin, pre-treatment with capsaicin had no influence on the NaHS response. NaHS induced capsazepine and LY29400 sensitive afferent discharge.

**Conclusions & Inferences:** H<sub>2</sub>S evokes mucosal secretion by targeting TRPV1 expressing afferent nerves which activate cholinergic secretomotor neurons via release of substance P acting species dependent on neurokinin-1, 2 or 3 receptors. Results suggest that H<sub>2</sub>S activates TRPV1 with additional contributions of intracellular calcium dependent pathways and PI3K.

**Key words:** hydrogen sulfide signalling; mucosal secretion, TRP channels; visceral afferents

## Introduction

Since the discovery of hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) as a gasotransmitter numerous actions of H<sub>2</sub>S on various organ functions have been reported.<sup>1-3</sup> These studies concluded that H<sub>2</sub>S regulates a number of physiological processes but plays at the same time an important role in the pathophysiology of various diseases. H<sub>2</sub>S releasing agents or blockade of H<sub>2</sub>S generation are today considered as novel therapeutic options to normalise malfunctions of biological processes.<sup>4</sup>

1  
2  
3  
4  
5 H<sub>2</sub>S exerts its functions by acting on a remarkably wide spectrum of extra- and intracellular  
6 targets. One of its first physiological role was found in the brain where H<sub>2</sub>S enhances the  
7 activity of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and facilitates the induction of long-term  
8 potentiation.<sup>5</sup> In the cardiovascular system the principal actions of H<sub>2</sub>S involve activation of  
9 K<sub>ATP</sub> channels<sup>6</sup> but further mechanisms have been suggested including inhibition of L-type  
10 calcium channels.<sup>7</sup> H<sub>2</sub>S is involved in acute pancreatitis through phosphatidylinositol 3-kinase  
11 (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway.<sup>8</sup> Last but not least, H<sub>2</sub>S may target TRP channels.  
12 TRPV1 channels are implicated in the pro-inflammatory action of H<sub>2</sub>S in the pulmonary  
13 circulation<sup>9</sup> as well as in its contractile effects in urinary bladder.<sup>10</sup> The H<sub>2</sub>S donor NaHS  
14 induced calcium responses in TRPA1 expressing HEK cells and H<sub>2</sub>S -sensitive TRPA1  
15 channels may play a role in sensory transduction in the urinary bladder.<sup>11</sup>  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 In the gut H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes are expressed by enteric neurons, interstitial cells of  
27 Cajal and in the epithelium.<sup>12,13</sup> In addition the gut microbiota produces H<sub>2</sub>S which leads to  
28 luminal concentrations of H<sub>2</sub>S of up to 1 mM.<sup>14</sup> Recently, several studies reported actions of  
29 H<sub>2</sub>S on various gut functions.<sup>1,15</sup> Thus, H<sub>2</sub>S inhibits smooth muscle activity in several species  
30 via K<sub>ATP</sub> dependent and independent mechanisms.<sup>16,17</sup> It has an anti-inflammatory action in  
31 the gut, very likely involving K<sub>ATP</sub> channels and TRPV1 receptors.<sup>18,19</sup> H<sub>2</sub>S has dual actions  
32 on visceral sensitivity; its anti-nociceptive action involved K<sub>ATP</sub> channels<sup>20</sup> while it activates  
33 T-type calcium channels to induce visceral hyperalgesia.<sup>21</sup>  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 We previously identified H<sub>2</sub>S as a pro-secretory neuromodulator increasing chloride secretion  
43 in the guinea-pig and human intestine.<sup>12</sup> The nerve blocker tetrodotoxin abolished the H<sub>2</sub>S  
44 induced secretion suggesting a central role for nerves.<sup>12</sup> Neither NMDA nor K<sub>ATP</sub> channels  
45 were involved because the H<sub>2</sub>S evoked secretion was not blocked by the NMDA antagonist  
46 AP-5 or the K<sub>ATP</sub> channel blocker glibenclamide. The reduced secretory response to NaHS  
47 after chemical ablation of primary afferents<sup>12</sup> suggested but did not prove the involvement of  
48 TRPV1. The effects of TRPV1 blockade on NaHS responses, in particular in human tissue,  
49 remain unknown.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57

58 The overall aim of this study was to provide further insights into the mechanisms responsible  
59 for H<sub>2</sub>S evoked secretion in guinea-pig and human tissue using antagonists against signalling  
60 pathways that have been described to play a central role in the physiological actions of H<sub>2</sub>S in



1  
2  
3 organs other than the gut. We therefore tested the effect of TRP channel antagonists with a  
4 focus on TRPV1. In addition we studied the transmitter cascade activated by H<sub>2</sub>S using  
5 receptor blockers of the sensory transmitter substance P and the enteric pro-secretory  
6 transmitter acetylcholine. Lastly, we studied whether intracellular signalling pathways which  
7 have been identified as possible targets of H<sub>2</sub>S in other models also play a role in the pro-  
8 secretory action of H<sub>2</sub>S. We used guinea-pig and human intestine because the pro-secretory  
9 action of NaHS in these tissues were entirely nerve mediated<sup>12</sup> whereas the NaHS induced  
10 secretion in the rat colon involves direct effects on epithelium.<sup>22</sup>  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

## 21 **Materials and Methods**

### 22 **Tissue samples:**

23  
24 Tissue samples were obtained from male guinea pigs (Dunkin Hartley 300-550g, Harlan-  
25 Winkelmann, Borchon, Germany; Harlan, Bichester, UK). For the Ussing chamber studies  
26 colonic segments were removed after killing the animals by cervical dislocation and  
27 exsanguination in accordance with the German ethical guidelines for animal experiments.  
28 Segments were dissected in ice cold Krebs solution to obtain mucosa/submucosa preparations  
29 containing the submucous plexus. For afferent recording experiments jejunal segments were  
30 removed from guinea pigs killed by cervical dislocation in accordance with UK home office  
31 regulations covering schedule 1 procedures. Jejunal segments were immediately placed into  
32 oxygenated (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>, Carbogen) Krebs solution at room temperature.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42  
43 Human tissue samples of small and large bowel were obtained from 71 patients (36 female,  
44 35 male, 63±16 years) undergoing surgery at the Medical Clinics in Freising and Rechts der  
45 Isar in Munich. Samples were taken from macroscopically unaffected areas. Diagnoses that  
46 led to the surgery were carcinoma of the large bowel (46), diverticulitis (9), neoplasia (2),  
47 Crohn disease (2), colon polyps (2), ileus (1), necrosis of the colon (1) and stenosis of the  
48 colon (1). Experiments were performed on 54 colon, 3 rectum, 9 ileum, 2 jejunum and 2  
49 duodenum specimens. Procedures were approved by the ethics committee of the Technical  
50 University Munich (1512/06). After removal specimens were placed in ice cold oxygenated  
51 sterile Krebs solution and immediately transferred to the institute. Segments were dissected in  
52 ice cold Krebs solution to obtain mucosa/submucosa preparations containing the submucous  
53 plexus.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Ussing chamber experiments

To test the effects of the H<sub>2</sub>S donor NaHS on ion secretion in intact submucosa/mucosa preparations of guinea-pig and human intestine we employed Ussing chamber techniques (Easy Mount chambers, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) as previously described in detail.<sup>12,23</sup> The area of the recording chamber was 0.5cm<sup>2</sup>. Mucosal and serosal sides were bathed separately in 5 mL Krebs solution maintained at 37°C and continuously bubbled with carbogen. The set-up allowed measurements of transepithelial electrogenic transport (short-circuit current in  $\mu\text{A}\times\text{cm}^{-2}$ , I<sub>sc</sub>) in eight mucosa/submucosa preparations from one tissue specimen. Positive I<sub>sc</sub> indicated a net anion current from the serosa to the lumen. The chambers were equipped with electrodes on either side of the tissue and connected to a constant voltage stimulator (Grass SD-9; Astro-Med Inc., WestWarwick, RI, USA). Electrodes were used for neural stimulation of the tissue (nerve mediated secretion) by delivering a train of pulses with supramaximal stimulus parameters: 20V pulse amplitude, 10Hz pulse frequency, 1ms pulse duration, 10s train duration for human tissue and 6V, 10Hz, 0.5ms pulse duration, 10s train duration for guinea-pig tissue. Tissues were allowed to equilibrate for at least 30min before measurements.

### Afferent nerve recordings

To investigate the effects of the H<sub>2</sub>S donor NaHS on afferent nerve activity jejunal segments were removed with their corresponding mesenteric bundle attached. A 5cm segment was placed into a purpose built chamber (14ml). The recording chamber was continually perfused with prewarmed (35°C) oxygenated Krebs solution. The jejunum was cannulated at either end, the oral catheter was attached to an infusion pump (Perfusor Secura, B.Braun, Germany) to allow constant perfusion of saline. The other catheter was attached to a pressure transducer (plus DT-XX, Becton Dickson, Singapore), to measure intraluminal pressure changes, and a drainage tube and tap. The mesenteric bundle was then pinned out onto the sylguard base of the recording chamber. A multiunit mesenteric nerve was dissected out of the surrounding fat and connective tissue and cut distal to the jejunum to eliminate efferent traffic. The nerve was then sucked into the glass electrode and the surrounding fat tissue is then used to create a seal. The electrode was connected to a headstage (NL100, Digitimer Ltd, UK). Signals then passed through a differential amplifier (NL104, Neurolog system) and filters (NL125, Neurolog system and Hum Bug, Quest Scientific). The nerve and jejunal pressure signals were captured on a computer via a 1401 analogue to digital converter and Spike 2 software (Version 5.21, Cambridge Electronic Design, UK) was used to visualise and record. Raw multiunit nerve

1  
2  
3 activity was quantified using wavemark analysis which counted the number of action  
4 potentials crossing a pre-set threshold. A threshold level for spike counting was set at the peak  
5 of the smallest identifiable spike (at roughly twice the baseline noise level). Recordings were  
6 closely monitored for changes in noise levels or electrode drift throughout the experiments.  
7  
8  
9

### 10 11 **Drugs and Solutions**

12 Krebs solution for Ussing chamber experiments contained (in mmol/L): 117 NaCl, 4.7 KCl,  
13 1.2 MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O, and 11 glucose (all from  
14 Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Krebs solution for afferent nerve recordings contained  
15 (in mmol/L): 120 NaCl; 5.9 KCl; 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 15.4 NaHCO<sub>3</sub>; 1.2 MgSO<sub>4</sub>; 11.5 glucose; 2.5  
16 CaCl<sub>2</sub>. Stock solution of NaHS (Sigma-Aldrich) was made in Krebs solution and prepared  
17 freshly before experiments. Stock solutions of ruthenium red, gadolinium chloride, lanthanum  
18 chloride, mibefradil, atropine (all from Sigma-Aldrich), tetrodotoxin (TTX, Alexis, Lausen,  
19 Switzerland) and SKF96365 (Biomol, Hamburg, Germany) were prepared in deionised water,  
20 capsaizepine (Biotrend, Cologne, Germany and Tocris Bioscience, Bristol, UK), AMG9810  
21 ((2E)-N-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-3-[4-(1,1-dim ethylethyl)phenyl]-2-  
22 propenamide; Biozol, Eching, Germany), SB705498 (N-(2-bromophenyl)-N'-[[(R)-1-(5-  
23 trifluoromethyl-2-pyridyl)pyrrolidin-3-yl)]urea; Department of Medicinal Chemistry  
24 Glaxo,SmithKline, Harlow, UK), BCTC (N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorpyridin-2-yl)  
25 tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide; Biomol, Hamburg, Germany), HC030031 (2-(1,3-  
26 dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7 -yl)-N-(4-isopropylphenyl)acetamide;  
27 Biozol, Eching, Germany), 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate; Sigma-Aldrich),  
28 LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one; Cell Signalling  
29 Technology, Denver, Co, USA and New England BioLabs, Herts, UK), SR140333B, SR  
30 4896C, SR 142801 (all from Sanofi-Aventis, Chilly-Mazarin, France) were dissolved in 100%  
31 dimethyl sulphoxide. Nifedipine (Sigma-Aldrich) was dissolved in ethanol. None of the  
32 substances affected the pH of the bathing solution. The solvents had no effect on short circuit  
33 currents. All compounds were added to the basolateral side.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

### 53 **Data analysis**

54 For the Ussing chamber experiments the statistical values were based on the number of  
55 patients and animals. Each dose and blocker was tested in separate tissues. For the blockers a  
56 separate tissue from the same patient or guinea-pig served as a control. Blockers were added  
57 to the mucosa/submucosa preparations 20min before application of NaHS. The peak response  
58  
59  
60

1  
2  
3 to NaHS was analysed. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. To detect significant  
4 differences we used Students t-test, Wilcoxon signed rank test, repeated measurement  
5 ANOVA (Bonferroni's posthoc) or repeated measurement ANOVA on ranks (Dunn's post-  
6 hoc) depending on the distribution of data and the study design (sigma plot 3.1). For afferent  
7 nerve recordings spontaneous baseline afferent nerve activity was subtracted from the  
8 response after NaHS administration in order to quantify the change in afferent firing which is  
9 represented as mean  $\pm$  SEM. The NaHS response in the absence and presence of blockers was  
10 analysed by 2-way ANOVA with Bonferroni post test.  $P < 0.05$  was considered statistically  
11 significant.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

## 23 Results

24 Based on our previous studies we used three concentrations of NaHS in guinea-pig tissue and  
25 one concentration in human tissue for Ussing chamber studies.<sup>12</sup> The concentrations were not  
26 toxic as they had no negative effects on tissue properties, such as the response to electrical  
27 stimulation.<sup>12</sup> The control responses were in the same range as previously reported (Table 1).  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Involvement of TRPV1 in NaHS evoked pro-secretory responses.

As selective TRPV1 blockers we used AMG 9810, SB-705498 and BCTC at concentrations  
that significantly reduced secretory responses to the TRPV1 activator capsaicin (1 $\mu$ M).  
AMG9810 (10 $\mu$ M), SB705498 (5 $\mu$ M) and BCTC (5 $\mu$ M) significantly reduced the capsaicin  
response to 36.5 $\pm$ 11.7% (n=7), 57.2 $\pm$ 17.8% (n=22) and 45.7 $\pm$ 19.3% (n=24), respectively. The  
TRPV1 antagonists had no effect on nerve mediated secretion (control vs. capsaizepine:  
311 $\pm$ 34 vs. 299 $\pm$ 26 $\mu$ Acm<sup>-2</sup>; control vs. AMG9810: 172 $\pm$ 28 vs 199 $\pm$ 33 $\mu$ Acm<sup>-2</sup>; control vs.  
SB705498: 270 $\pm$ 21 vs. 303 $\pm$ 21 $\mu$ Acm<sup>-2</sup>; control vs. BCTC: 342 $\pm$ 28 vs. 301 $\pm$ 28 $\mu$ Acm<sup>-2</sup>)

In guinea-pig tissues all three antagonists reduced the responses to NaHS (Table 1).  
AMG9810 significantly decreased the secretory responses to 0.2, 0.5 and 1 mM NaHS to  
6.7 $\pm$ 1.2%, 46.4 $\pm$ 17.9% and 43.6 $\pm$ 10.1%, respectively. SB705498 caused a significant  
decrease to 38.7 $\pm$ 9.9%, 45.3 $\pm$ 7.1% and 59.2 $\pm$ 14.4% of the responses to 0.2, 0.5 and 1 mM  
NaHS, respectively. BCTC significantly reduced the responses to 0.2 and 0.5mM NaHS to

1  
2  
3 61.8±9.4% and 60.7±9.5%, respectively, while the effect on 1 mM NaHS was not significant  
4 (75.4±14.6%). The unselective TRPV1 blocker ruthenium red had to be used at 50 µM to  
5 significantly reduce the capsaicin induced secretion to 5.3±3.3% (n=6). The 0.2mM and  
6  
7 0.5mM NaHS induced secretion was reduced by ruthenium red to 43.0±18.4% and 31.3±  
8  
9 23.8%, respectively, while the response to 1mM NaHS was non-significantly increased to  
10  
11 145.2±29.6% (Table 1).  
12

13  
14 In human tissues capsazepine, AMG9810, SB705498 and BCTC significantly reduced the  
15 secretory response evoked by NaHS to 29.3±0.7%, 26.3±6.5%, 21.5±6.4% and 33.0±3.3%,  
16  
17 respectively (Table 1). Ruthenium red, however, significantly increased the NaHS response to  
18  
19 597.6±241.5%.  
20  
21

22  
23 Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) is functionally coupled to TRPV1.<sup>24,25</sup> We therefore  
24 tested whether the response to NaHS was reduced by the PI3K inhibitor LY294002 (10µM)  
25 (Table 1). LY294002 decreased in guinea-pig tissue the responses to 0.2, 0.5 and 1 mM NaHS  
26  
27 to 38.3±19.3%, 43.8±12.3% and 44.6±8.1%, respectively. LY294002 had no effect on nerve  
28  
29 mediated secretion (control vs. LY294002: 264±19 vs. 249±12µAcm<sup>-2</sup>). In human tissues  
30  
31 LY294002 diminished the NaHS response to 34.1±8.7%.  
32  
33

34  
35 Capsaicin desensitizes TRPV1 receptors. We showed previously that the response to NaHS  
36 also desensitized.<sup>12</sup> We therefore investigated cross-desensitization between 1mM NaHS and  
37  
38 1µM capsaicin evoked secretion in human tissue. Repeated applications of capsaicin induced  
39  
40 a strong desensitization as the second capsaicin application only reached on average 0.9% of  
41  
42 the secretory response observed during the first capsaicin application (n=6, P=0.031). While  
43  
44 pre-treatment of human tissues with NaHS lead to a significantly reduced response to  
45  
46 capsaicin (n= 7; 66.4±25.6µAcm<sup>-2</sup> vs. 49.1±21.2µAcm<sup>-2</sup>, P=0.016), pre-treatment of the tissue  
47  
48 with capsaicin had no influence on the NaHS evoked response (n=6, 9.9±2.8µAcm<sup>-2</sup> vs.  
49  
50 10.0±2.7µAcm<sup>-2</sup>, P=0.94).  
51  
52

### 53 **NaHS actions on guinea-pig extrinsic afferent nerves**

54  
55 The results from the Ussing chamber experiments strongly suggested that TRPV1 is critically  
56  
57 involved in pro-secretory responses of NaHS. To provide further support for this conclusion  
58  
59 we performed recordings from extrinsic afferents nerves, most of which express TRPV1.  
60  
Serosal application of 300µM NaHS (n=8) caused a transient increase in jejunal afferent  
nerve activity which reached a maximum increase in firing of 8.1±2.4 Spikes/s 1 minute after

1  
2  
3 NaHS application. The response to 300 $\mu$ M NaHS was significantly reduced in the presence of  
4 the TRPV1 antagonist capsazepine (10 $\mu$ M circulated in the organ bath for 10 minutes prior to  
5 NaHS application;  $P=0.03$ ,  $n=7$ ) (Figure 2). The afferent response to 300 $\mu$ M NaHS was also  
6 reduced in the presence of the PI3K inhibitor, LY294002 (10  $\mu$ M circulated in the organ bath  
7 for 1hour prior to NaHS application;  $P<0.0001$ ,  $n=4$ , Figure 2).  
8  
9

### 10 11 12 13 **Involvement of substance P as a transmitter of TRPV1 expressing afferents and** 14 **acetylcholine as a pro-secretory transmitter of enteric secretomotor neurons.** 15

16  
17 If the pro-secretory action of NaHS involves TRPV1 expressing extrinsic afferents one would  
18 expect release of substance P which then activates enteric cholinergic secretomotor neurons.  
19  
20  
21

22  
23 In guinea-pig tissues the neurokinin (NK) 1 antagonists SR140333 (1 $\mu$ M) and the NK3  
24 antagonists SR142801 (1 $\mu$ M) both reduced the secretory responses after application of  
25 0.2mM NaHS to  $46.2\pm 12.7\%$  and  $29.1\pm 9.9\%$ , respectively (Table 1). The responses after  
26 0.5mM NaHS were also significantly reduced by SR143330 and SR142801 to  $32.5\pm 4.3\%$  and  
27  $47.9\pm 29.9\%$ . The NK2 antagonist SR4896 had no effect on NaHS evoked secretion (Table 1).  
28 In human tissues the responses to application of NaHS were significantly reduced by the NK1  
29 antagonist SR143330 to  $45.8\pm 10.1\%$  and by the NK2 antagonist SR4896C to  $40.9\pm 17.4\%$ ,  
30 whereas the NK3 antagonist SR142801 had no effect ( $105.2\pm 31.4\%$ , Table 1).  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 Because enteric secretomotor neurons release acetylcholine we tested if the responses to  
40 NaHS were atropine sensitive. In guinea pig tissues responses to 0.2, 0.5 and 1mM NaHS  
41 were significantly reduced by atropine to  $53.9\pm 13.3\%$ ,  $49.1\pm 11.0\%$  and  $52.3\pm 13.7\%$ ,  
42 respectively (Table 1). In human tissues the NaHS response was attenuated by atropine to  
43  $53.3\pm 11.0\%$ .  
44  
45  
46  
47  
48

### 49 **Involvement of other TRP channels and calcium signaling**

50  
51 The selective TRPA1 blocker HC030031 (10 $\mu$ M)<sup>27</sup> did not alter responses to 0.2, 0.5 or 1mM  
52 NaHS ( $113.9\pm 18.9\%$ ,  $73.9\pm 17.5$  or  $113.0\pm 29.9\%$ , respectively, Table 1). HC030031 had no  
53 effect on nerve mediated secretion (control vs. HC030031:  $270\pm 21$  vs.  $308\pm 24\mu\text{Acm}^{-2}$ ). Also  
54 in human tissues HC 030031 had no effect on the NaHS induced response ( $86.9\pm 58.8\%$ ).  
55 The trivalent cations lanthanum and gadolinium have been used to block TRPC1-7, TRPV4-6  
56 and TRPM1-3 subfamily.<sup>28</sup> Neither lanthanum (100 $\mu$ M) nor gadolinium (100 $\mu$ M) altered  
57 nerve mediated secretion (control vs. lanthanum:  $324\pm 29$  vs.  $339\pm 28\mu\text{Acm}^{-2}$ ; control vs.  
58  
59  
60

gadolinium:  $208 \pm 29$  vs.  $243 \pm 33 \mu\text{Acm}^{-2}$ ). In guinea-pig tissues neither  $\text{La}^{3+}$  nor  $\text{Gd}^{3+}$  reduced the NaHS induced secretion (Table 1). While  $\text{La}^{3+}$  was also ineffective in human tissue,  $\text{Gd}^{3+}$  caused a reduction in the response to NaHS to  $47.6 \pm 19.6\%$  (Table 1).

The L- and T-type calcium channel blockers Nifedipine ( $1 \mu\text{M}$ ) and mibefradil ( $0.1$  and  $10 \mu\text{M}$ ) had no effect on NaHS evoked secretion in guinea-pig or human tissues (Table 1). Nifedipine and  $0.1 \mu\text{M}$  mibefradil had no effect on nerve mediated secretion (control vs. nifedipine:  $238 \pm 23$  vs.  $208 \pm 26 \mu\text{Acm}^{-2}$ ; control vs. mibefradil:  $378 \pm 44$  vs.  $446 \pm 43 \mu\text{Acm}^{-2}$ ). In contrast,  $10 \mu\text{M}$  mibefradil significantly decreased nerve mediated secretion (control vs. mibefradil:  $229 \pm 23$  vs.  $159 \pm 34 \mu\text{Acm}^{-2}$ ).

SKF96365 ( $10 \mu\text{M}$ ) was used to block store operated Ca channels and 2-APB ( $1 \mu\text{M}$ ) as an IP3 blocker. Based on their mode of actions both substances have also been used as TRPC blockers.<sup>28</sup> In guinea pig tissues, SKF96365 significantly reduced the responses to  $0.2$ ,  $0.5$  and  $1 \text{mM}$  NaHS to  $30.3 \pm 13.9\%$ ,  $16.1 \pm 5.5\%$  and  $28.8 \pm 6.9\%$ , respectively (Table 1). 2-APB also significantly reduced responses to  $0.2$ ,  $0.5$  and  $1 \text{mM}$  NaHS to  $41.9 \pm 14.0\%$ ,  $48.3 \pm 12.3\%$  and  $49.1 \pm 28.2\%$ , respectively (Table 1). While SKF96365 had no effect on nerve mediated secretion (control vs. SKF96365:  $269 \pm 63$  vs.  $184 \pm 31 \mu\text{Acm}^{-2}$ ), 2-APB had inhibitory effects (control vs 2-APB:  $239 \pm 25$  vs.  $195 \pm 24 \mu\text{Acm}^{-2}$ ). Both SKF96365 and 2-APB significantly reduced NaHS induced secretion in human tissues to  $48.7 \pm 13.1\%$  and  $30.7 \pm 17.2\%$ , respectively.

## Discussion

This study revealed that the pro-secretory action of the  $\text{H}_2\text{S}$  donor NaHS in guinea-pig and human intestine is critically dependent on TRPV1 expressing nerves whereas other TRP channels like TRPA1, TRPC1-C7 and TRPM1-M3 appear not to be involved. As a consequence of TRPV1 activation the sensory transmitter substance P is released from afferent nerves. Substance P then activates enteric cholinergic secretomotor neurons. The neurokinin receptors involved agree with the pharmacology of secretomotor neuron activation by substance P in guinea-pig and human. While NK1 and NK3 are responsible for neurally mediated secretion in guinea-pig intestine<sup>26</sup>, it is NK1 and NK2 receptors in human intestine.<sup>29</sup>

1  
2  
3 We showed previously that the pro-secretory actions of NaHS are indeed mediated by H<sub>2</sub>S  
4 because the effects were mimicked by the endogenous H<sub>2</sub>S donor L-cysteine and effects of L-  
5 cysteine were blocked by inhibitors of the H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes cystathionine  $\gamma$ -lyase  
6 and cystathionine  $\beta$ -synthase.<sup>12</sup> The final concentrations of H<sub>2</sub>S in the Ussing chamber is  
7 within the expected physiological range of H<sub>2</sub>S levels (for further discussion see <sup>1,12</sup>).  
8  
9

10  
11  
12  
13 The strong inhibitory actions of the selective but chemically distinct TRPV1 antagonists  
14 capsazepine, AMG9801, SFB705498 and BCTC <sup>30</sup> emphasize the crucial role for TRPV1 in  
15 mediating pro-secretory actions of NaHS. All blockers act as group A antagonists on human  
16 and guinea-pig TRPV1, that is they block capsaicin as well as proton induced TRPV1  
17 activation.<sup>30,31</sup> None of the antagonists reduced the electrically evoked nerve mediated  
18 secretion, thereby ruling out unselective inhibitory effects. None of the TRPV1 antagonists  
19 fully abolished the responses to NaHS or 1 $\mu$ M capsaicin. To assure specificity of the TRPV1  
20 antagonists we did not test them at higher concentrations. It is noteworthy that the potency of  
21 the TRPV1 antagonists to reduce responses to capsaicin agrees with their potency to attenuate  
22 the responses to NaHS. TRPV1 expressing afferents appear to be the initial target of NaHS  
23 activated signalling cascades because the NaHS increased firing of afferent nerves was  
24 reversed by capsazepine and, as we have shown previously, chemical ablation of these nerves  
25 with capsaicin fully abolished H<sub>2</sub>S evoked secretion <sup>12</sup>  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38 TRPV1 is a polymodal nociceptor activated and sensitized by numerous extra- and  
39 intracellular ligands.<sup>30</sup> TRPV1 activation by vanilloid compounds, heat and protons is very  
40 likely through distinct or incompletely overlapping channel regions.<sup>32</sup> Our results suggest that  
41 NaHS may either directly stimulate TRPV1 or indirectly by targeting pathways which are  
42 functionally linked to TRPV1 activation. If NaHS directly modulates TRPV1 it is likely that it  
43 has multiple targets, one of which has to be the capsaicin binding site or pathways directly  
44 linked to capsaicin induced signalling. This is supported by the strong inhibitory actions of the  
45 TRPV1 antagonists which competitively inhibit capsaicin binding. Interestingly, NaHS  
46 desensitized TRPV1 to capsaicin, whereas capsaicin induced TRPV1 desensitization did not  
47 diminish NaHS evoked secretion. This suggests that NaHS has additional actions on TRPV1  
48 which are independent of capsaicin activated pathways. In this context, it is noteworthy that  
49 decreased TRPV1 expression associated with point mutations rendered TRPV1 insensitive to  
50 capsaicin but at the same time hypersensitive to garlic and more responsive to weak acids.<sup>33</sup>  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60 This observation may support a direct interaction of H<sub>2</sub>S with TRPV1 at regions distinct from



1  
2  
3 the capsaicin binding site as garlic actions on blood vessels are reported to be mediated by  
4 H<sub>2</sub>S.<sup>34</sup> However, the exact target region of H<sub>2</sub>S at human and guinea-pig TRPV1 remains  
5 elusive. Apart from transient ligand binding, TRP channel activation may also occur by  
6 covalent binding of ligands and stable modification of the channel protein.<sup>35</sup> This is also true  
7 for TRPV1 in which a single cystein residue in the N-terminal region of the protein enables  
8 pungent compounds from onion and garlic to activate the channel.<sup>36</sup> It remains to be studied if  
9 H<sub>2</sub>S may act similarly.

10  
11  
12 The SOC channel blocker SKF96365, the IP<sub>3</sub> blocker 2-APB and the PI3K inhibitor  
13 LY294002 potently inhibited NaHS induced secretion. Although it remains to be studied  
14 whether activation of IP<sub>3</sub> receptor, SOC channel or PI3K happens down- or upstream of  
15 TRPV1, the results suggest that NaHS signals through pathways involving increases in  
16 intracellular calcium levels.

17  
18  
19 Several lines of evidence suggest that inhibition of NaHS evoked secretion by the PI3K  
20 inhibitor LY294002 involves TRPV1. First, PI3K induces heat hyperalgesia very likely by  
21 regulating TRPV1; second, potentiation of capsaicin induced TRPV1 currents is completely  
22 blocked by LY294002.<sup>24</sup>

23  
24  
25 2-APB has recently been shown to inhibit H<sub>2</sub>S evoked secretion in rat colon through  
26 inhibition of neuronal IP<sub>3</sub> receptors because 2-APB did not affect NaHS evoked calcium  
27 signals in isolated colonic crypts.<sup>22</sup> IP<sub>3</sub> receptor activation may therefore be relevant at the  
28 level of enteric secretomotor neurons which are activated downstream of TRPV1. As shown  
29 in our study, this pathway is functional because NaHS effects depend on substance P release  
30 from afferents nerves which causes release of the prosecretory transmitter acetylcholine. This  
31 agrees with the finding that synaptic activation of guinea-pig submucosal neurons which are  
32 involved in secretory reflex activity was inhibited by 2-APB.<sup>37</sup>

33  
34  
35 SKF96365 blocks SOC channels as well as voltage gated calcium channels.<sup>38</sup> The lack of  
36 effect of the T- and L-type channel blockers mibefradil and nifedipine on NaHS induced  
37 secretions argues in favour of a SOC specific action. It is unlikely that SKF96365 directly  
38 interacts with TRPV1 because the capsaicin evoked calcium transients were not affected by  
39 SKF96365.<sup>39</sup>

40  
41  
42 Strikingly, 2-APB reduced NaHS evoked secretion at a 100 fold lower concentration than  
43 usually required to block IP<sub>3</sub> mediated calcium release in other tissue or cell systems.<sup>40</sup> At  
44 such low concentrations 2-APB has been shown to block TRPC channels.<sup>41</sup> SKF96365 has  
45 also been used as a TRPC antagonist.<sup>28</sup> These results suggest at first sight that TRPC channels

1  
2  
3 may be also targeted by NaHS. However, involvement of TRPC channels seems unlikely  
4 because the TRPC blockers lanthanum and gadolinium<sup>28</sup> had no effect on NaHS evoked  
5 secretion, with the exception that gadolinium acted as an inhibitor in human tissue.  
6  
7  
8

9  
10 Antagonists binding at the capsaicin site can be allosteric blockers of other modes of receptor  
11 activation. However, antagonist binding to sites other than the capsaicin site may not  
12 modulate polymodal receptor activation induced by stimuli other than capsaicin.<sup>42</sup> Ruthenium  
13 red is an unspecific TRP channel blocker also antagonizing capsaicin activation of TRPV1  
14 channels. Unlike capsazepine, AMG 9810, SB 705498 or BCTC, ruthenium red is blocking  
15 the pore of the TRPV1 channel. Ruthenium red significantly decreased the response to low  
16 NaHS concentrations but potentiated the response to 1mM NaHS. The potentiation may be  
17 caused by excitatory actions of ruthenium red at TRPV1 channels thereby masking the  
18 inhibitory action.<sup>43</sup> Ruthenium red was found to suppress only the capsaicin-induced  
19 excitation of polymodal nociceptors, whereas the proton and heat-induced discharge  
20 responses were not influenced.<sup>43</sup> This again supports the idea that H<sub>2</sub>S may directly interact  
21 with the capsaicin binding site at the human and guinea-pig TRPV1. Strikingly, we needed to  
22 use ruthenium red at a rather high concentration to achieve inhibition of capsaicin and NaHS  
23 induced secretion. Concentrations lower than 50 μM were ineffective although they have been  
24 reported to block TRPV1 responses in other systems.<sup>43</sup>  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38 The pro-nociceptive action of H<sub>2</sub>S in mice has been attributed to activation of T-type calcium  
39 channels.<sup>21</sup> Mibefradil at 0.1μM where it is a T-type specific blocker<sup>44</sup> did not alter NaHS  
40 evoked secretion in guinea-pig and human tissue and we therefore rule out involvement of T-  
41 type Calcium channels. Even 10μM mibefradil did not affect NaHS evoked secretion. At this  
42 concentration mibefradil also blocked L-type calcium channels and human TTX-resistant Na  
43 channels.<sup>44</sup> This may explain the inhibitory action of 10μM mibefradil on nerve mediated  
44 secretion.  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51  
52 We are aware that our study does not provide a comprehensive evaluation of the involvement  
53 of non-TRPV1 channels which is mostly due to the lack of specific antagonists. Our focus  
54 was on those non-TRPV1 channels that have been shown to be targeted by H<sub>2</sub>S in organs  
55 other than the gut. TRPA1 was not involved as the selective TRPA1 antagonist HC030031  
56 did not inhibit pro-secretory action of NaHS. Lanthanum and Gadolinium which have been  
57 used as blockers of TRPC1-7 and TRPM1-3 channels had also no inhibitory effect.  
58  
59  
60

1  
2  
3 In summary, our results suggest that H<sub>2</sub>S evokes mucosal secretion by targeting TRPV1  
4 expressing afferent nerves which activate cholinergic secretomotor neurons via release of  
5 substance P acting species dependent on neurokinin-1, 2 or 3 receptors. H<sub>2</sub>S may be an  
6 endogenous activator of TRPV1 in guinea-pig and human intestine. Further to TRPV1  
7 activation intracellular calcium dependent pathways and PI3K are involved in the pro-  
8 secretory action of H<sub>2</sub>S.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

### 16 **Acknowledgements and Disclosers.**

17 This study has been supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sche 267/6-1) and  
18 BBSRC (G022445/1).  
19  
20  
21  
22

### 23 *Authors contributions*

24 Experiments with Ussing chambers were performed in the laboratory of Prof. Schemann.  
25 Experiments on visceral afferents were performed in the laboratory of Prof. Grundy.  
26 D.K.;M.F.; K.M.; J.D.: data acquisition, analysis, interpretation  
27 F.Z.;J.S-H: material support  
28 D.K.;D.G.;M.S.: study design & supervision, manuscript writing; funding  
29  
30  
31  
32  
33  
34

35 Competing Interests: the authors have no competing interests.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

### 43 **References**

- 44 1. Linden DR, Levitt MD, Farrugia G, Szurszewski JH. Endogenous Production of H<sub>2</sub>S  
45 in the Gastrointestinal Tract: Still in Search of a Physiological Function. Antioxid  
46 Redox Signal doi:10.1089/ars.2009.2885
- 47 2. Li L, Hsu A, Moore PK. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide  
48 and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation--a tale of  
49 three gases! Pharmacol Ther 2009; 123:386-400.
- 50 3. Mancardi D, Penna C, Merlino A, Del Soldato P, Wink DA, Pagliaro P Physiological  
51 and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulfide. Biochim  
52 Biophys Acta 2009; 1787:864-72.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1
- 2
- 3
- 4 4. Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:917-35.
- 5
- 6
- 7 5. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous
- 8 neuromodulator. *J Neurosci.* 1996; 16:1066-71.
- 9
- 10 6. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel
- 11 endogenous gaseous KATP channel opener, *EMBO J* 2001; 20:6008–6016.
- 12
- 13 7. Sun YG, Cao YX, Wang WW, Ma SF, Yao T, Zhu YC. Hydrogen sulphide is an
- 14 inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat
- 15 cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2008; 79:632–641.
- 16
- 17 8. Tamizhselvi R, Sun J, Koh YH, Bhatia M Effect of hydrogen sulfide on the
- 18 phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B pathway and on caerulein-induced
- 19 cytokine production in isolated mouse pancreatic acinar cells. *J Pharmacol Exp Ther.*
- 20 2009;329:1166-77
- 21
- 22 9. Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, et al. Hydrogen sulfide causes vanilloid
- 23 receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways, *Br J Pharmacol*
- 24 2005;145:1123–1131.
- 25
- 26 10. Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Maggi CA. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) stimulates
- 27 capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br J*
- 28 *Pharmacol.* 2004;142:31-4.
- 29
- 30 11. Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, et al. Distribution and function of the hydrogen
- 31 sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *Eur Urol.* 2008;53:391-9.
- 32
- 33 12. Schicho R, Krueger D, Zeller F, et al. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory
- 34 neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology.*
- 35 2006;131:1542-52
- 36
- 37 13. Linden DR, Sha L, Mazzone A, et al. Production of the gaseous signal molecule
- 38 hydrogen sulfide in mouse tissues. *J Neurochem.* 2008 Aug;106(4):1577-85.
- 39
- 40 14. Deplancke B, Finster K, Graham WV, Collier CT, Thurmond JE, Gaskins HR.
- 41 Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in
- 42 mice. *Exp Biol Med.* 2003;228:424-33.
- 43
- 44 15. Schemann M and Grundy D. Role of hydrogen sulfide in visceral nociception. *Gut.*
- 45 2009;58:744-7.
- 46
- 47 16. Teague B, Asiedu S, Moore PK. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen
- 48 sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br*
- 49 *J Pharmacol.* 2002;137:139-45.
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

17. Gallego D, Clavé P, Donovan J, Rahmati R, Grundy D, Jiménez M, Beyak MJ. The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20:1306-16.
18. Medeiros JV, Bezerra VH, Gomes AS, et al. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;330:764-70.
19. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology.* 2005 Oct;129(4):1210-24.
20. Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, et al. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating  $K_{ATP}$  channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316:325-35.
21. Matsunami M, Tarui T, Mitani K, et al. Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut.* 2009;58:751-61.
22. Hennig B, Diener M. Actions of hydrogen sulphide on ion transport across rat distal colon. *Br J Pharmacol.* 2009;158:1263-75.
23. Krueger D, Gruber L, Buhner S, et al. The multi-herbal drug STW 5 (Iberogast) has prosecretory action in the human intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 2009; 21:1203-e110
24. Zhuang ZY, Xu H, Clapham DE, Ji RR. Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *J Neurosci.* 2004;24:8300-9.
25. Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol.* 2006;128:509-22
26. Frieling T, Dobрева G, Weber E, et al. Different tachykinin receptors mediate chloride secretion in the distal colon through activation of submucosal neurones. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999;359:71-9.
27. McNamara CR, Mandel-Brehm J, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:13525-30.
28. Alexander, SPH, Mathie A, Peters J.A. (2007). *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 2nd edition (2007 revision). *Br. J. Pharmacol.* 2007;150 (Suppl.1 ), S1 – S168.

- 1  
2  
3 29. Tough IR, Lewis CA, Fozard J, Cox HM Dual and selective antagonism of neurokinin  
4 NK(1) and NK(2) receptor-mediated responses in human colon mucosa. *Naunyn*  
5 *Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003;367:104-8.  
6  
7
- 8 30. Lázár J, Gharat L, Khairathkar-Joshi N, Blumberg PM, Szallasi A Screening TRPV1  
9 antagonists for the treatment of pain: lessons learned over a decade. *Expert Opin. Drug*  
10 *Discov.* 2009; 4:159-80  
11  
12
- 13 31. Gavva NR, Tamir R, Klionsky L, et al Proton activation does not alter antagonist  
14 interaction with the capsaicin-binding pocket of TRPV1. *Mol Pharmacol.*  
15 2005;68:1524-33.  
16  
17
- 18 32. Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch.*  
19 2005;451:143-50.  
20  
21
- 22 33. Park JJ, Lee J, Kim MA, Back SK, Hong SK, Na HS. Induction of total insensitivity to  
23 capsaicin and hypersensitivity to garlic extract in human by decreased expression of  
24 TRPV1. *Neurosci Lett.* 2007;411:87-91.  
25  
26
- 27 34. Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, et al. Hydrogen sulfide mediates the  
28 vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:17977-82.  
29  
30
- 31 35. Bandell M, Macpherson LJ, Patapoutian A. From chills to chilis: mechanisms for  
32 thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol.*  
33 2007;17:490-7.  
34  
35
- 36 36. Salazar H, Llorente I, Jara-Oseguera A, et al. A single N-terminal cysteine in TRPV1  
37 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat Neurosci.*  
38 2008;11:255-61.  
39  
40
- 41 37. Hu HZ, Gao N, Zhu MX, et al. Slow excitatory synaptic transmission mediated by  
42 P2Y1 receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *J Physiol.* 2003;550:493-  
43 504.  
44  
45
- 46 38. Merritt JE, Armstrong WP, Benham CD, et al. SK&F 96365, a novel inhibitor of  
47 receptor-mediated calcium entry. *Biochem J.* 1990;271:515-22.  
48  
49
- 50 39. Kress M, Karasek J, Ferrer-Montiel AV, Scherbakov N, Haberberger RV. TRPC  
51 channels and diacylglycerol dependent calcium signaling in rat sensory neurons.  
52 *Histochem Cell Biol.* 2008;130:655-67.  
53  
54
- 55 40. Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. 2APB, 2-  
56 aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P3-  
57 induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biochem (Tokyo)* 1997;122:498-505.  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
41. Sekaran S, Lall GS, Ralphs KL, et al. 2-Aminoethoxydiphenylborane is an acute inhibitor of directly photosensitive retinal ganglion cell activity in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2007 Apr 11;27(15):3981-6
42. Klionsky L, Tamir R, Holzinger B, et al. A polyclonal antibody to the prepore loop of transient receptor potential vanilloid type 1 blocks channel activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 ;319:192-8.
43. St Pierre M, Reeh PW, Zimmermann K. Differential effects of TRPV channel block on polymodal activation of rat cutaneous nociceptors in vitro. *Exp Brain Res*. 2009;196:31-44.
44. Strege PR, Bernard CE, Ou Y, Gibbons SJ, Farrugia G. Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *Am J Physiol* 2005; 289:G249-53.

**Table 1 Pharmacology of NaHS induced secretory responses in guinea-pig and human intestine.**

	Guinea-pig colon			Human colon
	NaHS [0.2 mM] Control vs. <i>treatment</i> <sup>1)</sup>	NaHS [0.5 mM] Control vs. <i>treatment</i> <sup>1)</sup>	NaHS [1 mM] Control vs. <i>treatment</i> <sup>1)</sup>	NaHS [1 mM] Control vs. <i>treatment</i> <sup>1)</sup>
<i>tissue pre-treatment with:</i>				
<i>Capsazepine</i> [10 $\mu$ M] <sup>2)</sup>	23.8 $\pm$ 7.4 vs 4.2 $\pm$ 1.0 <sup>#</sup> n=7	27.7 $\pm$ 4.9 vs 4.3 $\pm$ 1.5 <sup>*</sup> n=5	31.5 $\pm$ 6.4 vs 9.5 $\pm$ 2.4 <sup>*</sup> n=6	45.1 $\pm$ 7.9 vs 12.4 $\pm$ 4.0 <sup>*</sup> n=7
<i>AMG 9810</i> [10 $\mu$ M]	6.7 $\pm$ 1.2 vs 1.3 $\pm$ 0.5 <sup>*</sup> n=12	32.7 $\pm$ 10.2 vs 8.3 $\pm$ 2.2 <sup>#</sup> n=10	25.7 $\pm$ 7.2 vs 9.3 $\pm$ 2.5 <sup>*</sup> n=10	29.2 $\pm$ 6.7 vs 12.3 $\pm$ 3.2 <sup>+</sup> n=11
<i>SB 705498</i> [5 $\mu$ M]	16.9 $\pm$ 5.4 vs 6.6 $\pm$ 2.2 <sup>§</sup> n=7	25.8 $\pm$ 9.6 vs 10.5 $\pm$ 3.8 <sup>§</sup> n=10	28.7 $\pm$ 5.9 vs 16.3 $\pm$ 5.1 <sup>§</sup> n=9	21.3 $\pm$ 6.9 vs 4.9 $\pm$ 2.2 <sup>§</sup> n=9
<i>BCTC</i> [5 $\mu$ M]	26.6 $\pm$ 3.6 vs 15.7 $\pm$ 2.7 <sup>*</sup> n=8	32.6 $\pm$ 5.9 vs 19.6 $\pm$ 4.2 <sup>*</sup> n=8	31.9 $\pm$ 8.5 vs 17.3 $\pm$ 4.3 n=8	20.0 $\pm$ 4.1 vs 5.2 $\pm$ 2.1 <sup>§</sup> n=6
<i>Ruthenium Red</i> [50 $\mu$ M]	5.9 $\pm$ 2.8 vs 2.5 $\pm$ 1.3 <sup>#</sup> n=7	14.8 $\pm$ 4.2 vs 3.7 $\pm$ 1.5 <sup>*</sup> n=8	22.7 $\pm$ 5.5 vs 26.4 $\pm$ 5.5 n=7	14.1 $\pm$ 2.2 vs 52.2 $\pm$ 14.0 <sup>*</sup> n=10
<i>LY 294002</i> [10 $\mu$ M]	15.8 $\pm$ 4.9 vs 4.5 $\pm$ 1.6 <sup>*</sup> n=8	12.6 $\pm$ 3.3 vs 4.7 $\pm$ 1.0 <sup>#</sup> n=7	18.2 $\pm$ 3.2 vs 8.4 $\pm$ 2.4 <sup>*</sup> n=7	14.1 $\pm$ 4.8 vs 5.8 $\pm$ 2.2 <sup>#</sup> n=6
<i>SR 140333</i> [1 $\mu$ M]	9.9 $\pm$ 3.3 vs 3.4 $\pm$ 1.0 <sup>#</sup> n=8	30.8 $\pm$ 7.9 vs 8.8 $\pm$ 2.3 <sup>*</sup> n=7	17.1 $\pm$ 5.6 vs 29.2 $\pm$ 6.9 n=6	18.5 $\pm$ 2.7 vs 8.5 $\pm$ 2.2 <sup>*</sup> n=8
<i>SR 4896C</i> [1 $\mu$ M]	19.5 $\pm$ 4.8 vs 17.6 $\pm$ 5.3 n=8	27.6 $\pm$ 7.8 vs 16.8 $\pm$ 3.2 n=8	29.2 $\pm$ 6.9 vs 25.3 $\pm$ 6.1 n=7	28.1 $\pm$ 5.0 vs 8.4 $\pm$ 3.2 <sup>*</sup> n=7
<i>SR 142801</i> [1 $\mu$ M]	6.9 $\pm$ 2.7 vs 1.2 $\pm$ 0.6 <sup>#</sup> n=6	25.8 $\pm$ 4.8 vs 9.4 $\pm$ 4.0 <sup>*</sup> n=7	26.1 $\pm$ 4.6 vs 17.1 $\pm$ 5.3 n=9	18.0 $\pm$ 2.5 vs 13.6 $\pm$ 3.0 n=8
<i>Atropine</i> [1 $\mu$ M]	13.9 $\pm$ 1.8 vs 7.8 $\pm$ 2.2 <sup>*</sup> n=9	35.5 $\pm$ 9.8 vs 17.8 $\pm$ 5.9 <sup>*</sup> n=10	30.4 $\pm$ 5.5 vs 15.6 $\pm$ 4.8 <sup>*</sup> n=11	23.5 $\pm$ 6.5 vs 13.2 $\pm$ 5.1 <sup>#</sup> n=7
<i>HC 030031</i> [10 $\mu$ M]	16.9 $\pm$ 5.4 vs 21.4 $\pm$ 9.6 n=7	25.8 $\pm$ 9.6 vs 24.3 $\pm$ 7.8 n=10	28.7 $\pm$ 5.9 vs 30.1 $\pm$ 8.7 n=9	21.3 $\pm$ 6.9 vs 12.5 $\pm$ 6.5 n=9
<i>La</i> <sup>3+</sup> [100 $\mu$ M]	13.8 $\pm$ 5.6 vs 8.8 $\pm$ 3.1 n=6	15.3 $\pm$ 2.9 vs 13.4 $\pm$ 3.0 n=6	16.8 $\pm$ 3.1 vs 24.8 $\pm$ 3.3 n=5	9.3 $\pm$ 2.0 vs 5.8 $\pm$ 1.8 n=7
<i>Gd</i> <sup>3+</sup> [100 $\mu$ M]	10.0 $\pm$ 3.8 vs 11.3 $\pm$ 6.2 n=8	36.6 $\pm$ 17.1 vs 18.3 $\pm$ 5.3 n=6	35.6 $\pm$ 9.6 vs 23.3 $\pm$ 5.3 n=7	39.7 $\pm$ 6.8 vs 12.1 $\pm$ 4.8 <sup>+</sup> n=8
<i>Nifedipine</i> [1 $\mu$ M]	12.9 $\pm$ 3.0 vs 6.2 $\pm$ 2.2 n=9	23.4 $\pm$ 6.5 vs 16.2 $\pm$ 5.1 n=11	19.0 $\pm$ 3.0 vs 17.7 $\pm$ 4.5 n=12	not tested
<i>Mibefradil</i> [0.1 $\mu$ M]	26.0 $\pm$ 4.7 vs 23.8 $\pm$ 7.5 n=8	36.0 $\pm$ 8.6 vs 27.9 $\pm$ 6.3 n=10	31.7 $\pm$ 7.3 vs 28.5 $\pm$ 8.0 n=9	26.7 $\pm$ 8.8 vs 16.3 $\pm$ 6.9 n=8
<i>Mibefradil</i> [10 $\mu$ M]	13.4 $\pm$ 2.9 vs 9.7 $\pm$ 2.8 n=9	21.9 $\pm$ 6.1 vs 27.1 $\pm$ 11.1 n=12	29.2 $\pm$ 10.1 vs 29.3 $\pm$ 10.8 n=14	19.8 $\pm$ 8.0 vs 8.5 $\pm$ 2.4 n=8
<i>SKF 96365</i> [10 $\mu$ M]	11.3 $\pm$ 7.0 vs 2.2 $\pm$ 1.4 <sup>*</sup> n=6	21.7 $\pm$ 5.4 vs 2.4 $\pm$ 0.7 <sup>*</sup> n=6	16.7 $\pm$ 3.9 vs 2.6 $\pm$ 0.4 <sup>*</sup> n=13	25.0 $\pm$ 6.1 vs 10.8 $\pm$ 2.9 <sup>#</sup> n=10
<i>2-APB</i> [1 $\mu$ M]	9.4 $\pm$ 2.8 vs 3.3 $\pm$ 1.3 <sup>*</sup> n=9	22.3 $\pm$ 9.9 vs 4.7 $\pm$ 1.1 <sup>#</sup> n=10	17.2 $\pm$ 3.3 vs 4.0 $\pm$ 1.4 <sup>*</sup> n=9	20.0 $\pm$ 4.1 vs 5.3 $\pm$ 2.6 <sup>+</sup> n=6

<sup>1)</sup> Values are short circuit current in  $\mu$ A  $\times$  cm<sup>-2</sup>

<sup>2)</sup> Capsazepine data for guinea-pig tissues have been reanalysed from previously published results<sup>12</sup>

\* significant differences between control and treatment (Students t-test)

# significant differences between control and treatment (Wilcoxon Signed Rank test)

§ significant differences between control and treatment (RM ANOVA on Ranks with Dunn's post-hoc test)

+ significant differences between control and treatment (RM ANOVA with Bonferroni's post-hoc test)



## Figure Legends

### Figure 1

Traces from Ussing chamber experiments demonstrating inhibition of 1mM NaHS evoked secretion in human intestine (control responses: upper traces in A;B;C;D) by various antagonists (lower traces in A,B,C,D). Arrows indicate application of NaHS.

### Figure 2

Mesenteric afferent response to 300 $\mu$ M NaHS. (A) The upper trace shows nerve firing before (left) and after (right) NaHS application. The bottom trace shows the sequential rate histogram of whole-nerve afferent activity. Application of NaHS, indicated by the arrow, caused a transient increase in afferent nerve activity. This response was significantly reduced in the presence of the TRPV1 receptor antagonist, capsazepine (B), and the PI3K inhibitor LY 294002 (C).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure 1

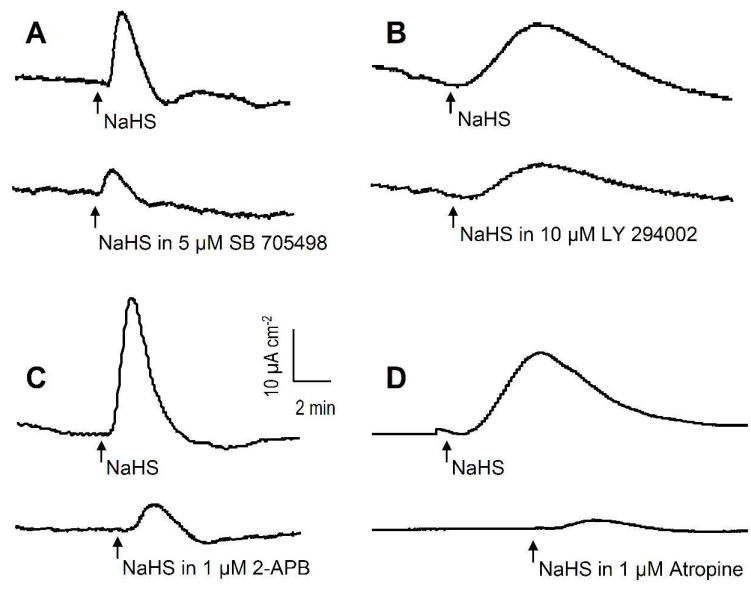


Figure 1  
190x254mm (600 x 600 DPI)

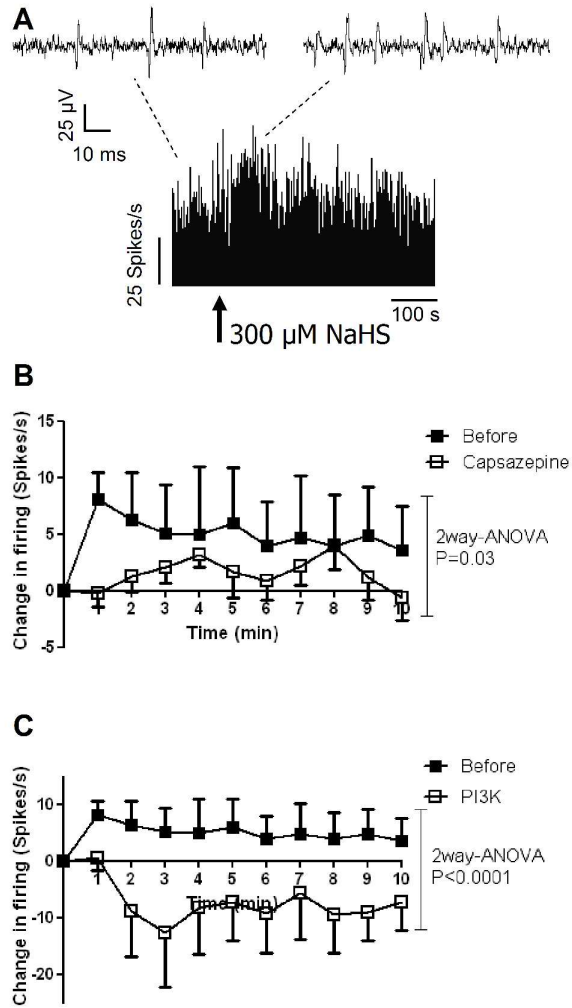


Figure 2  
190x254mm (600 x 600 DPI)

# Appendix 5

W. Rong, W. Ma, M. Beyak, W Jiang, B. Sun, X. Wang, D. Krueger, M.

Schemann, A. Surprenant, D. Grundy

Hydrogen sulphide activates mechnosensitive afferent fibres via TRP channel-induced release of ATP

Eingereicht

## **Contributions**

**D. Krueger:** study design of Ussing chamber experiments, generation and analysis of data on mode of pro-secretory action of hydrogen sulphide in mouse gut, immunohistochemistry of CSE and CBS expressing neurons in the mouse gut, co-editing the manuscript.

W. Rong, M. Beyak, W. Jiang: recordings from visceral afferents, co-editing the manuscript.

W. Ma, X. Wang: TRP expression studies and electrophysiology, co-editing the manuscript.

D. Grundy, A. Surprenant, M. Schemann: study design, grant support, manuscript editing.

## Hydrogen sulphide activates mechanosensitive afferent fibres via TRP channel-induced release of ATP

### ATP

Weifang Rong\*, Weihong Ma, Mike Beyak, Wen Jiang, Biying Sun\*, Xiaofang Wang\*, Dagmar Krueger<sup>†</sup>, Michael Schemann<sup>‡</sup>, Annmarie Surprenant and David Grundy

Department of Biomedical Science, University of Sheffield, Western Bank, Sheffield S10 2TN, UK. \*Department of Physiology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; <sup>†</sup>Human Biology, Technische Universität München, 85350 Freising, Germany  
Current address

M. J. Beyak – Gastrointestinal Diseases Research Unit (GIDRU), Queen's University, 76 Stuart St., Kingston Ontario, Canada K7L 2V7

Correspondence to D. Grundy at [d.grundy@sheffield.ac.uk](mailto:d.grundy@sheffield.ac.uk)

Short title: H<sub>2</sub>S activation of TRP channels

7 figures, + 2 supplemental figures and 2 supplementary table

Key words: hydrogen sulphide, TRPV1, TRPM2, TRPM4b, P2X receptors, afferent signalling.

Acknowledgements: Work supported by the Wellcome Trust (AS), BBSRC (AS and DC), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality and Natural Science Foundation of China (WR), and Deutsche Forschungsgemeinschaft Sche 267/6-1 (DK and MS). We thank E. Martin for tissue culture and molecular biology support and all groups who supplied TRP channel cDNA.

### Abstract

**Background and Aims:** Hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) has widespread actions and evidence implicates TRPV1 receptors as a molecular target for H<sub>2</sub>S. **Methods:** a multidisciplinary approach including immunohistochemistry, heterologously expressed TRP channel and functional studies in wildtype and TRPV1 receptor knockout mice was employed to examine the mechanism underlying the effect of H<sub>2</sub>S on gastrointestinal sensory function. **Results:** The H<sub>2</sub>S donor NaHS produced concentration-dependent increases in jejunal afferent discharge in both wild type and TRPV1 knockouts. The P2X receptor antagonists PPADS and A-317491, and TRP channel blockers ruthenium red, gadolinium and 2-APB significantly attenuated the afferent response to NaHS. Blocking endogenous H<sub>2</sub>S production with hydroxylamine attenuated distension-induced afferent activation. H<sub>2</sub>S evoked ATP release. Mucosal electrogenic chloride secretion in response to H<sub>2</sub>S was independent of capsaicin desensitization. We expressed P2X (2,2/3,3,4,7), TRPV (1,2,3), TRPC (1,4,5,6) and TRPM (2,4b) receptors in HEK and HeLa cells and measured NaHS induced Fluo-4 calcium transients and membrane currents. No untransfected, vector-transfected, P2X, TRPV, or TRPC1,6-expressing cells responded to NaHS while NaHS induced calcium transients and membrane currents from varying proportions of cells transfected with TRPC4, TRPC5, TRPM2 or TRPM4b receptors. H<sub>2</sub>S-induced calcium transients were blocked by lanthanum, gadolinium, and removal of extracellular calcium but not by the PLC inhibitor U73122. NaHS-induced currents in TRPM2 and TRPM4b-expressing cells were immediately reversed by lanthanum, gadolinium or replacing extracellular sodium with NMDG. **Conclusions:** H<sub>2</sub>S activates a subset of TRPC/M, but not TRPV, channels to induce the release of ATP which excites mechanosensitive afferent terminals via P2X receptors. This mechanism may play an important role in gut physiology and pathophysiology.

## Introduction

Hydrogen sulphide ( $H_2S$ ) is a malodorous and toxic gas. Nevertheless, recent evidence suggests that  $H_2S$  is an endogenous mediator, joining nitric oxide and carbon monoxide as a third gaseous transmitter (see Schemann and Grundy 2009).<sup>1</sup>  $H_2S$  is present in relatively large quantity in the brain and in peripheral tissues generated during cysteine metabolism mainly by the action of two enzymes, cystathionine- $\beta$ -synthetase (CBS) and cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE).<sup>2</sup> In the CNS,  $H_2S$  exhibits neurotransmitter-like functions.<sup>3,4</sup> It has been shown to enhance NMDA receptor-mediated currents and facilitates long-term potentiation (LTP) in the hippocampus as well as hyperpolarizing brainstem neurones and inhibiting corticotrophin releasing factor (CRF) efflux from the hypothalamus (see Moore *et al.*, 2003 for review).<sup>3</sup> The mechanisms underlying these effects are not completely understood but include increasing intracellular cAMP and activation of ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channels.  $K_{ATP}$  channels are also implicated in many of the peripheral actions of  $H_2S$  on vascular, reproductive and gastrointestinal smooth muscles<sup>5,7</sup> and inhibition of pancreatic  $\beta$ -cell secretion of insulin.<sup>8</sup>  $H_2S$  has been shown to cause contraction of detrusor muscles of rat urinary bladder via a capsaicin-sensitive mechanism linked to tachykinin release.<sup>9</sup> However, subsequent studies found that the contractile bladder response was not attenuated by the TRPV1 receptor antagonist capsazepine but blocked by the non-selective antagonist ruthenium red and speculated that some yet to be identified TRP channel might mediate the effect.<sup>10</sup> Ruthenium red also suppressed calcium waves in astrocytes generated following application of  $H_2S$  and since the trivalent cations lanthanum and gadolinium also attenuated the response this observation is consistent with  $Ca^{2+}$  entry via TRP channels.<sup>11</sup>

The highest levels of  $H_2S$  are seen in the gastrointestinal tract, where intraluminal concentration of  $H_2S$  ranging from 0.1 to 1 mmol/L from the stomach to the colon have been described.<sup>12</sup>  $H_2S$  generated by commensal bacteria is implicated in the pathogenesis of IBD and colorectal cancer possibly as a consequence of a reduction in the level of enzymes in the mucosal and submucosa that are responsible for

detoxifying  $H_2S$ . Endogenous  $H_2S$  is also pro-inflammatory.<sup>13</sup> Inhibition of endogenous  $H_2S$  formation by blocking CBS using propargylglycine (PPG) reduces inflammation and has a protective effect in septic shock.<sup>14</sup> Thus both endogenous and bacterial  $H_2S$  may contribute to inflammatory bowel disease. Afferent pathways are implicated in both GI immune responses and in sensory signalling to the CNS and within the enteric nervous system and as such, an action of  $H_2S$  at the level of sensory signal transduction may have both physiological and pathophysiological consequences. Indeed recent studies have shown the presence of both CBS and CSE in guinea-pig and human enteric neurones.<sup>15</sup>  $H_2S$  caused activation of enteric neurones leading to mucosal ion secretion via a mechanism that again implicated TRPV1 channels on sensory neurones. This effect was not altered by glibenclamide suggesting an effect independent of  $K_{ATP}$  channels<sup>15</sup> which is in contrast to an antinociceptive effect that has been described in both healthy and colitic rats that was attenuated by blocking  $K_{ATP}$ .<sup>16</sup> However, a pronociceptive effect has been described in a somatic pain model by a mechanism suggested to involve T-type calcium channels.<sup>17</sup> Thus  $H_2S$  may have both excitatory and inhibitory action on sensory signalling depending upon the transduction channels that it activates. While the inhibitory effects appear to be linked to  $K_{ATP}$  the mechanism underlying excitation are poorly understood although there is some data to implicate TRPV1 and possibly other TRP and calcium channels. In the present study we have investigated the mechanisms underlying activation of visceral sensory afferents by  $H_2S$  and combined with a screen of heterologously expressed ion channels we show that  $H_2S$  activates a subset of TRPC and/or TRPM channels. Our data provide an exciting prospect that  $H_2S$  may be a long-sought endogenous activator of these TRP channels, a signalling mechanism that may be of profound importance in GI physiology and pathophysiology.

**Detailed material and methods are provided as supplementary information and described only briefly below.**

**Afferent nerve recording** were made on segments of bowel taken from TRPV1 WT and KO mice killed with an overdose of pentobarbitone sodium (80 mg Kg<sup>-1</sup>) injected intraperitoneally. Details of the knockout are provided elsewhere.<sup>18</sup> All procedures were in accordance with the UK Animals Scientific Procedures Act (1986). Recordings were made from mesenteric paravascular nerve bundles using conventional extracellular electrophysiological techniques. The nerve signal was acquired to a computer through a Micro 1401 interface running Spike 2 software for single unit discrimination (version 5.03, Cambridge Electronic Design, UK). Krebs solution was continuously infused intraluminally at 10 ml/hr except during distension when the outlet tap was closed allowing pressure to rise to 60 mmHg and released by opening the tap. To test the effects of H<sub>2</sub>S, NaHS (0.03-3 mmol/L, BDH, Poole, UK) was added to Krebs solution perfusing the tissue chamber (10 ml/min, for 2 min) or infused intraluminally (1mmol/L) for 10 min. Antagonists and enzyme inhibitors were applied to the bathing perfusate. The mean firing rate (imp/s) was measured with a time constant of 10 s and plotted as peri-stimulus rate histograms.

**ATP release** from *in vitro* segments of jejunum were measured using a commercially available luciferin-luciferase assay (Sigma).

**Immunohistochemistry** was using a rabbit anti-CSE (1:1000, kindly provided by Dr. Hideo Kimura) and a goat anti-CBS antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) and species-specific secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch, (West Grove, PA, USA). Slides were viewed on an Olympus microscope (BX61 WI; Olympus) equipped with a SIS Fview II CCD camera and AnalySIS 3.1 software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany).

**Ussing Chamber Experiments** were performed on colonic segments from 15 mice killing by cervical dislocation and exsanguinations in accordance with German ethical guidelines for animal experiments. The transepithelial potential difference was measured by a pair of Ag/AgCl electrodes, connected to a voltage clamp apparatus (VCC 600; Physiologic Instruments). Ion secretion was measured as short circuit current ( $I_{sc}$ ) and expressed in  $\mu A\ cm^{-2}$ . Positive  $I_{sc}$  indicated a net anion current from the serosa to the lumen. NaHS was added to the serosal side of the preparation.

**Heterologous expression studies.** HEK or HeLa cells stably or transiently expressing P2X receptors were used as described previously.<sup>19</sup> The same transfection protocols (Lipofectamine 2000; 1  $\mu g$  cDNA) were used for expression of all other cDNAs. We used the following constructs: rTRPV1, mTRPV2, hTRPV3, hTRPC1, hTRPC4, hTRPC5, hTRPC6, hTRPC6-YFP, hTRPM2, hTRPM4b, rKir 6.2+SUR, rSK2, hSK2, rSK1. For electrophysiological, but not calcium imaging, experiments eGFP (0.1  $\mu g$ ) was co-transfected with each construct. Cells were plated on coverslips and used for Fluo-4 imaging or patch clamp recording 18–72 h post-transfection. Unless otherwise stated, all experiments were performed at room temperature.

#### **Fluo-4 imaging.**

Cells were incubated with 1  $\mu mol/L$  Fluo-4 AM (Invitrogen, UK) with 0.02% pluronic acid (Calbiochem, San Diego, CA) at 37 °C for 30 minutes before placing in a chamber on an Axiovert 25 inverted microscope (Carl Zeiss, Germany). Fluorescence was detected with an excitation range 450–490 nm and emission 515–565 nm (Carl Zeiss, Germany). The Fluo-4 signals were acquired for 5–10 minutes at 1–10s intervals by a QICAM camera (QImaging, Canada) and recorded with the Simple PCI software (Compix Inc., Imaging Systems, USA). Acquired data were exported to and plotted with KaleidaGraph (Synergy Software, USA).

#### **Patch-clamp recordings.**

Whole-cell patch-clamp recordings were performed using an EPC9 (HEKA, Lambrecht/Pfalz, Germany) amplifier. Cells were held at -60 mV unless otherwise indicated. Agonists/antagonists were dissolved in the standard extracellular solution and delivered via a rapid solution changer RSC-200 (Bio-logic Science Instruments, Claix, France). In some experiments, voltage ramps (-120 to 80 mV) were applied.

#### ***Analysis and statistics***

All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). To detect significant differences between treatments, paired or unpaired Student's t-test, two-way ANOVA with Bonferroni test were performed where appropriate. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

#### **Results**

##### ***H<sub>2</sub>S evokes mesenteric afferent fibres discharge in wild type and TRPV1<sup>-/-</sup>***

H<sub>2</sub>S (NaHS, 0.03-1mmol/L, for 2 min) evoked a concentration-dependent increase in mesenteric afferent nerve discharge of a magnitude comparable to that seen during noxious levels of distension (Fig.1A,B). The threshold response occurred around 30 $\mu$ mol/L NaHS and maximal activation occurred at 300 $\mu$ mol/L. At concentrations greater than 300 $\mu$ mol/L activation was followed by a period of reduced afferent firing in about half of the preparations (Fig.1B). The role of TRPV1 in the response to NaHS we examined using TRPV1<sup>-/-</sup> preparations which are insensitive to capsaicin administration. The response in terms of time course, threshold and magnitude were not different from wild-type preparations (Fig.1C,D,E). Intraluminal NaHS (1 mmol/L for 10 min) also evoked an excitatory afferent response. However, the time course and the amplitude of the response to intraluminal NaHS were different with a slower onset and peak (140 s and 340 s respectively) and lower maximum firing rate (20.8 $\pm$ 5.5 imp/s) (Fig.1F).

##### ***Role of endogenous H<sub>2</sub>S in modulating afferent sensitivity***

Presence of H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes in mouse enteric nervous system  
CSE expressing enteric neurons were observed in the submucous and myenteric plexus of the jejunum and in the myenteric plexus of the colon (see Supplementary Fig. 1). The vast majority, if not all, enteric neurons express CSE. CBS labeling showed a similar distribution but was more diffuse with high background staining.

##### Effect of enzyme inhibition on mesenteric afferent mechanosensitivity

Ramp distension to 60mmHg evoked a biphasic increase in afferent discharge reflecting the activity of low- and high-threshold mechanosensitive afferents. Simultaneous bath and intraluminal administration of the CBS inhibitor, hydroxylamine (1mmol/L), resulted in a significant attenuation in the response to distension across the whole range of intestinal pressures (Fig.2). In contrast,



D,L-propargylglycine (PPG), an inhibitor of CSE, had no effect on the afferent response to distension.

#### ***P2X receptor inhibition antagonizes the effects of H<sub>2</sub>S on mesenteric afferent fibres***

The possible involvement of a purinergic mechanism in the nerve responses to NaHS was examined by 2 approaches. First, we investigated if NaHS would stimulate the release of ATP from isolated segments of jejunum using a luciferase assay. Low concentrations of NaHS (30, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) significantly increased, while higher concentrations (300, 1000  $\mu\text{mol/L}$ ) significantly inhibited release of ATP from the preparation (Fig.3A). Second, we determined the extent to which the afferent response to NaHS was dependent upon purinoreceptor activation. Indeed, both NaHS (0.3 mmol/L) and ATP (0.3 mmol/L) evoked an increase in discharge rate of  $79.1 \pm 12.6$  and  $48.4 \pm 6.2$  imp/s, respectively (Fig.3B; N=12). Moreover, single unit analysis revealed that among 94 mechanosensitive fibres, 77 responded to both ATP and NaHS, with an average peak increase in discharge rate of  $2.3 \pm 0.16$  and  $3.52 \pm 0.21$  imp/s, respectively; 10 fibres were excited by NaHS only and 2 fibres were activated by ATP but not by NaHS. The remaining 5 mechanosensitive units did not respond to either ATP or NaHS (Fig.3C).

The P2 receptor antagonist, PPADS, (30  $\mu\text{M}$ ) markedly attenuated the nerve response to 0.3 mmol/L ATP (data not shown). Strikingly, it also attenuated the afferent response to 300  $\mu\text{mol/L}$  NaHS ( $P < 0.01$ , paired t-test, Fig.4D), leaving the response to distension unchanged (Fig. 4D). Similarly, the P2X<sub>3</sub> and P2X<sub>2/3</sub> selective antagonist-A317491 at 10  $\mu\text{mol/L}$  inhibited NaHS-induced discharge to a similar extent (Fig.3E).

#### ***H<sub>2</sub>S donor NaHS increased mucosal ion secretion in mouse colon***

The aim of these experiments was to investigate if NaHS evoked a pro-secretory effect in mouse colon via mechanisms similar to those observed in guinea-pig and human(15). Serosal application of 500  $\mu\text{mol/L}$  NaHS significantly increased the  $I_{sc}$  by

$2.1 \pm 4 \mu\text{A cm}^{-2}$  (n=40 tissues from 15 animals; Fig.4). The secretory response peaked after  $150 \pm 15.2$  seconds and lasted for  $700 \pm 53$  seconds (n=40 tissue from 15 animals). Successive NaHS applications in the mouse colon evoked reproducible responses (Fig. 5) which were relatively insensitive to TTX (0.5  $\mu\text{mol/L}$  evoked on average only a 36% reduction ( $p=0.186$ ) and capsaicin (4% reduction,  $p = 0.26$ ). The purinergic receptor antagonist pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonic acid (PPADS, 30  $\mu\text{mol/L}$ ) also did not affect the NaHS induced secretion; the response to NaHS decreased on average by 7% ( $p=0.81$ ; Fig.4).

#### ***TRP channel inhibition antagonizes the effects of H<sub>2</sub>S on mesenteric afferent fibres***

Since the observations in the TRPV1<sup>-/-</sup> would rule out involvement of TRPV1 in the sensitivity to NaHS we sought to examine the potential involvement of other TRP channels using a number of non-selective TRP channel blockers. Supplementary fig.2 shows representative examples showing almost complete abolition of the response to NaHS in the presence of ruthenium red (10, 30  $\mu\text{mol/L}$ ), gadolinium (100  $\mu\text{mol/L}$ ) and 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, 100  $\mu\text{mol/L}$ ).

#### ***H<sub>2</sub>S does not activate P2X<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> or TrpV1,2,3 receptors***

We used heterologous expression of recombinant proteins in HEK cells to determine potential direct effects of H<sub>2</sub>S on P2X channel function recorded using whole cell patch clamp or Fluo-4 calcium transients. We examined P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>4</sub> receptors which are known to be present on afferent terminals<sup>20</sup>, P2X<sub>7</sub> receptors which are present in mast cells within the GI wall and 5-HT<sub>3</sub> receptors are present at both sites.<sup>21</sup> In more than 200 whole cell recordings, NaHS (0.3–100  $\mu\text{mol/L}$ ) applied for 50-120s did not evoke any response at the holding potential of  $-50$  mV while all P2X or 5-HT<sub>3</sub>-expressing cells responded with typical large amplitude currents to EC<sub>50</sub> concentrations of their respective agonists (Fig 5A, Supplemental Table 1). NaHS also did not alter the current-voltage (IV) curves (from  $-120$  to  $+80$  mV) in any of the cells ( $n=46$ ). The lack of effect of NaHS was confirmed using Fluo-4 calcium imaging of large numbers of cells from which robust responses to the appropriate

agonists could be obtained (Fig.5B, Supplemental Table 1). Similarly, capsaicin, but not NaHS (1-100  $\mu\text{mol/L}$ ) evoked cationic currents and Fluo-4 calcium transients in 50 - 85% of all TRPV1 transfected cells (Fig.5C, Supplemental Table 1). NaHS also failed to evoke any response in cells transfected with TRPV2 or TRPV3 channels (Fig.5D, Supplemental Table 1). Concentrations of lanthanum, gadolinium (100 $\mu\text{mol/L}$ ) and ruthenium red (10 $\mu\text{mol/L}$ ) that blocked NaHS-induced afferent firing had no effect on any P2X receptor, lanthanum and gadolinium *increased* TRPV1 currents by 2-fold while ruthenium red blocked only TRPV1 and TRPV2, but not P2X<sub>2</sub> receptors (Fig.5E). These results provide unequivocal evidence against any of these receptors as direct targets for H<sub>2</sub>S.

#### ***H<sub>2</sub>S activates a subset of TRPC and TRPM expressing cells***

We broadened our screen to include a (non-exhaustive) set of TRPC and TRPM channels in HEK cells and found, in contrast to the consistently negative results with P2XR and TRPV-expressing cells, that NaHS evoked robust Fluo-4 calcium transients in a varying proportion of transfections with TRPC4, TRPC5, TRPM2 and TRPM4b, but not TRPC1, TRPC2, TRPC6 or TRPM8 (Supplemental Table 2). We focussed on TRPM2 and TRPM4B because TRPC4 and TRPC5-induced calcium transients and membrane currents are potentiated by La<sup>3+</sup> and Gd<sup>3+</sup> and so less likely to be involved in the afferent response.<sup>22,23</sup> NaHS (0.1-100 $\mu\text{mol/L}$ ) evoked calcium transient in a variable (10-85%) number of cells over 29 consecutive transient transfections with TRPM4 and TRPM2 (Supplemental Table 2), although the NaHS-mediated calcium response showed relatively little variability (Fig.6A,B). Superfusion or fast-flow application of NaHS for 50-120s induced concentration-dependent increases in calcium transients at concentrations between 0.3-100 $\mu\text{mol/L}$  but higher concentrations evoked smaller, or no, calcium transients (Fig.6B). Repeated applications of NaHS (50s duration at 3-10 min intervals) evoked approximately constant amplitude Fluo-4 responses at concentrations between 0.3-3 $\mu\text{mol/L}$ , but concentrations of 10-100 $\mu\text{mol/L}$  evoked rapidly desensitizing Fluo-4 transients with significant rundown upon repeated applications. Half-maximal

(EC<sub>50</sub>) concentrations for NaHS-induced calcium transients at TRPM4b and TRPM2 were 1.2 $\mu\text{mol/L}$  and 5 $\mu\text{mol/L}$  respectively (Fig.6B). In cells with NaHS-induced calcium transients to repeated low concentrations of NaHS, application of high ( $\geq 100\mu\text{mol/L}$ ) NaHS abolished responses to subsequent applications of low NaHS concentrations ( $n=4$  for TRPM2 and 3 for TRPM4b). Lanthanum (100 $\mu\text{mol/L}$ ) reversibly abolished NaHS-induced calcium transients in TRPM4b-expressing cells (Fig.6A,B) and reversibly inhibited responses by 50-5% in TRPM2-expressing cells. Gadolinium (100 $\mu\text{mol/L}$ ) inhibited NaHS-evoked responses by 40-75% in both TRPM2 and TRPM4b cells.

In whole cell recordings, NaHS (1-30 $\mu\text{mol/L}$ ) evoked a stimulus-locked (ie. occurring within the 50-60 s application) inward current at -50 mV in a proportion of TRPM2 and TRPM4b-expressing cells (Fig.6D,E;  $n = 22/76$  TRPM2-expressing and 19/98 TRPM4b-expressing cells). In TRPM2-expressing cells, NaHS-induced currents were rapidly reversed within 1-2 s upon application of La<sup>3+</sup> (100  $\mu\text{mol/L}$ ), or when NaCl was replaced with NMDG. Relatively similar results were obtained with TRPM4b-expressing cells with the main differences being that Gd<sup>3+</sup> was more potent at reversing the NaHS-induced current (~85% reversal) and N-methyl-d-glucamine (NMDG) replacing Na<sup>+</sup> (ie. divalent cations present) completely reversed the NaHS current (Fig. 6E).

H<sub>2</sub>S can act as a reducing agent and thus may, like thioredoxin, activate TRPs by disrupting S-S bonds present in these proteins.<sup>24</sup> However, in TRPM2 and TRPM4b-expressing cells which showed repeated activation by H<sub>2</sub>S, neither high concentrations of DTT (10mmol/L) nor the more potent reducing agent, BMS, activated calcium transients (Supplemental fig 3). BMS (1mmol/L) also did not evoke calcium transients in vector-transfected cells, nor in P2X-expressing cells (data not shown). We also used an engineered disulfide between P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> that has previously been shown to become active upon reduction with dithiothreitol (DTT) or bis(2-mercaptoethyl)sulfone (BMS)<sup>25</sup> but NaHS at concentrations up to 1mmol/L had

no effect on this engineered disulfide protein (supplemental Figure 3). These results exclude the possibility that these concentrations of H<sub>2</sub>S act as a reducing agent to break disulfide bonds in TRPM2 or TRPM4b channels.

#### Discussion

In the present study, we demonstrated using direct electrophysiological recordings that NaHS had a powerful excitatory influence on small intestinal afferent fibres. The effect involves a purinergic mechanism linked to the activation of a TRP channel that is not TRPV1.

H<sub>2</sub>S has been proposed to interact with *TRPV1* receptors on afferent terminals.<sup>26</sup> A similar conclusion was reached in a more recent study that examined electrogenic chloride secretion across the guinea-pig and human colonic mucosa showing effects of H<sub>2</sub>S blocked by capsaicin desensitization<sup>15</sup> or TRPV1 receptor blockade.<sup>27</sup> Moreover, H<sub>2</sub>S evoked afferent discharge in guinea-pigs was blocked by capsazepine.<sup>27</sup> However, in the current study using *TRPV1*<sup>-/-</sup> mice it is clear that this receptor is not involved in the afferent response to H<sub>2</sub>S. Moreover, transmucosal PD across the mouse intestinal mucosa in response to H<sub>2</sub>S was also unaffected by capsaicin desensitization. It appears therefore that H<sub>2</sub>S has complex actions in the gut and species differences may contribute to the complexity.

It has been estimated that in physiological solutions at neutral pH, about 18% of NaHS is dissociated to the form of H<sub>2</sub>S. Therefore the concentrations of H<sub>2</sub>S applied in this investigation range from 18 nM -180 μmol/L, which is comparable to the level of H<sub>2</sub>S found in the gut lumen.<sup>12</sup> However, it is evident that there may be endogenous sources of H<sub>2</sub>S in the gut wall. One of these is the enteric nervous system which expresses both CSE and CBS as observed also in guinea-pig and human.<sup>15</sup>

Endogenous H<sub>2</sub>S would appear to play a role in modulating afferent sensitivity since blocking the enzymes responsible for H<sub>2</sub>S production led to a reduction in afferent sensitivity to mechanical distension. In this respect it is interesting that blocking CBS with hydroxylamine attenuated afferent firing while the CSE inhibitor PPG had no effect despite both enzymes being constitutively expressed as described above. We have also looked at the other CBS and CSE inhibitors (amino oxyacetic acid, AOAA)

and  $\beta$ -cyno-L-alanine (BCLA). Again, AOAA (CBS inhibitor) inhibited the mechanosensory response but BCLA was without effect (data not shown). It would appear that only CBS is active under baseline conditions and that H<sub>2</sub>S may play a role in determining baseline afferent sensitivity.

Normally the intestinal mucosa is efficient at reducing H<sub>2</sub>S to thiosulfate<sup>28</sup> which could explain the weaker and slower effect of intraluminally applied NaHS compared to that applied to the bath. However one might imagine that in situations where mucosal integrity is compromised, such as in colitis, that H<sub>2</sub>S may contribute to effects on gut function or sensation. Indeed, it has been suggested that H<sub>2</sub>S may contribute to the clinical manifestations of inflammatory bowel disease.<sup>29</sup>

The involvement of a purinergic mechanism in the afferent response to H<sub>2</sub>S is evident from the observation that the P2X receptor antagonists PPADS and A-317491 substantially attenuated the afferent response to NaHS without affecting the mechanosensory response. ATP can potentially stimulate small intestinal afferent fibres in the rat *in vivo*<sup>30</sup> and colonic afferents *in vitro*<sup>31</sup> and further observations in mice with double deletions of P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> genes suggest that the effects of ATP on small intestinal afferent fibres involve both P2X and P2Y receptors.<sup>32</sup> The majority of individual afferent fibres respond to both ATP and NaHS which suggests either that H<sub>2</sub>S directly interact with P2X receptors present on afferent terminals or H<sub>2</sub>S stimulates the release of ATP from the gut wall, which in turn interacts with P2X receptors. Our data support the latter. First, cellular sources of ATP are widespread in the gut wall and include enterocytes, enterochromaffin cells as well as enteric neurons.<sup>20,33</sup> Second, our data demonstrates that H<sub>2</sub>S triggers ATP release at concentrations as low as 30 $\mu$ mol/L. At higher concentrations of H<sub>2</sub>S the release of ATP was attenuated but this may have arisen because of the cumulative dosing paradigm employed in these studies. However, as discussed below Ca<sup>2+</sup> transients in transfected cell lines also showed a bell shaped response to H<sub>2</sub>S suggesting that the mechanism underlying H<sub>2</sub>S activation may desensitize. Third, HeLa and HEK cells

expressing a variety of P2X receptors failed to respond to H<sub>2</sub>S while maintaining robust responses to ATP. Thus using both whole-cell patch clamp experiments and calcium imaging experiments on HEK cells stably or transiently expressing P2X<sub>1,2,3,4,7</sub> homomeric receptors and P2X<sub>2/3</sub> receptors we could find no evidence for a direct effect of H<sub>2</sub>S on P2X receptors. We also ruled out direct activation of 5-HT<sub>1</sub> receptors in the same manner. Thus it appears that H<sub>2</sub>S triggers ATP release which in turn activates intestinal afferents expressing P2X<sub>3</sub>/P2X<sub>2/3</sub> receptors. The effect of H<sub>2</sub>S on transmural PD response to H<sub>2</sub>S was independent of afferent nerve activation and P2X receptor blockade. The afferent response is attenuated by PPADS while the transmural PD is unchanged. This suggests that H<sub>2</sub>S may have a direct effect on mucosal enterocytes while the afferents respond indirectly following release of ATP. It is intriguing to speculate that it may be the enterocyte that is the source of ATP for afferent signalling although there are other cell types in the mucosa, particularly enterochromaffin cells, that have been shown to release ATP in response to luminal stimulation.

Since TRPV1 was apparently not the target for H<sub>2</sub>S in mice we sought to examine the role of other TRP channel blockers. Specifically, we found that ruthenium red, 2-APB and gadolinium all markedly inhibited the afferent response to NaHS. We realize the limited selectivity of these antagonists but these data suggest that H<sub>2</sub>S is targeting TRP channels, particularly those of the TRPC/TRPM family, to cause sensory neuron excitation. We had access to cDNA encoding rat and human TRPV1 and rat TRPV2, human TRPM4b, TRPM2, TRPC1, mouse TRPC2, and human or mouse TRPC4, TRPC5, TRPC6, TRPM7 and TRPM8. H<sub>2</sub>S evoked large calcium transients only in TRPC4, TRPC5, TRPM2, and TRPM4b transfected cells, with only rare (<2% of cells) responses being recorded from cells transfected with any of the other constructs. We also examined the actions of H<sub>2</sub>S on Fluo4-mediated calcium transients in HEK cells transfected with K<sub>ATP</sub> (SUR1+Kir 6.2) channels and by cell-attached patch clamp recordings of cells transfected with SK small-conductance calcium-activated potassium channels but saw no response to H<sub>2</sub>S.

We focussed our further attention solely on calcium imaging experiments on HEK and HeLa cells transiently transfected with TRPM2 or TRPM4b channels. We focussed on these because TRPC4 and TRPC5-induced calcium transients and membrane currents are potentiated by  $\text{La}^{3+}$  and  $\text{Gd}^{3+}$  and so less likely to be involved in the afferent response.<sup>22,23</sup> Low concentrations of NaHS (0.1-10  $\mu\text{mol/L}$ ) induced dose-dependent, relatively sustained, calcium transients while higher concentrations most often resulted in a significant decrease in level of Fluo4 fluorescence. Removal of extracellular calcium (including 0.1  $\text{mmol/L}$  EGTA) prevented the response to low concentrations of  $\text{H}_2\text{S}$ .  $\text{H}_2\text{S}$ -mediated calcium increases were completely blocked by 100  $\mu\text{mol/L}$  lanthanum. These effects of  $\text{H}_2\text{S}$  are not due to the disruption of S-S bonds since neither high concentrations of DTT (10  $\text{mmol/L}$ ) nor the more potent reducing agent, BMS, activated calcium transients in these transfected cells. We also used an engineered disulfide between P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> that has previously been shown to become active upon reduction with DTT or BMS<sup>25</sup> but NaHS had no effect on this engineered disulfided protein. These results exclude the possibility that these concentrations of  $\text{H}_2\text{S}$  act as a reducing agent to break disulfide bonds in TRPM2 or TRPM4b channels.

In summary these data demonstrate that  $\text{H}_2\text{S}$  acts to stimulate intestinal afferents via a mechanism that depends upon the release of ATP. The stimulus for ATP release appears to be a TRP channels but the current data would rule out any involvement of TRPV1. Instead we have provided both pharmacological and molecular data implicating members of the TRPC/M family in the transduction of stimulation by  $\text{H}_2\text{S}$ . Our data provide an exciting prospect that  $\text{H}_2\text{S}$  may be a long-sought endogenous activator of these TRP channels, a signalling mechanism that may be of profound importance in GI physiology and pathophysiology.

### Legends to Figs and tables

Figure 1. NaHS activates small intestinal afferent fibres. *A*, Representative traces of multiunit afferent nerve activity, afferent discharge rate and intraluminal pressure (IP) showing typical response to ramp distensions and to extraluminal NaHS (0.3 mM). *B* Traces of afferent discharge rate in wild type (upper) and TRPV1 knockout preparations (lower) illustrating the profile of the response to extraluminal NaHS. *C* & *D*, histogram showing concentration-dependent increases in afferent discharge in wild type (*C*) and in TRPV1 (*D*) preparations. *E* There is no statistical difference in the time course and amplitude of the response to NaHS between WT and TRPV1 KO mice ( $P>0.05$ , two-way ANOVA). *F*, A comparison of the nerve response profiles following extra- and intraluminal application of NaHS.

Figure 2. Effects of  $\text{H}_2\text{S}$ -synthesizing enzyme inhibitors on the mechanosensory responses of small intestinal afferent nerves. Note that in the presence of hydroxylamine (1 mM), a CBS inhibitor, the pressure-afferent response curve was lower than control ( $P<0.01$ , two-way ANOVA). PPG (0.3 and 3 mM), a CSE inhibitor, was without significant effect ( $P>0.05$ , two-way ANOVA).

Figure 3. Involvement of a purinergic mechanism in NaHS-evoked afferent discharge. *A*, NaHS stimulates the release of ATP from the small intestine. *B*, Representative recording of afferent nerve activity in response to extraluminal ATP and NaHS. The left and the right columns are consecutive recordings from a same preparation. *C*, Pie chart showing that 82% of 94 units were co-sensitive to ATP and NaHS. *D*, Representative traces of afferent discharge rate and intraluminal pressure showing afferent responses to jejunal distensions and extraluminal NaHS in control and in the presence of the broad-spectrum P2 receptor antagonist, PPADS. Note that PPADS inhibited NaHS-evoked afferent discharge but had no effect on the mechanosensory response. *E*, Mean data showing that PPADS and the P2X<sub>3</sub>/P2X<sub>2,3</sub> selective antagonist,

A317491 significantly attenuated the response to NaHS. \*,  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.01$ , two-way ANOVA,  $N = 6$ .

Figure 4 NAHS evoked a secretory response in the mouse colon. Panel A shows changes in short circuit currents from mucosa-submucosa preparations of the mouse colon. Addition of NaHS (marked by arrows) induced reproducible responses which were unaffected by tetrodotoxin (TTX). Panel B summarises the results of the Ussing chamber experiments. Three consecutive applications of NaHS evoked reproducible responses with similar amplitudes. The response is not altered by TTX, defunctionalisation of extrinsic afferents by long term incubation of  $10 \mu\text{M}$  capsaicin (CAP) or preincubation with PPADS.

Figure 5.  $\text{H}_2\text{S}$  does not activate  $\text{P2X}_1$ ,  $\text{TRPV1}$  or  $\text{TRPV2}$  receptors exogenously expressed in HEK cells. In A-D, records on the left are typical examples from whole-cell recordings and records on the right are Fluo4 fluorescence signals from cells expressing the indicated receptors. Fluo4 traces are average  $\pm$  s.e.m of 26–43 cells in the field of view. Bars indicate duration of application of indicated compound. Whole-cell recordings shown in D from  $\text{TRPV2}$ -expressing cell are currents in response to voltage ramps ( $-120$  to  $+80$  mV) in the presence of  $100 \mu\text{M}$  2-APB which is an agonist at this receptor. E, summary of all results from whole-cell recordings of currents in response to agonists ( $30 \mu\text{M}$  ATP at  $\text{P2X}_2$ ,  $30 \mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{methylene-ATP}$  at  $\text{P2X}_{2,3}$ ,  $3 \text{ mM}$  ATP at  $\text{P2X}_7$ ,  $1 \mu\text{M}$  capsaicin at  $\text{TRPV1}$  and  $100 \mu\text{M}$  2-APB at  $\text{TRPV2}$ ). Lanthanum and gadolinium concentrations were  $100 \mu\text{M}$  and ruthenium red was  $10 \mu\text{M}$ ;  $n = 4 - 6$  cells for each.

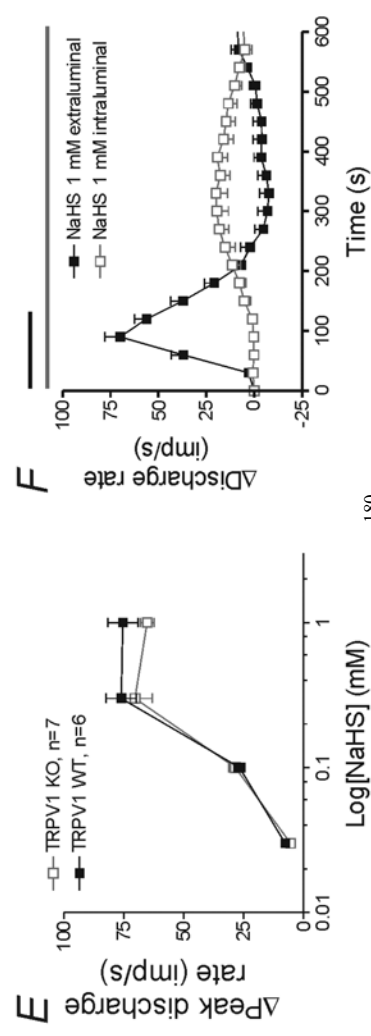
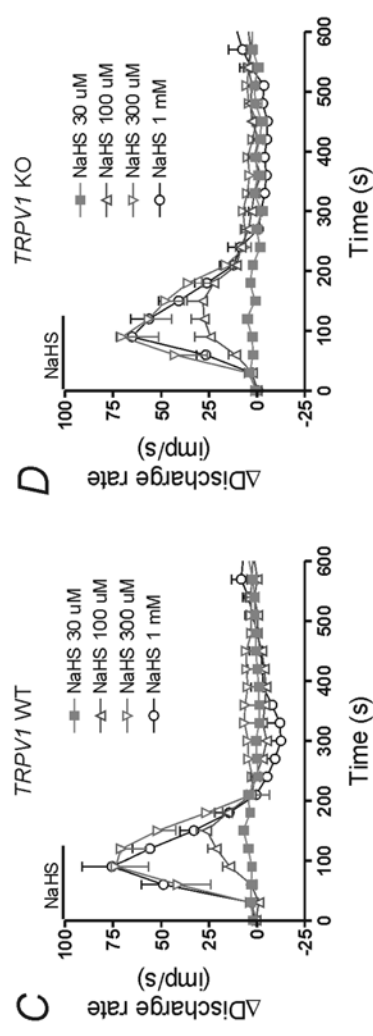
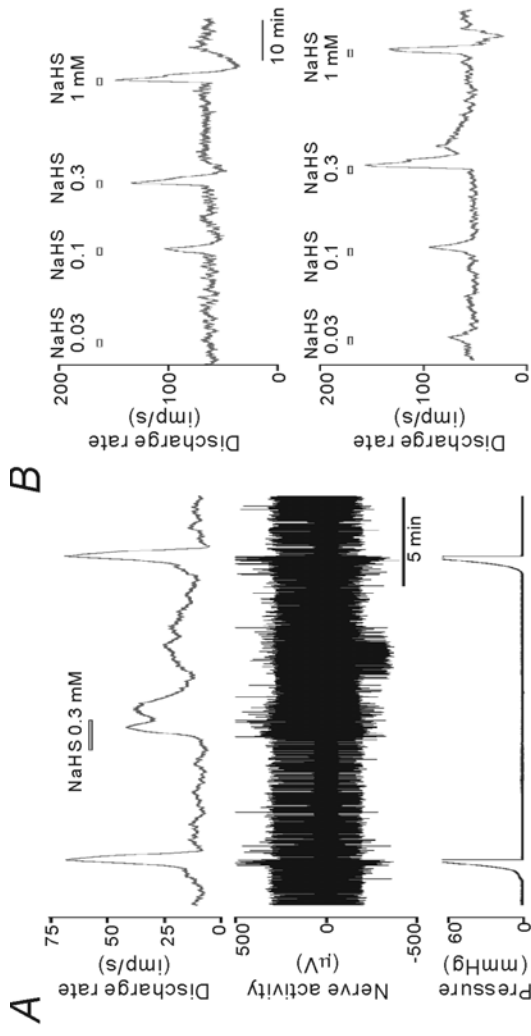
Figure 6.  $\text{H}_2\text{S}$  activates  $\text{TRPM2}$  and  $\text{TRPM4b}$  receptors exogenously expressed in HEK cells. A,C are Fluo4 fluorescence; D,E are whole cell recordings from cells expressing the indicated receptor. A, Calcium transients recorded from same set of cells in response to NaHS applied at 10 min intervals before and after the addition of  $100 \mu\text{M}$  lanthanum. B, NaHS concentration-response curve for calcium transients in

$\text{TRPM4b}$ -expressing cells in absence and presence of lanthanum; each point is mean  $\pm$  s.e.m of 3–5 separate experiments with each experiment averaging 14 – 32 cells in the field of view. C, The reducing agents, DTT and BMS, do not evoke calcium transients in the same  $\text{TRPM2}$ -expressing cells that respond to NaHS; trace is average of 14 cells in the field of view; similar results were obtained from 3 separate experiments with  $\text{TRPM2}$  and 4 separate experiments with  $\text{TRPM4b}$ . D, example of NaHS-induced inward current (at  $-50$  mV) in response to NaHS in  $\text{TRPM4b}$ -expressing cell, number are ramp voltages applied which are shown in IV curve on right. E, example of recording from a separate  $\text{TRPM4b}$ -expressing cell in response to NaHS which shows rapid reversal when extracellular sodium was replaced with NMDG.

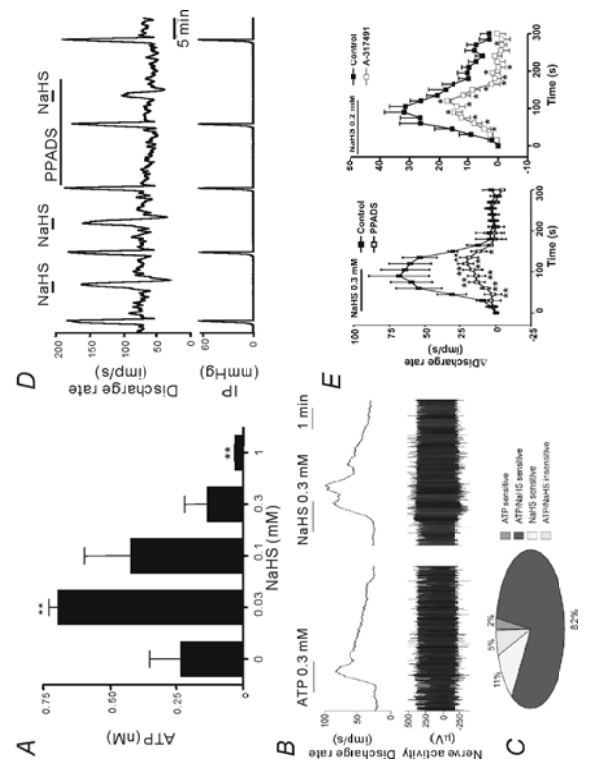
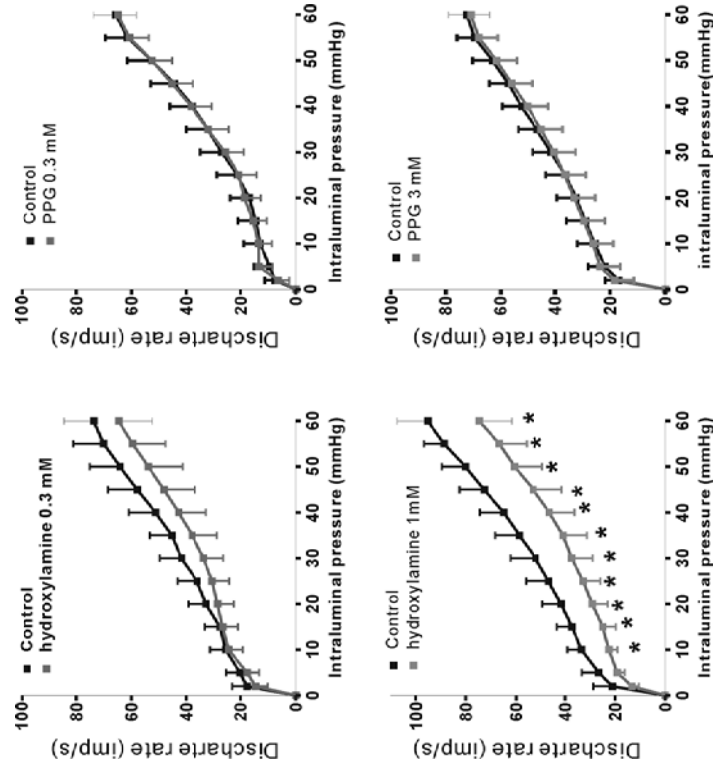
## References

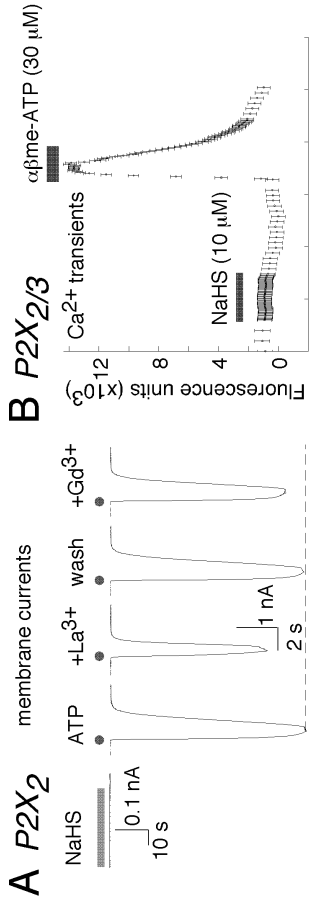
- Schemann M, Grundy D. Role of hydrogen sulfide in visceral nociception. *Gut* 2009;58:744-747.
- Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol* 2002;26:13-19.
- Moore PK, Bhatia M, Mochhala S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:609-611.
- Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002;16:1792-1798.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:527-531.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 2001;20:6008-6016.
- Sidhu R, Singh M, Samir G, et al. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolated pregnant rat uterine strips in vitro. *Pharmacol Toxicol* 2001;88:198-203.
- Yang W, Yang G, Jia X, et al. Activation of K<sub>ATP</sub> channels by H<sub>2</sub>S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J Physiol* 2005;569:519-531.
- Patacchini R, Santicicoli P, Giuliani S, et al. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 2004;142:31-34.
- Patacchini R, Santicicoli P, Giuliani S, et al. Pharmacological investigation of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) contractile activity in rat detrusor muscle. *Eur J Pharmacol* 2005;509:171-177.
- Nagai Y, Tsugane M, Oka J, et al. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J* 2004;18:557-559.
- Deplancke B, Finster K, Graham WV, et al. Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in mice. *Exp Biol Med* (Maywood) 2003;228:424-433.
- Li L, Bhatia M, Moore PK. Hydrogen sulphide—a novel mediator of inflammation? *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:125-129.
- Collin M, Anuar FB, Murch O, et al. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol* 2005;146:498-505.
- Schicho R, Krueger D, Zeiler F, et al. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology* 2006;131:1542-1552.
- Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, et al. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:325-335.
- Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, et al. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain* 2007;132:74-81.
- Rong W, Hillsley K, Davis JB, et al. Jejunal afferent nerve sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. *J Physiol* 2004;560:867-881.
- Roger S, Pelegrin P, Surprenant A. Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J Neurosci* 2008;28:6393-6401.
- Burnstock G. Purines and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol* 2009;333:392.
- Keating C, Pelegrin P, Surprenant A, et al. The ATP-gated P2X(7) receptor is required for the generation of jejunal afferent mechano-hypersensitivity in *Trichinella spiralis* infected. *Neurogastroenterology and Motility* 2007;19:19.
- Zeng F, Xu SZ, Jackson PK, et al. Human TRPC5 channel activated by a multiplicity of signals in a single cell. *J Physiol* 2004;559:739-750.
- Jung S, Muhle A, Schaefer M, et al. Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem* 2003;278:3562-3571.
- Xu SZ, Sukumar P, Zeng F, et al. TRPC channel activation by extracellular thiodoxin. *Nature* 2008;451:69-72.
- Jiang LH, Kim M, Spelta V, et al. Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 2003;23:8903-8910.
- Chahl LA. Hydrogen sulphide: an endogenous stimulant of capsaicin-sensitive primary afferent neurons? *Br J Pharmacol* 2004;142:1-2.
- Krueger D, Forster M, Muller K, et al. Signalling mechanisms involved in the intestinal pro-secretory actions of hydrogen sulphide. *Gastroenterology*. 2010. submitted.

28. Levitt MD, Furne J, Springfield J, et al. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J Clin Invest* 1999;104:1107-1114.
29. Levine J, Ellis CJ, Furne JK, et al. Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998;93:83-87.
30. Kirkup AJ, Booth CE, Chessell IP, et al. Excitatory effect of P2X receptor activation on mesenteric afferent nerves in the anaesthetised rat. *J Physiol* 1999;520 Pt 2:551-563.
31. Wynn G, Rong WF, Xiang ZH, et al. Purinergic mechanisms contribute to mechanosensory transduction in the rat colorectum. *Gastroenterology* 2003;125:1398-1409.
32. Rong W, Keating C, Sun B, et al. Purinergic contribution to small intestinal afferent hypersensitivity in a murine model of postinfectious bowel disease. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:665-71, e32.
33. Christofi FL. Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signal* 2008;4:213-236.

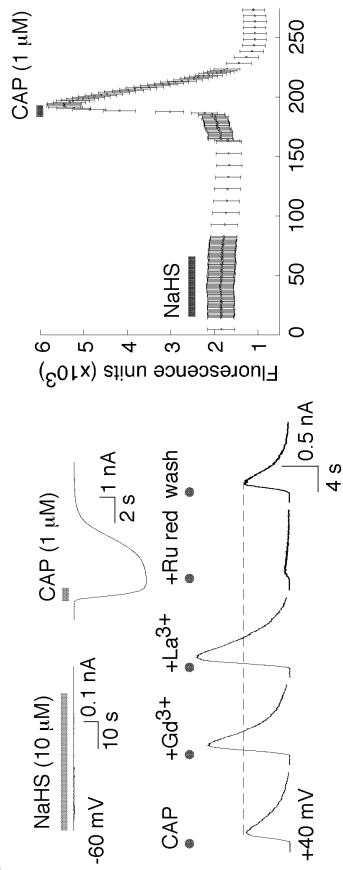




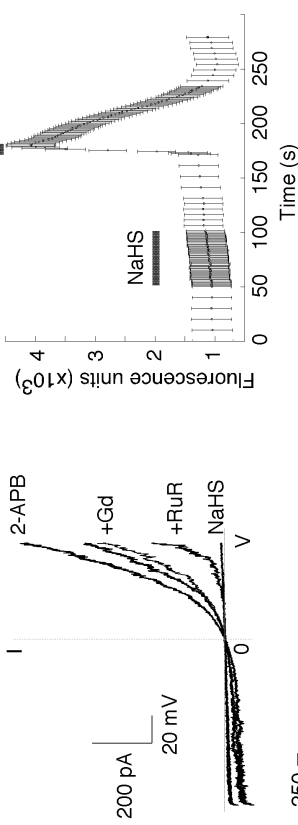




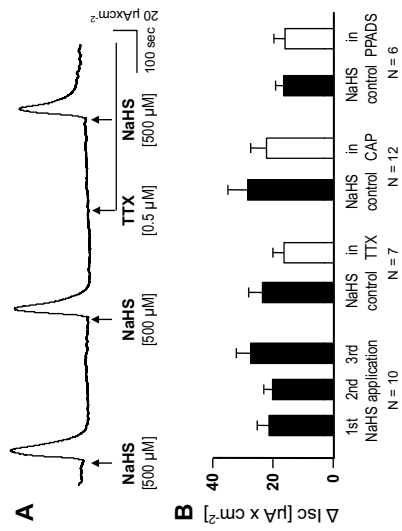
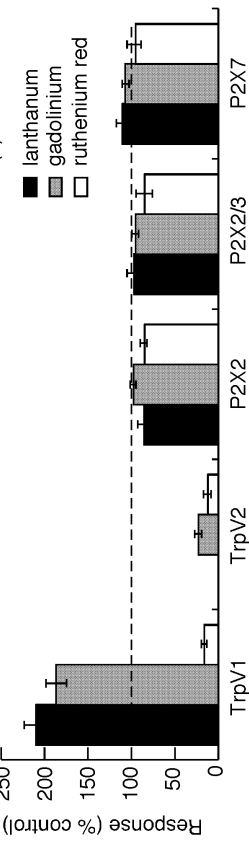
**C** *TRPV1*

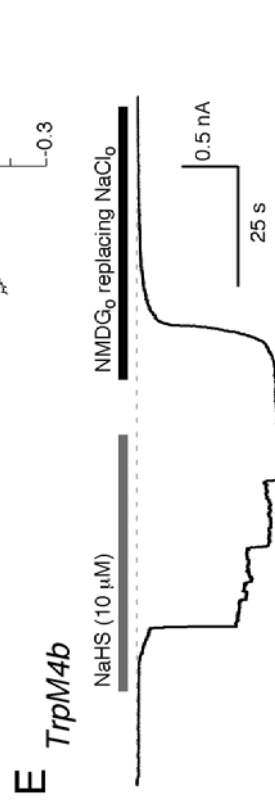
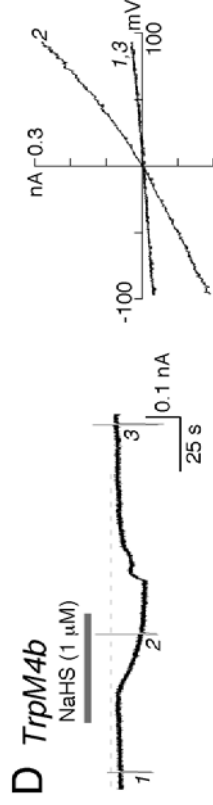
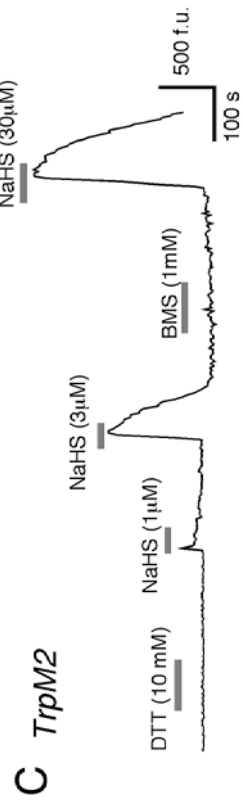
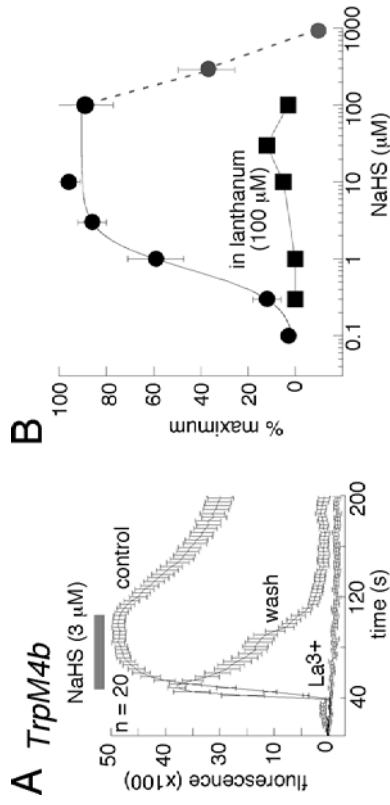


**D** *TRPV2*



**E**





### Supplementary methods

**Animals.** *TRPV1* WT and KO mice with a genetic background of C57/BL6 were generated in GlaxoSmithKline (Harlow, UK). Transmembrane domains 2–4 of the mouse *TRPV1* gene (DNA encoding amino acids 460 – 555) were replaced by the neo gene. Mating pairs of *TRPV1*<sup>-/-</sup> and *TRPV1*<sup>+/+</sup> N1F1 littermates were obtained to generate separate colonies of *TRPV1* WT and KO mice at the University of Sheffield according to UK Animals Scientific Procedures Act (1986).

**Tissue preparation and nerve recording.** Mice were killed with an overdose of pentobarbitone sodium (80 mg Kg<sup>-1</sup>) injected intraperitoneally. Sections of jejunum (30–35 mm in length) were removed and were kept in oxygenated (95 % O<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub>) Krebs solution (composition in mmol/L: NaCl 113; KCl 5.9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; MgSO<sub>4</sub> 1.2; NaHCO<sub>3</sub> 25; CaCl<sub>2</sub> 1.2; glucose 11.5). One of the jejunal segments was placed into a purpose-built chamber (20 ml). Krebs solution was constantly perfused through the tissue chamber (37 °C) at 10 ml/min. The jejunum was cannulated at each end, and intraluminal pressure was recorded via a pressure amplifier (NL 108, Digtimer, UK). Two syringe pumps were connected in parallel to the intraluminal inflow cannula via a T-piece connector, to allow intraluminal perfusion through the lumen of Krebs or test solutions. The mesenteric bundle was pinned out onto the Sylgard base of the recording chamber and a mesenteric nerve was carefully dissected from the bundle. Nerve activity was recorded using a suction electrode connected to a headstage (NL100), amplified (NL104) and filtered (NL 125, band pass 200–3000 Hz). Whole nerve activity was displayed on an oscilloscope. The nerve signal was acquired (20 kHz sampling rate) to a computer through a Micro 1401 interface and Spike 2 software (version 5.03, Cambridge Electronic Design, UK). Single unit discrimination was performed using the spike-sorting function of Spike2 software.

**Experimental protocols.** The preparation was allowed to stabilise for up to 60 minutes. Throughout the experiment, Krebs solution was constantly perfused intraluminally at 10 ml/hr against a distal pressure head of 1 mmHg. To distend the intestine, a 3-way tap on the intraluminal outlet cannula was closed whilst Krebs perfusion continued. In this manner, the gut segment was distended to 60 mmHg in approximately 120 s, before the 3-way tap was opened to return intraluminal pressure to baseline. To test the effects of H<sub>2</sub>S, NaHS (0.03–3 mmol/L, BDH,

Poole, UK) was added to Krebs solution perfusing the tissue chamber (10 ml/min, for 2 min). Nerve response to ATP (0.3 mmol/L, Sigma) was tested in a similar manner. In some preparations, NaHS (1mmol/L) was infused intraluminally (10 ml/hr) for 10 min. At least 15 min was allowed between consecutive chemical challenges. To investigate the possible involvement of a purinergic mechanism in the nerve response to H<sub>2</sub>S, the tissue was superfused with Krebs solution containing the P2 antagonist, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonic acid (PPADS, 30 μmol/L, Sigma) or A317491 (10 μmol/L, Sigma). Nerve response to NaHS (0.3 mmol/L) before and after application of antagonist were compared. The role of endogenous H<sub>2</sub>S in afferent sensitivity to mechanical distension was investigated through application of CBS or CSE inhibitors including hydroxylamine and D,L-propargylglycine (PPG). After the nerve response to ramp distension (up to 60 mmHg) stabilized, the intraluminal and bath perfusion was switched to Krebs containing one of the inhibitors and the gut was distended twice (15 interval) with the test solution and distended again after switching back to normal Krebs infusion to observe recovery. The mean firing frequency (imp/s) was measured with a time constant of 10 s. The response to NaHS was plotted as rate histograms for 10 minutes after the drug reached the organ bath. Data are expressed as means ± S.E.M and compared using paired or unpaired Student's t-tests as appropriate. A *P* value of less than 0.05 is considered as statistically significant.

#### **ATP release measurements.**

Jejunal segments of 30 mm length were cut open and pinned down on the Sylgard base with the epithelium facing upward. The tissue was initially superfused at a constant rate of 10 ml/min with oxygenated Krebs solution and was allowed to stabilize for 30 minutes. The superfusion was then switched off and a 300 μl bathing solution was collected from close proximity to the tissue. Each tissue was then challenged once with NaHS solution (final bath NaHS concentration ranging from 30 to 1000 μmol/L) and 1 min later another 300 μl bathing solution was again collected for ATP assay. ATP concentration in the bathing solution was measured in 100 μl samples which was placed in duplicates into a 96-well non-phosphorescent microplate, with each well pre-injected with 100 μl luciferin-luciferase reagent (Sigma). The level of luminescence was counted for 10 sec for each well and ATP concentration was extrapolated from appropriate calibration curves constructed using standard ATP solutions. Two calibration curves were

constructed in parallel using standard ATP solutions prepared in Krebs' solution with or without 1 mmol/L NaHS. The two curves overlapped across the entire ATP concentration range confirming that NaHS did not affect interaction of luciferin-luciferase reagent with ATP. ATP release was quantified as mean ATP concentration in the bathing solution.

#### **Immunohistochemistry.**

For multiple-labeling studies, mouse tissue was fixed overnight at room temperature in a solution containing 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 mol/L phosphate buffer and followed by several washes (3 × 10 min) in phosphate buffer. Whole-mount preparations or sections containing the submucosa or the myenteric plexus were first incubated in PBS (1 hour, room temperature; buffer changed every 10 min) followed by incubation (1 hour, room temperature) in PBS plus Triton X-100 (TX100; 0.3%) and normal goat serum (3%) to block non-specific binding. The tissue was then incubated for 24 hours at room temperature in solution containing the primary antibodies diluted in PBS/TX100 and normal goat serum (3%). A rabbit anti-CSE (1:1000, kindly provided by Dr. Hideo Kimura) and a goat anti-CBS antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) were used for labeling in mouse enteric nervous system. In addition, mouse anti-CSE (1:1000; Abnova, Taipei; Taiwan) and mouse anti-CBS antibodies (1:500; Abnova) were applied in rat tissue. Specificity of the antibody has been described previously (15). After washing in PBS/TX100, samples were exposed to the species-specific secondary antibodies (Cy2- and Cy3-labeled anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). After a final wash, preparations were mounted on slides. For the inspection of the tissue, an Olympus microscope (BX61 WI; Olympus) with appropriate filter blocks was used. The microscope was equipped with a SIS F-view II CCD camera and AnalySIS 3.1 software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) for image acquisition, processing and editing.

#### **Using Chamber Experiments**

Colonic segments from 15 mice either sex (C57/bl6; 33 ± 7 g; Charles River, Kisslegg, Germany) were quickly removed after killing the animals by cervical dislocation and exsanguination. The procedures used in this study are in accordance with the German ethical guidelines for animal experiments. Segments were dissected in ice cold Krebs solution to obtain

the mucosa/submucosa preparations containing the submucous plexus. To test the effects of the H<sub>2</sub>S donor NaHS on ion secretion in intact submucosa/mucosa preparations of mouse colon we employed Ussing chamber techniques (Easy Mount chambers, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA). The area of the recording chamber was 0.5 cm<sup>2</sup>. Mucosal and serosal sides were bathed separately in 5 ml Krebs solution. The bath was maintained at 37° C and continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (Carbogen). The transepithelial potential difference was measured by a pair of Ag/AgCl electrodes, connected to a voltage clamp apparatus (VCC 600; Physiologic Instruments) that compensated for the solution resistance between the electrodes. The current electrodes were placed on each side of the tissue. Each electrode was inserted in a pipette tip, connected to the Krebs solution in the chamber via a 3 mol/L KCl-filled agar bridge (Easy Mount Electrode Set P2020, Physiologic Instruments). Ion secretion was measured as short circuit current (*I<sub>sc</sub>*) and expressed in  $\mu\text{A cm}^{-2}$ . Positive *I<sub>sc</sub>* indicated a net anion current from the serosa to the lumen. NaHS was added to the serosal side of the preparation. Before starting the actual measurements, the tissues were allowed to equilibrate for at least 30 minutes.

**Heterologous expression studies.** HEK or HeLa cells stably or transiently expressing P2X receptors were used as described previously(18). The same transfection protocols (Lipofectamine 2000; 1  $\mu\text{g}$  eDNA) were used for expression of all other cDNAs. We used the following constructs: : rTRPV1, mTRPV2, hTRPV3, hTRPC1, hTRPC4, hTRPC5, hTRPC6, hTRPC6-YFP, hTRPM2, hTRPM4b, rKir 6.2+SUR, rSK2, hSK2, rSK1. Each transfection included a set of eGFP-only transfected cells to monitor transfection efficiency; in all cases > 75% of cells expressed GFP as did cells in which hTRPC6-YFP was transfected. For electrophysiological, but not calcium imaging, experiments eGFP (0.1  $\mu\text{g}$ ) was co-transfected with each construct. Cells were plated on coverslips and used for Fluo-4 imaging or patch clamp recording 18 – 72 h post-transfection. Unless otherwise stated, all experiments were performed at room temperature.

#### **Fluo-4 imaging.**

Cells were preincubated with 1  $\mu\text{mol/L}$  Fluo-4 AM (Invitrogen, UK) with 0.02% pluronic acid (Calbiochem, San Diego, CA) at 37 °C for 30 minutes. Coverslips with Fluo-4 loaded cells were then placed in a bath chamber on an Axiovert 25 inverted microscope (Carl Zeiss, Germany) and

perfused with a solution containing (in mmol/L) 136 NaCl, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 1.8 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 20 HEPES and 5.5 glucose. Fluorescence was detected with a filter set with an excitation range 450 –490 nm and emission 515-565 nm (Carl Zeiss, Germany). Agonists were added via perfusion at the indicated time. The Fluo-4 signals were acquired for 5-10 minutes at 1-10 s intervals by a QICAM camera (QImaging, Canada) and recorded with the Simple PCI software (Compix Inc., Imaging Systems, USA). Acquired data were exported to and plotted with KaleidaGraph (Synergy Software, USA).

#### **Patch-clamp recordings.**

Whole-cell patch-clamp recordings were performed using an EPC9 (HEKA, Lambrecht/Pfalz, Germany) amplifier. Micro-electrodes (4-6 m $\times$ ) were prepared by pulling thin wall borosilicate glass capillaries (1.5 mm outside diameter with filament, World Precision Instruments, UK) using a two-step electrode puller (Narishige, Japan). Cells were held at -60 mV unless otherwise indicated. Standard extracellular/intracellular solutions contained (in mmol/L): 147 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES and 13 glucose/147 NaCl, 10 HEPES and 10 EGTA. Agonists/antagonists were dissolved in the standard extracellular solution and delivered via a rapid solution changer RSC-200 (Bio-logic Science Instruments, Claix, France). In some experiments, voltage ramps (-120 to 80 mV) were applied after whole-cell configuration was attained.

#### **Drugs and reagents**

All chemicals, unless otherwise stated, were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany; Poole, UK). The components of various buffers used in this study were detailed above. Stock solutions of tetrodotoxin citrate (TTX; Toctis, Bristol, UK), Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2,4'-disulfonate (PPADS), A-317491 and NaHS were made in Krebs solution. Stock solutions of capsaicin (Alexis, Lausen, Switzerland; Sigma, Poole, UK), Ruthenium Red, 2-APB (Molecular Probes, USA) were dissolved in 100% DMSO and further diluted with Krebs solution. Solvents alone were without effect.

#### **Analysis and statistics**

All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). To detect significant differences between treatments, paired or unpaired Student's t-test, two-way ANOVA with Bonferroni test were performed where appropriate. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

**Supplementary figure 1.** Illustration of the H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes CSE and CBS in mouse intestinal preparations. The upper panel shows CSE-IR in sections of mouse jejunum and colon. The arrows mark a myenteric ganglion that contains CSE-positive cells. The lower panel shows CSE and CBS staining in whole mount preparations of the submucous (SMP) and myenteric plexus (MP). A strong CSE-IR and CBS-IR is evident in almost all submucous and myenteric neuronal cell bodies. In the rat intestine the CSE and CBS antibodies showed strong staining of enteric neurons. However, the staining in the rat could not be blocked by preincubation with the antigens and was therefore considered as nonspecific labeling and caution may be needed in using these antibodies in the rat.

**Supplementary figure 2.** NaHS evoked afferent discharge is inhibited by non-selective TRP channel blockers. The panels show representative examples of afferent discharge evoked by 0.3 mM NaHS in control condition and in the presence of non-selective TRP channel blockers, ruthenium red (10, 30  $\mu$ M), Gadolinium (100  $\mu$ M) and 2-APB (100  $\mu$ M).

**Supplemental Figure 3.** NaHS does not reduce accessible disulfide bonds in P2X<sub>2</sub>[V48C]/P2X<sub>3</sub>[I319C] receptor. We used protocols as described in detail in Jiang et al. (2003). Graph plots amplitude of ATP-induced current (30  $\mu$ M) relative to initial current in absence of reducing agents. DTT and BMS increased ATP currents by 2.5 - 4-fold; these results are similar to those obtained in the previous study by Jiang et al(25). NaHS up to 1 mM and present for 8 min did not significantly alter ATP-evoked currents in the same cells that DTT or BMS increased responses (n = 3 for each) or in cells not previously exposed to DTT or BMS (n = 4 for each).

**Supplemental Table 1.** Summary of results from whole-cell patch clamp recordings from HEK cells expressing the indicated construct.

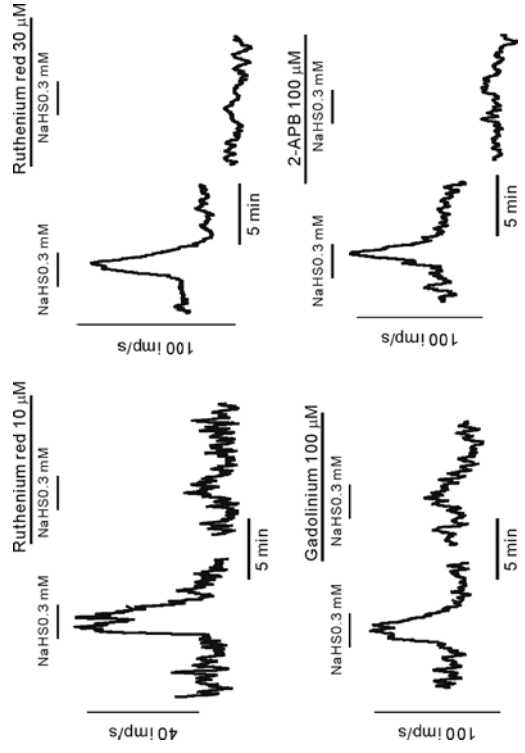
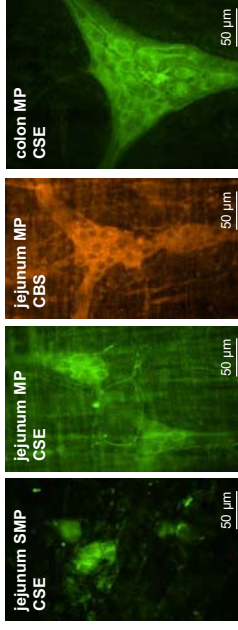
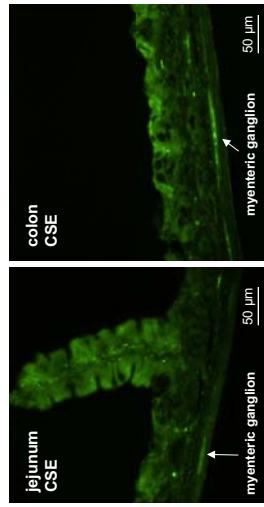
Construct in HEK	Peak current to agonist	Peak current to	
		NaHS	no. cells
Untransfected	0	0	21
GFP-transfected	0	0	31
rP2X <sub>2</sub> -stable	5.8 ± 0.6 nA	0	22
rP2X <sub>2</sub> -transient	7.8 ± 1.1 nA	0	12
rP2X <sub>2/3</sub> -stable	3.4 ± 0.7 nA	0	34
hP2X <sub>3</sub> -stable	4.1 ± 0.5 nA	0	18
hP2X <sub>4</sub> -stable	1.4 ± 0.3 nA	0	17
rP2X <sub>7</sub> -stable	4.9 ± 0.4 nA	0	42
5-HT <sub>3</sub> -transient	1.4 ± 0.7 nA	0	9
rTRPV1-transient	1.8 ± 0.1 nA	0	31
mTRPV2-transient	0.7 ± 0.2 nA	0	29

Agonist concentrations were: 30 μM ATP at P2X<sub>5</sub>, untransfected and GFP-transfected, 30 μM at P2X<sub>4</sub>, 30 μM αβmATP at P2X<sub>2/3</sub> and P2X<sub>3</sub>, 3 mM ATP at P2X<sub>7</sub>, 30 μM 5-HT at 5-HT<sub>3</sub>, 10 μM capsaicin at TRPV1 and 100 μM at TRPV2. NaHS was applied for 50 s at concentrations from 0.3 - 100 μM before or subsequent to agonist application in same cells.

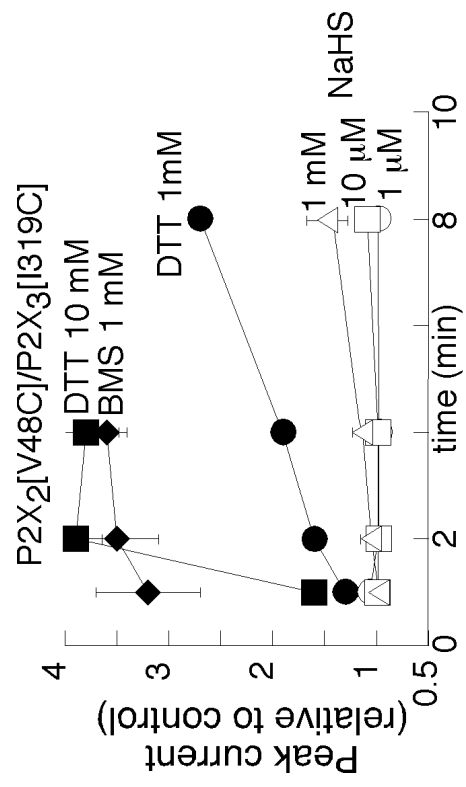
**Supplemental Table 2.** Summary of results from Fluo4 fluorescence measurements from HEK cells expressing the indicated receptors.

Construct	Cells responding/total	No. experiments
Untransfected	0/379	--
Vector or eGFP	0/2002	15
rP2X <sub>2</sub>	0/526	4
rP2X <sub>2/3</sub>	0/426	3
hP2X <sub>4</sub>	0/490	3
rP2X <sub>7</sub>	0/280	2
rTRPV1	0/1170	6
mTRPV2	0/865	4
hTRPC1	0/420	3
mTRPC2	12/980	5
hTRPM8	14/1190	6
hTRPC6	0/610	3
<b>hTRPC4</b>	<b>396/1110</b>	<b>11</b>
<b>hTRPC5</b>	<b>270/674</b>	<b>9</b>
<b>hTRPM2</b>	<b>655/1365</b>	<b>9</b>
<b>hTRPM4b</b>	<b>562/1250</b>	<b>8</b>

Data are numbers of cells responding to NaHS (0.1 – 100 μM) over total number of cells in the field of view. NaHS was applied for 120 s in all experiments except for cells expressing TRPC4,C5,M2 or M4b in which case duration of NaHS varied from 30 – 120 s.







## Danksagung

Für die Übernahme der Betreuung meiner Promotion möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dirk Haller bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Schemann. gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit schreiben zu können und für die jahrelange liebevolle Betreuung.

Ein Dankeschön an alle Kollegen des Lehrstuhls für Humanbiologie für die Kollegialität und Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Klaus Michel für seine Engelsgeduld beim Lösen technischer Probleme.

Bei Birgit Kuch, Christa Heilmeier und Marlene Redl möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei Färbungen, Präparation und Transfer von Gewebe bedanken.

## Curriculum Vitae Dagmar Krüger

**Name:** Dagmar Krüger  
**Geburtstag:** 06.12.1963  
**Geburtsort:** Gangkofen  
**Familienstand:** verheiratet, 1 Tochter

**Schulbildung:**  
1970-1974: Grundschule Gangkofen  
1974-1983: Carl-von-Closen Gymnasium, Eggenfelden  
1983: Abitur: Note 1,9

**Studium**  
1983-1986: Diplom Biologie  
Universität Regensburg  
1986-1990: Universität Hohenheim  
1990: Diplom: Note sehr gut

**Berufliche Erfahrungen:**  
1990 – 2001: freiberufliche Tätigkeit als Übersetzerin und Autorin von Lehrbüchern  
  
1998-2001: Tätigkeit bei dem Pharmaunternehmen Essex in Großburgwedel bei Hannover:  
  
2001-2002: Dozentin an der Veterinär-Medizinischen-Technischen-Assistenten-Schule der Tierärztlichen Hochschule Hannover für das Fach Physiologie.  
  
April-Juli 2002: Wissenschaftliche Hilfskraft an der Tierärztlichen und der Medizinischen Hochschule Hannover:  
  
Januar-März 2003: Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Technischen Universität München  
  
März 2003-März 2004: Wissenschaftliche Angestellte an der Ludwig-Maximilian Universität München: Gastvertrag mit der Gesellschaft für Gesundheit und Umwelt in Neuherberg:  
  
März 2004-bis 2006: Wissenschaftliche Angestellte des Klinikum Krefelds, Arbeitsort TU-München-Weihenstephan  
  
2006 – heute: Wissenschaftliche Angestellte an der Technischen Universität München