

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt

Lehrstuhl für Humanbiologie

Neuroimaging enterischer Neurone in humanen intestinalen Biopsien

Daniela Gisela Rosa Ostertag

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. M. Klingenspor

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann
2. apl. Prof. Dr. H. Adelsberger

Die Dissertation wurde am 12.11.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 25.01.2016 angenommen.

Finanzielle Unterstützung

Diese Arbeit wurde unterstützt durch DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) Graduate School RTG-1373/2 und DFG Sche 267/7-2.

Kollaborationen

Die verwendeten Humandarmresektate wurden im Rahmen einer bestehenden Kooperation mit Dr. Demir Ekin und Dr. Güralp Ceyhan (Krankenhaus Rechts der Isar der Technischen Universität München) sowie Dr. Florian Zeller (Krankenhaus Freising) für die Versuche zur Verfügung gestellt.

Die Biopsien wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Manfred Kurjak (Gastroenterologische Privatpraxis „Abdomen“ München), Prof. Dr. Christian Pehl (Krankenhaus Vilsbiburg) und Dr. Manuela Götzberger, Dr. Nikolaus Lukas, Dr. Astrid Lichius-Brich und Prof. Dr. Ewert Schulte-Frohlinde (Krankenhaus Freising) für die Versuche entnommen.

Der Online-Fragebogen, der zur Einteilung der Patientengruppen herangezogen worden war, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Björn Horing und Prof. Dr. Paul Enck (Universität Tübingen) entwickelt und verwendet.

Die verwendeten Schleimhautüberstände wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Thomas Frieling (Helios Klinikum Krefeld) zur Verfügung gestellt.

Ich bedanke mich bei allen Beteiligten sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit.

Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
AH	Afterhyperpolarisation
AM	Acetoxymethyl
AP	Aktionspotential
[Ca ²⁺] _i	Intrazellulärer Calcium Anstieg
CCD	<i>Charge Coupled Device</i> (= Ladungsträger gekoppelte Schaltung)
di-8-ANEPPS	((1-(3-sulfanato-propyl-4-[β-[2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium betaine
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i> (= Spinalganglien)
ENS	Enterisches Nervensystem
EPSP	Exzitatorisches PostSynaptisches Potential
F	Fluoreszenzstärke
GP	<i>Guniea Pig</i> (= Meerschweinchen)
HC	<i>Healthy Control</i> (=Gesunde Kontrollperson)
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HS	<i>Horse Serum</i> (= Pferde Serum)
LR	<i>Leakage Resistant</i> (= resistent gegen Leckströme)
M	mol/l
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MP	Myenterischer Plexus
MSORT	<i>Multi-site optical recording</i>
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NI	Neuroindex
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PAR AP	Protease-aktivierten Rezeptor aktivierendes Peptid
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PGP	Protein Gen Produkt
RDS	Reizdarmsyndrom
RDS-D	Diarrhoe prädominantes Reizdarmsyndrom
RDS-M	Reizdarmsyndrom vom Mischtyp
RDS-O	Obstipation prädominantes Reizdarmsyndrom
RLI	Resting Light Intensity (= Lichtintensität in Ruhe)
S	Synaptisch
SMP	Submuköser Plexus
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRPV	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>
UC	Colitis Ulcerosa
VSD	<i>Voltage sensitive dye</i> (= Spannungssensitiver Farbstoff)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VI
Summary	VIII
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1. Gewebegewinnung und Präparation	9
2.1.1. Humandarmbiopsien	9
2.1.2. Humandarmresektate	14
2.1.3. Meerschweinchengewebe	14
2.1.4. Meerschweinchen-Gewebekultur	15
2.2. Neuroimaging	16
2.2.1. Funktionsprinzip und Bestandteile der Neuroimaging Technik	16
2.2.2. Protokolle zum Färben der Präparate	23
2.2.3. Neuroimaging Versuchsprotokolle	25
2.3. Immunhistochemie	30
2.4. Datenanalyse und Statistik	32
3. Ergebnisse	38
3.1. Vorversuche zur Bearbeitung der Fragestellungen und Optimierung der Methoden ...	38
3.1.1. Vorversuche zur Ermittlung einer repräsentativen Möglichkeit der Auswertung von neuronaler Aktivität bei Calcium-imaging Versuchen	38
3.1.2. Vorversuche zur Etablierung der Neuroimaging Methode für Biopsien aus dem humanen <i>Colon sigmoideum</i>	39
3.1.3. Erste Versuche zur Rolle von TNF- α bezüglich der nervenaktivierenden Wirkung von RDS-Überständen	41
3.1.4. Die neuronale Aktivität durch Trypsin ist PAR1 vermittelt	44
3.1.5. Neutrophile Elastase deaktiviert PAR1 Rezeptoren	45
3.2. Untersuchungen zur Aktivität von Neuronen in Humandarmbiopsien	48
3.2.1. Mit Routinebiopsien kann submuköser Plexus gewonnen werden	48
3.2.2. Demographie der Studienteilnehmer	51

3.2.3. Die neuronale Aktivität in Ganglien von Reizdarmpatienten unterscheidet sich nach Applikation eines Mediator Cocktails.....	51
3.2.4. Langzeit Inkubation von Überständen von Reizdarmpatienten hat eine desensibilisierende Wirkung auf submuköse Ganglien des Meerschweinchens	58
3.2.5. Antworten nicht-neuronaler Zellen	61
3.3. Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Mediatoren	63
3.3.1 Untersuchungen zum Einfluss des Alters von Patienten auf neuronale Aktivität ...	64
3.3.2. Histamin und Serotonin zeigen keine verstärkende Wirkung	65
3.3.3. Tryptase hat eine potenzierende Wirkung auf Histamin und Serotonin	65
3.3.4. Der Effekt kann nicht mit dem PAR2 AP nachgeahmt werden	66
3.3.5. Die Zugabe von Trypsin zeigt keine Potenzierung	67
3.3.6. Die Aktivierung des PAR1 Rezeptors bewirkt keine Potenzierung.....	68
3.3.7. Der „biased“ Aktivator neutrophile Elastase zeigt eine verstärkende Wirkung.....	70
3.3.8. Spezifische PAR Antagonisten haben keinen Einfluss auf die Potenzierung	71
4. Diskussion.....	75
4.1. Die Rolle von TNF- α im Krankheitsbild Reizdarmsyndrom	76
4.2. Neuroimaging an humanen intestinalen Biopsien.....	77
4.3. Wechselwirkungen verschiedener Mediatoren	83
4.4. Verknüpfung der Ergebnisse und Ausblick.....	86
Literaturverzeichnis	88
Anhang.....	101
Tabellenverzeichnis.....	134
Abbildungsverzeichnis.....	135
Danksagung	138
Lebenslauf.....	139

Zusammenfassung

Viele Grundfunktionen des Darms, wie die Bewegung und der damit einhergehende Transport des Darminhalts sowie die Aufnahme oder Abgabe von Wasser und wichtigen Nährstoffen über die Darmwand, werden durch das enterische Nervensystem gesteuert und moduliert. Aufgrund dieser essentiellen Funktionen dieses Teils des autonomen Nervensystems werden Fehlfunktionen als Ursache für gastro-intestinale Erkrankungen verantwortlich gemacht. Als Grund für die funktionelle Darmerkrankung Reizdarmsyndrom beispielsweise wird eine unterschwellige Entzündung angenommen, die sich durch eine verstärkte Infiltration der Darmschleimhaut und tiefer liegender Schichten mit Immunzellen, beispielsweise Mastzellen und Lymphozyten, äußert. Diese Zellen schütten Mediatoren aus, die aktivierend auf enterische Neurone wirken und damit potentiell Einfluss auf Darmfunktionen haben können.

Um herauszufinden, ob und in welcher Weise enterische Neurone von Reizdarmpatienten eine veränderte Neurophysiologie aufweisen, wurde die Methode des Neuroimaging mittels spannungs- und Calcium sensitiver Farbstoffe für Gewebe aus Darmbiopsien etabliert. Mit diesem experimentellen Aufbau war es möglich, die neuronale Aktivität im submukösen Plexus von gesunden Kontrollpersonen und Reizdarmpatienten über einen Anstieg des intrazellulären freien Calciums zu vergleichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Neurone von Reizdarmpatienten auf allgemeine Stimuli nicht unterschiedlich im Vergleich zu gesunden Kontrollen reagieren. Die akute Druckapplikation von Nikotin, welches an nikotinerge Acetylcholin Rezeptoren der Neurone bindet, sowie die elektrische Stimulation über eine Elektrode, welche auf Nervenfasern aufgelegt wurde und kurze Stromimpulse abgab, zeigten keine Unterschiede zwischen Reizdarmpatienten und gesunden Kontrollen. Allerdings wiesen die Neurone von Reizdarmpatienten eine Desensibilisierung gegen einen RDS Mediator Cocktail auf, der die aktivierenden Eigenschaften von Überständen von Schleimhautbiopsien nachahmen sollte und mittels akuter Druckapplikation auf ein Ganglion appliziert wurde. Dieser Cocktail enthielt Histamin, Serotonin, Tryptase und TNF- α jeweils in geringen Konzentrationen, die vergleichbar waren mit Konzentrationen, die in Überständen von Reizdarmpatienten gemessen worden waren. Der Mediator Cocktail hatte eine signifikant stärkere Wirkung auf submuköse Ganglien von Kontrollpersonen im Vergleich zu Reizdarmpatienten. Dieser Effekt konnte durch die Inkubation von Präparationen des submukösen Plexus des Meerschweinchens mit Überständen von Schleimhautbiopsien von Reizdarmpatienten nachgeahmt werden. Es handelt sich dabei vermutlich um eine Desensibilisierung, die durch die dauerhafte Präsenz der Mediatoren zustande kommt.

Diese neue Erkenntnis über die Pathophysiologie des Reizdarmsyndroms kann dazu beitragen, die Ursachen der Erkrankung besser zu verstehen und darauf basierend neue Therapieansätze zu ermöglichen. Die Untersuchungen an Biopsien von Reizdarmpatienten stellen die ersten Experimente an derartigem erkranktem Gewebe dar und bilden damit die realen Umstände deutlich besser ab, als die bisherigen Untersuchungen an Kontrollgeweben, in Tiermodellen oder kultivierten Zellen.

Hauptsächlich verantwortlich für die Aktivierung von Neuronen durch Überstände von Schleimhautbiopsien von Reizdarmpatienten und damit bereits im Fokus für mögliche Therapieansätze sind die Mediatoren Histamin, Serotonin und Serin Proteasen. Da diese Substanzen in den Überständen jeweils nur in sehr geringen Konzentrationen gemessen werden konnten, sollte der Frage auf den Grund gegangen werden, ob die resultierende Aktivierung durch die Applikation des Überstands durch einen synergistischen Effekt zwischen den Mediatoren zu Stande kommt.

Es wurden daher alle Substanzen - neben Histamin und Serotonin wurden die Proteasen Tryptase, Trypsin und neutrophile Elastase, sowie spezifische Protease aktivierte Rezeptoren (PAR) aktivierende Peptide für den Typ 1 und 2 verwendet – einzeln und in Kombination auf ihre Aktivierung von submukösen Ganglien getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von Tryptase sowie von neutrophiler Elastase jeweils zu Histamin und Serotonin zu einer synergistischen Verstärkung der neuronalen Aktivierung führte. Trypsin hingegen hatte einen additiven Effekt auf die neuronale Aktivität. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, aktiviert Trypsin neben dem PAR2 auch den PAR1 Rezeptor auf humanen submukösen Ganglien, während neutrophile Elastase keine mit der verwendeten Neuroimaging Methode messbare Aktivierung erzeugen konnte. Durch die Verwendung der entsprechenden PAR aktivierenden Peptide sowie spezifischer Antagonisten konnte gezeigt werden, dass der synergistische Effekt nicht durch die klassische Aktivierung der PARs, die eine Erhöhung der intrazellulären Calcium Konzentration zur Folge hat, ausgelöst wird.

Diese Erkenntnisse über das Zusammenspiel verschiedener Mediatoren helfen zum einen zu verstehen, wieso Überstände von Schleimhautbiopsien von Reizdarmpatienten eine aktivierende Wirkung auf submuköse Ganglien haben, obwohl die Konzentration jeder einzelnen Substanz sehr gering ist. Zum anderen bringt es mehr Licht in die komplexen Zusammenhänge und Vorgänge, die das Darmnervensystem beeinflussen und bei Verschiebung einzelner Komponenten zu andauernden Problemen und Symptomen wie Verdauungsstörungen oder Bauchschmerzen führen können.

Summary

The enteric nervous system is regulating basic functions of the gut, like motility and therefore the transport of the gut content, as well as the secretion or absorption of water and the absorption of nutrients. Hence malfunctions of this part of the autonomic nervous system are often implied relevant mechanisms for diseases. For irritable bowel syndrome (IBS), for example, a low grade inflammation and the resulting infiltration of the lamina propria by mast cells and lymphocytes are believed to play an important role for symptom generation in this functional disease. Many cells in close proximity to enteric neurons are known to release mediators that modulate neuronal activity and consequently influence gut functions.

The neuroimaging method using voltage- and calcium-sensitive dyes was adapted to record activity of enteric neurons in colonic biopsies to investigate whether the neuronal behavior of submucous neurons of IBS patients showed altered neurophysiology when compared to healthy controls. The experimental setting of obtaining tissue samples during routine endoscopy enabled comparative measurements of neuronal activity in IBS patients and healthy controls (HC). The main finding of these experiments was that in contrast to the general assumption, enteric neurons of patients with IBS are not hypersensitive. The short term, pressure application of nicotine as an agonist for the nicotinic Acetylcholine receptors as well as electrical stimulation via an electrode placed on interganglionic fiber tracts did not lead to different neuronal activity. After the application of an IBS-mediator cocktail, however, a clear desensitization of the neuronal response was observed in biopsies from IBS patients in comparison to HC. This cocktail was designed to mimic the mediators contained in mucosal biopsy supernatants and therefore assumed to be an important part of the milieu present in close proximity to enteric neurons. It induced a significantly lower response in ganglia of IBS patients compared to HC. This effect could be reproduced by over-night incubation of submucous tissue preparations of guinea pig with mucosal biopsy supernatants of IBS and HC. The mechanism for this desensitization is assumed to be due to the permanent presence of the mediators, which causes receptor desensitization.

These new findings regarding altered neuronal responses to a mediator cocktail in IBS biopsies may improve treatment, as prevention of desensitization of receptors has so far never been a drug target. As the experiments were performed for the first time on diseased tissue from IBS patients, it resembles the pathological conditions more accurately than animal models or studies with cultured cells or control tissue only. The fact that no hypersensitivity of submucous neurons of IBS patients could be observed for any of the

stimuli might shed some light on the mechanisms underlying IBS. This may improve the understanding and interpretation of observations.

As main mediators responsible for nerve activation by mucosal biopsy supernatants, histamine, serotonin and serine proteases had been discovered and were already investigated as potential therapeutic targets. As only low, more or less sub threshold concentrations of these substances existed in the supernatants, the question arises whether there are synergistic interactions between these mediators.

To answer this question, the nerve activating ability of low concentrations of the relevant mediators histamine, serotonin, tryptase, trypsin and neutrophil elastase applied individually or in combination was investigated in human submucous neurons. In addition, the role of the protease activated receptor (PAR) 1 and 2 activating peptides was studied. The combination of histamine and serotonin together with tryptase or neutrophil elastase lead to a synergistically increased neuronal activation. Also trypsin increased in an additive manner the effects of combined histamine and serotonin application. Trypsin induced a response by itself which was mediated via PAR1 additionally to the already described PAR2 activation, while no intracellular calcium increase was evoked by neutrophil elastase. To further investigate the mechanism that caused the synergistic effect, the same experiments were performed with the human specific PAR1 and the PAR2 activating peptides as well as specific antagonists. It could be shown that the potentiation is not mediated via the classical way of PAR activation, as the PAR activating peptides did not potentiate the response to histamine and serotonin. Also the antagonists could not significantly reduce the potentiation induced by the mixture of histamine, serotonin and tryptase as well as histamine, serotonin and neutrophil elastase.

These findings suggest proteases potentiate effects of almost sub threshold concentrations of serotonin and histamine. This explains the strong nerve activation by mucosal biopsy supernatants from IBS patients. The results also emphasize that even small changes in concentrations or compositions of mediators in a cocktail may have dramatic effects on neuronal excitability and under pathological conditions may lead to symptoms.

1. Einleitung

Das enterische Nervensystem (ENS) besteht aus 10^7 bis 10^8 Nervenzellen (Furness und Costa 1980), die als Netzwerk bestehend aus zwei ganglionierten Plexus die Wände des Magen-Darm-Trakts auskleiden. Der *plexus myentericus* (MP) befindet sich zwischen der Längs- und der Zirkulärmuskulatur und zieht sich vom Ösophagus bis hin zum Rektum. Er wurde zuerst von Auerbach (1862) beschrieben. Bereits fünf Jahre zuvor hatte Meissner (1857) den *plexus submucosus* (SMP), welcher, eingebettet in Bindegewebe, zwischen der Mukosa und der Zirkulärmuskulatur des Dün- und Dickdarms zu finden ist, entdeckt. Dieser besteht im humanen Darm aus drei Netzwerken, die in Schichten von direkt unterhalb der Mukosa (innerer submuköser Plexus) bis direkt in der Nähe der Zirkulärmuskulatur (äußerer submuköser Plexus) liegen und sich unter anderem in der Größe der Ganglien unterscheiden (Wedel et al. 1999). Der *plexus submucosus* übernimmt vorwiegend die Kontrolle des Transports über die Mukosa oder Mikrozirkulation, ist aber auch an der Motilitätssteuerung der Zirkulärmuskulatur beteiligt (Schemann und Neunlist 2004).

Das ENS gehört neben dem Sympathikus und Parasympathikus zum autonomen Nervensystem. Es nimmt allerdings eine spezielle Stellung ein, da es weitestgehend unabhängig vom zentralen Nervensystem (ZNS) arbeitet und komplette Reflex Signalwege abbildet (Furness und Costa 1980). Ein Reflex, der den Darminhalt transportiert und ohne Kontrolle des zentralen Nervensystems abläuft, ist der peristaltische Reflex (Bayliss und Starling 1899). Dabei kontrahiert der Darm an oraler Stelle, wobei der anale Bereich relaxiert. Auf diese Weise können der Nahrungsbrei und schließlich der Bolus den gesamten Darmtrakt passieren. Bayliss und Starling (1899) konnten in ihren Untersuchungen nachweisen, dass diese Grundfunktion auch erhalten bleibt, wenn der Darm vom Rest des Körpers getrennt bzw. die Nerven, die zum Darm führen, paralytisch waren.

Seit diesen ersten Untersuchungen zum „Darmhirn“ (Wood 1981) oder auch „zweiten Gehirn“ (Gershon 1999) hat sich der Forschungszweig der Neurogastroenterologie etabliert und neue Erkenntnisse über die Arten und Funktionen der enterischen Neurone geliefert. Diese lassen sich aufgrund ihrer Funktion in motorische, sensorische, interneurone und intestinofugale Neurone, aufgrund ihrer Morphologie in Dogiel Typ I, II und III und ihrer Elektrophysiologie in AH und S Neurone einteilen sowie aufgrund ihrer neurochemischen Ausstattung charakterisieren (Furness 2000; Costa et al. 1996; Dogiel 1895; Schneider et al. 2001).

Als zentraler Neurotransmitter ist Acetylcholin (ACh) aufzuführen. Etwa 88% der neuronalen Zellkörper in humanen submukösen Ganglien sind positiv für den Antikörper gegen

Anticholin Acetyl Transferase (ChAT) (Schneider et al. 2001). Acetylcholin stellt in der Signaltransduktion, die im ENS genauso wie im ZNS über synaptische Übertragung verläuft, den bedeutendsten Neurotransmitter für die Erzeugung von schnellen (englisch: fast) **Erregenden PostSynaptischen Potentialen** (fEPSP) dar. Neurone werden über nicotinerge Acetylcholin Rezeptoren (nAChR) und Muskeln über muskarinerge AChR erregt (Galligan et al. 2000).

Neben der Kommunikation von Neuronen untereinander erfolgt auch eine Signalübertragung von extrinsischen Fasern sowie Immunzellen an enterische Neurone. Dieser Umstand spielt vor allem bei der Pathophysiologie verschiedener funktioneller und entzündlicher Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts eine zentrale Rolle (Wood 2004, 2007).

Das Reizdarmsyndrom (RDS) als funktionelle Erkrankung des Magen-Darm-Trakts wird mit einer gestörten Kommunikation zwischen Immunzellen, Zellen der Epithelschicht und Neuronen in Zusammenhang gebracht (Barbara et al. 2011; Gershon 2005). Etwa 10 – 20% der Bevölkerung aller Altersstufen weltweit leidet an dieser Erkrankung, die sich mit abdominalen Schmerzen, Blähungen und Stuhlunregelmäßigkeiten präsentiert (Longstreth et al. 2006). Häufig wird das Reizdarmsyndrom nicht oder erst sehr spät diagnostiziert, was teilweise daran liegt, dass Ärzte die Symptome nicht erkennen oder der Tatsache, dass die betroffenen Personen keinen Arzt aufsuchen (Olafsdottir 2012). Vor allem bei der Gruppe der unter 50 jährigen sind Frauen deutlich häufiger betroffen als Männer (Layer et al. 2011), die Verteilung schwankt allerdings in Abhängigkeit der untersuchten Kohorte von 2:1 bis 1:1 (Saito et al. 2002). Die Diagnose „Reizdarmsyndrom“ erfolgt nach Ausschluss aller anderen organischen Ursachen, die die Symptome der Patienten erklären könnten. Hierzu zählen Karzinome, Fruktose Malabsorption, Laktoseintoleranz oder Zöliakie (Bergmann 1999; Layer et al. 2011). Basierend darauf, ob Durchfall oder Obstipation vorherrschen oder beide Zustände im Wechsel auftreten, werden RDS Patienten den ROME III Kriterien folgend in RDS-D, RDS-O und RDS-M eingeteilt (Drossman 2006) (siehe auch Anhang Abbildung 36). Die Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und die Deutsche Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität (DGNM) haben gemeinsam eine deutsche Konsensus Leitlinie erarbeitet, in der neben den oben genannten Untergruppen auch der Subtyp „Blähungs-dominant“ definiert wird, bei dem keine Veränderung der Stuhlkonsistenz vorliegen muss (Layer et al. 2011).

Obwohl das Reizdarmsyndrom seit Jahrzehnten Gegenstand zahlreicher Studien war, bleibt unklar, worin die Ursache dieser Erkrankung liegt. Es gibt unterschiedliche Vermutungen, was potenzielle Biomarker sein könnten. Diese reichen von genetischer Prädisposition (Kapeller et al. 2008; Barkhordari et al. 2010) über veränderte Zusammensetzung der Mikrobiota bis hin zu einer geringfügigen Entzündung und damit einhergehender erhöhter

Anzahl an Immun-Mediatoren und Immunzellen (vergleiche Corsetti et al. 2014). Besonders die Beteiligung des Immunsystems an der Entstehung und Symptomatik des RDS wird durch zahlreiche Hinweise gestützt. So konnte beispielsweise von einzelnen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass sich im submukösen Plexus von Patienten mit RDS signifikant mehr Mastzellen in direkter Umgebung von enterischen Neuronen befinden als bei gesunden Kontrollen (Barbara et al. 2004; Balestra et al. 2012). Dieser Umstand ist besonders interessant, da Mastzellen neben verschiedenen Zytokinen unter anderem Histamin und Tryptase ausschütten. Diese Mediatoren binden an Rezeptoren auf enterischen Neuronen und aktivieren diese (Breunig et al. 2007; Mueller et al. 2011). Dieser vermeintlich direkte Einfluss von Mastzellen auf enterische Neurone wurde außerdem dadurch gestützt, dass der Überstand von aktivierten Mastzellen bei kurzzeitiger Applikation auf enterische Neurone von Mensch und Meerschweinchen aktivierend wirkt (Schemann et al. 2005). Ein weiteres Indiz für die Beteiligung des Immunsystems an der Pathophysiologie des RDS sind die erhöhten Werte an Zytokinen und anderen Immun-Mediatoren, die bei manchen Studien an RDS Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden und beschrieben wurden (Hughes et al. 2013b).

Weitere Hinweise zu Unterschieden zwischen dem Milieu im Darm von Patienten mit RDS im Vergleich zu gesunden Kontrollen lieferten Untersuchungen an Überständen von Schleimhautbiopsien beziehungsweise der *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC). Überstände, die die löslichen Mediatoren enthalten, wurden auf enterische Neurone des submukösen wie myenterischen Plexus sowie sensorische Spinalganglien (englisch: dorsal root ganglia, DRG) von Modelltieren und menschliche Gewebeproben appliziert. Dabei konnte reproduzierbar festgestellt werden, dass die Überstände von RDS Patienten eine deutlich stärkere nervenaktivierende Wirkung haben als die von gesunden Kontrollen. Dies traf in manchen Studien für alle RDS Untergruppen gleichermaßen zu (Buhner et al. 2009; Buhner et al. 2012, Buhner et al. 2014), während sich in anderen der aktivierende Effekt auf Überstände von RDS-D Patienten beschränkte (Hughes et al. 2013a). Maßgeblich verantwortlich für die aktivierende Wirkung waren die Mastzell-Mediatoren Histamin und Tryptase sowie Serotonin (Buhner et al. 2012), welches hauptsächlich aus enteroendokrinen Zellen in der Epithelschicht der Mukosa produziert und ausgeschüttet wird, und Tumor Nekrose Faktor (TNF-) α (Hughes et al. 2013a), ein Zytokin, das beispielsweise von Makrophagen ausgeschüttet wird. Die Konzentration von Serotonin bei RDS Patienten ist nicht erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Coates et al. 2004), es gibt dennoch Hinweise für eine Beteiligung an der Ausprägung der Symptome von RDS Patienten (Crowell 2004). Genauso wie Histamin und Proteasen, gibt es auch für Serotonin Rezeptoren auf enterischen Neuronen, die bei Aktivierung eine Erregung der Nervenzelle auslösen (Michel

et al. 2005). Eine derartige aktivierende Wirkung ist auch für TNF- α bekannt (O'Malley et al. 2011).

Besondere Beachtung verdienen Proteasen in dieser Betrachtung. Serin Proteasen kommen zahlreich im Darm vor und haben dort unterschiedliche Aufgaben. Während Mastzell Tryptase und neutrophile Elastase in Immunzellen gebildet und von diesen aus Vesikeln ausgeschüttet werden, dienen Pankreas Elastase und Trypsin, welche in der Bauchspeicheldrüse gebildet werden, der Verdauung und Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen. Trypsin wird dabei normalerweise nach Passage des Dünndarms deaktiviert, wohingegen aktive Elastase auch im Stuhl festgestellt werden kann (Löser et al. 1996). Teilweise wurden sie in erhöhter Konzentration oder mit erhöhter Aktivität (Tooth et al. 2014; Gecse et al. 2008) in RDS Patienten der Subgruppe Diarrhoe-prädominant gefunden. Außerdem aktivieren Serin Proteasen so genannte PARs (Protease aktivierte Rezeptoren), die neben Immunzellen, Blutzellen und Endothelzellen auch auf enterischen Neuronen exprimiert sind und zahlreich im Gastrointestinal Trakt vorkommen (Vergnolle 2005). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die durch das Abschneiden einer definierten Aminosäuresequenz und damit der Freilegung eines so genannten „*tethered ligand*“, welcher wiederum an den Rezeptor bindet, aktiviert werden (Déry et al. 1998; Hollenberg und Compton 2002). Es wurden vier unterschiedliche Varianten des Rezeptors beschrieben: PAR1, PAR2, PAR3 und PAR4 (Vu et al. 1991; Nystedt et al. 1995; Ishihara et al. 1997; Xu et al. 1998). Durch Identifikation der bindenden Aminosäuresequenz jedes Liganden konnten spezifische Aktivierende Peptide (PAR AP) für jeden Rezeptor synthetisiert werden (Vergnolle et al. 2001). Diese bestehen aus einer definierten Reihe von Aminosäuren, die genau diejenige des Liganden darstellt, der normalerweise freigelegt wird und anschließend an der entsprechenden Bindungsstelle des Rezeptors bindet. Die Peptidsequenzen sind jeweils leicht unterschiedlich für diverse Spezies, so ist beispielsweise die Sequenz für das humane PAR1 AP **TFLLR-NH2** während das nagetierspezifische aus den Aminosäuren **SFLLR-NH2** (jeder Buchstabe vor dem Bindestrich entspricht einer Aminosäure analog zum allgemein gültigen Ein-Buchstabe Code für Aminosäuren) besteht. Durch diese PAR AP ist es möglich, den Rezeptor auch ohne proteolytische Wirkung zu aktivieren, indem das AP direkt an die entsprechende Stelle des Rezeptors bindet, während der Ligand intakt bleibt (Hollenberg et al. 1997). Da eine Protease meist mehrere Rezeptortypen aktivieren kann (Vergnolle 2000; Vergnolle et al. 2001), ermöglichen diese APs die spezifische Untersuchung der einzelnen PARs. Die Präsenz und Aktivierbarkeit von PAR1, PAR2 und PAR4 auf enterischen Neuronen wurde gezeigt, wobei PAR1 die größte Bedeutung im humanen submukösen Plexus in Bezug auf neuronale Aktivierung zukommt (Mueller et al. 2011).

Neben der klassischen Aktivierung der PAR Rezeptoren, die zu Calcium Einstrom und neuronaler Erregung führt, gibt es noch eine weitere Art, die so genannte „*biased*“ Aktivierung (vergleiche Zhao et al. 2014). Dabei wird die Aktivierungssequenz nicht an der Stelle geschnitten, die den Liganden freisetzt, sondern an einer davon unterschiedlichen Stelle. Dadurch wird die klassische Aktivierung unterbunden, da die Ligandensequenz nicht mehr freigelegt werden kann und der Rezeptor damit „entwaffnet“ (englisch: *disarmed*) ist (Dulon et al. 2005). Stattdessen werden durch die „*biased*“ Aktivierung intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt, wie Aktivierung der MAP Kinase (englisch: *mitogen activated protein Kinase*). Dieser nicht-klassische Aktivierungsweg kann unter anderem durch neutrophile Elastase ausgelöst werden und wurde für PAR1 (Mihara et al. 2013) und PAR2 (Ramachandran et al. 2011) beschrieben.

Zumindest in Tiermodellen spielt der PAR2 Rezeptor durch seine Beteiligung an Entzündungsreaktionen und nervaler Hypersensitivität eine besondere Rolle bei Erkrankungen wie RDS (Kayssi et al 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des PAR2 Rezeptors mittels Trypsin oder Tryptase zu einer Sensibilisierung von TRPV1 (englisch: *transient receptor potential vanilloid*) und TRPV4 Kanälen in DRG Neuronen der Ratte und einer damit verbundenen Hyperalgesie führt (Amadesi 2004; Grant et al. 2007). In Schleimhautbiopsien von RDS Patienten konnte eine erhöhte Konzentration von TRPV4 Agonisten festgestellt werden, welche wiederum in DRG Neuronen der Maus zu Überempfindlichkeitsreaktionen führten (Cenac et al. 2015). In Stuhlproben von RDS-D Patienten wurde eine ähnlich hohe Protease Aktivität festgestellt wie in Patienten mit Colitis ulcerosa (englisch: *ulcerative colitis*, UC). Während der Mediator Cocktail, der aus Stuhlproben von RDS-D Patienten gewonnen wurde, Hypersensitivität bei Mäusen auslöste, hatte der Überstand der UC Patienten eine gegenläufige Wirkung und führte zu Hyposensitivität. Der Effekt des UC Überstands wird auf die Aktivierung von PAR4 Rezeptoren durch Cathepsin-G zurückgeführt, wohingegen an der nozizeptiven Wirkung des RDS-D Überstands wiederum die Aktivierung von PAR2 beteiligt ist. (Annaházi et al. 2009) Ob der PAR2 Rezeptor auch im enterischen Nervensystem eine Rolle bei Erkrankungen spielt, ist bislang unklar. Zumindest für die neuronale Aktivierung im humanen submukösen Plexus nimmt er eine untergeordnete Rolle ein (Mueller et al. 2011).

Neben *in vivo* Versuchen an Mäusen und Ratten als Modelltiere, stammen viele Erkenntnisse der Neurogastroenterologie aus *in vitro* Versuchen an intakten Geweben von Menschen, Tieren oder kultivierten Zellen. Das klassische Modelltier in der Neurogastroenterologie ist das Meerschweinchen (Furness und Costa 1980). Trotz all der Ähnlichkeiten zwischen dem ENS des Meerschweinchens und des Menschen, gibt es dennoch Unterschiede, die nicht zu vernachlässigen sind, wie beispielsweise die Aktivierung

durch PARs (Mueller et al. 2011). Elektrophysiologische Untersuchungen an humanen Geweben sind aufgrund ihrer direkten Anwendbarkeit daher zu bevorzugen. Aus ethischen Gründen ist es nicht möglich Ganzwandpräparate von RDS Patienten zu erhalten. Allerdings scheinen selbst in Routinebiopsien ausreichend enterische Ganglien vorhanden zu sein (Lebouvier et al. 2009). Immunhistochemische Färbungen an Biopsien von Parkinson Patienten wurden für die Untersuchung pathologischer Veränderungen im ENS eingesetzt (Pouclet et al. 2012; Lebouvier et al. 2010). Auch für Untersuchungen des RDS wurden häufig Biopsien eingesetzt, um beispielsweise Überstände zu gewinnen oder Expressionsmuster für Mediatoren oder Rezeptoren, bzw. die Dichte nicht-neuronaler Zellen zu vergleichen (Nasser et al. 2014). Gleichzeitig mit dieser Arbeit adaptierte Cirillo et al. (2013) die ursprünglich von Lebouvier et al. (2009) beschriebene Methode, um mit Hilfe eines Calcium sensitiven Farbstoffes die Aktivität enterischer Nervenzellen in Biopsien von Patienten mit funktioneller Dyspepsie zu registrieren (Cirillo et al. 2015).

Es gibt verschiedene Methoden, um Nervenaktivität abzuleiten. Die Neuroimaging Technik mittels fluoreszierender Farbstoffe macht es möglich, das Zusammenspiel einzelner Neurone und Zellen in Kultur oder in Ganglien in intaktem Gewebe in räumlich und zeitlich adäquater Auflösung zu untersuchen (Schemann et al. 2002). Die Verwendung des spannungssensitiven Farbstoffs di-8-ANEPPS und Aufnahmen mit einer Bildrate von bis zu 2kHz ermöglichen die Detektion einer Veränderung des Membranpotenzials im Millisekunden Bereich und damit die Abbildung von einzelnen Aktionspotenzialen und fEPSPs (Neunlist et al. 1999). Eine andere Möglichkeit, Nervenaktivität zu messen, besteht darin, den intrazellulären Calcium Anstieg ($[Ca^{2+}]_i$) zu beobachten, der als Antwort auf erregende Stimuli erfolgt. Zum einen strömt Calcium durch spannungsabhängige Calcium Kanäle ein, zum anderen wird Calcium aus intrazellulären Reservoirs ins Zytosol entlassen. Dieser Anstieg an freiem intrazellulärem Calcium als Indikator für Nervenaktivität kann mit Hilfe von Calcium sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen, wie beispielsweise Fluo-4 AM, sichtbar gemacht werden. Es handelt sich dabei um Calcium Chelatoren, die Photonen emittieren, sobald sie Calcium gebunden haben. Während di-8-ANEPPS sich in der neuronalen Zellmembran einlagert und dort nach Veränderung des Membranpotenzials seine Fluoreszenzeigenschaften verändert, so dass sich die Emissionskurve in den Bereich blauen Lichts verschiebt und dadurch aufgrund der gewählten Filterkonfiguration an Intensität abnimmt, müssen Fluo-4 AM und alle anderen Calcium Indikatoren ins Innere der Zelle gelangen. Dies wird durch die Veresterung mit dem Acetoxy-methyl Ester (AM Ester) ermöglicht, der die Ladung des Moleküls neutralisiert und es dadurch für die Zellmembran passierbar macht. Innerhalb der Zelle wird der Ester von unspezifischen Esterasen entfernt und der Farbstoff somit gefangen (Ikegaya et al. 2005). Die Verwendung von Calcium sensitiven Farbstoffen ermöglicht es außerdem, auch Calcium Veränderungen in anderen

intra- und extraganglionären Zellen, wie beispielsweise Glia und Immunzellen zu untersuchen.

Der aktuelle Wissensstand zur Pathophysiologie des Reizdarmsyndroms und zur Rolle des ENS in dieser Erkrankung beschränkt sich auf Erkenntnisse aus Experimenten an Tiermodellen, kultivierten Zellen und humanen Kontrollgeweben. In derartigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Überstände von Schleimhautbiopsien von RDS Patienten und Mediatoren aus PBMC Überständen von RDS-D Patienten nach akuter Applikation auf enterische und DRG Neurone reproduzierbar aktivierend wirkten. (Buhner et al. 2009; Buhner et al. 2014; Buhner et al. 2012; Hughes et al. 2013a; Valdez-Morales et al. 2013). Auch eine Erhöhung der neuronalen Aktivität nach Inkubation mit einem Überstand von RDS-D Patienten konnte beobachtet werden (Valdez-Morales et al. 2013). Daraus leitet sich die Hypothese ab, die in der vorliegenden Arbeit an intakten Gewebeproben von RDS Patienten und gesunden Kontrollen überprüft werden sollte:

Submuköse Ganglien im Colon von Patienten mit RDS sind übererregt und leichter aktivierbar im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Dazu sollte die Technik des Neuroimaging mittel Calcium und spannungssensitiver Farbstoffe an humanen Biopsien aus dem *Colon sigmoideum* etabliert und anschließend eine Studie mit RDS Patienten und Kontrollen durchgeführt werden. Im Rahmen der Studie sollten die submukösen Ganglien, die sich in den Gewebeproben aus Biopsien befanden, mit allgemeinen Stimuli (akute Druckapplikation von Nikotin und elektrische Stimulation an einem Faserstrang) und einem „RDS-spezifischen“ Mediator Cocktail, welcher analog zu den Studien mit Schleimhautüberständen (Buhner et al. 2009) mittels akuter Druckapplikation auf die Ganglien appliziert werden sollte, stimuliert werden. Die daraus resultierende neuronale Aktivität sollte anschließend verglichen werden. Des Weiteren sollte die These an konditioniertem Meerschweinchen-Gewebe überprüft werden.

Die Tatsache, dass die einzelnen Mediatoren in Überständen von Schleimhautbiopsien in sehr geringer Konzentration vorliegen (Buhner et al. 2009), aber dennoch zuverlässig Neurone aktivieren können, führte zu einer zweiten Hypothese, die an humanen Darmresektaten überprüft werden sollte:

Es besteht ein synergistischer Effekt zwischen Histamin, Serotonin und Serin Proteasen bei den geringen Konzentrationen, wie sie in Überständen von Schleimhautbiopsien von RDS Patienten gefunden werden.

Eine potenzierende Wirkung von Histamin, Serotonin und Proteasen auf TRPV1 und TRPV4 Kanäle ist bereits bekannt (Cenac et al. 2010; Amadesi 2004; Zhao et al. 2015). Welchen

Effekt die Substanzen aber auf ihre Aktivität gegenseitig haben oder ob sich der potenzierende Effekt noch verstärkt, ist bislang unklar.

Zusätzlich sollte getestet werden, welchen Einfluss TNF- α und der TNF- α bindende Antikörper Adalimumab (enthalten in dem für die Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen zugelassenen Medikament Humira®) auf die neuronale Aktivität haben.

2. Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Substanzen und Lösungen bei Sigma-Aldrich (*Steinheim, Deutschland*) gekauft.

2.1. Gewebegewinnung und Präparation

2.1.1. Humandarmbiopsien

Es wurden Routinebiopsien aus dem Sigma von Patienten mit diagnostiziertem Reizdarmsyndrom und aus der gleichen Region von gesunden Kontrollen entnommen. Eine Koloskopie wird von Ärzten genutzt, um andere Ursachen für die Beschwerden des Patienten auszuschließen und damit die Diagnose Reizdarmsyndrom zu sichern (Layer et al. 2011). Daher konnten bei Patienten mit RDS im Rahmen ihrer ohnehin notwendigen Untersuchung Biopsien entnommen und die Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Als gesunde Kontrollen kamen mehrere Gruppen in Frage. A) Menschen ab 55 Jahren, die zur routinemäßigen Darmkrebskontrolle vorstellig wurden. B) Menschen mit einer Prädisposition für Kolonkarzinom in der Familie, die zum routinemäßigen Screening einen Gastroenterologen aufsuchten. C) Personen mit Hämorrhoidalblutung und positivem Hämoccult, die zur Abklärung der Symptome eine endoskopische Untersuchung erhielten. D) Freiwillige, die mittels Ausschreibung für die Teilnahme an der Studie rekrutiert wurden.

Es wurden ausschließlich Personen als gesunde Kontrollen in die Studie eingeschlossen, die beschwerdefrei waren.

Die Diagnose Reizdarmsyndrom wurde von einem Arzt nach den ROME III Kriterien (Drossman 2006) sowie den deutschen S3-Leitlinien Reizdarmsyndrom (Layer et al. 2011) gestellt. Den ROME III Kriterien folgend müssen die Patienten in den drei vorangegangenen Monaten an mindestens 3 Tagen pro Monat abdominelle Schmerzen oder Unwohlsein erfahren haben. Zusätzlich müssen mindestens zwei der folgenden Punkte zutreffen: 1) Es tritt eine Verbesserung der Schmerzen nach Defäkation ein. 2) Der Beginn der Beschwerden geht mit einer Veränderung der Häufigkeit des Stuhlgangs einher. 3) Der Beginn der Beschwerden geht mit einer Veränderung der Konsistenz des Stuhlgangs einher. Zusätzlich können die Patienten anhand der vorherrschenden Stuhlkonsistenz in den letzten drei Monaten in die Untergruppen Diarrhö prädominant (RDS-D; weicher Stuhl mindestens 25% der Zeit und nie harter Stuhl), Obstipation prädominant (RDS-O; harter Stuhl mindestens 25% und nie weicher Stuhl) oder Mischtyp (RDS-M; harter und weicher Stuhl jeweils mindestens 25% der Zeit) für den Fall, dass ein rascher Wechsel zwischen Diarrhö und Obstipation auftritt (vgl. Abbildung 36), eingeteilt werden. Für die Studie zum Unterschied

zwischen der neuronalen Aktivität zwischen RDS-Patienten und gesunden Kontrollen konnten insgesamt 35 Patienten mit RDS (48 ± 13 Jahre; 26 weiblich und 9 männlich) eingeschlossen werden, von denen 16 in die ROME III Untergruppe RDS-D (46 ± 14 Jahre; 11 weiblich und 5 männlich), 8 RDS-O (51 ± 14 Jahre; 6 weiblich und 2 männlich) und 5 RDS-M (47 ± 7 Jahre; 4 weiblich und 1 männlich) zählten. Sechs Patienten wurden nach den deutschen Leitlinien in die Untergruppe RDS-Blähtyp eingeteilt (50 ± 11 Jahre; 5 weiblich und 1 männlich). Als gesunde Kontrollen konnten 17 Teilnehmer eingeschlossen werden (58 ± 11 Jahre; 7 weiblich und 10 männlich). Eine Liste aller Studienteilnehmer findet sich im Anhang (Tabelle 4 und Tabelle 5). Hier sind außerdem nähere Informationen zur Medikation aufgeführt, die einzelne Teilnehmer aus der RDS Gruppe zum Zeitpunkt der Probenentnahme verwendet hatten. Alle einbezogenen Reizdarmpatienten klagten über Beschwerden zum Zeitpunkt der Untersuchung.

Die Gewebeentnahme erfolgte jeweils auf die gleiche Weise. Die endoskopischen Eingriffe fanden im Klinikum Freising, Klinikum Vilsbiburg, in der Privatpraxis Dr. med. Manfred Kurjak in München und – zu Beginn des Projekts – am Klinikum München Rechts der Isar statt. Im Rahmen einer routinemäßigen endoskopischen Untersuchung des Dickdarms (Koloskopie) wurden 2 bis 5 Biopsien mit einer Routinezange (155-929-02; *Pauldrach, Garbsen, Deutschland*) entnommen. Anschließend wurden die Biopsien direkt von der Endoskopiezange in ein bereitgestelltes steriles Glasgefäß mit Schraubverschluss überführt, welches mit 10ml 4°C kalter, steriler Hepes/Krebslösung (Zusammensetzung (in mM): 135 NaCl, 3 Hepes, 12,2 Glukose, 5,4 KCl, 1 MgCl₂·6H₂O, 1,25 CaCl₂·2H₂O, 1,2 NaH₂PO₄; pH=7,4; 293mosmol/l) gefüllt war. Unter ständiger Kühlung wurde das Gefäß im Zeitraum von 20 Minuten bis 2 Stunden zum Lehrstuhl für Humanbiologie transportiert. Dieses Protokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt (Fallnummer: 2595/09). Jeder Patient erhielt außerdem eine von der Kommission genehmigte Patienteninformation zur Aufklärung und musste seine Einwilligung schriftlich im Vorfeld erklären. Zusätzlich erhielt jeder Patient einen eindeutigen Code als anonymen Zugang zu einem Online-Fragebogen (www.bioclibs.de). In diesem Fragebogen wurden unter anderem die ROME III Kriterien in einer deutschen, validierten Übersetzung abgeprüft, um eine eindeutige und konforme Zuordnung zu ermöglichen (siehe Anhang Abbildung 37).

Zur weiteren Bearbeitung der Proben wurden die Biopsien mit einer Transferpipette (100-1000µl, *Transferpipette® S, Brand, Wertheim, Deutschland*) mit abgeschnittener Einweg-Pipettenspitze angesaugt und in eine mit eiskalter Präparationskrebslösung (Zusammensetzung in mM: 117 NaCl, 25 NaHCO₃, 11 Glukose, 4,7 KCl, 1,2 MgCl₂·6H₂O, 2,5 CaCl₂·2H₂O, 1,2 NaH₂PO₄; pH=7,4, 293mosmol/l) gefüllte und kontinuierlich perfundierte

Glaspetrischale mit Sylgardboden (*Sylgard®184; Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland*) überführt. Dort wurden die einzelnen Stücke mit gekürzten Minutiennadeln der Stärke 10 (0,1mm Durchmesser, *Bioform, Nürnberg, Deutschland*) flach aufgespannt, so dass die Mukosa nach unten und das submuköse Gewebe nach oben ausgerichtet waren (siehe Abbildung 1). Stücke, die kein submuköses Gewebe enthielten, wurden fachgerecht entsorgt. Biopsien, die submuköses Gewebe enthielten, wurden für die Versuche an einem inversen Mikroskop (IX 50, *Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland*) oder an einem aufrechten Mikroskop (*Zeiss Examiner D1, Zeiss, Oberkochen, Deutschland*) folgendermaßen weiterbearbeitet.

Für die Versuche am inversen Mikroskop wurde das submuköse Gewebe durch vorsichtiges Abziehen mit zwei feinen Pinzetten (#5, *Dumont, Schweiz*) von der Mukosa getrennt. Die Mukosa wurde entsorgt, während das submuköse Gewebe entweder auf einen speziell angefertigten Ring aus Sylgard®184 (im Folgenden nur als „Sylgard“ bezeichnet) (Durchmesser: 3cm) mit einer rechteckigen Öffnung in drei verschiedenen Variationen (Variante 1: Länge: 3cm, Höhe: 1cm; Variante 2: Länge: 1,6cm, Höhe: 0,7cm und eine speziell angefertigte Variante für Biopsien (Länge: 0,5cm, Höhe 0,2cm)) oder den mit Sylgard beschichteten optischen Boden einer kleinen Petrischale (Durchmesser: 3cm) gespannt wurde. Für das Aufspannen wurden wiederum auf 2-3mm Länge gekürzte Minutiennadeln der Stärke 10 verwendet.

Für die Versuche am aufrechten Mikroskop wurde die Biopsie ebenfalls mit gekürzten Minutiennadeln der Stärke 10 mit Mukosa auf ein Sylgard-Plättchen aufgespannt. Zur Herstellung dieser Plättchen wurde eine Plastikpetrischale, wie sie auch zum Präparieren von Meerschweinchengewebe verwendet wurde, mit der entsprechenden Menge Sylgard ausgegossen, so dass eine etwa 1cm hohe Schicht entstand und über Nacht bei Raumtemperatur zum Aushärten stehen gelassen. Sobald das Sylgard ausgehärtet war, konnte man mit einem Korkbohrer runde Plättchen mit einem Durchmesser von 1,5cm ausstechen. Diese Plättchen wurden in die für die Präparation vorgesehene Schale überführt und dort festgesteckt.



Abbildung 1: Biopsien mit und ohne Mukosa aufgespannt auf Versuchsplättchen. Links im Bild ist eine Probenentnahme (PE) mit Mukosa und aufliegendem submukösem Gewebe, rechts im Bild sind zwei PEs ohne Mukosa zu sehen. Alle Stücke sind auf ein Sylgard-Plättchen gespannt, welches anschließend in die Versuchskammer überführt werden konnte.

Die Biopsien wurden nun einzeln auf das Plättchen gelegt und zunächst mit der Mukosa nach unten moderat gespannt und auf dem Plättchen festgesteckt. Das submuköse Gewebe, welches weiterhin mit der Mukosa in Verbindung blieb, befand sich bei diesem Schritt als loses Häutchen auf der Mukosa. Die Pinne wurden in einem möglichst flachen Winkel zum Sylgardplättchen eingestochen, so dass die Spitzen das Plättchen nicht durchstachen und die Enden nicht nach oben abstanden (siehe Abbildung 1). Anschließend wurde das submuköse Gewebe möglichst flächig ausgebreitet und über die Mukosa gespannt. Das Gewebe wurde nach demselben Prinzip festgesteckt wie zuvor die Mukosa. Die Ausrichtung der beiden Schichten zueinander blieb unverändert (vergleiche Abbildung 2), so dass der submuköse Plexus als oberste Schicht auf der Mukosa auflag und damit für den Versuch zugänglich war.

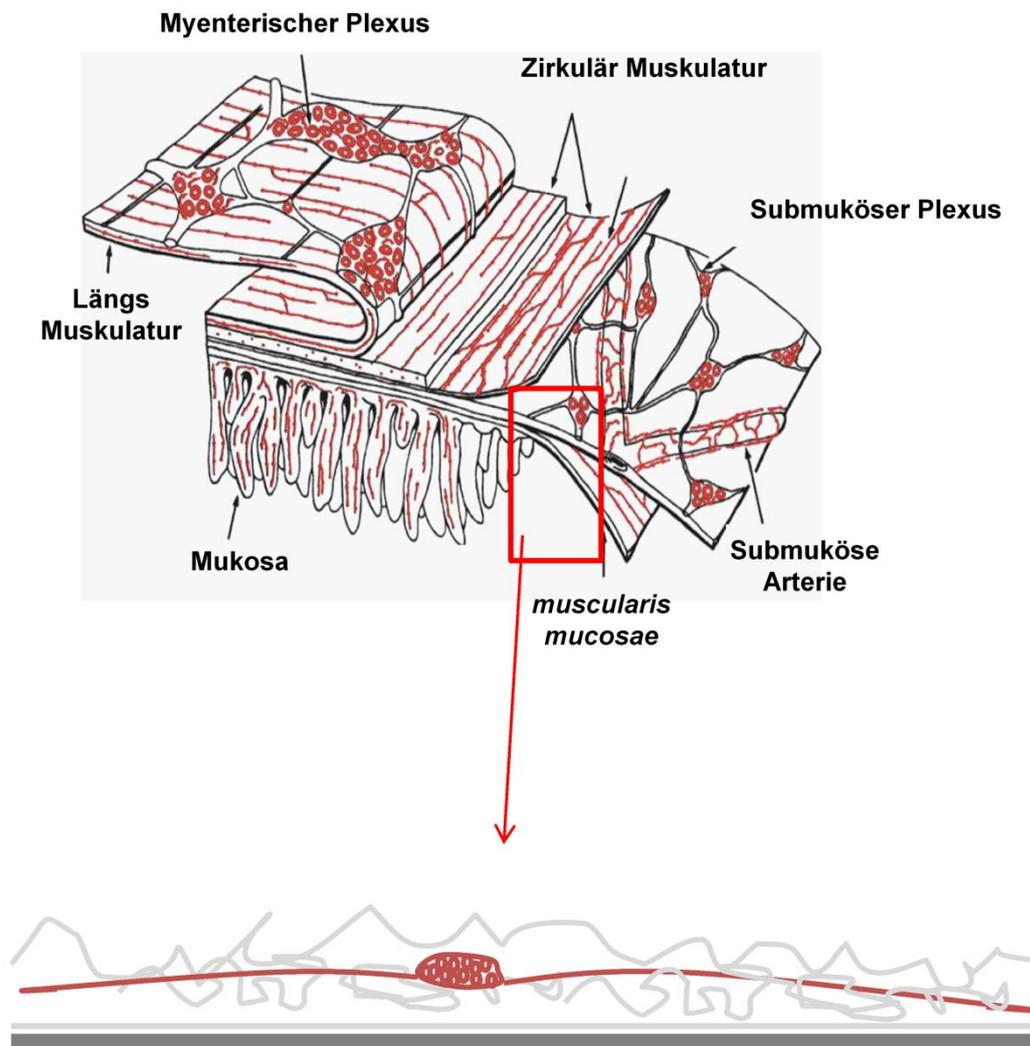


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schichten, die sich in einer Biopsie befinden können. Die Abbildung oben ist adaptiert von Furness und Costa (1980). Ein Schnitt durch Mukosa, *muscularis mucosae* und submukösen Plexus ist unterhalb noch einmal in der Seitenansicht schematisch dargestellt. Als unterste Schicht ist in dunkelgrau die Mukosa dargestellt. Ihr liegt die *muscularis mucosae* als sehr dünnes Häutchen auf (hellgrauer Strich). Mit der *muscularis* verwachsen sind Schichten aus Bindegewebe (hellgraue Linien Strukturen), in denen eingebettet sich die Ganglien (in rot, mit einer Nervenfasern nach links und rechts) des submukösen Plexus befinden. Für das Imaging musste die obere Schicht des Bindegewebes möglichst abgetragen werden, um bessere Sicht auf das Ganglion zu bekommen, aber ohne dieses dabei zu beschädigen.

In manchen Fällen war es nicht möglich, das submuköse Gewebe oberhalb der Mukosa zu spannen, da die Verbindung zwischen Mukosa und *muscularis mucosae* bereits getrennt war oder aufgrund einer zu geringen flächigen Ausdehnung des submukösen Gewebes. In diesen Fällen wurden submuköses Gewebe und Mukosa voneinander getrennt (falls dies nicht ohnehin bereits der Fall war) und dann direkt nebeneinander auf das Plättchen gespannt, um weiterhin die räumliche Nähe zu wahren und das mukosale Milieu für den submukösen Plexus aufrecht zu erhalten (siehe Abbildung 1). Sofern notwendig wurde

überschüssiges Bindegewebe, welches den Plexus bedeckte, mit Hilfe einer feinen Federschere (15000-10; *Fine Science Tools (FST), Heidelberg, Deutschland*) entfernt (Abbildung 2).

2.1.2 Humandarmresektate

Es wurden 55 Darmresektate des Dickdarms (36) und des Dünndarms (19) aus makroskopisch unauffälligen Regionen verwendet. Diese wurden im Rahmen von Operationen am Darm, bei denen aus medizinischen Gründen Stücke entfernt werden mussten, im Klinikum Freising und im Klinikum München Rechts der Isar der Technischen Universität München gewonnen. Die Diagnosen lauteten: Karzinom/Tumor (42), Divertikulose/Divertikulitis (6), Stenose (3), Hartmann Situation (1), Perforation Dünndarm (1), Rektozele (1), Ileum-stoma Rückverlagerung (1). Direkt im Anschluss an die Resektion wurden makroskopisch unauffällige Stücke in bereitgestellte sterile Glasflaschen überführt, die mit auf 4°C gekühlter, steriler Hepes/Krebslösung (siehe Biopsien) gefüllt waren. Der anschließende Transport erfolgte unter ständiger Kühlung im selben Zeitraum, wie für die Biopsien aufgeführt wurde. Das Vorgehen wurde durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt (1746/07). Von jedem Patient liegt eine schriftliche Zustimmung vor, die nach der Aufklärung und dem Erhalt einer Patienteninformation abgegeben wurde.

Nach der Ankunft am Lehrstuhl für Humanbiologie wurde das Resektat dreimal mit eiskühler, carbogengesättigter Präparationskrebslösung (siehe oben) gewaschen und anschließend präpariert. Durch das Entfernen des Muskels und Abziehen der Mukosa erhielt man Präparate des submukösen Plexus. Diese wurden auf die oben bereits beschriebenen Plättchen für das aufrechte Mikroskop gespannt, so dass der submuköse Plexus nach oben orientiert war. Mit Feinpinzetten und Feinscheren, wie oben beschrieben, wurde ausreichend Bindegewebe entfernt, um den inneren submukösen Plexus (Wedel et al. 1999) freizulegen.

2.1.3. Meerschweinchengewebe

Es wurden insgesamt 9 männliche Dunkin Hartley Meerschweinchen (*Harlan Winkelmann, Borcheln, Germany*) (GP) verwendet, die unter standardisierten Bedingungen in den Normen entsprechenden Käfigen gehalten wurden. Es befanden sich je zwei Tiere in einem Käfig, welcher in einem Klimaschrank (*Uni Protect; Ehret, Emmendingen, Deutschland*) stand. Vor den Experimenten befanden sich die Tiere für mindestens eine Woche am Lehrstuhl für Humanbiologie. Den Meerschweinchen standen Standardtrockenfutter (*Altromin, Lage, Deutschland*) und Trinkwasser ad libitum zur Verfügung. Es wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 14:10 Stunden bei 20°C-24°C und 60% relativer Luftfeuchtigkeit eingehalten. Die Tötung erfolgte durch Genickbruch mit anschließendem Durchtrennen der Halswirbel

und Kehle, um ein vollständiges Ausbluten zu ermöglichen. Um unnötigen Stress zu vermeiden, wurden die Meerschweinchen erst direkt vor der Tötung aus dem Käfig genommen. Die Haltung und Tötung der Tiere entsprach den ethischen Richtlinien für Tierversuche in Deutschland (nach §11 Deutsches Tierschutzgesetz).

Der Dickdarm wurde entnommen und ein etwa zwei Zentimeter langes Stück des distalen Colons wurde in eine mit eiskalter Präparationskrebslösung gefüllte und ständig perfundierte Plastikpetrischale (633161; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit Sylgardboden überführt. Um den submukösen Plexus für die Neuroimaging Versuche vorzubereiten, wurde das Stück Darm entlang des Mesenterialansatzes mit einer Schere geöffnet und mit Mukosa nach oben straff gespannt. Nachdem die Mukosa entfernt worden war, wurde das Stück umgedreht und mit nach oben orientierter Serosa festgesteckt. Anschließend wurde der gesamte Muskel vorsichtig mit einer Fein-Schere abpräpariert, so dass der submuköse Plexus freigelegt wurde.

Im Anschluss wurde ein Stück auf identische Art und Weise wie unter Punkt 2.1.2. beschrieben auf das Sylgard-Plättchen gespannt.

2.1.4. Meerschweinchen-Gewebekultur

Präparate für Gewebekultur-Versuche wurden in der oben beschriebenen Art und Weise gewonnen und präpariert. Es wurde ein maximal 5mm x 5mm großes, quadratisches Stück auf das Sylgard-Plättchen überführt und festgesteckt, wie oben beschrieben. Das Plättchen mit dem aufgespannten Präparat wurde an der Unterseite abgetrocknet und in eine kleine, sterile Plastikpetrischale überführt. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Anschließend wurde auch das Sylgard um das Gewebestück herum vorsichtig mit einem Stück Kosmetiktuch abgetrocknet, ohne das Gewebestück dabei zu berühren oder auszutrocknen. Sofort im Anschluss wurde eine kleine Inkubationskammer um das Gewebestück herum aufgesetzt. Bei dieser „Klebe-Kammer“ handelte es sich um eine quadratische Kammer, die eine 5mm x 5mm große Aussparung besaß (Abbildung 3). Die Oberseite dieser Kammer bestand aus Sylgard mit der Verdünnung 1:5 (festes Material) und die Unterseite aus Sylgard in der Verdünnung 1:60 (weiches, klebriges Material). Beides wurde in eine speziell gefertigte Form aus Kunststoff gefüllt, wobei das weiche Sylgard zuerst eingefüllt wurde. Es musste darauf geachtet werden, dass sich keine Blasen in der Masse befanden. Nachdem diese Schicht für 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet war, konnte die zweite, härtere Schicht darauf gegeben werden. Auch hier musste auf Blasenfreiheit geachtet und entstandene Blasen abgesaugt werden. Anschließend wurde der Behälter über Nacht bei 50°C zum Trocknen aufbewahrt. Die Kammer wurde so auf das Sylgard-Plättchen aufgesetzt, dass sich das Gewebestückchen innerhalb der Öffnung der

Kammer befand. Durch ihre klebrige Unterseite konnte die Kammer mit leichtem Druck auf dem Plättchen festgeklebt werden und bildete somit eine undurchlässige Barriere. Dies wurde in Vorversuchen mit angefärbtem Wasser innerhalb der Kammer getestet (Daten werden nicht aufgeführt). Es zeigte sich, dass die Flüssigkeiten innerhalb und außerhalb der Kammer komplett voneinander getrennt sind.

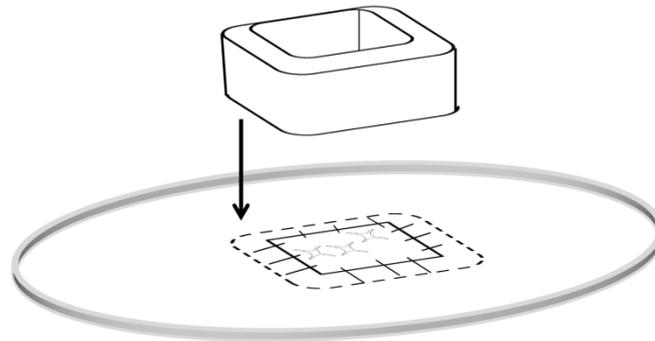


Abbildung 3: Aufsetzen der Inkubationskammer auf das Plättchen mit aufgespanntem Gewebe. Zu sehen ist die quadratische Kammer, welche senkrecht auf das Plättchen aufgesetzt wird, so dass ihre Wände das Gewebe umschließen (dargestellt mit gestrichelter Linie). Auf diese Weise befindet sich das aufgespannte Gewebe innerhalb der Kammer, die einen dichten Abschluss zum umgebenden Milieu bildet. Das ganze befindet sich auf einem Sylgard-Plättchen (grauer Ring).

Sobald die Kammer befestigt war, folgten drei Waschschriffe mit steriler, kalter Präparationskrebslösung mit 1% Antibiotic-Antimycotic (*Z-18 M; C-C-Pro, Oberdorla, Deutschland*). Die sterile Lösung wurde sowohl innerhalb als auch außerhalb der Kammer verteilt, für wenige Minuten in Ruhe belassen und anschließend verworfen. Nach dem letzten Waschschriff wurde die komplette Präparationskrebslösung abgesaugt und die Kammer anschließend mit 100µl Lösung gefüllt. Um die Kammer herum wurden 3ml Präparationskrebslösung verteilt, um das verdampfen der Flüssigkeit innerhalb der Inkubationskammer durch eine mit Feuchtigkeit gesättigte Atmosphäre zu verhindern. In Vorversuchen mit Krebslösung zeigte sich, dass das Volumen ausreichend ist, um das Gewebe über Nacht mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen, sowie den pH stabil zu halten. Für die Versuchsdurchführung wurde die Kammer mit 100µl 1:10 verdünntem Überstand gefüllt. Verwendet wurden die Überstände IBS-D 11 (RDS, weiblich, Krefeld) und K07 (HC, weiblich, Krefeld). Die Gewebestücke wurden über Nacht bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

2.2. Neuroimaging

2.2.1. Funktionsprinzip und Bestandteile der Neuroimaging Technik

Die Technik des „Ultrafast Neuroimaging“, bei der mit einer Geschwindigkeit von bis zu 2kHz und einer optischen Auflösung von 80x80 Pixel aufgenommen werden kann, wurde bereits

im Detail beschrieben (Neunlist et al. 1999; Schemann et al. 2002). Dieses als „Multi-site optical recording“ (MSORT) bezeichnete Verfahren wurde dazu verwendet, um mit fluoreszierenden Farbstoffen Nervenaktivität zu messen.

Fluoreszierende Farbstoffe

Hierbei diente der Farbstoff di-8-ANEPPS ((1-(3-sulfonato-propyl-4-[β -[2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium betaine; *Life Technologies, Darmstadt, Deutschland*) als spannungssensitiver Farbstoff (englisch: *voltage sensitive dye*, VSD) dazu, direkt Membranpotentialänderungen der Neurone zu detektieren. Dieser Farbstoff lagert sich in die Zellmembran ein und ändert seine Fluoreszenz in Abhängigkeit vom Membranpotential (siehe Abbildung 4 A). Aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung der verwendeten Kamera konnten mit dieser Methode Aktionspotentiale gemessen werden. Aufgrund der Tatsache, dass nur von erregbaren Zellen, also Zellen die über ein Membranpotential verfügen, abgeleitet werden kann, führt dazu, dass Glia-Zellen, die sich in direkter Umgebung der Neurone im Ganglion befinden sowie Immunzellen, beispielsweise Mastzellen und Makrophagen, die sich außerhalb der Ganglienhülle in direkter Nähe befinden können, von diesem Farbstoff unerkant bleiben. Nachteilig äußert sich, dass das Ausbleichen sowie die Bildung freier Radikale durch den Farbstoff nur extrem kurze Belichtungszeiten im einstelligen Sekundenbereich zulassen.

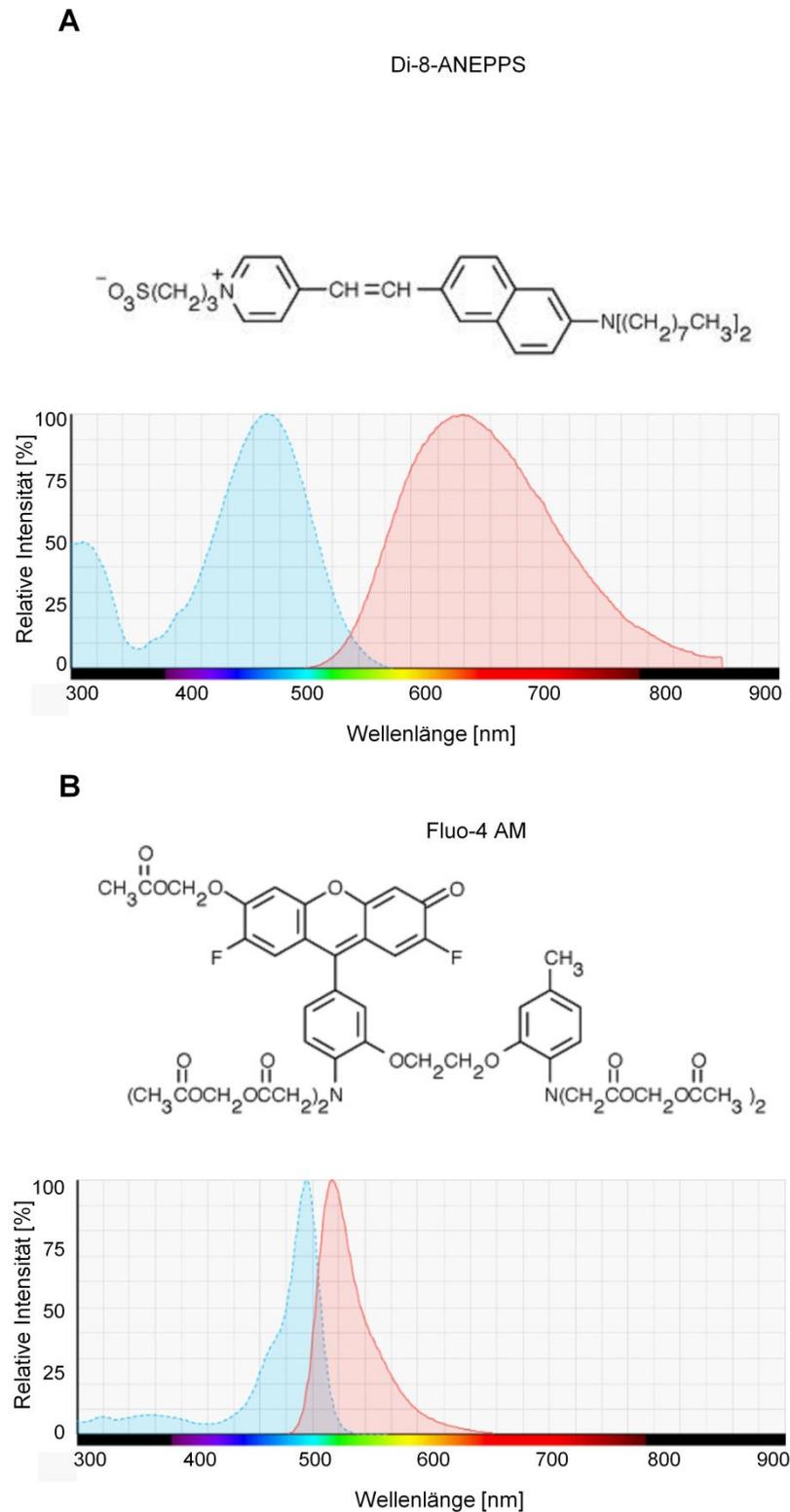


Abbildung 4: Fluoreszierende Farbstoffe. A) Als spannungssensitiver Farbstoff wurde di-8-ANEPPS verwendet. Dieser lagert sich in die Zellmembran ein und verändert seine Fluoreszenz in Abhängigkeit des Membranpotenzials. Dargestellt sind das Exzitations- und das Emissions-Spektrum des Farbstoffs. Die Grafik wurde der Produktseite entnommen unter <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D3167> und modifiziert. B) Als Calcium sensitiver Farbstoff wurde Fluo-4 AM verwendet. Dieser kann aufgrund des Acetoxymethyl Esters die Zellmembran passieren und reichert sich im Zellinneren an. Der Calcium Chelator bindet freies Calcium im Cytosol und emittiert dadurch Photonen. Dargestellt sind Exzitations- und Emissions-Spektrum des Farbstoffs. Grafik modifiziert von: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/F14202>

Eine andere Variante der Neuroimaging Technik stellt die Verwendung Calcium sensitiver Farbstoffe, wie Fluo-4 AM (*F14202; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland*) dar. Hierbei handelt es sich um an Acetoxy-methyl (AM)-Ester gekoppelte Calcium Chelatoren (siehe Abbildung 4 B). Der AM-Ester ermöglicht dem Farbstoff das Passieren der Zellmembran. Innerhalb der Zelle wird der Ester von unspezifischen Esterasen abgespalten, was ein Verlassen der Zelle für den Farbstoff verhindern soll. Freies Calcium bindet reversibel an die vorhandene Bindungsstelle des Chelators und erhöht die Quantenausbeute des Fluoreszenzfarbstoffes. Dies führt zu einer Zunahme der Fluoreszenz des Farbstoffs. Die Kinetik der Konzentrationszunahme von Calcium innerhalb der Zelle bei Erregung erlaubt Aufnahmen mit geringer Frequenz von ≤ 2 Hz und nicht-kontinuierlicher Belichtung, so genannte Time-Lapse Aufnahmen. Hierbei wird zwischen jeder Aufnahme eine definierte Zeit pausiert, in der die Lampe ausgeschaltet und das Präparat nicht beleuchtet wird. Mit dieser Methode ist es möglich, den Aktivierungsverlauf über mehrere Sekunden bis Minuten zu verfolgen, ohne das Präparat zu schädigen oder ein Ausbleichen des Farbstoffs zu riskieren. Da der Farbstoff über längere Zeit mittels unspezifischer Ionenpumpen aus der Zelle heraus transportiert wird, wurde Probenecid (*P8761; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*) als Blocker für unspezifische organische Anionen Transporter der Zelle in der Versuchskreislösung verwendet. Außerdem wurde Fluo-2 LR AM (*0230; MoBiTec, Göttingen, Deutschland*) getestet, der als besonders „leakage resistant“ (Resistent gegen Leckströme) beschrieben wird. Das Funktionsprinzip des Fluoreszenzfarbstoffs ist hierbei das gleiche wie bei Fluo-4. Jedoch verfügt der LR Farbstoff über eine zusätzliche Gruppe, die ihm auch das Passieren von Ionenpumpen erschweren soll.

Unterschiede zwischen inversem und aufrechtem Mikroskop

Die Vorversuche zum Neuroimaging an Humandarmbiopsien erfolgten teilweise an einem inversen Mikroskop der Firma Olympus. Alle anderen Versuche wurden mit einem aufrechten Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt.

In der Konfiguration eines inversen Mikroskops sind die Objektive unterhalb des Präparates angebracht. Daher war die Versuchskammer für das inverse Mikroskop mit einem sehr dünnen optischen Boden ausgestattet. Dieser war ein mit Silikon oder Sylgard befestigtes rundes Deckglas. Durch diesen Boden konnte das Präparat, welches direkt auf diesem auflag, mit den Objektiven scharf gestellt werden. Die Pipetten sowie die Elektrode wurden von oben in die Versuchskammer eingeführt und konnten ebenfalls durch den Boden hindurch gesehen werden. Diese Methode war von Vorteil für diese Art von Versuchen, da zum einen die Objektive von der physiologischen Lösung getrennt sind und man zum anderen ausreichend Platz für diverse Pipetten und die Elektrode hat. Nachteil an der Methode ist die Tatsache, dass man einen Arbeitsabstand von 0,1mm mit den Objektiven

(UAPO/340 x40, *Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland*) zur Verfügung hat, so dass die Präparate sehr dicht auf dem Glasboden aufliegen müssen. Hierfür war eine ausreichende Spannung auf dem Ring unbedingt nötig. Diese zu erreichen war mit den Biopsien häufig aufgrund ihrer sehr geringen flächigen Ausdehnung nicht möglich. Außerdem mussten die Präparate sehr dünn und lichtdurchlässig sein, da ansonsten das Imaging nicht möglich war. Dies machte das Belassen der Mukosa auf dem submukösen Plexus unmöglich. Aus diesen Gründen fand der Wechsel zu einem aufrechten Mikroskop statt. Aufgrund der unterschiedlichen Bearbeitung der Gewebe wurden die Ergebnisse getrennt ausgewertet.

Im Gegensatz zu einem inversen Mikroskop befinden sich bei einem aufrechten Mikroskop die Objektive oberhalb des Präparats. Für die Versuche wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (Plan-Apochromat 40x/1.0 DIC M27, *Zeiss, Oberkochen, Deutschland*) verwendet, so dass dieses direkt in die Kammer mit dem Präparat und enthaltener Versuchskrebslösung (Zusammensetzung in mM: 117 NaCl, 20 NaHCO₃, 11 Glukose, 4,7 KCl, 1,2 MgCl₂·6H₂O, 2,5 CaCl₂·2H₂O, 1,2 NaH₂PO₄; pH=7,4; 293mosmol/l) eingetaucht werden konnte. Dies wies den Vorteil auf, dass die Biopsie nicht länger auf einen Ring mit Öffnung aufgespannt werden musste, sondern auf ein flaches Plättchen aus Sylgard (siehe 2.1.1). Dadurch war es möglich, auch sehr kleine und unregelmäßig geformte Stücke von submukösem Plexus komplett aufzuspannen und für das Imaging zu verwenden. Außerdem eröffnete es die Möglichkeit, die Mukosa und den Plexus übereinander aufzuspannen. Da der Plexus oben auf der Mukosa auflag, war es mit dem aufrechten Mikroskop möglich, die Ganglien zu identifizieren und Ableitungen durchzuführen.

Aufgrund des durch das Objektiv limitierten Platzes über dem Präparat musste das Design der selbst gefertigten Punkt-Stimulations-Elektrode angepasst werden, so dass der Elektrodendraht besser kontrollierbar wurde. Diese Elektrode bestand aus einem teflonbeschichteten Platindraht (Durchmesser von 25µm), der durch eine Glaskapillare mit spitz zulaufender Öffnung (entsprechend einer Applikationspipette) gezogen worden war. Zur Versiegelung der Öffnung wurde die Spitze kurz in klaren Nagellack gehalten, so dass dieser wenige Millimeter hoch in die Kapillare gezogen wurde und diese verschloss. Dadurch wurde das Eindringen von Krebslösung während des Versuchs verhindert. Ein ca. 4mm langes Stück des Elektrodendrahts befand sich außerhalb der Glaskapillare und konnte mittels eines Manipulators auf einen interganglionären Faserstrang zur Stimulation positioniert werden. Im Vergleich dazu blieb bei der Variante für das inverse Mikroskop die Glaskapillare im Rohzustand, wobei der Elektrodendraht 8-12mm aus ihr hervorragte.

Auch die Ausrichtung der Manipulatoren sowohl für die Elektrode als auch für die Applikationspipetten wurde dem verminderten Platzangebot entsprechend angepasst. Die

Halter wurden um ca. 90° gedreht. Die Strömungsrichtung der applizierten Lösungen änderte sich dadurch. Während die Spritzrichtung beim inversen Mikroskop nahezu senkrecht auf das Gewebe zeigte, wurde nun die Flüssigkeit in einem flachen Winkel über das Ganglion appliziert. In Vorversuchen mit farbiger Lösung wurde festgestellt, dass der gewünschte Bereich nach wie vor ausreichend mit der sich innerhalb der Pipette befindenden Lösung bedeckt werden konnte und sich keine Nachteile durch die veränderte Richtung im Sinne der Nervenstimulation ergaben. Der äußere Durchmesser der Pipettenöffnung zur chemischen Stimulation betrug $10\mu\text{m}\pm 5\mu\text{m}$ ($n=26$ Pipetten) bei beiden Mikroskop-Varianten.

Die Präparate für das aufrechte Mikroskop wurden in eine speziell angefertigte Versuchskammer überführt. Diese bestand aus einem flachen Plastikring, in dem mittig eine schräg abfallende Vertiefung eingelassen war. Diese war mit einem Objektträgerglas, welches von unten an den Ring geklebt wurde, verschlossen. Auf dieses Glas wurde der Sylgard-Ring mit dem aufgespannten Präparat geklebt. Sylgard zeichnet sich unter anderem durch starke Adhäsionseigenschaften aus. Ist das Material trocken, so haftet das Plättchen fest am Glas und muss für den Versuch nicht zusätzlich befestigt werden. Als Ein- und Ausfluss für die Perfusionslösung wurden abgeschnittene Kanülen mit Hilfe von Knetmasse auf die Kammer geklebt und so eingestellt, dass der Flüssigkeitsspiegel ausreichte, um das Objektiv eintauchen zu lassen.

Allgemeiner Aufbau des Imaging-Setups

Der grundsätzliche Aufbau des Imaging-Setups (siehe Abbildung 5) war für beide Mikroskope identisch und entspricht zum Großteil der bereits im Detail beschriebenen Methode (Mueller et al. 2011).

Zur Untersuchung von schnellen Änderungen des Membranpotentials (Aktionspotentiale und fEPSPs) wurde der spannungsabhängige Farbstoff di-8-ANEPPS verwendet. Zur Detektion der Fluoreszenzänderung, die mit Spannungsänderungen einhergeht, wurde ein modifizierter Cy3-Filterblock (545±15nm Bandpassfilter, 565nm dichromatischer Spiegel, 580nm Langpassfilter, *Ahf Analysentechnik, Tübingen, Germany*) und eine grüne LED (*LE T S2W und LE T A2A; Osram, München, Deutschland*) verwendet. Für die Messung von intrazellulärem Calcium Anstieg wurden die Calcium sensitiven Farbstoffe Fluo-4 AM und Fluo-2 AM LR verwendet, die beide im gleichen Fluoreszenzbereich liegen. Zur Detektion der Fluoreszenzänderung wurden ein FITC Filterset (Exzitation: HD475/35, dichromatischer Spiegel: BS499 und Emission: HC 530/43; *BrightLineFITC HC Basic BP-Filterset, Ahf Anaysentechnik, Tübingen, Germany*) und eine blaue LED (*3W blau und 3W royal blau, Philips Lumiled; Conrad, München, Deutschland*) verwendet.

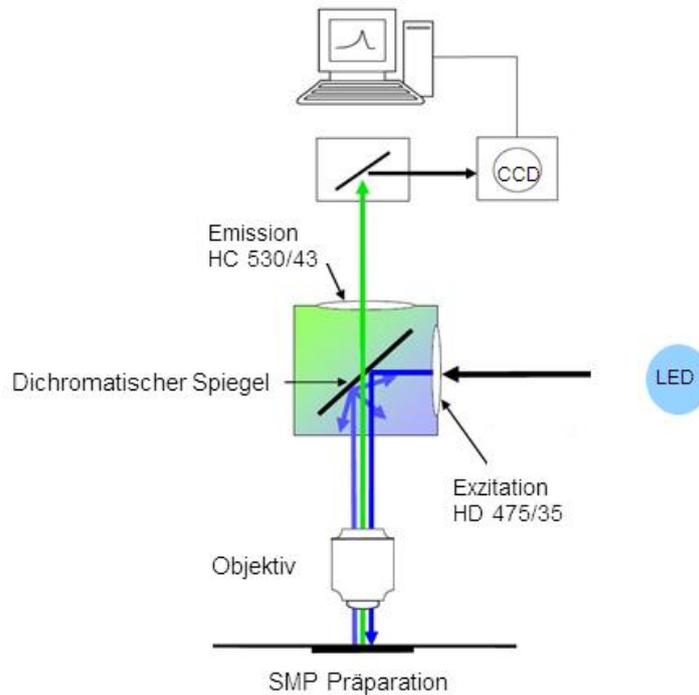


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Setups mit dem aufrechten Mikroskop für das Beispiel Calcium Imaging. Das Objektiv befindet sich oberhalb des Präparats und taucht in die Lösung ein. Über eine blaue LED wird Licht in den Strahlengang geleitet, welcher durch einen Filter-Würfel führt. In diesem befindet sich ein dichromatischer Spiegel, der das Exzitationslicht nach unten durch das Objektiv lenkt. Dadurch wird der Farbstoff im Präparat angeregt und emittiert Photonen, welche auf den Chip der CCD Kamera gelenkt und schließlich am angeschlossenen PC angezeigt werden.

Zur Durchführung der Neuroimaging Versuche wurde das NeuroCCD SM System von RedShirtImaging (*Decatur, USA*) verwendet. Dieses bestand aus einer CCD („charge coupled device“) Kamera, einem Windows-PC und der Neuroplex Software, die zur Erfassung und Auswertung der Daten verwendet wurde. Bei dem aufrechten Zeiss Mikroskop war zusätzlich eine CCD Kamera mit höherer Auflösung angebracht (Moticam Pro 205C, Motic Asia, Hong Kong.), die über eine mitgelieferte Software (Motic Images Plus 2.0) gesteuert und für Einzelaufnahmen in höherer Auflösung verwendet wurde. Beide Kameras waren an einem Tubus befestigt. Durch einen Einschub konnte der Strahlengang entweder auf die CCD Kamera oder auf die MotiCam Kamera gelenkt werden.

Das Gewebepräparat wurde nach der Präparation in eine Versuchskammer überführt, in der es für den Versuch kontinuierlich mit ca. $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ warmer, carbogengesättigter Versuchskrebslösung mit einer Geschwindigkeit von 8,4ml/min perfundiert wurde. Die Versuchskammer wurde in einer Halterung am Mikroskop Tisch befestigt. Das Gewebe wurde jeweils für mindestens 20 Minuten equilibriert, bevor der Versuch gestartet wurde.

2.2.2. Protokolle zum Färben der Präparate

Spannungssensitiver Farbstoff

Zur Ableitung von Aktionspotentialen und schnellen Potentialänderungen einzelner Neurone, wurde der Farbstoff di-8-ANEPPS in der Konzentration von 20 μ M mit Hilfe einer Glaspipette mit sehr kleiner Öffnung (<5 μ m äußerer Durchmesser) in das Ganglion injiziert. Dazu wurde die Ganglienhülle an einem Faserstrang etwa 10 μ m vom Ganglion entfernt vorsichtig durch Anritzen geöffnet und der Farbstoff für insgesamt 10 – 15s mit einem mäßigen Druck (\leq 0,5 bar) eingespritzt. Anschließend wurde mindestens 10 Minuten gewartet, bis der Farbstoff sich in ausreichender Menge in der Zellmembran eingelagert hatte. Während dieser Zeit befand sich das Präparat im Dunkeln. Dieses Vorgehen war identisch für alle Gewebearten.

Zusätzlich wurden bei Biopsien zwei weitere Färbetechniken getestet: a) Duschapplikation des Ganglions. Hierbei wird die Farbstofflösung nicht in die Hülle injiziert sondern großflächig über das Ganglion appliziert. Um ein längeres Verweilen des Farbstoffs dort zu ermöglichen, wurde die Pumpe für etwa 1 Minute nach erfolgter Applikation gestoppt. b) Inkubation des gesamten Gewebes mit der Farbstofflösung für etwa 10 Minuten. Anschließend wurde das Gewebe mit klarer Krebslösung gespült.

Nach der Wartezeit zur Inkorporation des Farbstoffs wurden Aufnahmen mit einer Frequenz von 1kHz und einer maximalen Dauer von 2 Sekunden gemacht.

Calcium sensitive Farbstoffe

In Vorversuchen wurden zwei unterschiedliche Calcium sensitive Farbstoffe getestet, um ein zuverlässiges Versuchsprotokoll zu erarbeiten. Für den ersten Farbstoff, Fluo-4 AM, bestand bereits ein Protokoll in der Arbeitsgruppe, welches angepasst wurde. In früheren Versuchen wurde der Farbstoff in einer Konzentration von 30 μ M verwendet. Gewebepräparationen wurden für 2 Stunden damit inkubiert und anschließend 1 Stunde in einem 100ml Becherglas gefüllt mit Versuchskrebslösung gewaschen (Mueller et al. 2011). Da es sich bei dem Farbstoff um einen Calcium Chelator handelt, der freies Calcium bindet, kann es bei einer zu hohen Farbstoff Konzentration innerhalb der Zelle zu einer erhöhten Pufferwirkung kommen (Vanden Berghe et al. 2001). Dies kann die Physiologie der Nervenzelle beeinflussen. Auch die langen Inkubationszeiten sollten verkürzt werden, um vor allem bei der Bearbeitung der Biopsien eine Anpassung der neuronalen Gegebenheiten an die Bedingungen *ex vivo* zu vermeiden. Getestet wurde Fluo-4 AM in den Konzentrationen 1 μ M – 10 μ M mit Inkubationsdauern von 20 Minuten bis 1,5 Stunden an 20 Präparaten des submukösen Plexus GP, 12 Präparaten des humanen submukösen Plexus aus Darmresektaten und 15 Präparaten des humanen submukösen Plexus mit Mukosa aus Biopsien.

Schließlich wurde das folgende Protokoll erarbeitet, mit dem die meisten erfolgreichen Färbungen und Ableitungen von Calcium Antworten erreicht werden konnten (100% der getesteten GP, 100% der getesteten Resektate und 55% der getesteten Biopsien). Dieses Protokoll wurde für alle Versuche am humanen submukösen Plexus in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Die Versuchskrebslösung wurde zunächst für wenige Minuten begast. Während der Begasung wurde Probenecid hinzugegeben, welches in 1N NaOH gelöst war. Probenecid wurde der Versuchskrebslösung zugegeben und war in der Inkubations- sowie der Waschlösung und im weiteren Verlauf in der Perfusionslösung enthalten. Die Endkonzentration von Probenecid betrug 500 μ M. Die Lösung wurde für weitere 1 – 2 Minuten begast. Anschließend wurde der pH der Lösung gemessen und bei Bedarf noch bis zu 10 Minuten länger begast bis ein pH von etwa 7,4 erreicht wurde. Mit dieser Versuchskrebslösung wurde eine 10 μ M Lösung Fluo-4 AM hergestellt. Mit dieser wurde das submuköse Gewebe für 45 Minuten inkubiert und dabei kontinuierlich begast. Anschließend wurde das Gewebe in ein 100ml Becherglas überführt, welches mit der Probenecid haltigen Versuchskrebslösung gefüllt war. Darin wurde es für 20 Minuten unter ständiger Begasung belassen.

Als zweiter Farbstoff wurde Fluo-2 LR AM getestet, der als besonders „Leakage Resistant“ gilt (Takahashi et al. 1999) und somit länger als Fluo-4 AM in der Zelle gehalten werden soll. Dieser Farbstoff wurde ebenfalls in den Konzentrationen 1 μ M – 10 μ M mit Inkubationsdauern von 45 Minuten bis 2 Stunden an 9 Präparaten des submukösen Plexus des Meerschweinchens, 2 Präparaten des humanen submukösen Plexus aus Resektaten und 24 Präparaten des humanen submukösen Plexus mit Mukosa aus Biopsien getestet.

Für den Farbstoff Fluo-2 LR AM wurde das folgende Protokoll ermittelt, welches in 100% der getesteten Präparate des GP und Humandarmresektate zu Ableitungen geführt hat, aber in nur 4% der getesteten Biopsien eine erfolgreiche Ableitung ermöglichte:

Das Präparat des submukösen Plexus wurde mit 10 μ M Fluo-2 LR AM in Versuchskrebslösung für 45 Minuten inkubiert und anschließend für 20 Minuten in 100ml Versuchskrebslösung in einem Becherglas gewaschen. Die Lösungen wurden dabei kontinuierlich mit Carbogen begast.

Aufgrund des ausbleibenden Erfolgs mit Fluo-2 LR AM Calcium Signale aus Biopsien aufzunehmen, wurde dieser Farbstoff nicht weiter verwendet, sondern ausschließlich das Protokoll für Fluo-4 AM.

Nach der Auswaschphase wurde das Präparat in die Versuchskammer transferiert. Aufnahmen wurden entweder mit einer Frequenz von 1kHz (schnelles Calcium Imaging) oder 2Hz (Time-lapse-Aufnahmen) durchgeführt. Dabei variierte die Aufnahmedauer von 2s – 30s. Die notwendige Länge der Aufnahmen wurde jeweils in Vorversuchen abhängig von der Antwortdauer sowie dem erwarteten Einsetzen der Antwort ermittelt und entsprechend festgesetzt. Die Belichtungszeit pro Bild wurde für alle Aufnahmen auf 1ms eingestellt.

Teilweise wurden die Präparate mit 2,5 μ M 4-di-2-ASP (D289; *Life Technologies, Darmstadt, Deutschland*) für maximal 10 Minuten direkt in der Kammer inkubiert, um die Ganglien besser sichtbar zu machen. Dabei handelt es sich um einen kationischen, mitochondrialen Farbstoff, welcher Nervenendigungen anfärbt (Magrassi et al. 1987). Seine Eignung als Vitalfarbstoff wurde in früheren Versuchen getestet, außerdem wurde sichergestellt, dass er die Physiologie der Nervenzellen nicht verändert (Vignali et al. 2010). Der Farbstoff kann innerhalb von einer Stunde bei normaler Perfusion ausgewaschen werden und beeinflusst damit die Messungen nicht.

2.2.3. Neuroimaging Versuchsprotokolle

Humandarmbiopsien

Biopsien von gesunden Kontrollen und RDS-Patienten wurden gleich behandelt. Es wurde jeweils die allgemeine Vitalität der Neurone durch eine 600ms dauernde Druckapplikation mit 0,7 bar von 100 μ M Nikotin getestet. Die Aufnahmezeit betrug 20s bei 2Hz für Calcium Imaging und 2s bei 1kHz für Versuche mit spannungssensitiven Farbstoffen. Zur Überprüfung der synaptischen Funktion, wurde eine elektrische Punktstimulation an einem Nervenstrang, der zu dem untersuchten Ganglion führte, durchgeführt. Es handelte sich um eine Train-Stimulation, bei der 20 Impulse für eine Sekunde mit einer Stärke von 60 μ A abgegeben wurden. Jeder Impuls hatte eine Länge von 600 μ s. Die Aufnahmezeit betrug 1,5 – 2s bei 1kHz sowohl für Calcium als auch VSD Imaging. Als krankheitsspezifischer Stimulus wurde ein Mix aus Mediatoren (im Folgenden als „Mediator Cocktail“ bezeichnet), die auch in Überständen von Schleimhautbiopsien und Serum von Reizdarmpatienten gemessen wurden und bei akuter Applikation zu einer Stimulation von Geweberesektaten führte (Buhner et al. 2009), appliziert. Dieser bestand aus folgenden Substanzen: 1 μ M Histamin, 1 μ M Serotonin, 10nM Tryptase (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) und 150pg/ml TNF- α (*Biomol GmbH, Hamburg, Germany*) und wurde für 600ms mittels Druckapplikation verabreicht. Die Aufnahmezeit betrug 30s bei 2Hz für Calcium Imaging und 2s bei 1kHz für VSD Imaging.

In Vorversuchen wurde jeweils als letzte Substanz 15 μ M Ionomycin für 600ms verwendet, um die Qualität der Fluo-4 AM bzw. Fluo-2 LR AM Färbung zu testen. Des Weiteren wurde

evaluiert, ob sich Ionomycin in den durchgeführten Experimenten dafür eignet, als Referenzwert (100%) mit den resultierenden Calcium Peaks der restlichen Applikationen verrechnet zu werden, um eine Normierung der Ergebnisse zu erreichen. Hierbei sollten Unterschiede in der Qualität der Färbung sowie eventuelle Schwankungen an intrazellulärem Calcium ausgeglichen werden. Dieses Vorgehen wurde aufgrund inkonsistenter Ergebnisse als Antwort auf die Applikation von Ionomycin (die teilweise deutlich schwächer war als die vorangegangenen Applikationen) eingestellt. Stattdessen wurden Vergleiche der Resting Light Intensity (die Lichtintensität ohne Stimulation im Ruhezustand, RLI) als Qualitätseinschätzung herangezogen. Diese wurde in Biopsien von 5 HC und 18 RDS bestimmt und miteinander verglichen. Zur Ermittlung der RLI pro Person wurden jeweils die Ganglien herangezogen, die im Versuch getestet worden waren. In der Software Neuroplex kann eine beliebige Fläche, in diesem Fall das gesamte Ganglion, markiert werden. Dies führt dazu, dass das Programm die gemittelte Signalstärke in mV anzeigt. Diese Werte wurden für jedes Ganglion notiert und anschließend pro Person gemittelt. Diese Auswertung ergab eine mediane Signalstärke im Ruhezustand für HC von 2012 mV (1215/2615) und für RDS von 1642 mV (1065/2355). Die Messwerte für beide Gruppen waren nicht unterschiedlich ($p=0,737$). Daraus wird geschlossen, dass die Beladung mit Farbstoff sowie die grundsätzliche Calcium Konzentration innerhalb der Ganglien nicht unterschiedlich waren zwischen HC und RDS und daher die absoluten Werte für die Fluoreszenzzunahme ($\Delta F/F$) verwendet werden können.

Wirkung und Interaktion verschiedener Substanzen aus Überständen von Reizdarmpatienten an Humandarmresektaten

Um die Wechselwirkungen mehrerer in Überständen von Schleimhautbiopsien vorkommenden Substanzen (siehe Protokoll Biopsien), zu charakterisieren, wurden diese sowohl als Einzelapplikationen als auch in unterschiedlichen Kombinationen auf Neurone appliziert. Die Konzentration der einzelnen Stoffe war jeweils identisch, unabhängig davon, ob es sich um die Applikation einer einzelnen Substanz oder einer Mischung handelte. Die entsprechenden Stoffe und Konzentrationen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Applikationsdauer betrug jeweils 600ms, die Aufnahmedauer 30s bei 2Hz für Calcium Imaging. Die Versuche wurden ungepaart durchgeführt. Pro untersuchtem Ganglion wurde jeweils 600ms 100 μ M Nikotin als Vitalitätstest sowie zur Unterscheidung zwischen neuronaler und Antworten von Gliazellen appliziert (vgl. Abbildung 40). Um Kreuzsensibilisierung zu vermeiden, wurde danach jeweils nur eine Substanz pro Ganglion getestet.

Tabelle 1: Liste aller verwendeter Substanzen und Konzentrationen zur Untersuchung der Wechselwirkung der entsprechenden Substanzen. PAR1 AP: aktivierendes Peptid des PAR1 Rezeptors; PAR2 AP: aktivierendes Peptid des PAR2 Rezeptors

Substanz	Konzentration
Histamin	1 μ M
Serotonin	1 μ M
Tryptase	10nM
Trypsin	10nM
Neutrophile Elastase	100nM
PAR1 AP	10 μ M
PAR1 AP	1 μ M
PAR2 AP	10 μ M

Zur Untersuchung des Einflusses der PAR-Aktivierung wurden neben der Verwendung der spezifischen PAR aktivierenden Peptide (PAR APs) auch Antagonisten für die entsprechenden Rezeptoren verwendet. Zur Untersuchung von PAR-1 wurde der Antagonist SCH79797 (Dihydrochlorid, *Tocris Bioscience, Bristol, UK*) (Ahn et al. 2000) in einer Konzentration von 10 μ M in 100ml Versuchskreislösung (mit Probenecid) verwendet, um das Gewebe damit zu perfundieren. Zwischen Beginn der Perfusion mit dem Antagonisten und der ersten Applikation wurde 20 Minuten gewartet, um dem Antagonisten ausreichend Zeit zu geben, an die Rezeptoren zu binden und sie damit zu blockieren. Dieser Antagonist wurde gemeinsam mit der Mischung aus Histamin, Serotonin und Trypsin sowie Histamin, Serotonin und neutrophiler Elastase verwendet. Um sicherzustellen, dass die Neurone durch die Perfusion mit dem Antagonisten nicht in ihrer Funktion eingeschränkt wurden, wurde jeweils die Antwort auf 100 μ M Nikotin vor und nach der Perfusion miteinander verglichen.

Zur Untersuchung von PAR 2 wurde der Antagonist GB 83 in einer Konzentration von 2 μ M in 100ml Versuchskreislösung verwendet. Da kein etabliertes Protokoll für die Verwendung dieses Blockers mit Präparaten des humanen submukösen Plexus existierte, wurde dessen Wirkung zunächst mit der Ussing Kammer Technik, die von Krueger et al. (2013) ausführlich beschrieben wurde, mit Hilfe des PAR 2 APs auf Spezifität getestet (Daten werden nicht gezeigt). Anschließend wurde der Blocker in gleicher Weise mit der Mischung aus Histamin, Serotonin und Tryptase für die Untersuchungen verwendet.

Wirkung von Trypsin auf enterische Neurone in Humandarmresektaten

Trypsin ist in der Literatur hauptsächlich als PAR2 aktivierende Protease beschrieben. Ikehara et al. (2012) demonstrierte im Caecum der Maus eine Aktivierung von PAR 1

Rezeptoren auf enterischen Nerven durch Trypsin. Daher sollte untersucht werden, ob Trypsin auch im humanen submukösen Plexus aktivierende Wirkung hat und ob diese über die Aktivierung von PAR 1 Rezeptoren vermittelt ist. Hierfür wurde aufgereinigtes Trypsin (TRSEQII, *Cellsystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf, Deutschland*) verwendet, um eine Kontamination mit Chymotrypsin auszuschließen. Zunächst wurde in Vorversuchen getestet, in welcher Konzentration und mit welcher Applikationsdauer reproduzierbare Ergebnisse in mehreren Ganglien erlangt werden können. Da bereits eine 800ms andauernde Applikation von 100nM Trypsin eine messbare Aktivierung verursachte, wurde diese Konzentration beibehalten und lediglich die Applikationsdauer erhöht. Getestet wurden die Applikationsdauern 800ms, 2s, 5s und 10s, wobei sich die Applikationsdauer von 10s als optimal herausstellte und fortan als Standardprotokoll verwendet wurde. Um die Vermittlung der Antwort über den PAR 1 Rezeptor zu untersuchen, wurde der PAR 1 Antagonist SCH79797 (siehe oben) in einer Konzentration von 5µM verwendet. Die Versuche wurden ungepaart durchgeführt. Die Aufnahmedauer betrug jeweils 60s bei einer Frequenz von 2Hz (Calcium Imaging). Zur Überprüfung der Vitalität sowie der Identifizierung von Neuronen wurde Nikotin in der bereits beschriebenen Weise verwendet (siehe oben).

Wirkung von neutrophiler Elastase auf enterische Neurone in Humandarmresektaten

Zur Untersuchung, ob neutrophile Elastase (324681, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*) aktivierend auf enterische Neurone des submukösen Plexus wirkt, wurde diese in unterschiedlichen Konzentrationen und Applikationsdauern getestet. Untersucht wurden folgende Konzentrationen: 100nM, 1µM, 2µM. Als Spritzdauern wurden 800ms, 2s, 5s und 10s getestet. Um eine vermeintliche inaktivierende Wirkung von neutrophiler Elastase auf den PAR1 Rezeptor zu untersuchen (Mihara et al. 2013), wurde in Vorversuchen nach der Applikation von 1µM neutrophiler Elastase die PAR1 aktivierende Protease Thrombin in der Konzentration 100nM (605206, *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*) appliziert. In einer Versuchsreihe wurden Gewebestückchen für 15 Minuten mit 2µM neutrophiler Elastase inkubiert. Thrombin wurde ungepaart - an unterschiedlichen Ganglien - vor und nach der Inkubation für jeweils 800ms appliziert. Die Aufnahmezeit betrug 20s bei einer Bildrate von 2Hz (Calcium Imaging). Zur Überprüfung der Vitalität sowie der Identifizierung von Neuronen wurde wiederum Nikotin in der bereits beschriebenen Weise verwendet (siehe oben).

Vorversuche zur Wirkung des TNF-α Antikörpers Adalimumab auf die exzitatorische Wirkung von Überständen von RDS-Patienten im submukösen Plexus des Meerschweinchens

Der monoklonale Antikörper gegen TNF-α, Adalimumab (Humira©, *AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland*), wird gegen entzündliche Erkrankungen wie Arthritis (Schiff et al. 2006; Mease et al. 2005), Morbus Crohn oder Ulcerative Colitis

(Sandborn 2003) bei Patienten angewendet. In Versuchen mit PBMC Überständen von RDS-D Patienten (Hughes et al. 2013a) konnte gezeigt werden, dass auch bei Patienten mit Reizdarmsyndrom eine erhöhte Konzentration von TNF- α vorliegt und die sensibilisierende Wirkung des Überstands durch Inkubation mit dem TNF- α Antikörper Infliximab vermindert werden konnte.

Dies führte zu der Fragestellung, ob die exzitatorische Wirkung von Überständen von Schleimhautbiopsien von RDS-Patienten durch die Anwendung des TNF- α Antikörpers Adalimumab verringert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden Kontrollversuche an GP SMP Präparaten durchgeführt, um sicherzustellen, dass der Antikörper selbst 1) nicht exzitatorisch, 2) nicht hemmend auf enterische Neurone wirkt und 3) ausreichend Hinweise für die Vermutung vorhanden sind, dass eine Reduktion stattfindet. Die Spritzdauer von 600ms sowie die Aufnahmedauer von 2s bei 1kHz (VSD Imaging) wurden für alle folgenden Versuchsprotokolle beibehalten.

Für Fragestellung 1) wurde Adalimumab mit Versuchskrebslösung verdünnt und dadurch in einer Konzentration von 100 μ g/ml auf Neurone appliziert. Für Fragestellung 2) wurde Adalimumab ebenfalls in einer Konzentration von 100 μ g/ml mit 100 μ M Nikotin gemischt und in gepaartem Aufbau gegen 100 μ M Nikotin ohne Zugabe des Antikörpers getestet. Zur Klärung der Fragestellung 3) wurden zwei Ansätze verwendet: Zum einen wurde der Mediator Cocktail (siehe Abschnitt Biopsien) mit 50 μ g/ml Adalimumab inkubiert und gepaart in randomisierter Reihenfolge gegen den Mediator Cocktail ohne Adalimumab getestet. Die Verdünnung hierbei war 1:10, 1 μ l Versuchskrebslösung oder Versuchskrebslösung mit Adalimumab + 9 μ l Mediator Cocktail. Zum anderen wurde der Mediator Cocktail gepaart in randomisierter Reihenfolge gegen eine Mischung ohne TNF- α getestet (bestehend aus 1 μ M Histamin/1 μ M Serotonin/10nM Tryptase).

Auswirkung von chronischem Kontakt enterischer Neurone des Meerschweinchens mit Überständen von RDS-Patienten gegenüber Überständen von Kontrollen

Zur Reproduktion der in den Biopsie-Experimenten beobachteten Effekte einer langen Exposition des enterischen Nervensystems mit Mediatoren, wurden Versuche am submukösen Plexus des Meerschweinchens durchgeführt. Nachdem die Stücke über Nacht mit den Überständen inkubiert worden waren (siehe 2.1.4.), wurde ein Versuchsprotokoll in Anlehnung an die Biopsien durchgeführt. Dieses bestand aus einer Spritzapplikation von 600ms mit 100 μ M Nikotin und einer Druckapplikation des RDS Überstands für 600ms, der auch zur Inkubation verwendet worden war.

2.3. Immunhistochemie

Alle Gewebe wurden jeweils nach dem Experiment bei 4°C über Nacht fixiert. Humane Präparate (Resektate und Biopsien mit oder ohne Mukosa) wurden dabei mit einer Formaldehydlösung (4%), Meerschweinchen Präparate mit Formaldehyd plus 0,2% Pikrinsäure behandelt. Nach Abschluss der Fixierung wurde das Gewebe 3x10min mit Phosphatpuffer gewaschen. Zur längeren Aufbewahrung wurde das Gewebe in PBS/NaN₃ Lösung transferiert und gekühlt bei 4°C gelagert.

Der grundsätzliche Ablauf für eine immunhistochemische Färbung war für alle Präparate gleich. Zunächst wurde das Gewebe für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocking-Serum (PBS, 0,1% NaN₃, 4% Pferdeserum (englisch: *horse serum*) (HS), 0,5% Triton X-100 (TX)) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde der spezifische primäre Antikörper (siehe Tabelle 2 für verwendete Antikörper) mit dem Blocking-Serum entsprechend verdünnt und das Gewebe für 12-16 Stunden (Biopsien und Meerschweinchenpräparate) beziehungsweise 40 Stunden (Humanresektate) bei Raumtemperatur darin inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein Waschschrift (3x10min mit PBS-Puffer). Anschließend wurde der sekundäre Antikörper wiederum in dem Blocking-Serum verdünnt und das Gewebe bei Raumtemperatur erneut 1,5 – 2h (Biopsien und Meerschweinchengewebe) bzw. 3,5h (Humanresektate) inkubiert. Zum Schluss wurde das Gewebe erneut 3x10min mit PBS-Puffer gewaschen und schließlich auf einen mit poly-L-Lysine bedeckten Objektträger eingedeckt. Als Eindeckmedium wurde eine Lösung bestehend aus PBS (pH=7.0) / NaN₃ (0.1%) / glycerol (80%) verwendet. Zur Begutachtung der Färbungen wurde ein Mikroskop von Olympus (BX61 WI; *Olympus, Japan*) mit entsprechenden Filtern verwendet, welches mit einer SIS F-view II charge-coupled device (CCD) Kamera und der Software analySIS 3.1 (*Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany*) ausgestattet war.

Biopsien wurden zunächst mit Mukosa (sofern diese noch vorhanden war) gefärbt. Für manche Antikörper war es notwendig, die Mukosa vom submukösen Plexus zu trennen, da ansonsten eine zu starke Hintergrundfluoreszenz vorhanden war (siehe Tabelle 2). Für die Identifikation nicht-neuronaler Zellen im Blickfeld, die während des Experiments Aktivität gezeigt hatten, war es notwendig, eine dreifach-Färbung mit zwei primären Maus-Antikörpern durchzuführen. Hierzu wurde zunächst sheepPGP 9.5 und mouse anti human CD68 gefärbt und mit sekundären Antikörpern (Cy5 und Cy3) versehen. Anschließend wurde das Gewebe nochmals mit mouse anti human mast cell tryptase und dem sekundären Antikörper AMCA gefärbt. Dadurch sollten unspezifische Bindungen aufgrund der identischen Wirtstiere vermieden werden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 2: Liste aller verwendeter Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Verwendet für...
sheep anti PGP 9.5	1:30000; 1:50000	The Binding Site	Resektat, Biopsie (mit Mukosa)
Mouse anti Human Mast Cell Tryptase	1:2000	Chemicon	Biopsie (mit Mukosa)
Rabbit anti NSE	1:10000	Polysciences	Biopsie
Rabbit anti c-kit	1:100	Oncogene	Biopsie
Mouse anti human CD68	1:200	Serotec	Biopsie (nur ohne Mukosa möglich)
Mouse anti HU biotin konjugiert	1:100; 1:200	Molecular Probes	Biopsie (nur ohne Mukosa möglich)
Mouse anti SOX-10	1:100	Prof. Wegner, Universität Erlangen-Nürnberg	Resektat, Biopsie (ohne Mukosa besser)
Rabbit Phospho p44/42 MAP Kinase	1:500; 1:2000	Birgit fragen	Resektat
Human Adalimumab	1:500; 1:1000; 1:5000; 1:10000	Abbott GmbH & Co. KG	Meerschweinchen

Für die Versuche zur Wirkung von Adalimumab auf Überstände von Reizdarmpatienten wurden als Vorversuche Färbungen mit Adalimumab im submukösen und myenterischen Plexus des Meerschweinchens durchgeführt. Dabei handelte es sich um Gewebe, welches nicht vorher experimentell untersucht worden war. Adalimumab wurde in unterschiedlichen Verdünnungen (siehe Tabelle 2) getestet.

Tabelle 3: Liste verwendeter Antikörper für dreifache Färbung

Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper
Erster Färbeschritt		
Sheep Anti PGP 9.5	1:30000; 1:50000	Donkey anti sheep Cy5
Mouse anti human CD68	1:200	Donkey anti mouse Cy3
Zweiter Färbeschritt		
Mouse anti Human Mast Cell Tryptase	1:2000	Donkey anti mouse AMCA

Die sekundären Antikörper wurden jeweils so gewählt, dass sie spezifisch zu dem Wirtstier, aus dem der primäre Antikörper gewonnen worden war, passten. Dabei wurden folgende Verdünnungen verwendet: Cy2: 1:200; Cy3: 1:500; Cy5 1:500; AMCA 1:50

2.4. Datenanalyse und Statistik

Imaging Versuche

Die Auswertung der Neuroimagingversuche erfolgte mit Hilfe der Software Neuroplex, Version 10.1.2. (*RedShirtImaging, Decatur, GA, USA*). Die statistische Auswertung sowie Graphen wurden mit Sigma Plot 12.5. (*Systat Software Inc., Erkrath, Germany*) erstellt. Signalspuren (englisch: *traces*) wurden mit Hilfe von Igor 6.3.4.1. (*WaveMetrics, Lake Oswego, USA*) dargestellt. Messungen in Bildern, wie beispielsweise Flächen oder Längen, wurden mit dem Programm Fiji/ImageJ (Schneider et al. 2012) durchgeführt.

Durch die Eigenschaft von di-8-ANEPPS sich in die Zellmembran einzulagern, konnte man bei Versuchen mit diesem Farbstoff direkt auf Zellebene auswerten. Dazu wurde jeweils eine Zelle im Programm Neuroplex an ihrer Begrenzung umrandet und der entsprechende Trace konnte angezeigt werden (Abbildung 6). Die Aktionspotentiale wurden per Hand gezählt. Es wurden nur Aktionspotentiale in die Statistik einbezogen, die nach dem Beginn der Stimulation gemessen werden konnten. Für die spätere statistische Auswertung und Darstellung wurde jeweils der Neuroindex berechnet. Dieser setzt sich zusammen aus der gemittelten AP Frequenz pro Ganglion multipliziert mit dem Prozentsatz antwortender Zellen pro Ganglion.

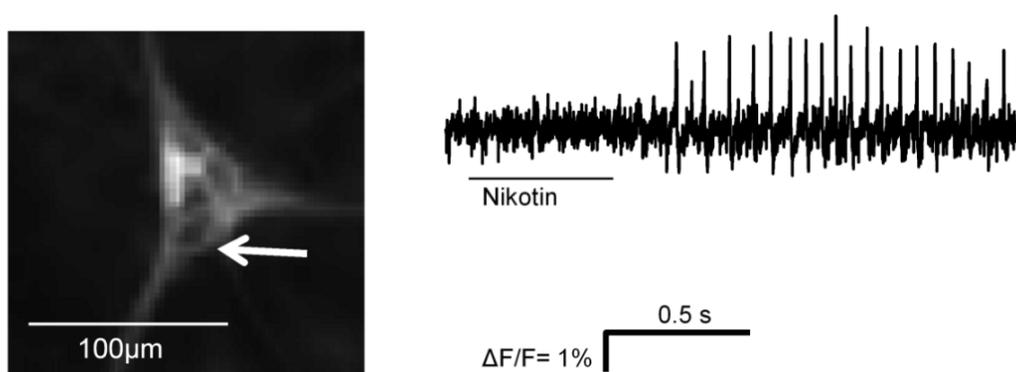


Abbildung 6: Submuköses Ganglion aus dem Meerschweinchen distalen Colon gefärbt mit di-8-ANEPPS und Beispiel Trace nach Nikotinapplikation. Im Bild links sieht man ein mit di-8-ANEPPS gefärbtes submuköses Ganglion des Meerschweinchen distalen Colons. Der Farbstoff lagert sich in die Zellmembran ein, wodurch jedes einzelne Neuron klar abgegrenzt ist und identifiziert werden kann. Die Signalspur auf der rechten Seite stammt von dem mit dem weißen Pfeil markierten Neuron. Jeder Ausschlag repräsentiert ein Aktionspotential, das durch die Applikation von Nikotin ausgelöst worden ist. Der Trace wurde mit einem Breitbandfilter von 9,9 – 298,9 Hz gefiltert.

Diese Art der Auswertung war nicht möglich für Experimente mit Calcium sensitiven Farbstoffen, da diese eine klare Abgrenzung einzelner Zellen nicht eindeutig möglich machen (Abbildung 7). Aufgrund der Tatsache, dass nur ein geringer Anteil an Ganglien in post-hoc immunhistochemischen Färbungen identifiziert und eindeutig zugeordnet werden konnte, war es nicht möglich, die Neurone über diesen Weg zu zählen (vergleiche Anhang Abbildung 41). Um dennoch ein Maß für die Nervenaktivität (Neuroindex) angeben und verwenden zu können, wurde in Vorversuchen (siehe 3.1.) getestet, welche Methode zur Zählung der Neurone pro Ganglion am praktikabelsten ist und dem Readout während des Experiments am nächsten kommt.

Da beide Varianten keine zufriedenstellende Übereinstimmung aufwiesen, wurden schließlich anhand der experimentellen Gegebenheiten und gewünschten Auswertungen zwei unterschiedliche Methoden für die Experimente an Humandarmresektaten und die Experimente an Humandarmbiopsien gewählt.

Bei den Versuchen an Humandarmresektaten wurde Nikotin lediglich zur Einschätzung der Vitalität der Neurone und die Abgrenzung zu Glia eingesetzt und floss nicht gesondert in die Auswertung ein. Daher wurde für alle Versuche, die an Resektaten durchgeführt wurden, die folgende Methode verwendet: Es wurden jeweils auf Basis des „Frame Subtraction“ Bildes die Neurone bestimmt, die auf Nikotin Applikation mit einem Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$ reagiert hatten (Abbildung 7) und in der Auswertung mit Neuroplex entsprechend markiert. Die Auswertung aller weiteren Applikationen erfolgte ausschließlich auf Basis dieser Markierung, die über die gesamte Dauer der Auswertung beibehalten wurde. Demnach wurden nur Neurone betrachtet, die durch Nikotin stimulierbar waren. Die Anzahl der Neurone aus der Nikotin-Applikation wurde als 100% gesetzt und der prozentuale Anteil antwortender Neurone auf einen anderen Stimulus jeweils relativ dazu berechnet.

Für die Versuche an Humandarmbiopsien war dieses Vorgehen nicht möglich, da Nikotin als Vitalitätsparameter selbst statistisch ausgewertet wurde. Daher wurde hier eine Abwandlung der Methode 1 (siehe 3.1.) zum Einsatz gebracht. Es wurde jeweils die Fläche des Ganglions insgesamt gemessen, so wie diese im RLI-Bild in Neuroplex zu sehen war. Anschließend wurde die Fläche gemessen, die auf einen bestimmten Stimulus mit Calcium Anstieg reagierte. Dies wurde durch ein Subtraktionsbild realisiert (siehe Abbildung 7). Der prozentuale Anteil der Fläche aus der zweiten Messung an der Fläche aus der ersten Messung wurde als „% antwortende Fläche Ganglion“ zur Berechnung des Neuroindex und als separater Parameter für die Aktivität in einem Ganglion verwendet.

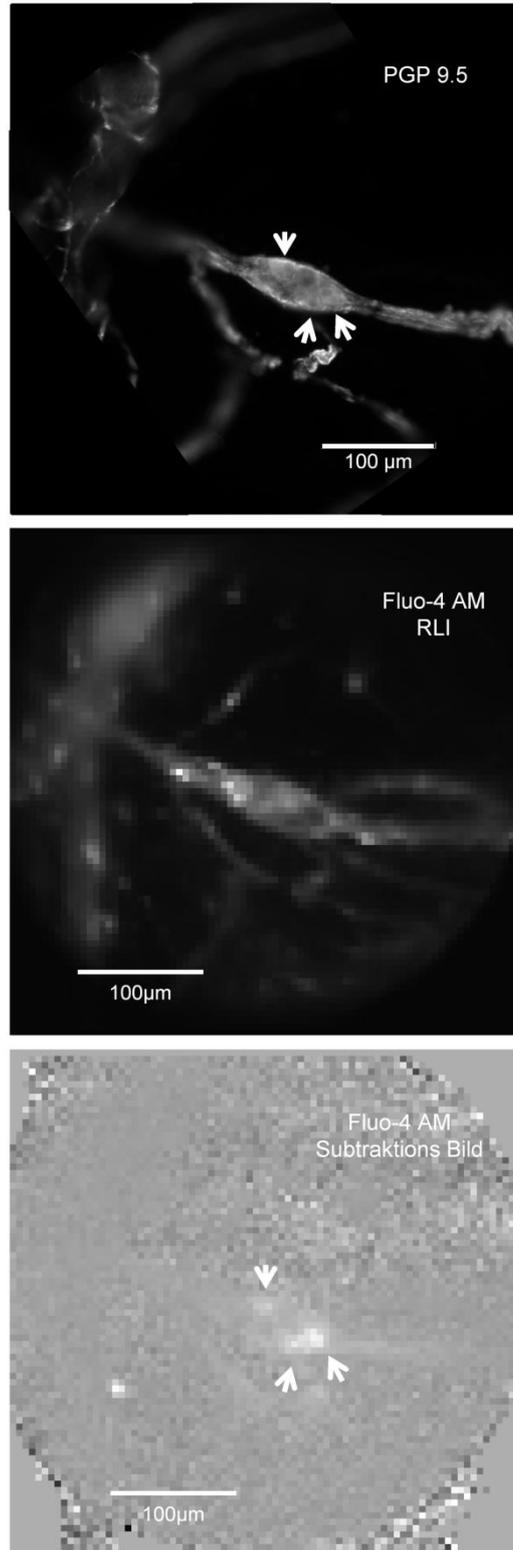


Abbildung 7: Humanes submuköses Ganglion immunhistochemisch mit PGP 9.5 und Fluo-4 AM gefärbt. Dargestellt ist dasselbe Ganglion in immunhistochemischer Färbung (PGP 9.5, oben), mit dem Calcium sensitiven Farbstoff Fluo-4 AM gefärbt (RLI, mittig) und, ebenfalls mit Fluo-4 AM gefärbt, als Subtraktions Bild, welches Bereiche, in denen eine Zunahme der Fluoreszenz stattgefunden hat, heller darstellt (unten). Die Aktivität wurde durch eine 600ms andauernde Applikation von 100µM Nikotin erzeugt. Die weißen Pfeile zeigen die antwortenden Areale, die in der Abbildung PGP 9.5 mit Neuronen übereinstimmen.

Als Auswertparameter stand bei Calcium sensitiven Farbstoffen die intrazelluläre Calcium Konzentration zur Verfügung. Zur Auswertung wurde jeder maximale Anstieg an intrazellulärem Calcium (vergleiche Abbildung 17) durch Markieren aufleuchtender Flächen im Ganglion in Neuroplex abgelesen. Hier wurde jeweils der maximale Wert verwendet, der nach der Stimulation zu messen war. Pro Ganglion wurden alle Werte der ausgewählten Regionen gemittelt und mit dem prozentualen Anteil antwortender Neurone bzw. Fläche multipliziert (=Neuroindex). Die Daten der Experimente mit Humandarmresektaten sind jeweils pro Ganglion angegeben, die der Humandarmbiopsien pro Ganglion oder pro Patient. Hierfür wurde zunächst der Neuroindex (NI) für die einzelnen Ganglien berechnet und anschließend alle NIs pro Patient gemittelt.

Abhängig von der Anzahl der zu vergleichenden Gruppen sowie der Verteilung der Daten wurden unterschiedliche statistische Tests angewendet, um signifikante Unterschiede herauszufinden. Verwendet wurden für nicht-normalverteilte Daten der Mann-Whitney-Test, Wilcoxon Test und der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Test. Für normalverteilte Daten wurden der t-test, der gepaarte t-test und eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Um bei den Versuchen, die sich mit Potenzierung der Antworten durch Proteasen beschäftigen, ein zusätzliches Maß dafür zu haben, ob es sich um eine Addition oder eine synergistische Potenzierung handelt, wurde jeweils ein erwarteter Median (durch Addition der Mediane der Einzel-Applikationen) für Kombinationen errechnet und die experimentell ermittelten Daten gegen diesen mit einem „One sample t-test“ getestet. Potenzierung wird darüber definiert, dass ein Effekt signifikant stärker auftritt, wenn eine weitere Substanz hinzu gegeben wird (Cenac et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wird analog dazu von Potenzierung gesprochen, wenn die ausgelöste neuronale Aktivität einer Kombination aus verschiedenen Substanzen signifikant stärker ist als die Aktivität, die durch jede Einzelsubstanz ausgelöst worden war. Betrachtet werden hierbei alle ausgewerteten Parameter einzeln (Neuroindex, $[Ca^{2+}]$, % antwortende Zellen Ganglion), um zu vermeiden, dass ein Effekt beispielsweise durch die Verrechnung zum Neuroindex verschleiert wird.

Als signifikant wurde ein Ergebnis jeweils für $p < 0,05$ angesehen.

Der Großteil der Daten war nicht normalverteilt und wird daher als Median mit 25% und 75% in Klammern im Text sowie als Median mit 10%, 25%, 75% und 90% als Box-Whisker-Plot grafisch dargestellt. Normalverteilte Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Charakterisierung der Biopsate

Zur quantitativen Charakterisierung der Biopsien wurden Fotos von fixierten Biopsien, die für immunhistochemische Untersuchungen auf einen Objektträger flach aufgebracht worden waren, angefertigt. Mit Hilfe des Programms Fiji (ImageJ) konnte die folgende Messung durchgeführt werden (siehe Abbildung 8):

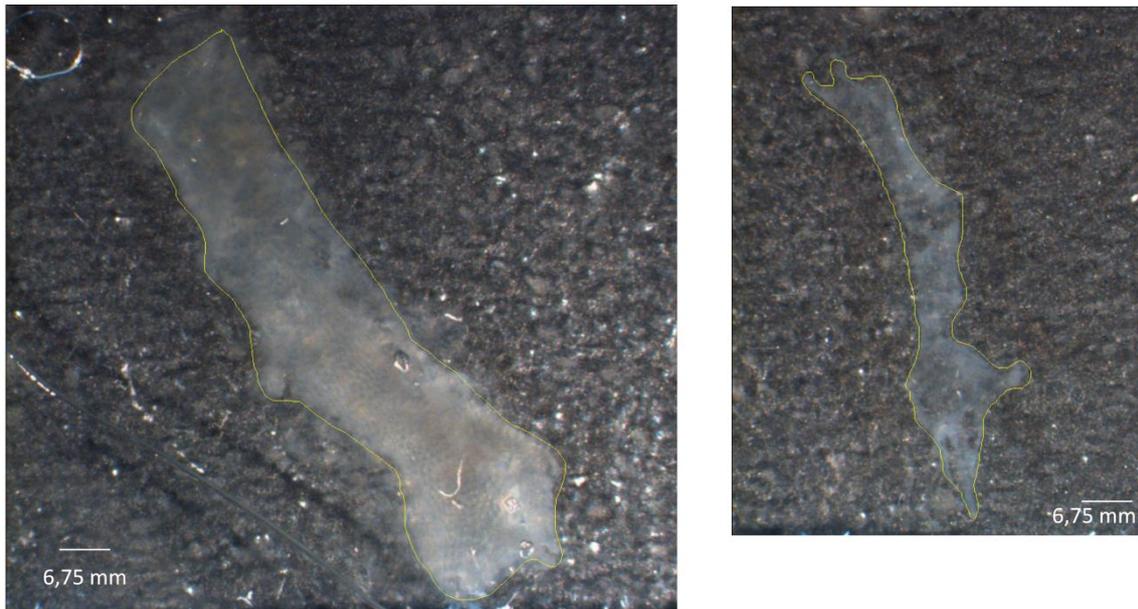


Abbildung 8: Vermessen der Fläche von mukosalem und submukösem Gewebe einer Biopsie. Das linke Bild zeigt den mukosalen Teil einer Biopsie, das rechte den submukösen Anteil. Die gelbe Umrandung stellt die Markierung für das Programm dar. Die somit umkreiste Fläche wird gemessen und vom Programm ausgegeben.

Bestimmt wurde die Fläche in cm^2 . Mit dem Freihand-Zeichentool wurde der Umriss der Biopsie nachgefahren. Anschließend wurde über die Funktion „measure“ die Fläche von dem Programm Fiji bestimmt und angezeigt. Da nur submuköses Gewebe für die Versuche verwendet werden konnte, wurde dieses getrennt vermessen und analysiert.

Online-Fragebogen

Der Online-Fragebogen wurde von Mitarbeitern der Universität Tübingen gebaut und gepflegt. Er wurde in Kooperation mit der Universität Tübingen verwendet. Personen, die sich bereit erklärt hatten, Biopsien zur Untersuchung abzugeben, wurden gebeten, diesen Online-Fragebogen auszufüllen. Dieser lag in zwei unterschiedlichen Formen vor, einmal für Reizdarmpatienten und einmal für gesunde Kontrollen. Beide Varianten prüfen die ROME III Kriterien für RDS ab (Drossman 2006). Die Variante für RDS-Patienten enthielt darüber hinaus noch weitere spezifische Fragen zur Erkrankung der Patienten. Abbildungen des Fragebogens befinden sich im Anhang (Abbildung 37).

Die Auswertung des Fragebogens erfolgte über einen Export der Daten aus der Datenbank. Diese konnten in einer Excel-Datei geöffnet und durch festgelegte Bedingungen, die den Vorgaben zur Auswertung des Selbstauskunftsbogen für RDS nach ROME III entsprach (siehe Abbildung 36) in Excel direkt ausgewertet werden. Für die vorliegende Studie wurden lediglich die Informationen bezüglich der körperlichen Beschwerden ausgewertet. Die Daten zur Charakterisierung des psychologischen Zustands der Teilnehmer wurden nicht berücksichtigt. Auch blieb der Teil für RDS Patienten, der sich mit dem Postinfektiösen RDS beschäftigt, bislang unbeachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche zur Bearbeitung der Fragestellungen und Optimierung der Methoden

3.1.1. Vorversuche zur Ermittlung einer repräsentativen Möglichkeit der Auswertung von neuronaler Aktivität bei Calcium imaging Versuchen

Aufgrund der Problematik, dass in Calcium imaging Versuchen die Anzahl an Neuronen pro Ganglion nicht direkt aus der Aufnahme während des Versuchs abzulesen ist, wurde in Vorversuchen nach einer alternativen Methode gesucht. Es wurden zwei Ansätze getestet:

1. Korrelation zwischen gemessener Fläche des Ganglions und Anzahl der Neurone im Ganglion, die durch die Färbung mit dem neuronalen Marker PGP 9.5 identifiziert wurden.
2. Korrelation zwischen Anzahl Neurone, die während des Experiments nach Applikation von Nikotin gezählt wurden, und Neurone, die anhand der immunhistochemischen Färbung mit dem neuronalen Marker PGP 9.5 gezählt wurden.

Hinter Ansatz 1 steht die Hypothese, dass über die messbare Fläche des Ganglions auf die Anzahl darin befindlicher Neurone geschlossen werden kann. Um dies zu testen, wurde zunächst die Fläche von 17 Ganglien in humanen Darmresektaten von 3 Patienten in immunhistochemischen Färbungen mit PGP 9.5 sowie die selben Ganglien in den Bildern, die aus Neuroplex exportiert wurden, vermessen und gepaart getestet, um zu sehen, ob sich die gemessenen Flächen aus beiden Bildern signifikant unterscheiden. Die Messung fand nach dem gleichen Prinzip statt wie bei der Flächen Messung der ganzen Biopsie (siehe Abbildung 8). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Flächen, die in den immunhistochemisch gefärbten Bildern gemessen wurden ($4915 \pm 3266 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu den RLI Bildern von Neuroplex ($4678 \pm 2929 \mu\text{m}^2$; $p=0,417$). Der Test auf Korrelation zwischen der gemessenen Fläche aus den Neuroplex Bildern mit der Anzahl an Neuronen, die in diesen Ganglien in der immunhistochemischen Färbung gezählt worden waren, ergab keine Korrelation ($p=0,522$; $r=0,167$).

Für Ansatz 2 wurde die Hypothese getestet, dass über die Antwort auf den Stimulus Nikotin die Anzahl an Nervenzellen pro Ganglion gezählt werden kann. Hierfür wurden mit Hilfe einer Einzelbild Subtraktion (siehe Abbildung 7) die Neurone gezählt, die auf den Stimulus Nikotin mit einer Erhöhung des intrazellulären Calcium und damit einhergehend einer Erhöhung der Fluoreszenz reagierten. Bei dem Subtraktions Bild handelt es sich um ein Bild, welches das Programm Neuroplex erstellen kann, indem ein manuell gewähltes Einzelbild von Einzelbild 1 subtrahiert wird. Im resultierenden Bild lassen sich aktivierte Zellen aufgrund ihrer Form

und Größe identifizieren. Als Stimulus zur Visualisierung der Neurone wurde jeweils die Nikotin Applikation verwendet, die als Vitalitätstest für jedes Ganglion erfolgt war. Im humanen submukösen Plexus konnten $98,7 \pm 2,4\%$ der Zellen in immunhistochemischen Färbungen mit einem primären Antikörper gegen nAChR gefärbt werden, während $79 \pm 20\%$ auf DMPP (Dimethylphenylpiperazin, ein spezifischer Agonist für nAChR) antworteten (persönliche Mitteilung Dr. Klaus Michel). Die ermittelte Anzahl an Neuronen pro Ganglion, die über das Subtraktions Bild gezählt worden war, war signifikant und um etwa 30% niedriger als die aus den immunhistochemischen Färbungen gezählte Anzahl an Neuronen (4 Neurone pro Ganglion gegen 6 Neurone pro Ganglion, $p=0,002$). Wie Abbildung 7 zeigt, stimmt der Bereich, in dem eine Antwort auf Nikotin gemessen werden konnte mit den Bereichen überein, in denen in der immunhistochemischen Färbung Neurone sichtbar sind. Die Tatsache, dass die Anzahl deutlich geringer ist als die wirklich vorhandenen Neurone kann entweder daraus resultieren, dass die Antwortstärke mancher Neurone zu gering war oder dass Neurone sehr dicht nebeneinander lagen und daher nicht als unterschiedliche Zellen wahrgenommen werden konnten (siehe Anhang Abbildung 40). Die absolute Anzahl der Neurone ist zwar damit in dieser Zählweise unterrepräsentiert, lässt aber die Identifikation tatsächlich vorhandener Neurone innerhalb des Ganglions zu. Für die Versuche an Humandarmresektaten wurde in der vorliegenden Arbeit diese Methode für die Auswertung verwendet.

3.1.2. Vorversuche zur Etablierung der Neuroimaging Methode für Biopsien aus dem humanen *Colon sigmoideum*

Vorversuche zur Ableitung von neuronaler Aktivität an humanen intestinalen Biopsien wurden an einem inversen Mikroskop durchgeführt. Dafür wurden Biopsien von insgesamt 42 Personen verwendet, von denen bei 20 Personen (48%) submuköses Gewebe in mindestens einer Biopsie enthalten war. Es wurden Versuche mit Fluo-4 AM, Fluo-2 LR AM und di-8-ANEPPS durchgeführt. Für Versuche mit $10\mu\text{M}$ Fluo-4 AM, was dem Protokoll entspricht, welches im weiteren Verlauf verwendet wurde, konnten vitale Ganglien in insgesamt 1 von 8 Geweben (= 12,5%) gefunden werden. Für ein Protokoll, bei dem $5\mu\text{M}$ Fluo-4 AM verwendet worden waren, konnten in 2 von 5 Geweben (40%) Ganglien gefunden werden, die stimulierbar waren. In 1 von 7 Geweben (14%), die mit Fluo-2 LR AM gefärbt worden waren, konnte ein positiver Vitalitätstest verbucht werden. In 1 Gewebe von 4 (25%), die zusätzlich zu der Färbung mit Fluo-2 LR AM auch mit di-8-ANEPPS gefärbt worden waren, konnten Aktionspotentiale abgeleitet werden. Die geringen Erfolgsquoten sind hauptsächlich dadurch begründet, dass die technische Machbarkeit nicht gegeben war, da die SMP Stücke zu klein waren, um sie auf einen dafür vorgesehenen Ring zu spannen. Dies hatte zum einen zur Folge, dass die Gewebe nicht ausreichend gespannt waren und zum anderen war durch die Anbringung auf dem Ring nur ein geringer Bereich des Gewebes

zugänglich. Auch die Verwendung von Schalen mit Sylgard-beschichtetem Boden brachten keine Verbesserung, da meist der Boden dicker als 0,1mm und damit der Abstand zu groß war, um das darauf festgesteckte Gewebe scharf stellen zu können.

Um zum einen diese Problematik zu lösen und zum anderen die Möglichkeit zu gewähren, Aufnahmen mit Mukosa und SMP gemeinsam durchzuführen und dadurch die Präparation so gering wie nur möglich zu halten, fand der Wechsel auf ein aufrechtes Mikroskop statt. Zur Etablierung der Methode an diesem Mikroskop wurden insgesamt Biopsien von 88 Personen verwendet. Biopsien von 37 Personen (42%) wurden für Versuche verwendet, während die der verbleibenden 51 zu oberflächlich waren. Es wurde hauptsächlich Fluo-2 LR AM als Calcium Farbstoff getestet. Es konnte kein positiver Vitalitätstest durchgeführt werden. Aufgrund dieser Datenlage wurde die Verwendung des Farbstoffs Fluo-2 LR AM für Biopsien eingestellt und stattdessen das Protokoll mit 10 μ M Fluo-4 AM und 500 μ M Probenecid in der Krebslösung verwendet. Dies führte zu Ableitungen in Gewebeproben von 78 von 176 Teilnehmern, was einer Erfolgsquote von 44% entsprach. Insgesamt waren für die durchgeführte Studie zum Reizdarmsyndrom Proben von 296 Personen gesammelt worden. Proben von 120 Teilnehmern konnten aufgrund fehlenden neuronalen Gewebes nicht verwendet werden (Erfolgsrate: 59%). Die Ergebnisse der Studie finden sich unter 3.2.

Es wurden neben Calcium sensitiven Farbstoffen auch diverse Protokolle mit dem spannungssensitiven Farbstoff di-8-ANEPPS verwendet, um die Ganglien zu färben. Getestet wurde die Inkubation mit di-8-ANEPPS sowie die lokale Applikation auf ein einzelnes Ganglion, so wie von Neunlist et al. (1999) beschrieben. Des Weiteren wurde die Injektion in einen Faserstrang (so genannte *intraganglionic injection*) verwendet (Michel et al. 2005). Da eine Doppel-Färbung mit Fluo-4 AM möglich ist (Michel et al. 2011), konnte jeweils die Vitalität durch eine Aufnahme im Fluoreszenzbereich des Calcium sensitiven Farbstoffs sichergestellt werden. Während die Inkubation und auch die lokale Applikation von di-8-ANEPPS zu keiner messbaren Antwort führte, wahrscheinlich aufgrund der starken Hintergrundfluoreszenz durch die Mukosa, stellte das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis auch bei den wenigen erfolgreichen Färbungen mit *intraganglionic injection* das Hauptproblem dar. In Abbildung 9 sieht man ein solches gefärbtes Ganglion und ein nicht repräsentatives (da eines der besten) Signal nach Nikotin Applikation. Bei einem Großteil der Versuche war das Signal-Rausch-Verhältnis nicht ausreichend, um zweifelsfrei Aktionspotentiale von Störungen zu unterscheiden, auch konnten häufig gar keine Messungen durchgeführt werden, da die Färbung nicht ausreichend war. Es konnte daher keine Auswertung für den spannungssensitiven Farbstoff erstellt werden.

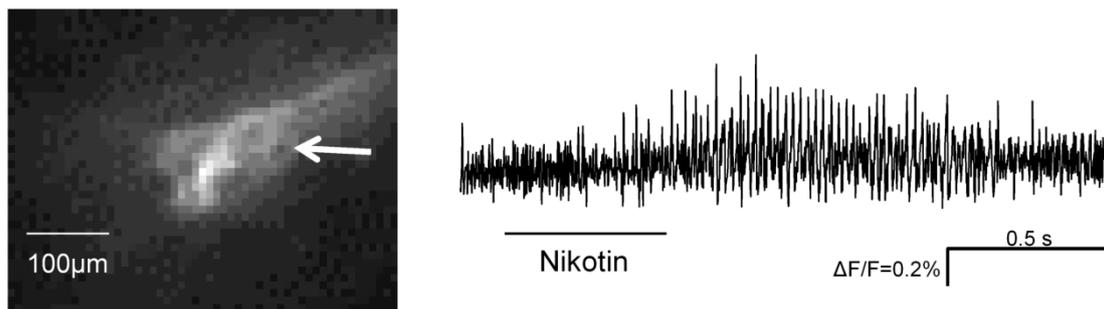


Abbildung 9: Humanes submuköses Ganglion aus einer Biopsie mit di-8-ANEPPS gefärbt und Beispieltrace nach Applikation von Nikotin. Das Bild zeigt ein Ganglion des humanen submukösen Plexus. Es wurde mittels Injektion von di-8-ANEPPS gefärbt. Der Beispieltrace stammt von der mit dem Pfeil markierten Zelle. Der Trace wurde mit einem Bandpassfilter 9.9Hz – 298.9 Hz gefiltert.

Alle weiteren Analysen bezüglich der Biopsien beziehen sich ausschließlich auf die Versuche, die mit dem aufrechten Mikroskop und dem Calcium Imaging Protokoll mit 10µM Fluo-4 AM durchgeführt worden waren.

3.1.3. Erste Versuche zur Rolle von TNF- α bezüglich der nervenaktivierenden Wirkung von RDS-Überständen

Hughes et al. (2013a) beschrieb eine signifikante Reduktion der sensibilisierenden Wirkung von PBMC Überständen von RDS-D Patienten auf sensorische Neurone der Maus durch den TNF- α bindenden Antikörper Infliximab. Dieser Beitrag von TNF- α zur neuronalen Aktivierung sollte mit Hilfe des humanen Antikörpers Adalimumab an enterischen Neuronen getestet werden.

Adalimumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper gegen das humane TNF- α . Dementsprechend sollte er in Gewebe von Meerschweinchen keine Bindungen eingehen und selbst keine aktivierende Wirkung aufweisen. Um dies zu testen wurden Färbungen an fixiertem SMP und MP des Meerschweinchen Colons durchgeführt. Es konnte keine spezifische Färbung festgestellt werden (Beispiele siehe Abbildung 10).

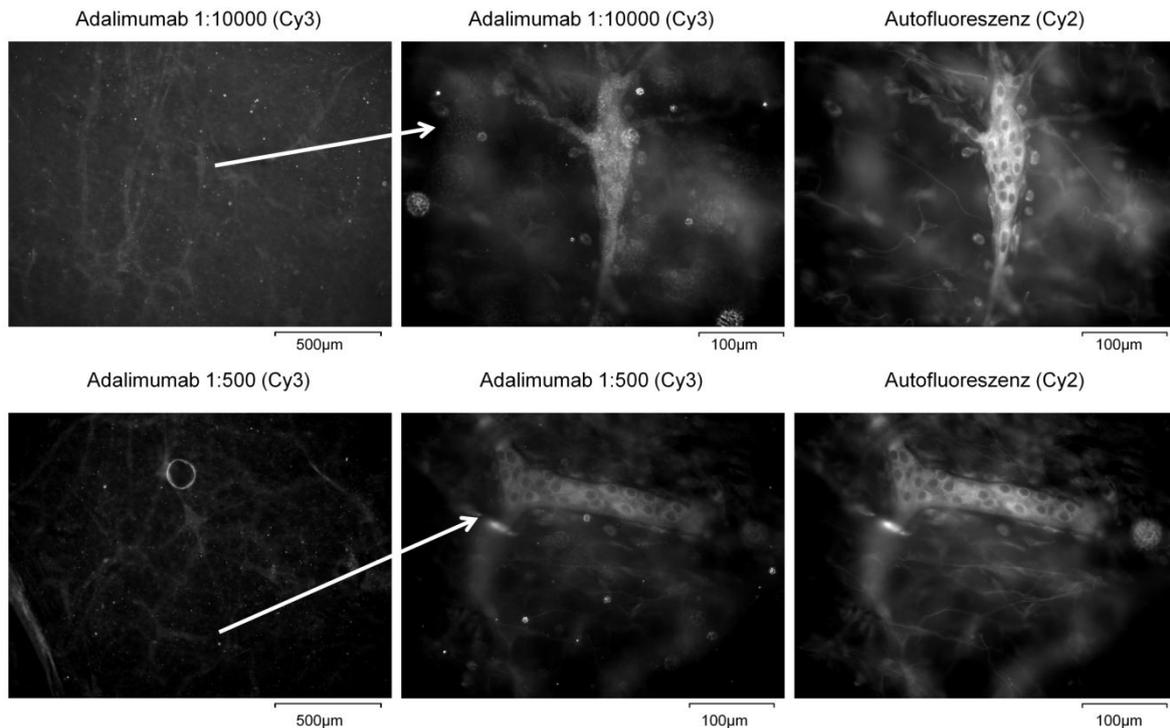


Abbildung 10: Inkubation von Meerschweinchen SMP mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Adalimumab. Das Gewebe wurde mit Adalimumab in der Verdünnung 1:10000 (Bildreihe oben) und 1:500 (Bildreihe unten) inkubiert. Adalimumab als primärer Antikörper wurde mit einem Cy3 Antikörper markiert. Das Übersichtsbild zeigt keine spezifische Bindung. Auch das Ganglion, welches in höherer Vergrößerung gezeigt wird (weißer Pfeil) weist keine spezifische Färbung auf. Zum Vergleich wurde die Fluoreszenz für die Wellenlänge von Cy2 getestet. Da sich keine Cy2 Antikörper in dem Präparat befinden, handelt es sich hierbei vermutlich um unspezifische Autofluoreszenz des Gewebes.

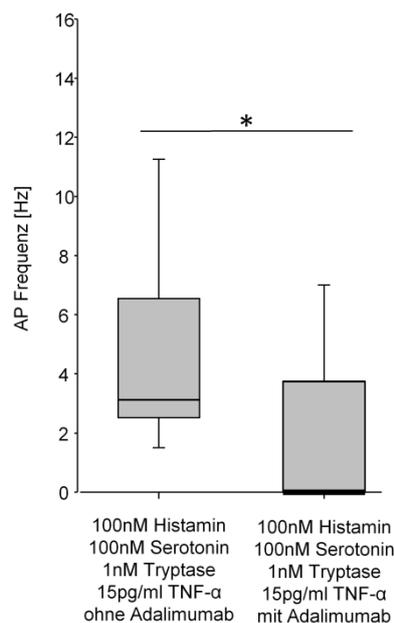
Um die Ergebnisse aus der immunhistologischen Färbung zu verifizieren, wurde die Wirkung einer 600ms dauernden Spritzapplikation von 100µg/ml Adalimumab getestet, was einer etwa 20fach höheren Konzentration entspricht als im Körper durch Verabreichung des Arzneimittels Humira® entstehen kann (Mease 2007). Die Applikation zeigte keine aktivierende Wirkung (n=1 GP/2 Ganglien/13 Zellen)

Um eine potentielle Beeinflussung neuronaler Aktivität auszuschließen, wurde eine Lösung appliziert, die neben 100µg/ml Adalimumab auch 100µM Nikotin enthielt. Die Wirkung wurde gepaart pro Neuron gegen die Aktivierung von 100µM Nikotin getestet. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Neuroindices für Nikotin und Nikotin + Adalimumab (385 ± 291 und 431 ± 341 ; $p=0,676$; n=1 GP/3 Ganglien/21 Neurone).

Um zu testen, ob die Inkubation einer Lösung, die TNF- α enthält, mit Adalimumab dazu führt, dass TNF- α eliminiert beziehungsweise dessen Wirksamkeit verringert wird, wurde die kontrollierte Lösung, die als RDS Mediator Cocktail bezeichnet wird und aus 1µM Histamin/1µM Serotonin/10nM Tryptase und 150pg/ml TNF- α besteht, mit 50µg/ml Adalimumab oder mit einem entsprechenden Volumen von reiner Krebslösung inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen gepaart randomisiert auf submuköse Ganglien von

Präparaten aus Meerschweinchen Colon appliziert. Zuvor war in zwei Geweben und 3 Ganglien (6 Neurone) getestet worden, ob die Applikation des Mediator Cocktails reproduzierbar war. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Applikation (2,1Hz (1,4/5) und 5,4Hz (0/9); $p=0,313$). Die Applikation der beiden Lösungen erfolgte dennoch in zufällig abwechselnder Reihenfolge, so dass bei drei Ganglien der Mediator Cocktail ohne und bei 4 Ganglien der Mediator Cocktail mit Adalimumab zuerst auf das Ganglion appliziert wurde.

Dabei zeigte sich eine signifikant reduzierte Aktionspotenzialfrequenz nach Applikation des RDS Mediator Cocktails mit Adalimumab im Vergleich zu dem Mediator Cocktail ohne Adalimumab (3,1Hz (2,5/6,6) und 0Hz (0/3,8); $p<0,001$; $n=3$ GP/7 Ganglien/33 Neurone) (Abbildung 11). Es wurden hier jeweils die einzelnen Neurone gepaart gegeneinander getestet. Aufgrund dessen wird kein Neuroindex angegeben. Der Anteil antwortender Zellen pro Ganglion reduzierte sich durch die Zugabe von Adalimumab von $31,1\% \pm 10,8\%$ auf $16,4\% \pm 13,5\%$, erreichte im gepaarten t-test aber keine Signifikanz ($p=0,1$).

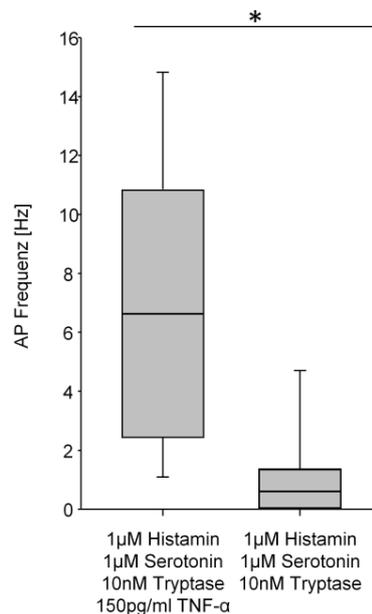


3/7/33

Abbildung 11: Applikation des RDS-Mediator Cocktails mit und ohne Adalimumab. Der Mediator Cocktail wurde 1:10 entweder mit 50 μ g/ml Adalimumab in Krebslösung oder mit purer Krebslösung inkubiert und randomisiert gepaart auf submuköse Ganglien des Meerschweinchen Colons appliziert. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der ausgelösten AP Frequenz ($p<0,001$)

Um sicherzustellen, dass die Bindung von TNF- α an den Antikörper zu der Reduktion der Aktivität geführt hat, wurde als Gegenprobe der RDS Mediator Cocktail gegen den RDS Mediator Cocktail ohne TNF- α in der gleichen Weise getestet. Die Aktionspotential Frequenz induziert durch die Applikation des Mediator Cocktails ohne TNF- α war signifikant reduziert

im Vergleich zu dem Mediator Cocktail mit TNF- α (RDS-Mediator Cocktail: 6,7Hz (2,4/10,8) und RDS-Mediator Cocktail ohne TNF- α : 0,6Hz (0/1,4); $p < 0,001$; $n = 3$ GP/6 Ganglien/18 Neurone; Abbildung 12).



3/6/18

Abbildung 12: Applikation des RDS-Mediator Cocktails mit und ohne TNF- α . Der Mediator Cocktail wurde entweder in seiner ursprünglichen Form (mit TNF- α) oder ohne TNF- α randomisiert gepaart auf submuköse Ganglien des Meerschweinchen Colons appliziert. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der ausgelösten AP Frequenz ($p < 0,001$)

Vergleicht man die beiden Versuchsansätze im Hinblick auf die induzierte Aktionspotenzial Frequenz durch den Mediator Cocktail, fällt auf, dass diese im zuletzt beschriebenen Experiment im median fast doppelt so hoch war wie im zuvor beschriebenen Aufbau. Hierbei muss man berücksichtigen, dass im Versuchsaufbau mit Adalimumab der RDS-Mediator Cocktail 1:10 verdünnt wurde, entweder mit Krebslösung, die Adalimumab enthielt oder mit purer Krebslösung, und dadurch eine geringere Konzentration der Mediatoren enthält. Diese Verdünnung findet im zweiten beschriebenen Experiment nicht statt.

3.1.4. Die neuronale Aktivität durch Trypsin ist PAR1 vermittelt

Trypsin ist eine Serin-Protease, die im Magen-Darm-Trakt häufig vorkommt. Sie ist bekannt als PAR2 Aktivator in unterschiedlichen Geweben und Zellarten, wird aber auch manchmal als PAR1 aktivierend beschrieben (Ikehara et al. 2012; Vergnolle 2005; Kwong et al. 2010). Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob Trypsin PAR-Rezeptoren auf enterischen Neuronen aktivieren kann und ob diese Aktivität über den PAR1 Rezeptor vermittelt ist.

Um ein Applikationsprotokoll zu etablieren, das verlässlich zu Nervenaktivität führt, wurden unterschiedliche Längen der Spritzapplikation getestet. Als sehr zuverlässig erwies sich eine

Spritzdauer von 10s bei einer Konzentration von 100nM Trypsin in der Spritzpipette. Dadurch wurde ein Median des Neuroindex von 3768 (1737/5312) erreicht. Der $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg betrug im Median 38% (18/53) bei 100% (96/100) antwortenden Zellen pro Ganglion. Diese Aktivierung durch die Applikation von Trypsin wurde für alle Parameter signifikant durch die Perfusion mit dem PAR1 Antagonisten SCH79797 (5 μ M) reduziert (NI: 151 (0/327); $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg: 5% (0/16); Antwortende Zellen pro Ganglion: 20% (0/29); jeweils $p < 0,001$; Abbildung 13).

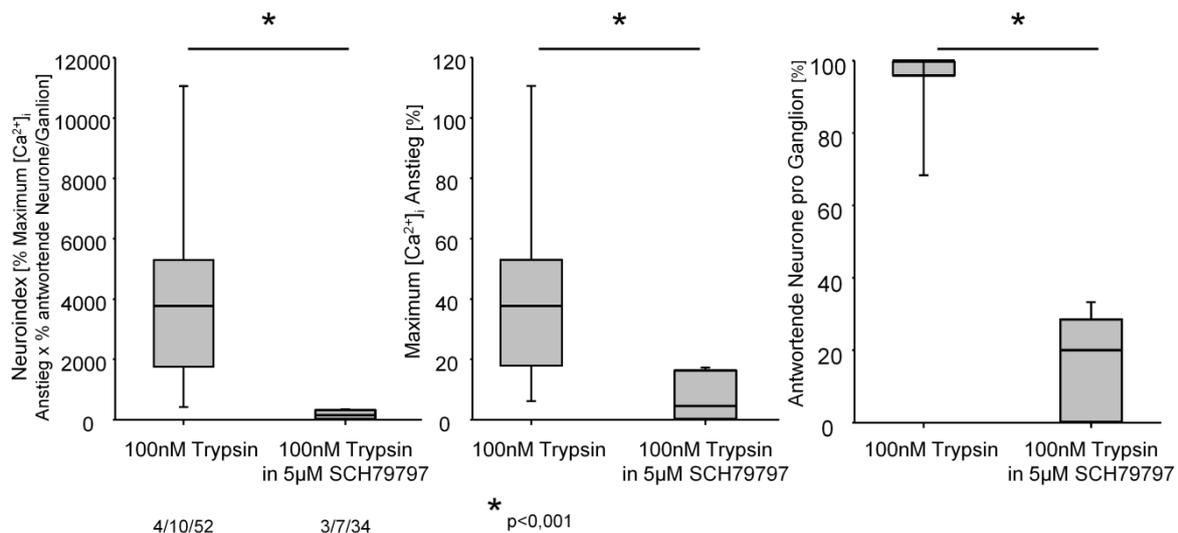


Abbildung 13: Effekt von Trypsin auf humane submuköse Ganglien. Die Applikation von Trypsin führte zu einer deutlichen Aktivierung eines Großteils der Neurone in den getesteten Ganglien. Diese Aktivität wurde durch die Perfusion von 5 μ M SCH79797 (PAR1 Blocker) signifikant reduziert.

3.1.5. Neutrophile Elastase deaktiviert PAR1 Rezeptoren

Die Applikation von neutrophiler Elastase auf enterische Ganglien des humanen submukösen Plexus zeigte, unabhängig von Konzentration und Dauer der Applikation (100nM - 2 μ M; 600ms – 10s), keine reproduzierbare Aktivierung. In 7 Humandarmresektaten (21 Ganglien) konnte ein Calcium Anstieg in 10 submukösen Ganglien jeweils in 1 bis 2 Zellen pro Ganglion nach Applikation von verschiedenen Konzentrationen von neutrophiler Elastase gemessen werden. Diese zeigten keinen Zusammenhang mit der Konzentration oder Länge der Applikation (keine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit). Es handelte sich dabei häufig um sehr spät auftretende, kurze Peaks (etwa 20-40 Sekunden nach Ende der Applikation, siehe Abbildung 14). Es könnte sich dabei entweder um eine späte Aktivierung durch die Applikation der neutrophilen Elastase handeln, oder um spontane Aktivität der Zellen. In weiteren 4 Humandarmresektaten (10 Ganglien) konnte keinerlei Aktivierung gemessen werden.

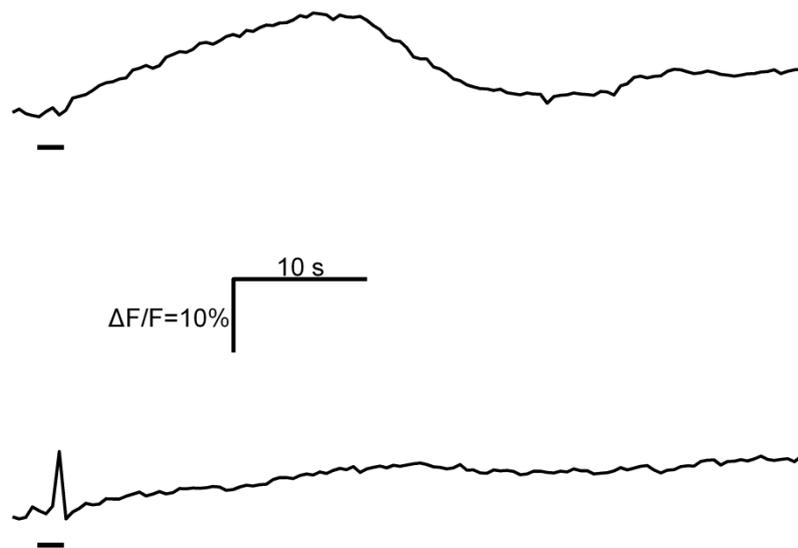


Abbildung 14: Beispielsignale für eine 2s dauernde Applikation von 100nM neutrophiler Elastase. Die obere Bildspur zeigt einen deutlichen Peak und einen weiteren Anstieg zum Ende der Aufnahme. Diese Art der Antwort zeigte sich in je 1 bis 2 Zellen von 10 Ganglien. In der unteren Bildspur sieht man eine konstant steigende Linie. Diese Art der Aktivität zeigte sich häufig in den übrigen Neuronen der Ganglien, in denen mindestens 1 Zelle mit einem Calcium Peak geantwortet hatte. Vermutlich handelt es sich dabei um eine spontane Aktivität oder ein technisches Phänomen.

Diese Beobachtungen decken sich mit der von anderen Arbeitsgruppen, die keinen signifikanten Calcium Einstrom nach Applikation von neutrophiler Elastase detektieren konnten (Mihara et al. 2013; Ramachandran et al. 2011). Stattdessen berichten diese Arbeitsgruppen eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege sowie Deaktivierung des PAR1 und PAR2 Rezeptors durch neutrophile Elastase aufgrund von „disarming“ des Rezeptors. Die neutrophile Elastase schneidet den Ligand an einer Stelle, die unterschiedlich ist von derjenigen, die den Ligand freisetzen kann. Dadurch wird verhindert, dass eine andere Protease, beispielsweise Thrombin, an der richtigen Stelle schneiden und den Rezeptor damit aktivieren kann. Dömötör et al. (2002) berichten dieses Phänomen des disarming ebenfalls für kultivierte Epithelzellen aus Kapillaren des Rattenhirns. Anders als die oben erwähnten Studien konnten sie schwache aber deutliche Calcium Antworten auf den Stimulus neutrophile Elastase verzeichnen, ohne jedoch den Mechanismus dafür näher zu beschreiben.

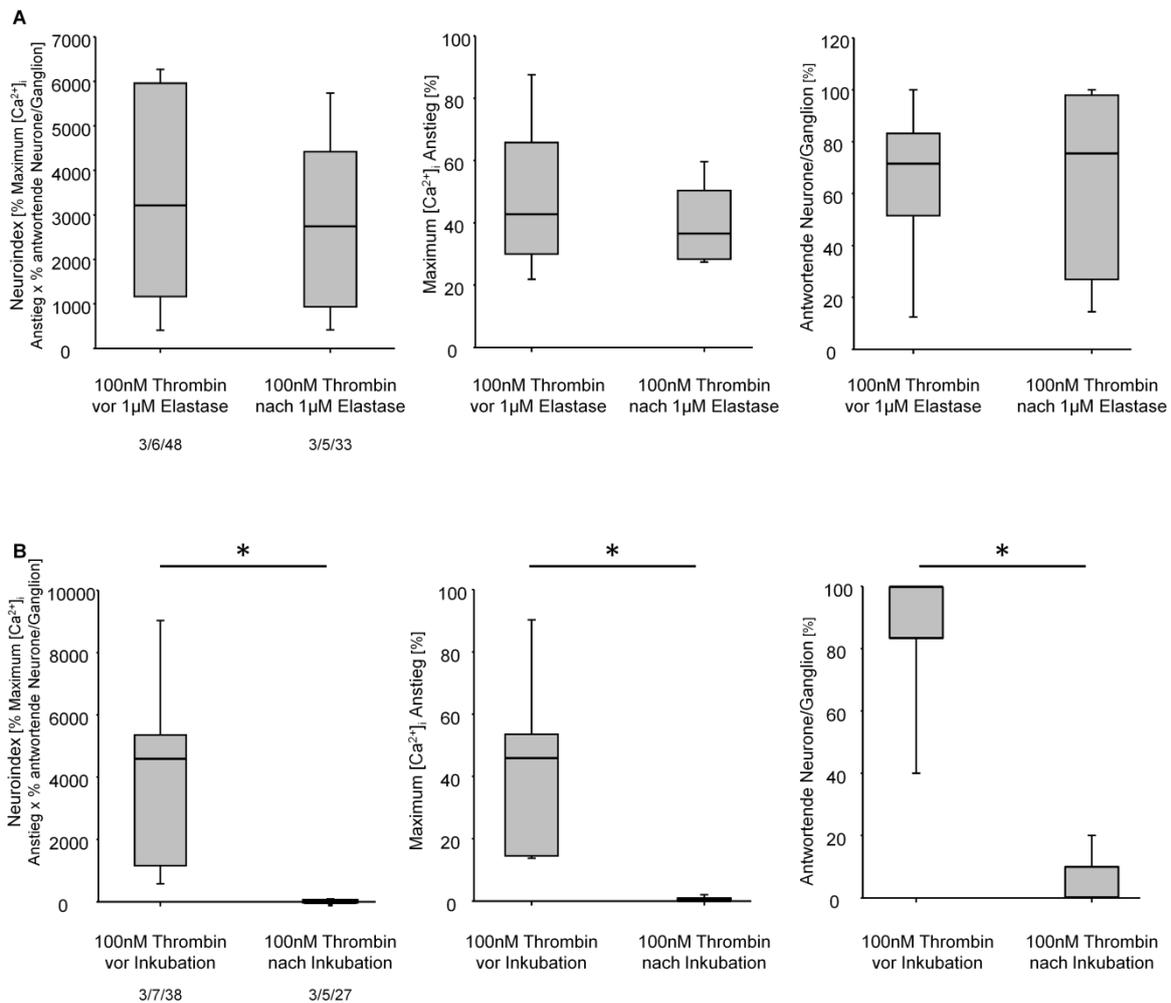


Abbildung 15: Die Wirkung von neutrophiler Elastase auf den PAR1 Rezeptor im humanen submukösen Gewebe. (A) Es wurde getestet, ob eine Applikation von Thrombin nach der Applikation von neutrophiler Elastase die gleiche Wirkung zeigt, wie vor der Applikation von neutrophiler Elastase. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Applikationen (NI: $p=0,616$; $[Ca^{2+}]_i$: $p=0,476$; antwortende Zellen: $p=0,954$). (B) Nach 20 minütiger Inkubation mit $2\mu M$ neutrophiler Elastase hingegen zeigte sich eine deutliche Reduktion der Antwort auf Thrombin (NI: $p=0,003$; $[Ca^{2+}]_i$: $p=0,003$; antwortende Zellen: $p=0,003$).

Es sollte getestet werden, ob die neutrophile Elastase auch den von humanen submukösen Ganglien exprimierten PAR1 Rezeptor inaktivieren kann. Dazu wurde zunächst getestet, ob eine Applikation von Thrombin nach der Applikation von neutrophiler Elastase noch zu einer Aktivierung führt. Es zeigte sich keine Reduktion der Nervenaktivität induziert durch Thrombin im Vergleich zu einer Applikation von Thrombin ohne vorherige neutrophile Elastase Applikation (Thrombin vor Elastase: 3396 ± 2404 und Thrombin nach Elastase: 2690 ± 2014 ; $p=0,616$). Um sicherzustellen, dass ausreichend PAR-Rezeptoren deaktiviert werden konnten, um einen Unterschied feststellen zu können, wurden Gewebestücke mit neutrophiler Elastase inkubiert. Die Thrombin Applikation vor und nach der Inkubation wurde verglichen. Während vor der Inkubation Thrombin einen medianen $[Ca^{2+}]_i$ von 46% (14/54) in 100% (83/100) der Neurone pro Ganglion (Neuroindex: 4589 (1144/5367)) induzierte, war diese Aktivität nahezu komplett blockiert nach der Inkubation mit neutrophiler Elastase

($[Ca^{2+}]_i$: 0% (0/1); Antwortende Neurone: 0% (0/10); Neuroindex: 0 (0/20); jeweils $p=0,003$). Um sicherzustellen, dass die Ganglien durch die Inkubation mit neutrophiler Elastase nicht beschädigt wurden, wurde auch die Antwort auf Nikotin vorher und nachher verglichen. Der $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg war nicht unterschiedlich vor (28% (21/49)) und nach (27% (18/48)) der Inkubation mit neutrophiler Elastase ($p=0,931$). Da Nikotin bei diesen Versuchen als 100% für die antwortenden Neurone pro Ganglion gesetzt wurde, wurde hierfür kein Neuroindex berechnet. Um dennoch ein Maß dafür zu haben, ob signifikant weniger Neurone nach der Inkubation auf Nikotin antworten, wurde die Anzahl antwortender Neurone pro Ganglion vor und nach der Inkubation gezählt. Diese unterschied sich nicht signifikant (5 (3/7) Zellen vor gegen 4 (3,5/8) Zellen nach der Inkubation; $p=1$).

3.2. Untersuchungen zur Aktivität von Neuronen in Humandarmbiopsien

Um die Auswirkungen von Erkrankungen des Gastrointestinal Trakts auf das enterische Nervensystem untersuchen zu können, sollte die Neuroimaging Technik für humane intestinale Biopsien angepasst und etabliert werden. Cirillo et al. (2013) wendete diese Technik für Biopsien aus dem Duodenum und Versuche ohne Mukosa an. In der vorliegenden Arbeit sollten im Gegensatz dazu Biopsien aus dem Bereich des *Colon sigmoideum* verwendet werden, welche ohne Entfernen der Mukosa im Versuch eingesetzt werden sollten. Nach erfolgreicher Etablierung der Methode sollte diese eingesetzt werden, um die Nervenaktivität enterischer Neurone in Biopsien von Kontrollpersonen mit der von Reizdarmpatienten zu vergleichen.

Um die Langzeitwirkung von Mediatoren im Darm von Reizdarmpatienten auf das enterische Nervensystem auch unter kontrollierten Bedingungen am Modelltier zu testen, wurden Experimente mit kultiviertem Meerschweinchengewebe durchgeführt. Dieses wurde über Nacht entweder mit einem Schleimhautüberstand von Reizdarmpatienten oder von gesunden Kontrollpersonen inkubiert.

3.2.1. Mit Routinebiopsien kann submuköser Plexus gewonnen werden

Routinebiopsien aus dem Colon oder Rektum werden in immunhistochemischen Untersuchungen zu verschiedenen Krankheiten, wie beispielsweise Parkinson, verwendet, die eine Auswirkung auf den submukösen Plexus haben (Pouclet et al. 2012; Lebouvier et al. 2010; Lebouvier et al. 2009). In diesen Studien wurde gezeigt, dass sich in den Stücken, die mit Hilfe einer Biopsiezange während einer Endoskopie aus dem Darm entnommen werden, submuköse Ganglien finden lassen. Nach dieser Technik wurden auch die Biopsien der vorliegenden Studie im Sigma entnommen, um an ihnen mit Calcium Imaging Nervenaktivität zu messen.

Insgesamt erklärten sich 190 Personen als Kontrollen und 106 Personen mit Reizdarmsyndrom bereit, sich vier Biopsien für die Studie entnehmen zu lassen. Aus der Gruppe der potentiellen Kontrollen mussten 79 Personen direkt ausgeschlossen werden, da sich in keiner der entnommenen Biopsien submuköses Gewebe (vgl. Abbildung 2) befand. In manchen Fällen kam es vor, dass die *muscularis mucosae* enthalten, aber keine tiefere Schicht vorhanden war. Auch in derartigen Gewebeproben fanden sich manchmal einzelne Ganglien, diese waren aber stark beschädigt und nicht für das Neuroimaging geeignet. Weitere 67 Teilnehmer konnten nicht in die Analyse aufgenommen werden, da sich kein stimulierbares Ganglion, welches auf mindestens einen der drei Stimuli (Nikotin, elektrische Stimulation, Mediator Cocktail) reagierte, finden ließ. Da von 26 Teilnehmern nicht ausreichend Informationen vorlagen bzw. ungeklärte Symptome beschrieben worden waren, konnten schließlich nur 17 Personen (58 ± 11 Jahre; 7 Frauen und 10 Männer) als verifizierte gesunde Kontrollen (HC) in die Analyse eingeschlossen werden. Ein Patient, der sich als Kontrollperson angeboten hatte, wurde aufgrund der Angaben im Fragebogen und späterer Konfirmation durch den behandelnden Arzt als RDS Patient identifiziert und in diese Gruppe übernommen. Aus der Gruppe der RDS Patienten mussten 41 Personen direkt ausgeschlossen werden, da sich kein submuköses Gewebe in den Biopsien befand und 29 weitere konnten nicht in die Analyse aufgenommen werden, da sich kein einziges stimulierbares Ganglion in den Gewebeproben befand. Aus der Gruppe der RDS Patienten konnten 2 Personen nicht weiter eingeschlossen werden, da die Diagnose Reizdarm bei einem Patient widerrufen wurde (er wurde stattdessen mit diabetisch autonomer Neuropathie diagnostiziert) und ein anderer keine Symptome aufgrund von Medikation hatte. Dieser Patient wies zudem einen Neuroindex in Antwort auf den Mediator Cocktail auf, der etwa 10fach höher war als der Rest der Reizdarmgruppe und wurde daher auch als Ausreißer aus der Analyse ausgeschlossen. Schließlich bestand die Kohorte der RDS Patienten aus 35 Personen (48 ± 13 Jahre; 26 Frauen und 9 Männer) (Abbildung 16, Tabelle 4 und Tabelle 5).

Eine graphische Darstellung der nicht für die Analyse verwendeten Patienten befindet sich im Anhang (Abbildung 38). Dort dargestellt ist jeweils der Neuroindex pro Person auf die Stimuli Nikotin, elektrische Stimulation und den RDS Mediator Cocktail. Die Patienten wurden in drei Gruppen eingeteilt. 1. Teilnehmer, für die keine Information über bestehende Symptome vorhanden ist, aber auch nicht ausgeschlossen werden kann, dass welche vorlagen ($n=6$); 2. Teilnehmer, für die Symptome beschrieben wurden, welche aber entweder nicht verifiziert bzw. näher spezifiziert wurden (beispielsweise beinhaltet die Diagnose eine Beschreibung „unspezifische Bauchmerzen“ oder „Stuhlnunregelmäßigkeiten“ ohne weitere Informationen hierzu, ein ausgefüllter Onlinefragebogen liegt nicht vor, $n=14$) oder die Kriterien für ROME III nicht erfüllt wurden aber dennoch gastrointestinale Beschwerden vorhanden sind (Onlinefragebogen liegt vor, $n=1$); 3. Teilnehmer, die laut Onlinefragebogen

als Reizdarmpatienten nach ROME III eingestuft werden, aber keine positive Diagnose von einem Arzt vorliegt (n=2). Für einen Teilnehmer war die Auswertung der Daten nicht möglich, da die Ganglien nicht erkannt werden konnten, um die Fläche zu vermessen. Dabei handelt es sich um einen Patienten ohne Fragebogen mit der Diagnose „unspezifische Beschwerden“. Abbildung 39 stellt die Neuroindices für 3 Personen dar, die an anderen Krankheiten leiden (die Diagnosen lauten: Obstipation bei diabetisch autonomer Neuropathie, Slow-transit Obstipation mit Medikamenten Abusus, Divertikulitis) sowie den Reizdarmpatienten, der als Ausreißer aus der Analyse ausgeschlossen wurde.

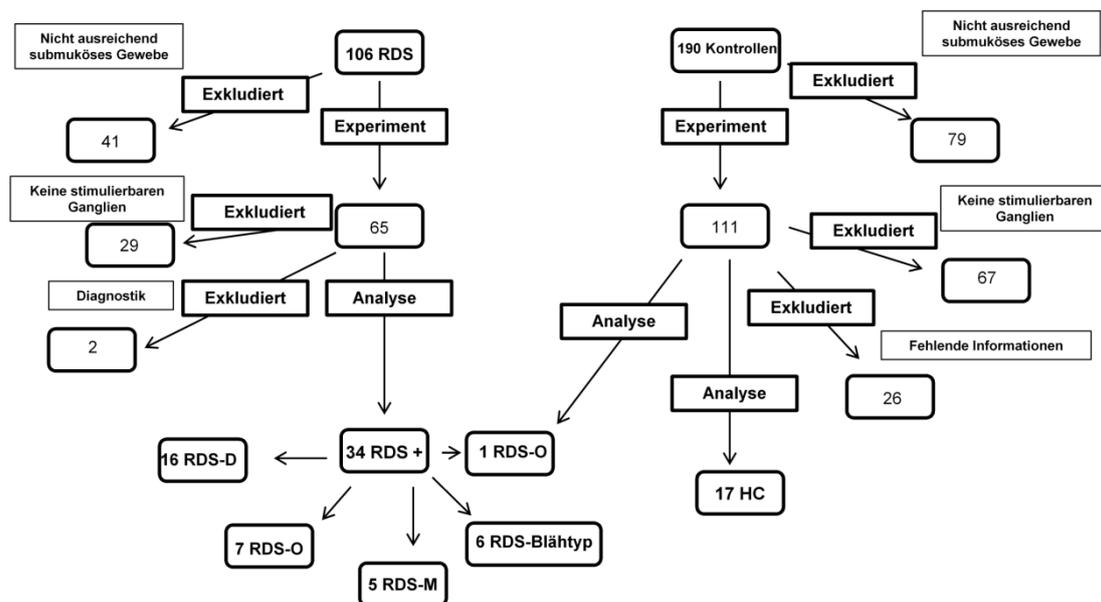


Abbildung 16: Verlaufsbild aller Studienteilnehmer. Dargestellt sind die Anzahl der eingeschlossenen sowie der ausgeschlossenen Personen für die Studie. RDS: Reizdarmsyndrom; RDS-D: Diarrhoe-prädominantes Reizdarmsyndrom; RDS-O: Obstipations-prädominantes Reizdarmsyndrom; RDS-M: Mischtyp Reizdarmsyndrom; HC: Gesunde Kontrollperson.

Auf die gesamte Anzahl der rekrutierten Teilnehmer gesehen, war in 60% aller gelieferter Proben mindestens eine Biopsie mit vorhandenem submukösem Plexus enthalten. Dieser befand sich als milchig-weißes Gewebe an der Mukosa (siehe Abbildung 8) und enthielt durchschnittlich 8 ± 5 Ganglien.

Die Fläche des gewonnenen SMP pro Biopsie unterschied sich nicht zwischen Kontrollen und Reizdarmpatienten ($0,116\text{cm}^2$ (0,091/0,141) und $0,116\text{cm}^2$ (0,077/0,209); $p=0,921$; HC: $n=3$ Biopsien; RDS: $n=8$ Biopsien). Auch zwischen den drei Zentren (hierbei wird das Klinikum München Rechts der Isar nicht mitbetrachtet, da keine Biopsien für die durchgeführte Studie aus diesem Zentrum geliefert worden waren), von denen die Biopsien geliefert wurden, gab es keine Unterschiede bezüglich der Fläche des enthaltenen SMP (München: $0,158\text{cm}^2$ (0,072/0,232), $n=6$ Biopsien; Vilsbiburg: $0,164\text{cm}^2$ (0,089/0,292), $n=6$ Biopsien; Freising: $0,135\text{cm}^2$ (0,096/0,235), $n=16$ Biopsien; $p=0,845$)

Auch die absolute gemessene Fläche pro Ganglion war nicht unterschiedlich zwischen RDS (n=17 Personen/ 29 Ganglien) und gesunden Kontrollen (n=35 Personen/ 57 Ganglien) ($3850\mu\text{m}^2$ (2850/6110) und $4160\mu\text{m}^2$ (2150/5550); $p=0,519$). Des Weiteren unterschied sich die Fläche der Ganglien in Biopsien nicht von der Fläche der Ganglien in Resektaten ($4260\mu\text{m}^2$ (2400/6250); $p=0,81$; Resektate: n= 41 Personen/ 147 Ganglien). Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass auch in Biopsien Ganglien des inneren submukösen Plexus für die Versuche verwendet wurden.

Als Indiz dafür, ob die Ganglien in den Biopsien von RDS Patienten durch die Entnahme vermeintlich stärker beschädigt sein könnten als die von gesunden Kontrollen, wurde neben der relativen antwortenden Fläche im Ganglion auf den Stimulus Nikotin (dargestellt als % antwortende Fläche Ganglion in der Abbildung 17) auch die absolute Fläche verglichen. Diese war mit $1500\mu\text{m}^2$ bei RDS und $2000\mu\text{m}^2$ bei gesunden Kontrollen nicht unterschiedlich ($p=0,76$).

3.2.2. Demographie der Studienteilnehmer

Als gesunde Kontrollen wurden hauptsächlich Personen für die Studie rekrutiert, die zu Zwecken der Krebsvorsorge eine Koloskopie erhielten. Diese Vorsorgeleistung wird in Deutschland erst ab 55 Jahren gewährt. Daraus resultierte ein signifikanter Altersunterschied zwischen RDS (48 ± 13 Jahre) und HC (58 ± 11 Jahre) ($p=0,014$). Auch die Geschlechterverteilung war signifikant unterschiedlich ($p=0,032$), da in der RDS Gruppe deutlich mehr weibliche Teilnehmer waren (RDS: 26 Frauen und 9 Männer; HC: 7 Frauen und 10 Männer).

3.2.3. Die neuronale Aktivität in Ganglien von Reizdarmpatienten unterscheidet sich nach Applikation eines Mediator Cocktails

Um die neuronale Aktivität zwischen HC und RDS Patienten zu vergleichen, wurden elektrophysiologische Untersuchungen mit drei unterschiedlichen Stimuli durchgeführt. Aufgrund der Unterschiede im Alter und in der Verteilung der Geschlechter, wurde jeweils kontrolliert, ob eine Korrelation mit einem der Parameter besteht.

Es konnte keine Korrelation zwischen dem Alter aller Teilnehmer (HC und RDS gemeinsam) und der neuronalen Aktivität, repräsentiert durch den Neuroindex, für den Stimulus Nikotin gefunden werden ($p=0,868$; $r= 0,024$). Ebenso bestand keine Korrelation für die beiden Gruppen in getrennter Betrachtung (HC: $p=0,302$; $r= -0,262$; RDS: $p=0,721$; $r=-0,062$) sowie kein Unterschied der Aktivität zwischen Männern und Frauen ($p=0,438$).

Auf den Stimulus Nikotin konnte in 97% (28 von 29) der getesteten Ganglien der gesunden Kontrollen und 93 % (53 von 57; $p=0,659$) der Ganglien von Reizdarmpatienten ein Calcium

Anstieg gemessen werden. Die ausgelöste nervale Aktivität, repräsentiert durch den Neuroindex, war nicht unterschiedlich zwischen beiden Gruppen (HC: 770 (420/934); RDS: 487 (228/903); $p=0,097$). Auch die Untergruppen, in die die Gruppe der Reizdarmpatienten unterteilt werden kann, wies keinerlei signifikante Unterschiede untereinander auf (RDS-D: 346 (195/885), RDS-O: 231 (98/825), RDS-M: 533 (360/908); RDS-Blähtyp: 551 (251/1094) $p=0,580$). In ähnlicher Weise ergaben sich auch für die korrespondierenden Werte des Calcium Anstiegs und der antwortenden Fläche pro Ganglion keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 17).

Durch die Verwendung einer Punkt-Elektrode kann ein einzelner Nervenstrang, der zu einem Ganglion führt, stimuliert werden. Die daraus resultierende Antwort entsteht entweder durch synaptische Übertragung von den stimulierten Axonen auf die im Ganglion befindlichen Neurone oder eine antidrome Aktivierung der neuronalen Somata.

Für die elektrische Stimulation bestand keine Korrelation zwischen der neuronalen Aktivität und dem Alter aller Teilnehmer ($p=0,278$; $r=-0,190$). Dies war ebenfalls der Fall, wenn HC und RDS getrennt betrachtet wurden (HC: $p=0,094$; $r=-0,460$; RDS: $p=0,617$; $r=-0,117$). Allerdings war die Aktivität zwischen allen männlichen (NI: 38 (0/92); $n=15$ Personen) und weiblichen Teilnehmern (NI: 131 (38/365); $n=19$ Personen) signifikant unterschiedlich ($p=0,033$). Dieser Unterschied bestand nicht, wenn man RDS getrennt betrachtete ($p=0,811$; $n=13$ Frauen; 7 Männer). Nur für HC zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,003$; $n=6$ Frauen; 8 Männer), welcher hauptsächlich daraus resultierte, dass Biopsien von 4 der 8 Männer keine Erregbarkeit zeigten.

Mit der Punktstimulation konnten 61% (13 von 21 Ganglien) der Ganglien in Biopsien von Kontrollen und 62% (17 von 27 Ganglien; $p=1$) der Ganglien von RDS Patienten stimuliert werden. Die Nervenaktivität war auch hier nicht signifikant unterschiedlich (HC: 93 (0/548), RDS: 80 (1/158); $p=0,448$). Die Untergruppen gegeneinander, wobei RDS-M aufgrund zu geringer Patientenzahl nicht einbezogen wurde, weisen ebenfalls keinen Unterschied auf. Auch die einzelne Betrachtung des Calcium Anstiegs sowie der antwortenden Fläche des Ganglions war nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 18).

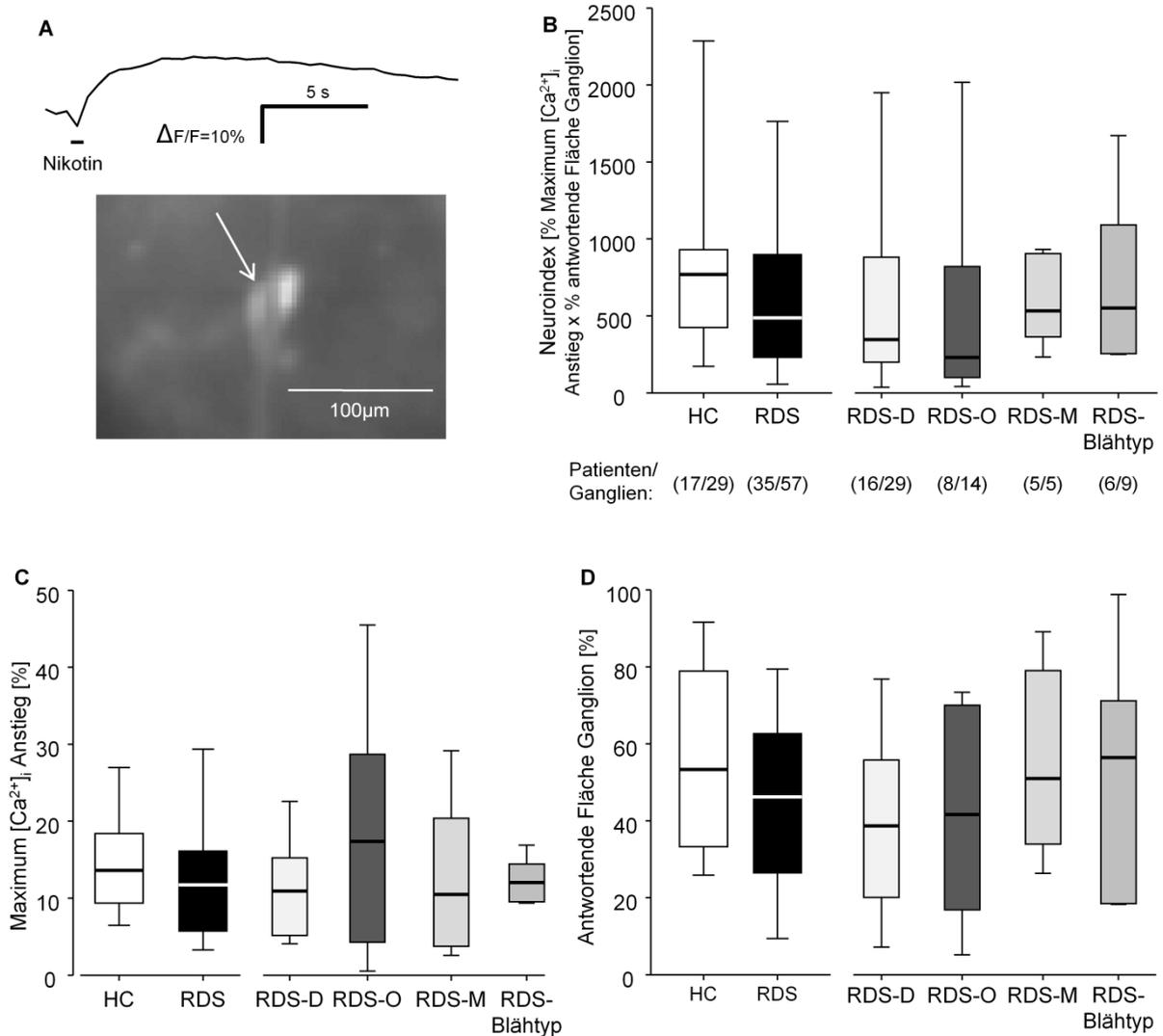


Abbildung 17: Nikotin Applikation auf Ganglien von gesunden Kontrollen und RDS Patienten. Dargestellt ist (A) ein mit Fluo-4 AM gefärbtes Ganglion mit einem exemplarischen Trace aus einem Calcium Imaging Experiment. Der Trace stammt von der mit dem Pfeil markierten Zelle. Der Neuroindex (B) setzt sich zusammen aus dem maximalen intrazellulären Calcium Anstieg (C) und der antwortenden Fläche des Ganglions (D). Dargestellt sind jeweils die Werte für gesunde Kontrollen und Reizdarmpatienten, sowie die Untergruppen der Reizdarmgruppe. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen und der Reizdarmgruppe. Auch die Untergruppen unterschieden sich nicht voneinander.

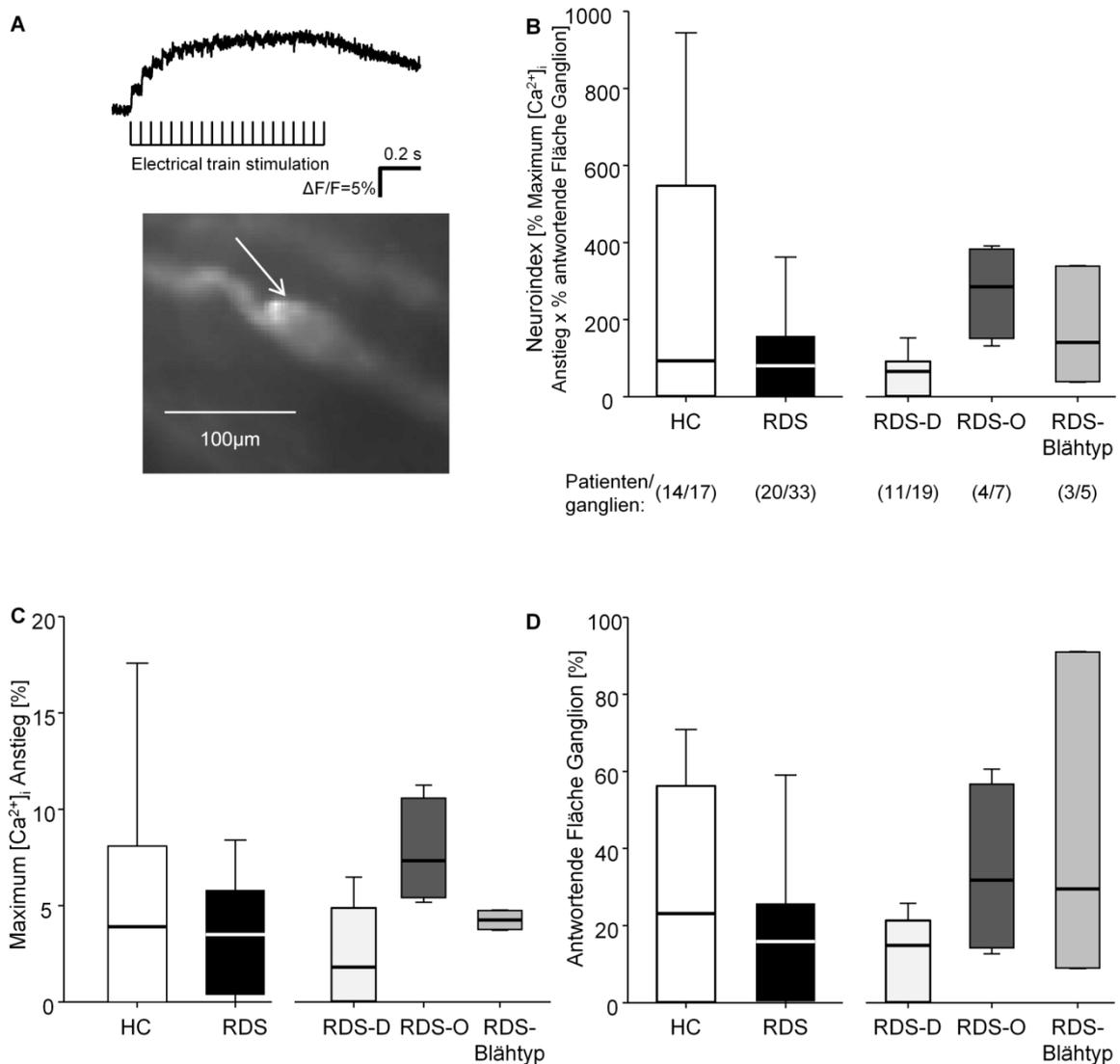


Abbildung 18: Elektrische-Punkt-Stimulation in Geweben von gesunden Kontrollen und RDS Patienten. Die Aufnahmen zur elektrischen Stimulation wurden mit einer Bildfrequenz von 1kHz durchgeführt. Daher kann man im exemplarisch dargestellten Trace (A) Abstufungen (in der Erscheinung ähnlich wie Treppen) erkennen, welche mit Aktionspotentialen korreliert werden können (Michel et al. 2011). Für die Auswertung wurden der maximale Calcium Anstieg (C) und die antwortende Fläche des Ganglions (D) herangezogen, welche sich zu dem Neuroindex (B) zusammenfassen lassen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Kontrollen und RDS-Patienten.

Der Vergleich der aktivierten Areale pro Ganglion nach Spritzapplikation von Nikotin und elektrischer Punkt-Stimulation zeigt, dass durch beide Stimuli die gleichen Bereiche und demnach vermutlich die gleichen Populationen von Neuronen aktiviert wurden (Abbildung 19), wobei nicht immer die gesamte Fläche von beiden Stimuli aktiviert werden konnte. Die prozentual aktivierte Fläche durch Nikotin Applikation war im Vergleich zu der aktivierten Fläche durch elektrische Stimulation desselben Ganglions signifikant größer in beiden untersuchten Gruppen (HC: 57,3% (36,9/84,2) aktiviert durch Nikotin vs. 33,9 % (0/60) aktiviert durch elektrische Stimulation; $p=0,01$; $n=15$ Ganglien; IBS: 45,1% (20,4/62) aktiviert

durch Nikotin vs. 21,9% (5,1/38,6) aktiviert durch elektrische Stimulation; $p=0,009$; $n=21$ Ganglien).

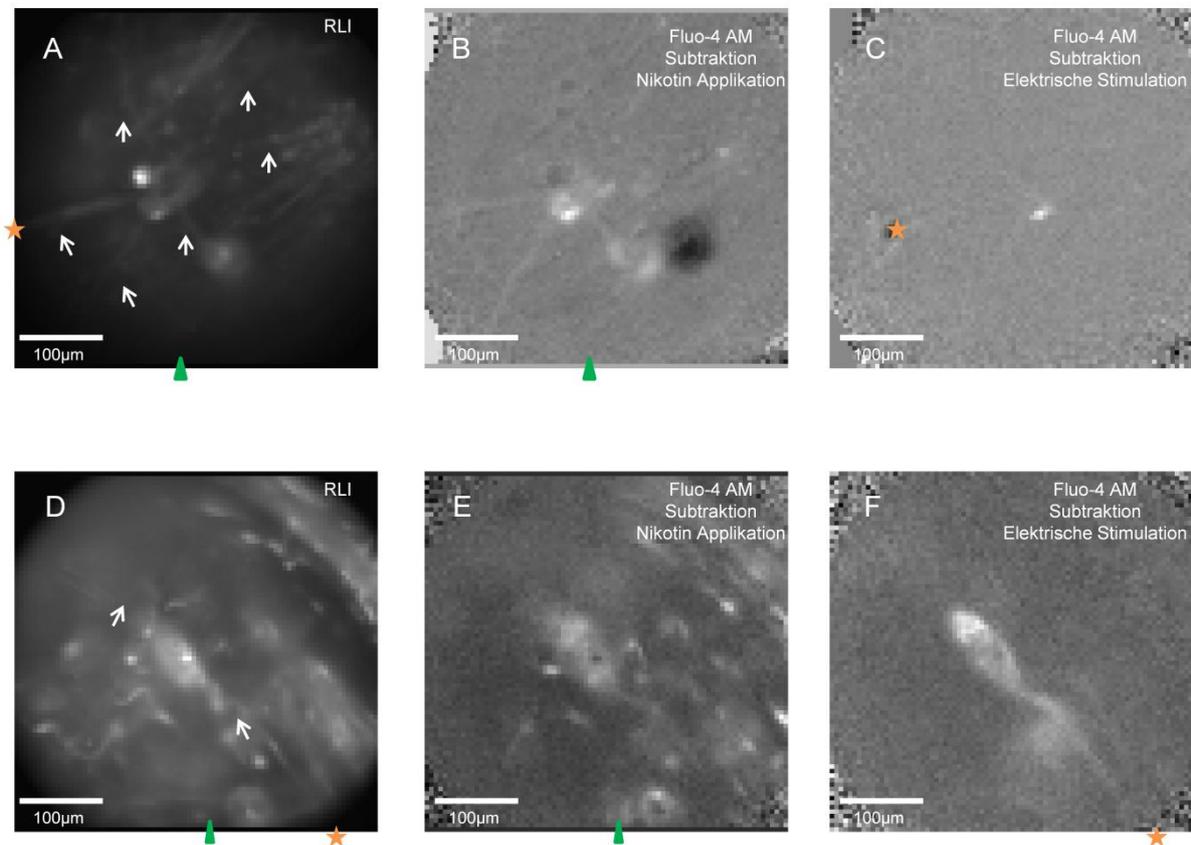


Abbildung 19: Vergleich der aktivierten Fläche durch Nikotin Applikation und elektrische Stimulation. Dargestellt sind zwei Ganglien, jeweils als Ruhebild (RLI), Subtraktionsbild nach Nikotin Applikation und Subtraktionsbild nach elektrischer Stimulation. In A und D sind die zu dem Ganglion gehörigen Faserstränge mit weißen Pfeilen markiert. Der orange Stern markiert jeweils den Punkt, an dem die Stimulationselektrode auflag und das grüne Dreieck deutet die Spritzrichtung der Nikotin Applikation an. Im Subtraktionsbild hell dargestellte Bereiche spiegeln Areale mit erhöhter Calcium Konzentration im Vergleich zur Ruhelage wieder. In Bild C wurde der Bildausschnitt so verändert, dass das untersuchte Ganglion im Vergleich zu Bild A und B um etwa $100\mu\text{m}$ nach rechts verlagert ist, so dass sich in diesem Bild die Punktelektrode im sichtbaren Bereich befindet. Die aktivierten Areale des Ganglions in der unteren Reihe durch Nikotin Applikation decken sich mit denjenigen durch elektrische Stimulation, wohingegen in der oberen Reihe ein deutlich kleinerer Bereich mit einem Anstieg an intrazellulärem Calcium auf die elektrische Stimulation antwortete.

Die Korrelation der aktivierten Fläche des Ganglions mit der Anzahl an interganglionären Fasersträngen ergibt keine Korrelation ($p=0,126$; $r=-0,271$; $n=33$ Ganglien (bei 3 Ganglien konnte die Anzahl der Faserstränge nicht eindeutig ermittelt werden); Abbildung 20).

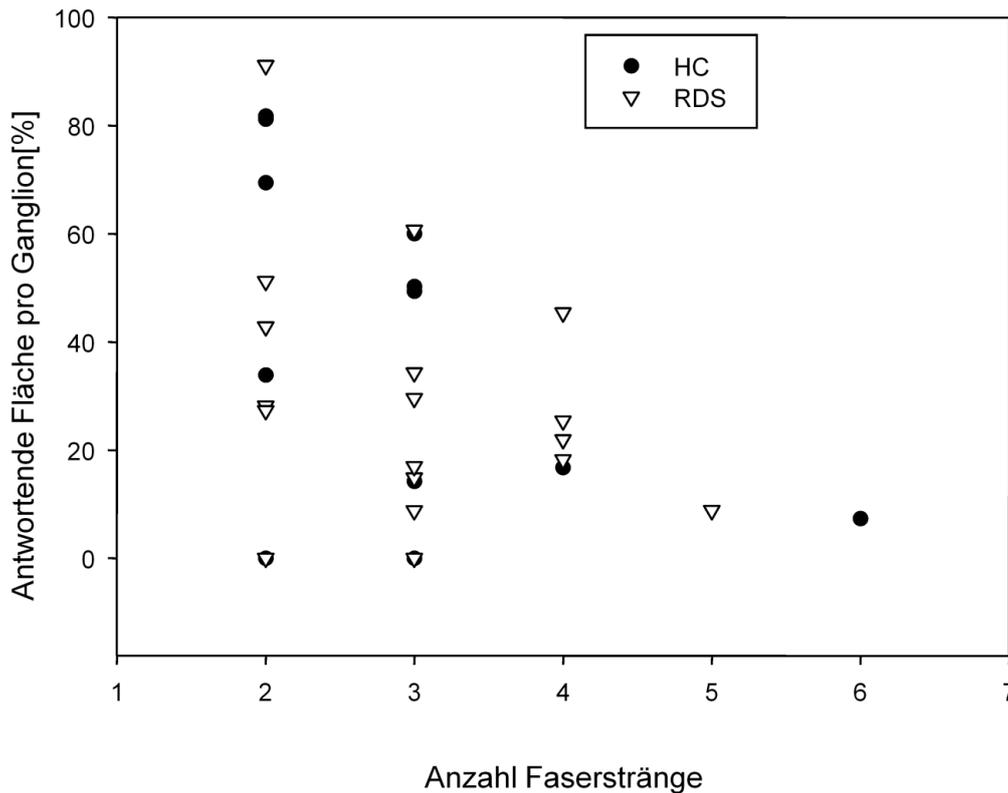


Abbildung 20: Korrelation der antwortenden Fläche des Ganglions auf elektrische Stimulation und der Anzahl an interganglionären Fasersträngen des Ganglions. Es handelt sich hier um eine gemeinsame Auswertung der Daten aus der HC und RDS Gruppe (n=33 Ganglien). Es zeigt sich keine Korrelation zwischen der prozentualen Fläche des Ganglions, die stimuliert wurde, und der Anzahl der Faserstränge des Ganglions ($p=0,126$; $r=-0,271$).

Der Vergleich der Anzahl Faserstränge zwischen den Ganglien der HC Gruppe und RDS Gruppe zeigt, dass hier kein Unterschied vorlag (HC: 3 [2/3] vs. RDS: 3[2/3,8]; $p=0,636$).

Als spezifischen Stimulus für das vorliegende Milieu im Darm eines Patienten mit Reizdarmsyndrom wurde ein RDS Mediator Cocktail, bestehend aus Histamin, Serotonin, Tryptase und TNF- α appliziert.

Korreliert man das Alter aller Teilnehmer mit der Aktivität als Antwort auf den RDS-Mediator-Cocktail, so erhält man eine signifikante Korrelation ($p=0,006$; $r=0,448$; Abbildung 21) zwischen den beiden Parametern. Bei getrennter Betrachtung von RDS und HC besteht die Korrelation lediglich für RDS Patienten aber nicht für HC (RDS: $p=0,0013$; $r=0,619$; HC: $p=0,667$; $r=0,135$). Die Antworten von männlichen und weiblichen Teilnehmern von HC und RDS zusammen waren nicht unterschiedlich (0 (0/121) gegen 0 (0/57); $p=0,957$).

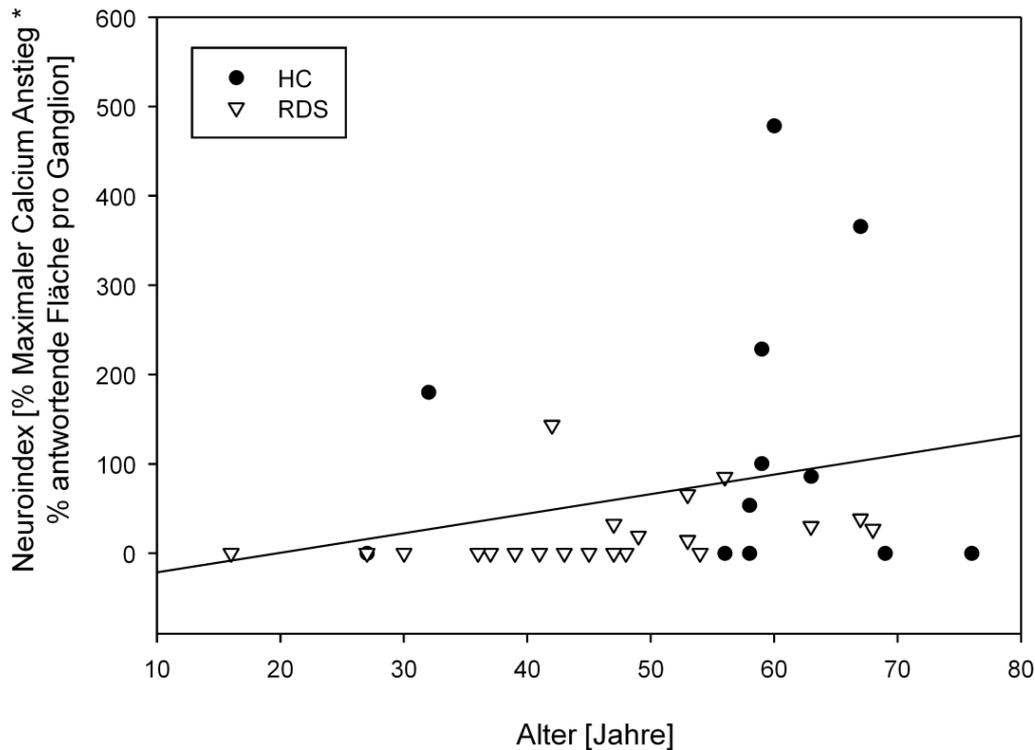


Abbildung 21: Korrelation zwischen Alter und Neuroindex nach Mediator Cocktail Applikation in humanen submukösen Ganglien aus Biopsien von HC und RDS. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Stärke der Calcium Antwort und dem Alter des Patienten, von dem die Biopsie stammte, gefunden werden ($p=0,006$; $r=0,448$).

Der Mediator Cocktail hatte eine erregende Wirkung auf 53% der Ganglien (9 von 17) von gesunden Kontrollen und 30% (10 Ganglien von 33 getesteten) von RDS Patienten. Dieses Verhältnis war nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,137$). Die neuronale Aktivität hingegen war bei RDS-Patienten signifikant niedriger im Vergleich zu gesunden Kontrollen (RDS, NI: 0 (0/29) und HC, NI: 70 (0/216); $p=0,039$). Diese drastisch reduzierte Aktivität war bei allen Untergruppen gleichermaßen zu beobachten ($p=0,98$). Die Betrachtung des maximalen Calcium Anstiegs und der antwortenden Fläche des Ganglions separat voneinander erreichte knapp nicht das Signifikanzniveau ($p=0,065$ und $p=0,055$). Die Untergruppen waren auch für diese beiden Parameter nicht unterschiedlich (Abbildung 22).

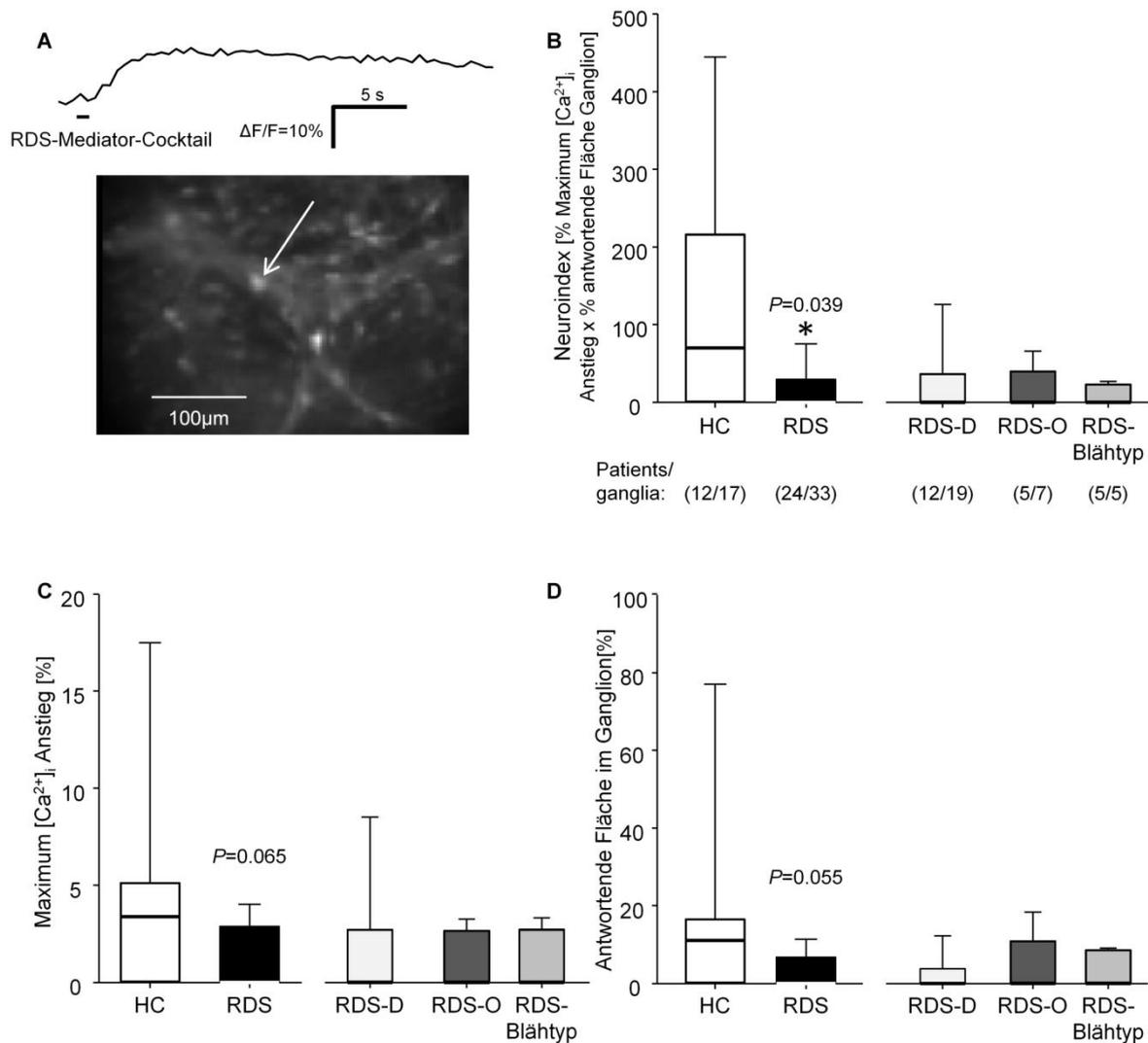


Abbildung 22: Applikation des Mediator Cocktails auf Ganglien von gesunden Kontrollen und RDS Patienten. Der Mediator Cocktail, der mit seinen Bestandteilen (Histamin, Serotonin, Tryptase und $\text{TNF-}\alpha$) die wichtigsten Komponenten im Kontext neuronaler Erregung von Schleimhautbiopsien von RDS Patienten nachbilden sollte, erzeugte eine messbare Aktivierung in 53% der getesteten Ganglien von gesunden Kontrollen und in 30% der Ganglien von RDS Patienten. (A) zeigt einen Beispieltrace des mit dem Pfeil markierten Neurons. Der Neuroindex war signifikant niedriger für Patienten mit RDS im Vergleich zu gesunden Kontrollen (B). Der maximale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Anstieg und die antwortende Fläche im Ganglion erreichten keine Signifikanz (C-D)

3.2.4. Langzeit Inkubation von Überständen von Reizdarmpatienten hat eine desensibilisierende Wirkung auf submuköse Ganglien des Meerschweinchens

Um den vermuteten chronischen Kontakt von submukösen Ganglien von Reizdarmpatienten mit Mediatoren aus der Schleimhaut und von Immunzellen nachzuahmen, wurden je zwei Präparationen von submukösem Plexus aus dem distalen Colon von drei Meerschweinchen über Nacht mit Überständen von einem Reizdarmpatient und einer Kontrolle inkubiert (Abbildung 23). Die Stimulation der Neurone mit $100\mu\text{M}$ Nikotin induzierte Aktionspotentiale in 100% der getesteten Ganglien ($n=8$) von Geweben, die mit dem Überstand der gesunden Kontrolle inkubiert worden waren, und 100% der getesteten Ganglien ($n=7$) von Geweben, die mit dem Überstand des RDS-Patienten inkubiert worden waren. Die dadurch erzeugte

neuronale Aktivität in Form des Neuroindex war nicht signifikant unterschiedlich (HC: 551 (369/717); RDS: 858 (367/1213); $p=0,397$).

Als spezifischen Stimulus, vergleichbar mit dem RDS Mediator Cocktail, der für die Biopsien verwendet worden war, wurde der RDS Überstand appliziert, mit dem eines der beiden Gewebestücke inkubiert worden war. Dieser Stimulus konnte neuronale Aktivität in einer vergleichbaren Anzahl von Ganglien auslösen (jeweils 66% der getesteten Ganglien). Der gemessene Neuroindex allerdings war bei dem Gewebe, welches mit dem RDS Überstand inkubiert worden war, signifikant erniedrigt (RDS: 36 (15/90) und HC: 254 (113/501); $p=0.019$). Um die Qualität der Antwortstärke miteinander vergleichen zu können, wurden die Ganglien, die nicht auf den Stimulus reagiert hatten, nicht in die Statistik einbezogen.

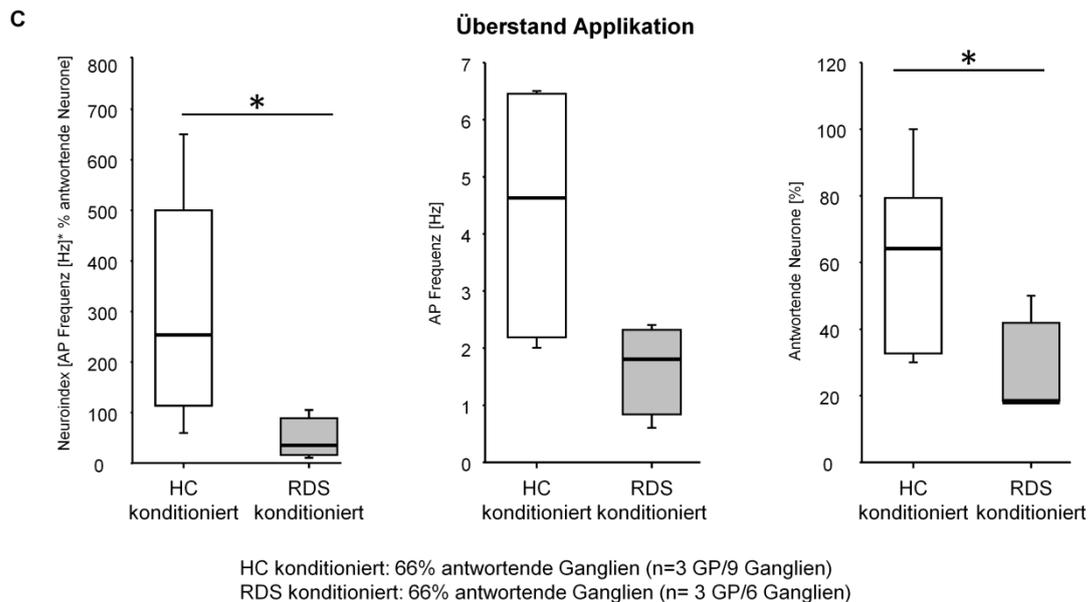
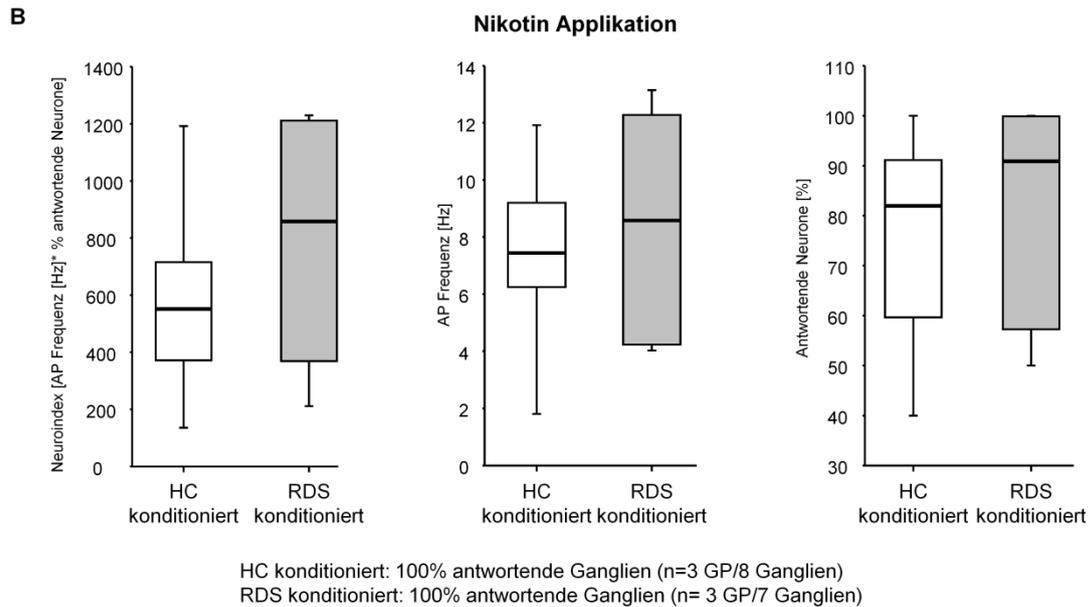
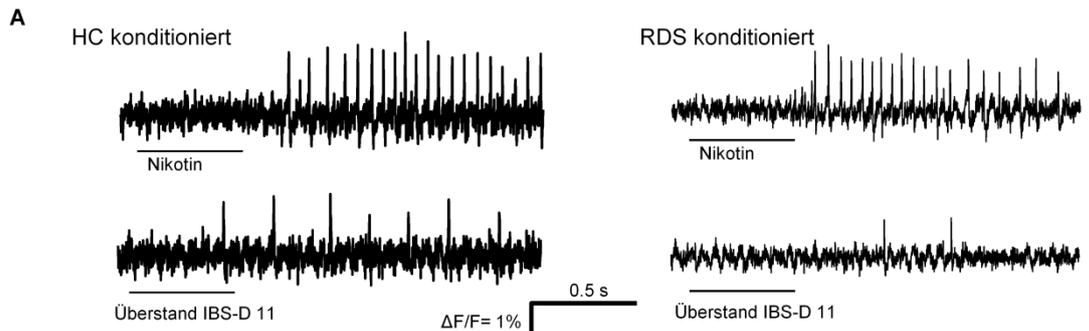


Abbildung 23: Übernacht Inkubation von submukösem Gewebe des Meerschweinchen Colons. Es wurde jeweils ein Stück von insgesamt drei Meerschweinchen mit einem Überstand eines RDS Patienten und ein Stück mit einem Überstand einer gesunden Kontrolle über Nacht inkubiert. Dadurch waren die Ganglien den diversen Mediatoren, die sich in den Überständen befinden, über einen längeren Zeitraum ausgesetzt und damit konditioniert. (A) Repräsentative Kurven für beide Stimuli (B) Es gab keinen Unterschied zwischen der Reaktivität auf den allgemeinen Stimulus Nikotin. (C) Auf die Applikation des RDS Überstands, mit dem inkubiert worden war, antworteten Ganglien, die mit diesem Überstand konditioniert worden waren, signifikant schwächer.

3.2.5. Antworten nicht-neuronaler Zellen

Die Calcium Imaging Methode ermöglicht auch den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen außerhalb der Ganglien zu messen. Unter anderem finden sich Mastzellen und Makrophagen in der submukösen Schicht, in der auch die Ganglien eingebettet sind. Muller et al. (2014) konnte zeigen, dass die Makrophagen, die sich in der Muskelschicht befinden, direkten Einfluss auf die dort befindlichen enterischen Neurone und auf die Motilität des Darms haben. Eine ähnliche Kommunikation wird auch für Mastzellen, die sich in der Nähe von submukösen Ganglien befinden, vermutet (Buhner und Schemann 2012).

Während der Versuche, bei denen submuköse Ganglien in Biopsien von RDS Patienten und HC stimuliert und die resultierende neuronale Aktivität verglichen wurde, konnten auch Antworten von nicht-neuronalen Zellen detektiert werden. Diese traten nach Applikation von Nikotin sowie des Mediator Cocktails auf. Da auch Mastzellen (Sudheer et al. 2006) und Makrophagen (Nemethova et al. 2013) über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren verfügen sowie Histamin (Hofstra et al. 2003; Wang et al. 2000) und PAR Rezeptoren (D'andrea et al. 2000; Mueller et al. 2011) exprimieren, ist die Aktivierung vermutlich in den meisten Fällen auf direkte Stimulation der Zellen durch die applizierte Substanz zurück zu führen. Anders als bei Mastzellen wirkt Nikotin bei Makrophagen inhibierend und unterbindet dadurch die Ausschüttung von TNF über die $\alpha 7$ Untereinheit des nAChR (Wang et al. 2003).

Es konnten in Biopsien von 5 gesunden Kontrollen und 8 RDS Patienten antwortende Zellen außerhalb des Ganglions nach Applikation von Nikotin festgestellt werden. Dies entspricht 29% bzw. 23% der gesamten Anzahl an untersuchten Patienten und stellt keinen signifikanten Unterschied dar ($p=0,749$). Auf den Mediator Cocktail reagierten in Biopsien von 9 gesunden Kontrollen und 10 RDS Patienten Zellen außerhalb des untersuchten Ganglions. Dies entspricht einer Quote von 75% zu 42% und ist ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,386$). Betrachtet man die Anzahl antwortender Zellen außerhalb des Ganglions pro untersuchtem Ganglion, so findet man keinen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Kontrollen für den Stimulus Nikotin, mit einem Verhältnis von 1,2 Zellen pro Ganglion zu 2,6 Zellen pro Ganglion ($p=0,31$), oder den Stimulus Mediator Cocktail, mit einem Verhältnis von 2 Zellen pro Ganglion zu 2,4 Zellen pro Ganglion ($p=0,812$). Die Betrachtung des maximalen $[Ca^{2+}]_i$ der detektierten Zellen für den Stimulus Nikotin zeigt mit 13% [11/15] für gesunde Kontrollen und 16% [8/28] für RDS Patienten keinen signifikanten Unterschied in der Stärke der gemessenen Antworten ($p=0,522$). Auch für den Mediator Cocktail sind die Werte für HC (20% [14/35]) und RDS (23% [10/32]) nicht unterschiedlich ($p=0,406$).

Eine genauere Bestimmung der Zellen, die von den Applikationen stimuliert wurden, war aufgrund mehrerer Probleme nicht möglich. Zum einen ist die Auflösung der durch die ultraschnelle Kamera generierten Bilder nicht ausreichend, um die Zellen zu erkennen und anhand ihrer Form als Makrophagen, Mastzellen oder andere Zellen zu identifizieren. Zum anderen ist es nur in seltenen Fällen möglich gewesen, das richtige Ganglion auf Basis des Neuroplex Bildes und Vergleich mit der entsprechenden PGP 9.5 Färbung in post-hoc immunhistochemischen Färbungen wieder zu finden. In Abbildung 24 findet sich ein entsprechendes Beispiel für die versuchte Identifizierung. Obwohl im Subtraktionsbild mehrere runde Zellen im Sichtbereich zu sehen sind, kann nur eine Zelle als CD68+ identifiziert werden. Alle anderen Zellen können nicht eindeutig charakterisiert werden. Die Färbung mit Mastzell Tryptase führte in diesem Fall lediglich zu unspezifischer Hintergrundfärbung und wurde durch die Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz eliminiert. Aufgrund der Tatsache, dass Nikotinrezeptoren von Makrophagen hemmend und nicht erregend wirken, führt letztendlich zu dem Schluss, dass die angewendete Methode nicht ausreichend spezifisch ist, um zweifelsfrei die beobachteten Zellen charakterisieren zu können.

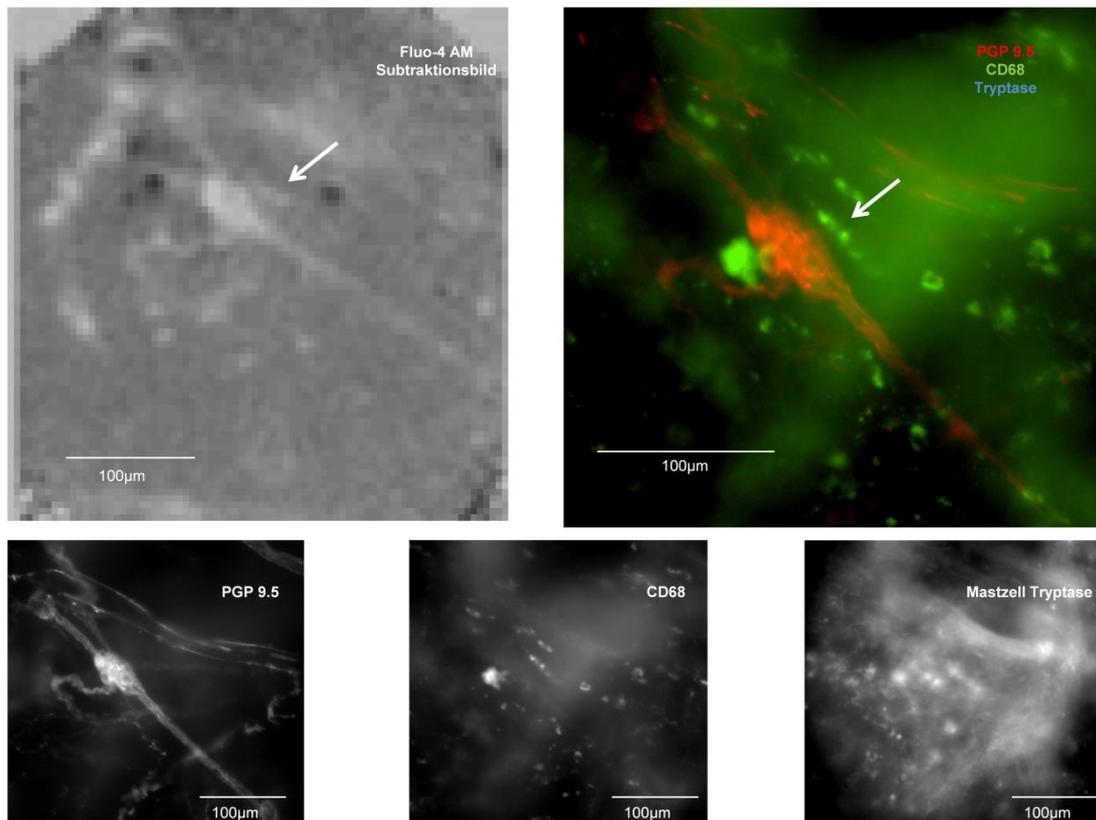


Abbildung 24: Identifikation von reaktiven Zellen außerhalb des Ganglions. Die Abbildung zeigt die versuchte Identifikation von Zellen außerhalb des Ganglions, die auf einen Stimulus ebenfalls mit einem Anstieg von intrazellulärem Calcium reagiert haben. Dargestellt ist oben links ein Subtraktionsbild nach Nikotinapplikation, in dem zum einen das Ganglion deutlich hell (was einen Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$ repräsentiert) und zum anderen rundliche beziehungsweise längliche kleinere Zellen außerhalb des Ganglions zu identifizieren sind. Eine Struktur direkt neben dem Ganglion wurde mit einem weißen Pfeil markiert und findet sich auf der immunhistochemischen Färbung rechts daneben wieder. Diese Zelle wurde als CD68+ identifiziert. Alle anderen leuchtenden Zellen können aufgrund der nicht eindeutigen immunhistochemischen Färbung nicht charakterisiert werden. Auch ergab die Färbung mit Mastzell Tryptase in diesem Fall nur unspezifische Hintergrundfärbung und wurde durch die Hintergrundsubtraktion eliminiert. Unterhalb des Merge-Bildes finden sich die drei Einzelbilder.

3.3. Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Mediatoren

Die Konzentration einzelner Mediatoren in Überständen von Schleimhautbiopsien von RDS Patienten (Buhner et al. 2009) entsprechen in etwa 1/100 bzw 1/1000 der Konzentrationen, die verwendet wurden, um die nervaktivierende Wirkung dieser Mediatoren auf enterische Neurone nachzuweisen (Breunig et al. 2007; Michel et al. 2005; Mueller et al. 2011). Trotzdem haben Überstände von RDS Patienten eine erregende Wirkung, wenn sie auf enterische Neurone appliziert werden (Buhner et al. 2012). Aus diesem Grund sollte die Frage geklärt werden, ob die Substanzen, die hauptsächlich für die neuronale Aktivierung verantwortlich sind, nämlich Histamin, Serotonin und Proteasen, eine sich gegenseitig verstärkende Wirkung haben, wenn sie in geringen Konzentrationen auf enterische Neurone appliziert werden.

3.3.1 Untersuchungen zum Einfluss des Alters von Patienten auf neuronale Aktivität

Aufgrund der Tatsache, dass durch die Art der Rekrutierung von Teilnehmern für die Studie zur neuronalen Aktivität bei Reizdarmpatienten keine gleiche Altersverteilung bei Reizdarmpatienten und gesunden Kontrollen vorhanden ist, sollte getestet werden, ob das Alter des Patienten einen Einfluss auf die neuronale Aktivität hat. Hierzu wurden die Daten aus den Versuchen zur Potenzierung verschiedener Mediatoren verwendet und jeweils mit dem Alter des Patienten, von dem das Gewebe stammte, korreliert.

Für den Calcium Anstieg, der durch die Applikation von Nikotin ausgelöst wird, ergab sich keine signifikante Korrelation mit dem Alter der Patienten ($p=0,594$; $r=0,085$; $n=41$ Patienten/147 Ganglien). Das mittlere Alter der Patienten, die in diese Korrelation einbezogen wurden, lag bei 64 ± 10 Jahren, wobei der älteste Patient 80 Jahre alt und der jüngste 38 Jahre alt war (Abbildung 25). Da in diesen Versuchen die Anzahl der Neurone, die auf Nikotin antworten, den Referenzwert für die Berechnung der prozentual antwortenden Neurone auf einen anderen Stimulus darstellten und damit als 100% deklariert wurden, wird hier nur der maximale Calcium Anstieg als Wert herangezogen.

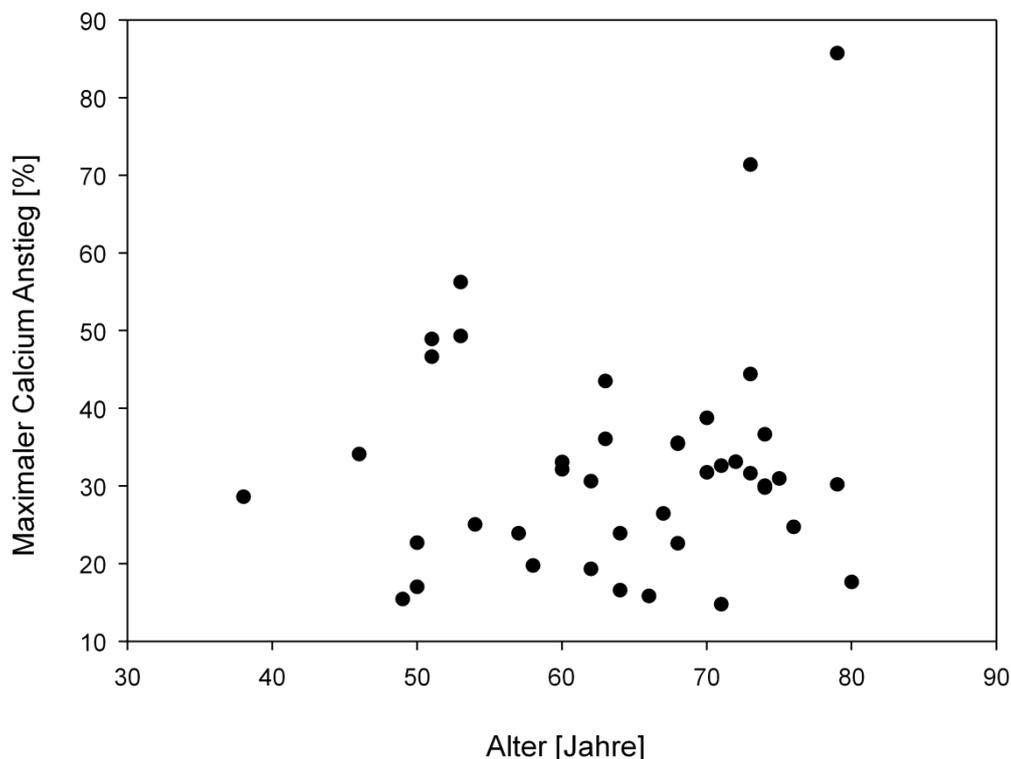


Abbildung 25: Korrelation zwischen Alter und maximalem Calcium Anstieg nach Nikotin Applikation in humanen submukösen Ganglien von operativ entfernten Darmstücken. Für die Korrelation wurde die Applikation von Nikotin herangezogen, die bei jedem Ganglion in der Versuchsreihe für die Potenzierung der Mediatoren als Vitalitätstest verwendet worden war. Es konnte keine Korrelation zwischen der Stärke der Calcium Antwort und dem Alter des Patienten, von dem das Gewebe stammte, gefunden werden.

3.3.2. Histamin und Serotonin zeigen keine verstärkende Wirkung

Zunächst wurden Histamin und Serotonin jeweils in der Konzentration 1 μ M einzeln auf Neurone appliziert. Dabei konnte Histamin kaum neuronale Aktivität erzeugen (Neuroindex: 0 (0/148)) und auch Serotonin hatte nur eine sehr geringe erregende Wirkung (Neuroindex: 85 (0/705)). Die gemeinsame Applikation beider Substanzen in einer Mischung erzeugte eine Aktivität, die nicht unterschiedlich von der Wirkung von Serotonin und Histamin als Einzelapplikation war (216 (21/651); $p=0,235$) (Abbildung 26). Der erwartete Neuroindex Median für die Kombination aus Serotonin und Histamin, der durch die Addition der Mediane der beiden einzelnen Applikationen entstanden ist, war 85. Dieser unterschied sich signifikant ($p=0,042$) von dem experimentell ermittelten Neuroindex mit einem Median von 216 (siehe oben). Um die Wirkung der Mischung aus Histamin und Serotonin abzubilden, wird in den folgenden Kalkulationen jeweils der experimentell gemessene Median für Histamin und Serotonin verwendet und nicht der erwartete (berechnete) Neuroindex.

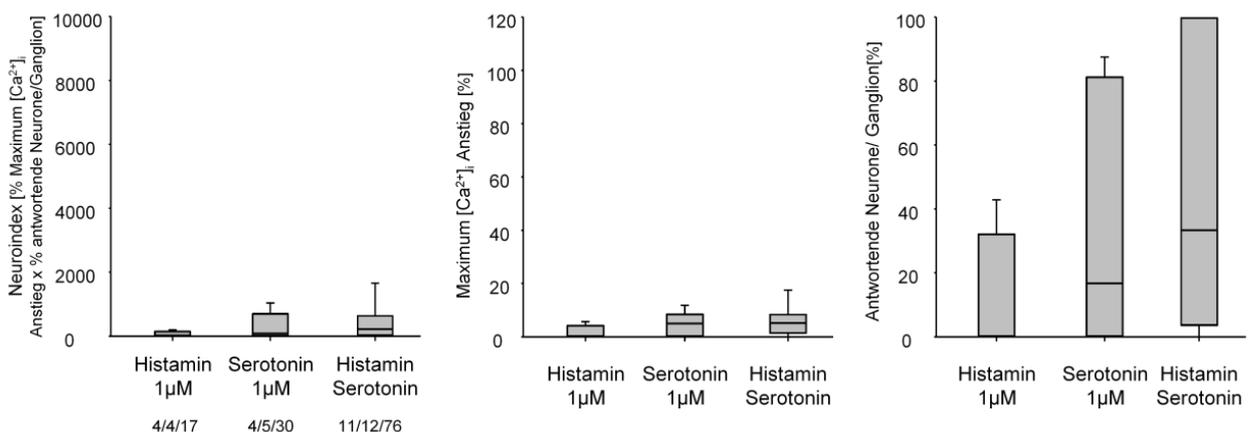


Abbildung 26: Einzelapplikation und Kombination von Histamin und Serotonin, jeweils in der Konzentration 1 μ M. Die unterschiedlichen Substanzen und die Kombination daraus wurden jeweils auf humane submuköse Ganglien appliziert. Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich neuronaler Aktivität bei allen drei Varianten. Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Geweben/Ganglien/Neuronen an, an denen die Substanzen getestet wurden.

3.3.3. Tryptase hat eine potenzierende Wirkung auf Histamin und Serotonin

Tryptase wird in einigen Arbeiten eine wichtige Rolle in der RDS Pathogenese zugeschrieben, da in einzelnen Kohorten die Aktivität der Mastzellen in RDS Biopsien erhöht war (Barbara et al. 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung von PAR2 Rezeptoren einen verstärkenden Einfluss auf TRPV-Kanäle und damit einen Einfluss auf Schmerzempfindung hat (Cenac et al. 2007; Amadesi 2004; Chen et al. 2011). In der Lunge wurde außerdem eine verstärkende Wirkung von Histamin durch Tryptase beobachtet (Johnson et al. 1997). In Überständen von Schleimhautbiopsien von RDS Patienten wurde Tryptase, neben Histamin, in erhöhter Konzentration im Vergleich zu gesunden Kontrollen

gemessen (Buhner et al. 2009). Daher wurde getestet, ob Tryptase womöglich auch verstärkend auf die nerv aktivierende Wirkung von Histamin und Serotonin wirkt.

Der induzierte Neuroindex durch Applikation einer Mischung aus 1 μ M Histamin, 1 μ M Serotonin und 10nM Tryptase war signifikant höher als die Applikation der Mischung aus 1 μ M Histamin und 1 μ M Serotonin (1401 (867/4075) gegen 216 (21/651); $p=0,003$). Der Neuroindex erreichte im post-hoc Test keine Signifikanz für den Vergleich von Tryptase als Einzelapplikation (450 (74/783)) und dem Cocktail mit Histamin und Serotonin. Bei Betrachtung des $[Ca^{2+}]_i$ hingegen zeigte sich, dass die Aktivierung durch den Cocktail aus Histamin/Serotonin/Tryptase stärker war sowohl als die Einzelapplikation von Tryptase als auch die Applikation von Histamin/Serotonin ($p=0,003$; Abbildung 27). Demnach handelt es sich hierbei laut der verwendeten Definition um eine Potenzierung. Da der erwartete Median aus der Einzelapplikation von Tryptase und der Mischung Histamin/Serotonin mit 666 signifikant niedriger war, als der gemessene Median ($p=0,012$), wird von einer synergistischen Verstärkung ausgegangen.

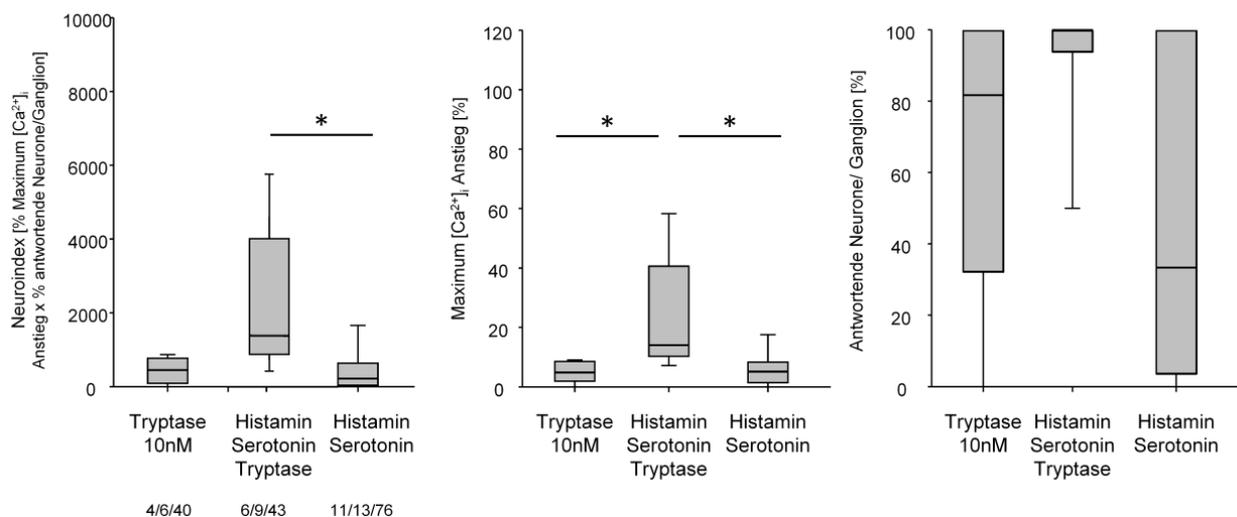


Abbildung 27: Einzelapplikation und Kombination von 10nM Tryptase sowie Histamin/Serotonin/Tryptase.

Die Konzentration der Einzelapplikationen und der Kombination war jeweils identisch, für Histamin und Serotonin wurde jeweils 1 μ M verwendet. Die unterschiedlichen Substanzen und die Kombination daraus wurden jeweils auf humane submuköse Ganglien appliziert. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich neuronaler Aktivität zwischen der Mischung aus Histamin/Serotonin/Tryptase und der Kombination aus Histamin/Serotonin (NI: $p=0,003$; $[Ca^{2+}]_i$: $p=0,003$), sowie der Einzelapplikation Tryptase und Histamin/Serotonin ($[Ca^{2+}]_i$: $p=0,003$). Der prozentuale Anteil antwortender Neurone pro Ganglion unterschied sich nicht signifikant ($p=0,047$, keine Signifikanz im post-hoc Test). Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Geweben/Ganglien/Neuronen an, an denen die Substanzen getestet wurden.

3.3.4. Der Effekt kann nicht mit dem PAR2 AP nachgeahmt werden

Tryptase ist ein bekannter Aktivator des PAR2 Rezeptors (Mueller et al. 2011). Um herauszufinden, ob die Potenzierung über eine klassische PAR2 Aktivierung zustande kommt, wurde das human spezifische PAR2 AP SLIGKV-NH₂ in derselben Weise wie Tryptase verwendet. Die Applikation von PAR2 AP in einer Konzentration, die 1/10 der in

anderen Versuchen verwendeten entspricht, nämlich 10 μ M, erzeugte kaum neuronale Aktivität (65 (0/1129)). Auch die Mischung aus 10 μ M PAR2 AP und 1 μ M Histamin/1 μ M Serotonin brachte keine signifikant höhere Aktivierung (322 (67/1565)) als die Mischung aus 1 μ M Histamin/1 μ M Serotonin alleine ($p=0,513$). Auch für die beiden anderen Parameter ($[Ca^{2+}]_i$ und % antwortender Neurone pro Ganglion ergab sich kein Unterschied (Abbildung 28). Der erwartete Median von 281 für die Mischung war nicht unterschiedlich von dem tatsächlich gemessenen Wert ($p=0,191$).

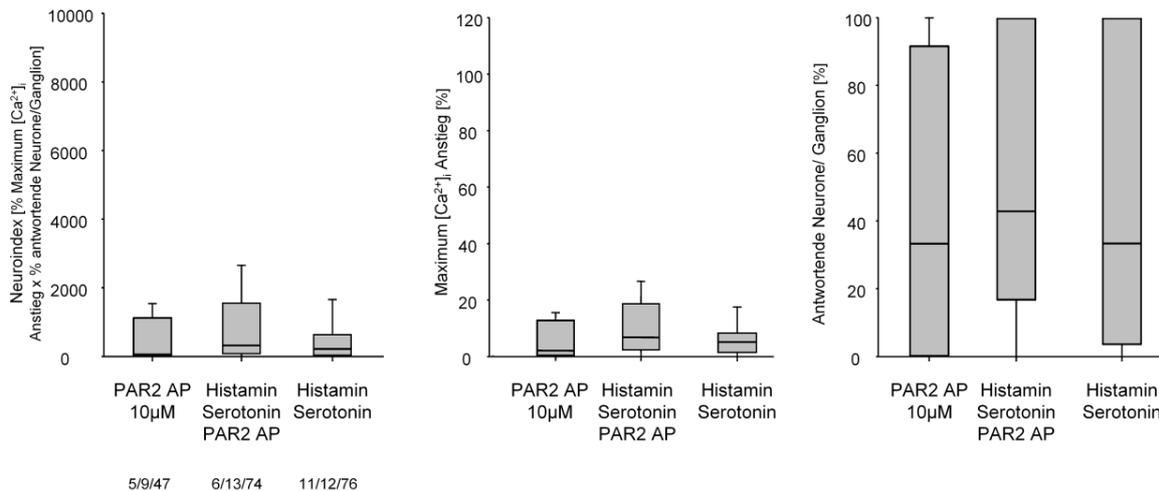


Abbildung 28: Einzelapplikation und Kombination von 10 μ M PAR2 AP (SLIGKV-NH₂) sowie Histamin/Serotonin/PAR2 AP. Die Konzentration der Einzelapplikationen und der Kombination war jeweils identisch, für Histamin und Serotonin wurde jeweils 1 μ M verwendet. Die unterschiedlichen Substanzen und die Kombination daraus wurden jeweils auf humane submuköse Ganglien appliziert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich neuronaler Aktivität zwischen den unterschiedlichen Applikationen (NI: $p=0,513$; $[Ca^{2+}]_i$: 0,237; % antwortende Neurone: 0,721). Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Geweben/Ganglien/Neuronen an, an denen die Substanzen getestet wurden.

3.3.5. Die Zugabe von Trypsin zeigt keine Potenzierung

Es konnte gezeigt werden, dass der PAR1 Rezeptor im humanen submukösen Plexus eine wichtigere Rolle in Bezug auf neuronale Aktivität spielt als PAR2 (Mueller et al. 2011). Daher sollte auch die Wirkung einer PAR1 aktivierenden Protease auf Histamin und Serotonin getestet werden. Als Protease wurde hierfür Trypsin gewählt, welches sowohl als PAR2 Aktivator bekannt ist (Linden et al. 2001) als auch über PAR1 vermittelte Aktivität zeigt (siehe Abschnitt 3.1.4). Obwohl eine geringere Konzentration und kürzere Applikationsdauer gewählt wurde, als für die Versuche unter 3.1.4. (siehe auch 2.2.3.), erzeugte 10nM Trypsin eine deutliche Aktivität (886 (106/1883)). Diese Wirkung wurde durch die gemeinsame Applikation mit 1 μ M Histamin und 1 μ M Serotonin erhöht (1752 (869/4401)) und war sowohl bei Betrachtung des Neuroindex als auch der maximalen Calcium Erhöhung signifikant stärker im Vergleich zu Histamin/Serotonin allein (NI: $p=0,016$; $[Ca^{2+}]_i$: $p=0,016$) aber nicht im Vergleich zu der Einzelapplikation von Trypsin (jeweils $p>0,05$) (Abbildung 29). Der experimentell gemessene Median war nicht unterschiedlich von dem erwarteten Wert für

Trypsin und Histamin/Serotonin ($p=0,148$), was einen additiven Effekt der aktivierenden Wirkung der Substanzen repräsentiert.

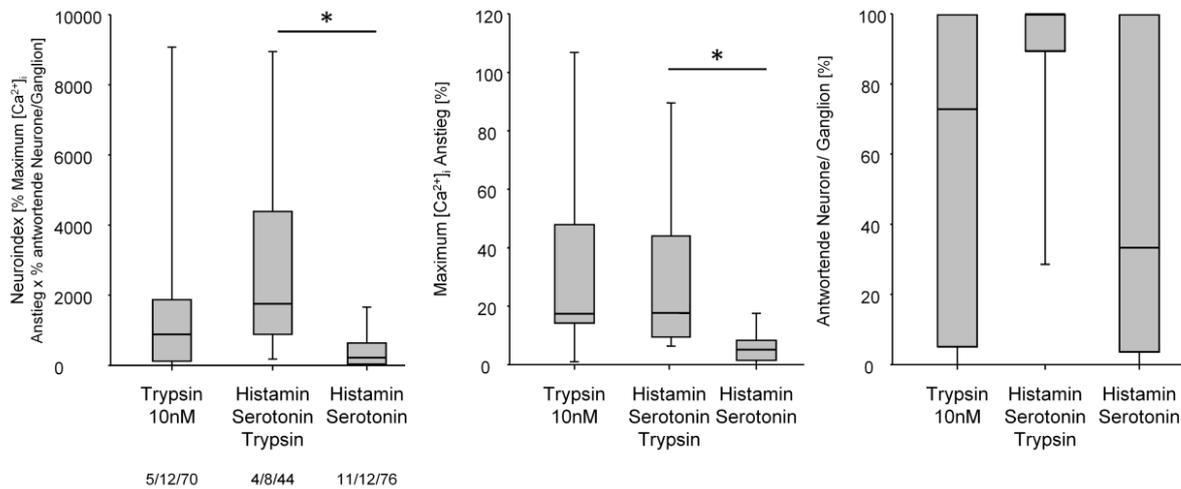


Abbildung 29: Einzelapplikation und Kombination von 10nM Trypsin sowie Histamin/Serotonin/Trypsin. Die Konzentration der Einzelapplikationen und der Kombination war jeweils identisch, für Histamin und Serotonin wurde jeweils 1 μ M verwendet. Die unterschiedlichen Substanzen und die Kombination daraus wurden jeweils auf humane submuköse Ganglien appliziert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich neuronaler Aktivität zwischen der Einzelapplikation von Trypsin und der Kombination aus Trypsin sowie Histamin/Serotonin. Für den Neuroindex und auch [Ca²⁺]_i ergab sich eine signifikant stärkere Antwort auf den Cocktail aus Histamin/Serotonin/Trypsin im Vergleich zu Histamin/Serotonin ($p=0,016$ für beide Parameter). Die Einzelapplikation von Trypsin zeigte jeweils keinen Unterschied zu den beiden Mischungen ($p>0,05$). Für die antwortenden Neurone ergab sich kein Unterschied ($p=0,091$). Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Geweben/Ganglien/Neuronen an, an denen die Substanzen getestet wurden.

3.3.6. Die Aktivierung des PAR1 Rezeptors bewirkt keine Potenzierung

Das PAR1 AP TFLLR-NH₂ wurde verwendet, um spezifisch die Wirkung des PAR1 Rezeptors in der Versuchsanordnung zu testen. Ähnlich wie für Trypsin, hatte auch das PAR1 AP, trotz reduzierter Konzentration im Vergleich zu vorherigen Versuchen (Mueller et al. 2011), eine sehr starke Wirkung auf die submukösen Ganglien. Daher wurden die Versuche zuerst mit 10 μ M PAR1 AP (was 1/10 der Konzentration aus anderen Versuchen entspricht) durchgeführt und anschließend noch einmal mit 1 μ M PAR1 AP, um sicherzugehen, dass durch die starke Aktivierung durch 10 μ M TFLLR-NH₂ die Potenzierung nicht verschleiert wurde.

Die Einzelapplikation von 10 μ M TFLLR-NH₂ erzeugte eine neuronale Aktivität von 4216 (2007/5772) und war nicht unterschiedlich von der Aktivität, die durch die Mischung des AP mit 1 μ M Histamin/1 μ M Serotonin erzeugt wurde (3403 (1945/4370); $p>0,05$). Im Vergleich zu Histamin/Serotonin war die Aktivierung beider Applikationen signifikant stärker ($p<0,001$). Dies galt auch für den [Ca²⁺]_i (10 μ M PAR1 AP: 42% (21/58); Histamin/Serotonin/10 μ M PAR1 AP: 34% (24/45); $p<0,001$) (Abbildung 30). Es bestand kein Unterschied zwischen dem erwarteten Median und dem gemessenen Median für diese Mischung ($p=0,219$).

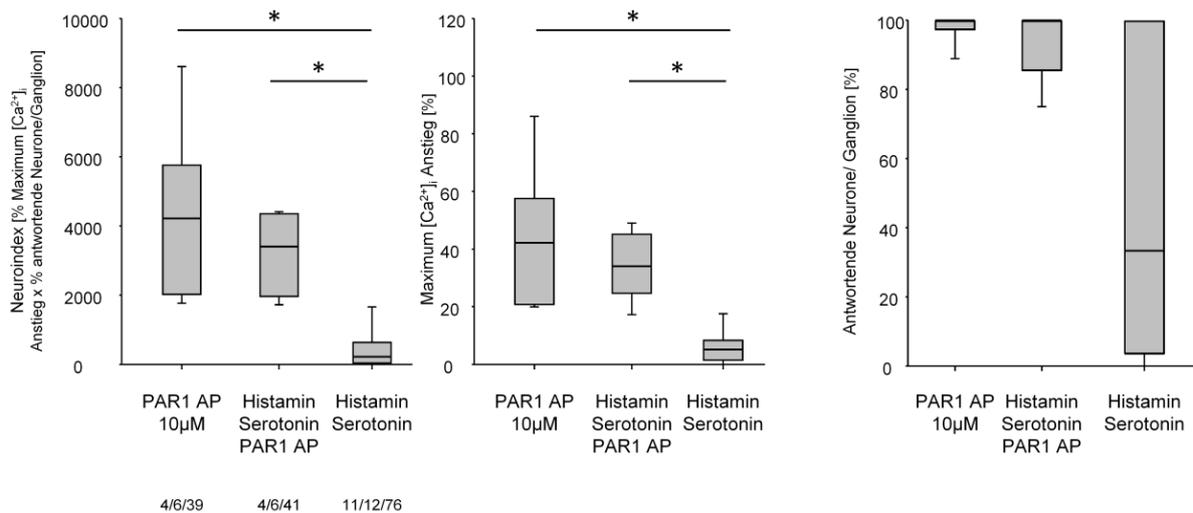


Abbildung 30: Einzelapplikation und Kombination von 10µM PAR1 AP (TFLLR-NH₂) sowie Histamin/Serotonin/PAR1 AP. Die Konzentration der Einzelapplikationen und der Kombination war jeweils identisch, für Histamin und Serotonin wurde jeweils 1µM verwendet. Die unterschiedlichen Substanzen und die Kombination daraus wurden jeweils auf humane submuköse Ganglien appliziert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich neuronaler Aktivität zwischen der Einzelapplikation von 10µM PAR1 AP und der Kombination aus 10µM PAR1 AP und Histamin/Serotonin. Allerdings war sowohl der [Ca²⁺]_i als auch der Neuroindex beider Applikationen deutlich erhöht im Vergleich zu Histamin/Serotonin (jeweils p < 0,001). Für die antwortenden Neurone ergab sich kein Unterschied (p = 0,032; keine Signifikanz im post-hoc Test). Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Geweben/Ganglien/Neuronen an, an denen die Substanzen getestet wurden.

Zur Reduktion der grundsätzlichen Aktivierung durch das PAR1 AP wurde eine Konzentration von 1µM TFLLR-NH₂ verwendet. In dieser Konzentration konnte das Peptid kaum noch neuronale Aktivität erzeugen (NI: 0 (0/218); [Ca²⁺]_i: 0% (0/6); antwortende Zellen: 0% (0/35)). Diese war stärker in der Mischung mit 1µM Histamin/1µM Serotonin (NI: 408 (273/1287); [Ca²⁺]_i: 8% (3/14); antwortende Zellen: 75% (33/100)) erreichte aber keine Signifikanz, weder gegenüber der Einzelapplikation noch gegenüber der Applikation von Histamin/Serotonin (NI: p = 0,098; [Ca²⁺]_i: p = 0,125; antwortende Zellen: p = 0,127) (Abbildung 31). Auch für den Vergleich von tatsächlich gemessenem und kalkuliertem Median ergab sich kein signifikanter Unterschied (p = 0,109).

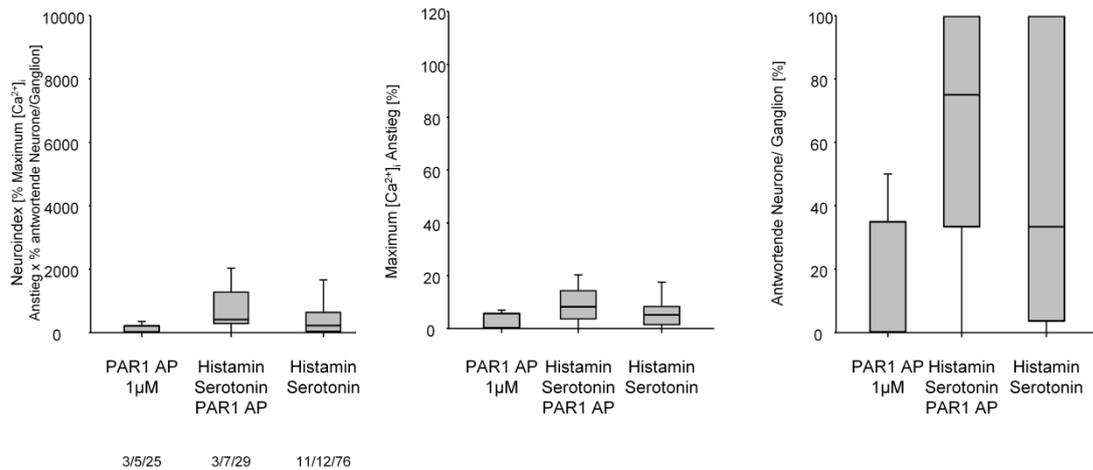


Abbildung 31: Einzelapplikation und Kombination von 1µM PAR1 AP (TFLLR-NH₂) sowie Histamin/Serotonin/PAR1 AP. Die Konzentration der Einzelapplikationen und der Kombination war jeweils identisch, für Histamin und Serotonin wurde jeweils 1µM verwendet. Die unterschiedlichen Substanzen und die Kombination daraus wurden jeweils auf humane submuköse Ganglien appliziert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich neuronaler Aktivität zwischen der Einzelapplikation von 1µM PAR1 AP, der Kombination aus 1µM PAR1 AP und Histamin/Serotonin und der Applikation von Histamin/Serotonin (NI: $p=0,098$; $[Ca^{2+}]_i$: $p=0,125$; antwortende Zellen: $p=0,127$). Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Gewebe/Ganglien/Neurone an, an denen die Substanzen getestet wurden.

3.3.7. Der „biased“ Aktivator neutrophile Elastase zeigt eine verstärkende Wirkung

Neutrophile Elastase wurde als „biased“ Aktivator für PAR1 und PAR2 beschrieben (Mihara et al. 2013; Ramachandran et al. 2011), da diese Protease keine klassische Aktivierung des Rezeptors mit einhergehendem Calcium Einstrom in die Zelle auslöst. Aufgrund dieser Eigenschaft sollte geprüft werden, ob die potenzierende Wirkung, die durch Zugabe der Protease Trypsin zu Histamin und Serotonin beobachtet werden konnte, durch die Wirkung der Protease auf andere Signalwege oder durch Aktivierung des PAR Rezeptors und einen dadurch potenzierten Calcium Einstrom zustande kommt.

Wie unter 3.1.6. beschrieben, induziert neutrophile Elastase allein kaum ein Calcium Signal in Neuronen. In Mischung mit 1µM Histamin/1µM Serotonin hingegen konnte eine neuronale Aktivität von 1499 (746/2111) in 100% (50/100) der Zellen pro Ganglion gemessen werden. Dies unterschied sich signifikant von der Einzelapplikation von neutrophiler Elastase (NI: $p=0,005$; antwortende Zellen: $p=0,027$), jedoch nicht von der Applikation Histamin/Serotonin (jeweils $p>0,05$ im post-hoc Test). Der $[Ca^{2+}]_i$ war signifikant stärker als die Einzelapplikation von neutrophiler Elastase (15% (11/21) und 0% (0/0)) sowie die Applikation von Histamin/Serotonin ($p<0,001$) und stellt dadurch eine Potenzierung dar (Abbildung 32). Der Vergleich mit dem erwarteten Median für die neuronale Aktivierung von Histamin/Serotonin/Elastase ergab einen signifikanten Unterschied ($p=0,016$).

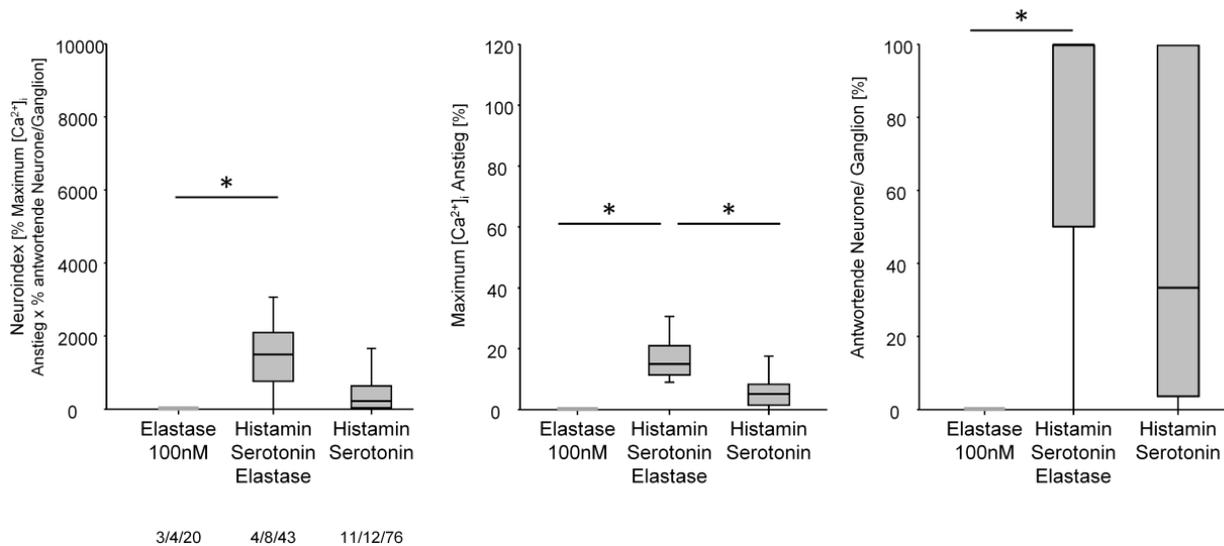


Abbildung 32: Einzelapplikation und Kombination von 100nM neutrophiler Elastase sowie Histamin/Serotonin/Elastase. Die Konzentration der Einzelapplikationen und der Kombination war jeweils identisch, für Histamin und Serotonin wurde jeweils 1 μ M verwendet. Die unterschiedlichen Substanzen und die Kombination daraus wurden jeweils auf humane submuköse Ganglien appliziert. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied für den intrazellulären Calcium Anstieg zwischen Histamin/Serotonin/Elastase und der Applikation von Elastase sowie der Applikation von Histamin/Serotonin ($p < 0,001$). Für die neuronale Aktivität sowie die antwortenden Zellen bestand lediglich ein Unterschied zwischen Histamin/Serotonin/Elastase und Elastase (NI: $p = 0,005$; antwortende Zellen: $p = 0,027$). Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Geweben/Ganglien/Neuronen an, an denen die Substanzen getestet wurden.

3.3.8. Spezifische PAR Antagonisten haben keinen Einfluss auf die Potenzierung

Um herauszufinden, ob die Antwort auf die Mischung aus Histamin, Serotonin und einer Protease durch das Blockieren der PAR-vermittelten Antwort verändert ist, wurden Versuche mit den einzelnen Mischungen und den entsprechenden Blockern für die aktivierten PARs durchgeführt.

PAR2 Antagonist GB83

Die Mischung Histamin/Serotonin/Tryptase wurde ohne und mit dem PAR2 Antagonist GB83 (2 μ M) (Barry et al. 2010) getestet. Die PAR2 blockierende Wirkung war zuvor in der Ussing Kammer bestätigt worden (siehe oben). Es ergab sich kein Unterschied ($p = 0,876$) für die neuronale Aktivität vor (1147 (218/1557)) und nach der Perfusion von GB83 (676 (365/1690)). Auch der maximale Calcium Anstieg (11% (3/16) und 10% (7/20); $p = 0,876$) sowie der Prozentsatz antwortender Neurone pro Ganglion (100% (29/100) und 67% (50/100); $p = 0,53$) war nicht unterschiedlich vor im Vergleich zu nach GB83 (Abbildung 33).

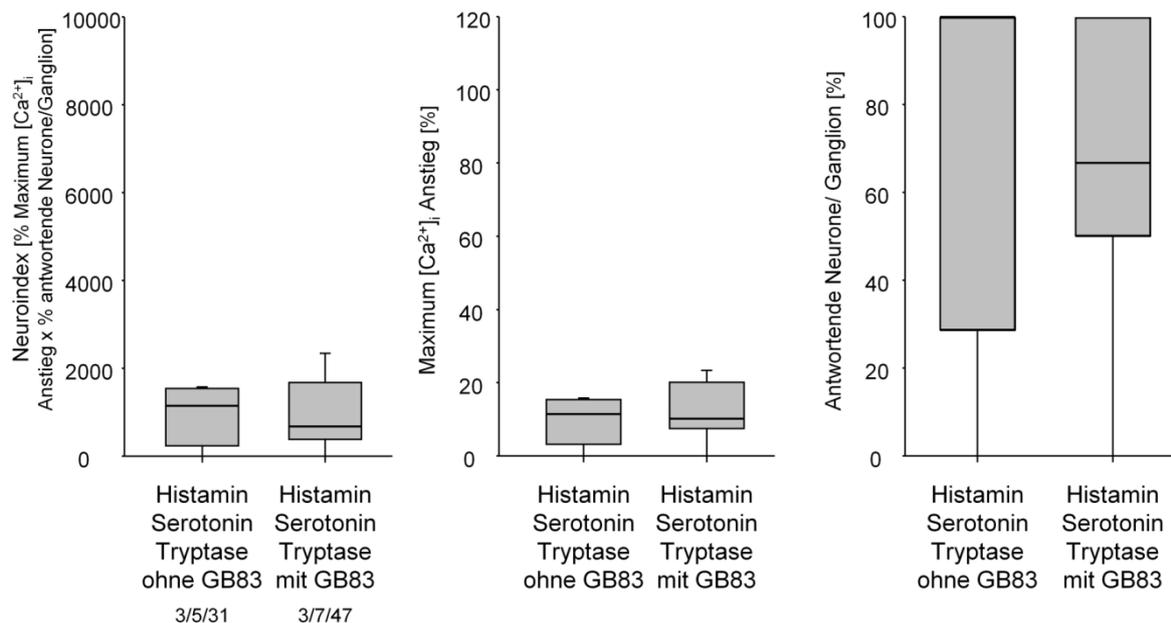


Abbildung 33: Verwendung des PAR2 Antagonisten GB83 (2 μ M) mit der Mischung Histamin/Serotonin/Tryptase. Es wurde jeweils die Antwort auf die Applikation vor der Perfusion von GB83 und nachher getestet und verglichen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für alle Varianten (NI: $p=0,876$; $[Ca^{2+}]_i$: $p=0,876$; % antwortender Zellen: $p=0,53$). Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Geweben/Ganglien/Neuronen an, an denen die Substanzen getestet wurden.

PAR1 Antagonist SCH79797

Da ein Großteil der erzeugten Antwort durch Trypsin im humanen submukösen Plexus über PAR1 vermittelt wird (siehe 3.1.4), wurde der PAR1 Antagonist SCH79797 (10 μ M) verwendet, um den Anteil der PAR1 vermittelten Antwort zu blockieren.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der neuronalen Aktivität von 2765 (1649/3999) vor und 1276 (454/1702) nach Perfusion ($p=0,014$) von SCH79797, jedoch nicht des $[Ca^{2+}]_i$ Anstiegs (28% (16/40) und 14% (5/21); $p=0,051$) oder des Anteils antwortender Zellen (100% (100/100) und 100% (88/100); $p=0,445$) (Abbildung 34).

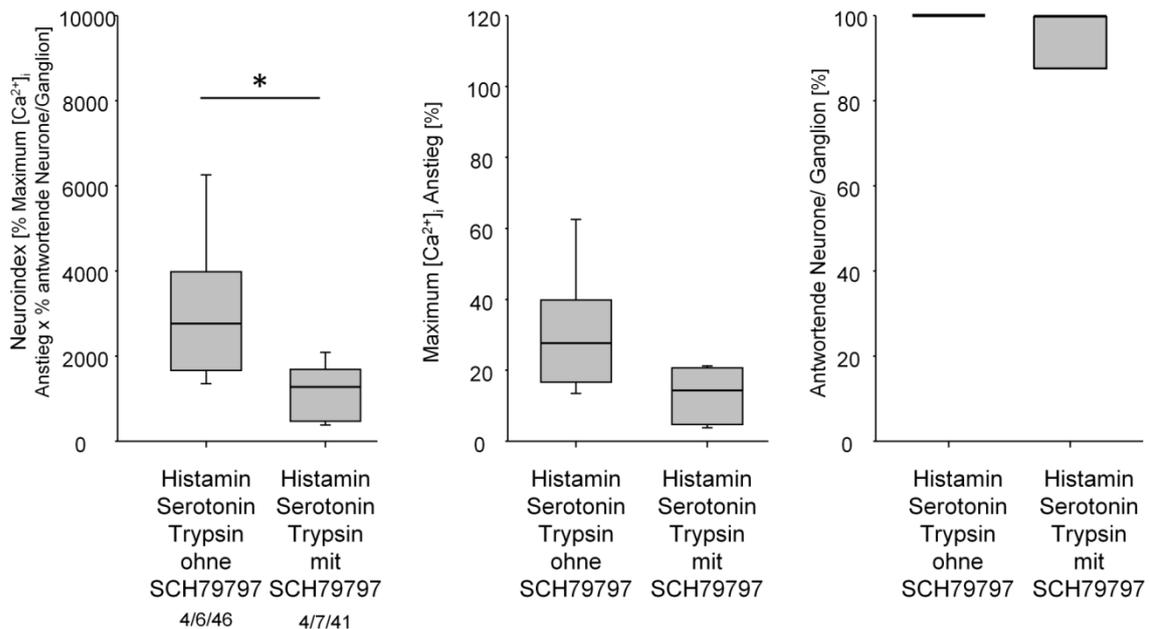


Abbildung 34: Verwendung des PAR1 Antagonisten SCH79797 (10 μ M) mit der Mischung Histamin/Serotonin/Trypsin. Es wurde jeweils die Antwort auf die Applikation vor der Perfusion von SCH79797 und danach getestet und verglichen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für $[Ca^{2+}]_i$ ($p=0,051$) und % antwortender Zellen ($p=0,445$). Die neuronale Aktivität ausgedrückt als Neuroindex hingegen war signifikant erniedrigt nach Perfusion mit SCH79797 ($p=0,014$). Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Gewebe/Ganglien/Neuronen an, an denen die Substanzen getestet wurden.

Der PAR1 Antagonist SCH79797 wurde in identischer Konzentration für die Mischung Histamin/Serotonin/Elastase getestet. Zwar zeigt neutrophile Elastase allein keine Wirkung und damit kann eine klassische Aktivierung des PAR1 Rezeptors, die einen Calcium Einstrom auslösen würde, ausgeschlossen werden. Dennoch sollte getestet werden, ob andere Einflüsse auf den PAR1 Rezeptor blockiert werden können. Mihara et al. (2013) beschreibt in seiner Veröffentlichung über die „*biased activation*“ des PAR1 Rezeptors durch neutrophile Elastase, dass intrazellulär aktivierte Pfade, wie beispielsweise die MAP Kinase, durch SCH79797 zumindest teilweise blockiert werden konnten.

Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Applikation vor und nach der Perfusion mit SCH79797 (NI: $p=0,595$; $[Ca^{2+}]_i$: $p=0,543$; % antwortende Zellen: $p=0,23$) (Abbildung 35).

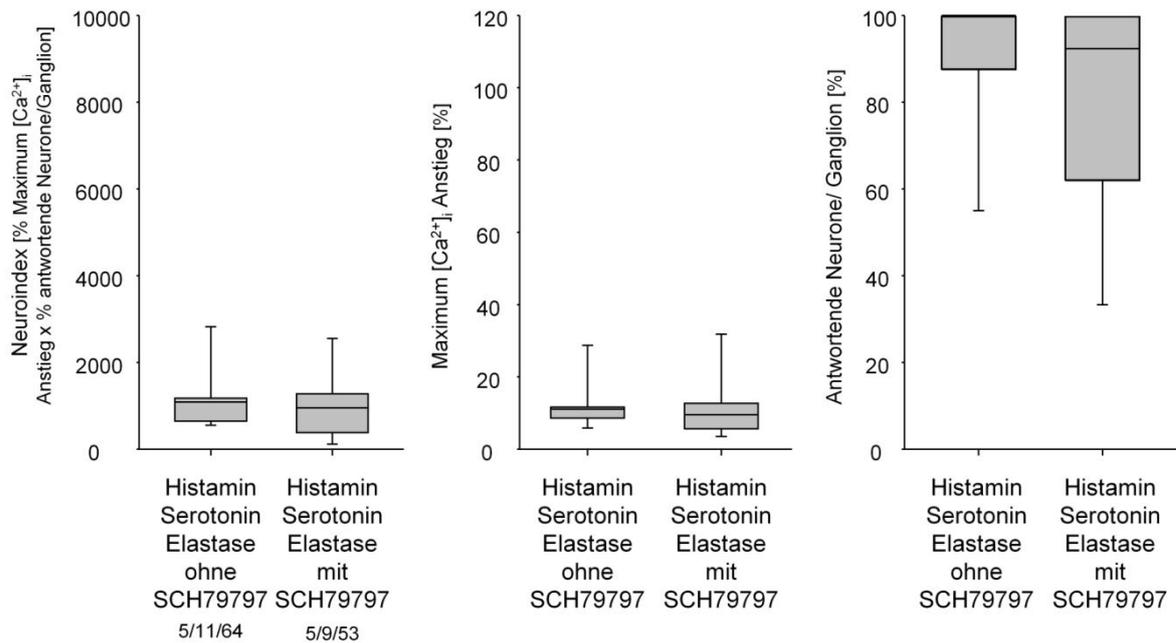


Abbildung 35: Verwendung des PAR1 Antagonisten SCH79797 (10 μ M) mit der Mischung Histamin/Serotonin/Elastase. Es wurde jeweils die Antwort auf die Applikation vor der Perfusion von SCH79797 und nachher getestet und verglichen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für alle Varianten (NI: $p=0,595$; $[Ca^{2+}]_i$: $p=0,543$; % antwortender Zellen: $p=0,23$). Die angegebenen Zahlen unterhalb der Beschriftung geben die Anzahl an Geweben/Ganglien/Neuronen an, an denen die Substanzen getestet wurden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Hauptthemen behandelt. Zum einen wurde die Methode des Neuroimaging mittels Calcium und spannungssensitiver Farbstoffe für humane Routinebiopsien etabliert, um die Neuropathophysiologie der Erkrankung Reizdarmsyndrom zu untersuchen. Dies ermöglichte die bislang erste elektrophysiologische Charakterisierung von submukösen Ganglien von Reizdarmpatienten und deren Vergleich mit Ganglien von gesunden Kontrollen. Dabei konnte festgestellt werden, dass - entgegen der ursprünglichen Annahme - submuköse Neurone von Patienten mit Reizdarmsyndrom nicht hypersensitiv sind. Auf die akute Druckapplikation eines Mediator Cocktails, der die Zusammensetzung von Überständen von Schleimhautbiopsien nachahmen sollte, zeigten sich die Ganglien sogar desensibilisiert im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Auch in der Submukosa befindliche Immunzellen waren nicht stärker erregbar als bei gesunden Kontrollen.

Zum anderen wurden gegenseitige Verstärkungswirkungen einzelner Mediatoren untersucht, die vor allem in Überständen von Kolonbiopsien von Reizdarmpatienten in erhöhter Konzentration gemessen worden waren. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe der Serin Proteasen Trypsin und neutrophile Elastase zu einer Mischung aus Serotonin und Histamin für eine synergistische Potenzierung der Aktivierung von submukösen Ganglien in Darmresektaten sorgten. Diese verstärkte Erregung war unabhängig von der klassischen Aktivierung von PAR Rezeptoren, da sie weder durch spezifische PAR APs nachgeahmt, noch durch Antagonisten gehemmt werden konnte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine Erklärung dafür ableiten, wieso die geringe Konzentration von Mediatoren in Überständen von Reizdarmpatienten dennoch deutlich aktivierend auf enterische Neurone und Spinalganglien wirkt, wie vorangegangene Studien zeigen konnten. Auch kann eine plausible Erklärung daraus abgeleitet werden, dass die Hemmung eines einzelnen Mediators beziehungsweise einer Gruppe von Mediatoren, beispielsweise Serin Proteasen, dazu führt, dass der Schleimhautüberstand keine neuronale Aktivität mehr hervorrufen kann, wie ebenfalls in vorangegangenen Studien demonstriert worden war. (Buhner et al. 2012; Hughes et al. 2013a)

Zusätzlich wurden unterschiedliche Vorversuche durchgeführt: Zum einen waren diese für die Klärung der beiden Hauptfragen notwendig, zum anderen bilden sie die Grundlage für zukünftige Experimente.

4.1. Die Rolle von TNF- α im Krankheitsbild Reizdarmsyndrom

TNF- α ist ein entzündungsförderndes Zytokin und spielt daher bei entzündlichen Erkrankungen, wie Arthritis (Mease 2007) oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Bouchaud et al. 2010) eine wichtige Rolle. Auch bei RDS Patienten konnte eine Assoziation zwischen der Produktion von TNF- α und dem Auftreten von RDS festgestellt werden (van der Veek, Patrick et al. 2005). Eine eindeutige Prädisposition durch den auftretenden Polymorphismus für die Entwicklung von RDS konnte noch nicht endgültig nachgewiesen werden (siehe Bashashati et al. 2012). Dennoch scheint die genetische Konfiguration der heterozygoten „*high producer*“ (stark produzierende Personen) einen Einfluss auf die Entstehung und das Fortbestehen der Krankheit zu haben, zumindest bei Betrachtung des Postinfektiösen und Diarrhö prädominanten RDS (Swan et al. 2013). Aus diesem Grund könnte ein TNF- α Antikörper wie Adalimumab, unter Abwägung der negativen Effekte durch Nebenwirkungen (Mease 2007), auch für die Behandlung oder Prävention von RDS in Frage kommen.

Die Rolle von TNF- α bei der nerv aktivierenden Wirkung von Schleimhautüberständen von RDS Patienten auf enterische Neurone ist bislang noch ungeklärt. Hughes et al. (2013a) zeigte, dass TNF- α in PBMC Überständen von RDS-D Patienten viszerale mechanische Hypersensibilität in Mäusen auslöste. Dieser Effekt konnte mit dem TNF- α bindenden Antikörper Infliximab reduziert werden. Diese Erkenntnis beschränkte sich auf Überstände von RDS-D Patienten und traf nicht für RDS-O Patienten zu. Die Bedeutung des Zytokins wird dadurch unterstrichen, dass TNF- α im Blut vieler RDS-Patienten in deutlich erhöhter Konzentration gemessen werden kann im Vergleich zu gesunden Kontrollen (vergleiche Bashashati et al. 2014). Die Vorversuche an Meerschweinchen-Präparaten unter Verwendung des humanen monoklonalen Antikörpers Adalimumab zeigten, dass der Antikörper selbst keine Wirkung auf die neuronale Aktivität hat. Die Eliminierung von TNF- α durch Bindung an den Antikörper reduzierte allerdings die neuronale Aktivität ausgelöst durch akute Applikation des Mediator Cocktails signifikant (Abbildung 11). Dass diese Reduktion durch das Fehlen des Zytokins zu Stande kam, konnte in Kontrollversuchen bestätigt werden, bei denen der Mediator Cocktail gegen einen entsprechenden Cocktail ohne Zugabe von TNF- α getestet wurde. Auch dabei zeigte sich eine Reduktion der Aktivierung (Abbildung 12).

Rehn et al. (2004) beschrieb die verändernde Wirkung von TNF- α auf kultivierte, intakte myenterische Ganglien von neugeborenen Ratten. Er stellte eine deutliche Hyperpolarisation nach 20 Stunden Inkubation der Ganglien mit TNF- α fest. Gleichzeitig berichtet er von einer Potenzierung der Antwort ausgelöst durch Aktivierung der nAChR die auf Hochregulation

von Cyclooxygenase 2 (COX2) und Thromboxane A₂ zurück geführt wird (Rehn et al. 2005). Die stärkere Aktivierung der submukösen Neurone des Meerschweinchens durch den Cocktail mit TNF- α im Vergleich zu ohne TNF- α , die in der vorliegenden Arbeit beobachtet worden ist, deutet ebenfalls auf einen Einfluss des Zytokins hin. Während in den vorangegangenen Studien die kultivierten Ganglien für 20 Stunden mit dem Zytokin inkubiert worden waren (Rehn et al. 2005; Rehn et al. 2004), beschränkte sich die Exposition der Neurone durch die 600ms andauernde Druckapplikation in der vorliegenden Arbeit auf wenige Sekunden. Dieser kurze Zeitraum scheint ausreichend für TNF- α , um auf die Physiologie der Ganglien einzuwirken.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen Vorversuche dar. Nachdem gezeigt werden konnte, dass TNF- α eine direkte Wirkung auf enterische Neurone in Zusammenhang mit Mediatoren, die in Schleimhautüberständen von RDS-Patienten gefunden wurden, zu haben scheint, müssen diese Erkenntnisse mit RDS-Schleimhautbiopsien überprüft werden. Diese Proben enthalten noch viele weitere Zytokine und Mediatoren, die vor allem aus der Mukosa stammen und daher auch durch die Versuche von Hughes et al. (2013a) an PBMC Überständen nicht abgedeckt werden konnten.

4.2. Neuroimaging an humanen intestinalen Biopsien

Die Neuroimaging Methode mittels spannungssensitiver und Calcium sensitiver Farbstoffe wird seit langem erfolgreich zur Untersuchung neuronaler Aktivität im enterischen Nervensystem eingesetzt (Schemann et al. 2002). Zeitgleich mit der vorliegenden Arbeit, etablierte Cirillo et al. (2013) diese Methode für humane Darmbiopsien. Da beispielsweise beim Reizdarmsyndrom keine operative Entfernung von Darmsegmenten erforderlich ist, stellt die Verwendung von Biopsien eine gute Quelle zur direkten Untersuchung von Gewebeproben in *in vitro* Versuchen dar - eine Möglichkeit die zuvor ungenutzt blieb. Schon die immunhistochemische Untersuchung solcher Biopsien, die Isolation von löslichen Schleimhautmediatoren sowie die Messung von Permeabilität und Sekretion brachten einige Erkenntnisse über die Pathophysiologie dieser funktionellen Darmerkrankung (siehe Nasser et al. 2014). Cirillo et al. (2013) etablierte die Methode für Biopsien aus dem Duodenum. Die hier verwendete Methode unterscheidet sich in mehreren Aspekten von dem beschriebenen Aufbau. Neben der veränderten Lokalisation (*Colon sigmoideum* anstatt Duodenum) stellt die Tatsache, dass die Mukosa während des Versuchs intakt und in direktem Kontakt mit dem submukösen Plexus bleibt, die gravierendste Änderung dar. Diese wurde gewählt, um sicherzustellen, dass die submukösen Ganglien weiterhin allen Mediatoren ausgesetzt sind, von denen sie auch im intakten Darm umgeben waren und sollte verhindern, dass aufgrund der fehlenden Mediatoren die Neurone readaptieren und es damit nicht mehr möglich wäre,

Änderungen der neuronalen Physiologie zu messen. Die These stützt sich auf Messungen, die an Überständen von Schleimhautbiopsien vorgenommen worden waren (Buhner et al. 2009), in denen unter anderem Serotonin detektiert wurde, welches hauptsächlich in enterochromaffin Zellen produziert und ausgeschüttet wird, die sich in der Epithelschicht der Mukosa befinden und unter anderem wichtige Regulatoren für die Sekretion darstellen (Braun et al. 2007). Desweiteren sollte eine Beschädigung des fragilen Gewebes und eine fehlende oder reduzierte Erregbarkeit der Neurone ausgelöst durch Präparation minimiert werden (Carbone et al. 2014). Es zeigte sich, dass das Belassen der Mukosa unterhalb des submukösen Plexus kein Problem während der Aufnahmen für das Neuroimaging darstellte.

Es gab dennoch Limitationen, die die Etablierung der Methode erschwerten. Etwa 40% der gelieferten Proben waren zu oberflächlich und enthielten lediglich Mukosa, ohne submuköses Gewebe. Dies steht in Kontrast zu der originären Studie (Lebouvier et al. 2009), nach der alle Biopsien ausreichend Ganglien enthielten (im Mittel 34 ± 3). Dies haben weder wir mit im Mittel 8 ± 5 Ganglien pro Biopsie noch Cirillo et al. (2013) mit im Mittel $7,7 \pm 6$ Ganglien erreicht. Es muss hierbei erwähnt werden, dass sich die Studie von Lebouvier et al. (2009) auf nur drei Patienten bezieht und damit eine zufällige Komponente als Erklärung für die stark erhöhte Zahl an Ganglien pro Stück nicht ausgeschlossen werden kann. Desweiteren wurden die Biopsien für das vorliegende Projekt in drei unterschiedlichen Zentren während des laufenden Praxis- beziehungsweise Klinikbetriebs entnommen, was einen Grund für die geringere Ausbeute darstellen könnte.

Auch die Rekrutierung von Patienten aus Kliniken und Privatpraxen, die als Erst- oder Zweitversorger tätig werden, stellte sich als problematisch heraus. So war es beispielsweise nicht möglich, demographisch aufeinander abgestimmte Patientengruppen zu bilden, da für die Gruppe der Kontrollen überproportional mehr Menschen über 55 Jahre zur Verfügung standen. Bernard et al. (2009) führten Untersuchungen an humanen Gewebeproben des Kolons von Patienten mit Kolonkarzinom durch und entdeckten eine Abnahme der Anzahl Neurone im myenterischen Plexus, hauptsächlich der ChAT positiven Neurone, in Abhängigkeit des Alters. Dieser Rückgang war allerdings im submukösen Plexus nicht zu beobachten. In der durchgeführten Studie mit Biopsien konnte keine Korrelation zwischen der Aktivität ausgelöst durch die Stimuli Nikotin und elektrische Stimulation und dem Alter der Patienten festgestellt werden. Auch durch die Korrelation des maximalen Calcium Anstiegs nach Nikotin Applikation in Darmresektaten, die für die Versuche zur Potenzierung von Mediatoren verwendet worden waren, konnte kein Zusammenhang zwischen Antwortstärke und Alter gefunden werden. Lediglich der Mediator Cocktail in den Versuchen an Schleimhautbiopsien wies eine schwache aber signifikante Korrelation mit dem Alter auf. Breunig et al. (2007) fand keine Korrelation zwischen Alter der Patienten und Antwort auf

Histamin oder spezifische Agonisten. Das Durchschnittsalter lag in dieser Studie von 2007 deutlich höher, allerdings erstreckte sich die Variation von 25 Jahre bis 88 Jahre und deckt damit den in der vorliegenden Studie untersuchten Bereich ab. Auch Michel et al. (2005) und Mueller et al. (2011) führten ihre Untersuchungen an Gewebeproben von Patienten dieses Altersspektrums durch. In beiden Studien wird nicht über Zusammenhänge in Bezug auf das Alter der Patienten eingegangen. Demnach wird davon ausgegangen, dass es sich bei der vorliegenden Korrelation für den Mediator Cocktail mit dem Alter, die darauf hindeutet, dass ältere Patienten stärker auf den Mediator Cocktail reagieren als junge, um ein Phänomen handelt, welches aus der ungleichen Verteilung bezüglich des Alters zwischen gesunden Kontrollen und RDS Patienten resultiert. Verifiziert werden kann diese Vermutung allerdings nur durch das Einführen einer entsprechenden jüngeren Gruppe von Kontrollen. Gleiches gilt für den unerklärlichen Effekt, dass männliche gesunde Kontrollen weniger stark auf elektrische Stimulation reagierten als Frauen. Auch dies scheint auf die ungleiche Verteilung innerhalb der beiden Gruppen zurück zu führen zu sein und müsste durch die Verwendung ausgeglichener Gruppen überprüft werden.

In manchen Kohorten von RDS Patienten wurde eine erhöhte Anzahl von Mastzellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen in der Darmwand gefunden, die teilweise mit Symptomen wie viszerale Hypersensitivität korrelierte (Barbara et al. 2004; Cremon et al. 2009; Park et al. 2006). Auch die Symptom lindernde Wirkung des Mastzell Stabilisators Ketotifen deutet auf eine Beteiligung von Mastzellen in der Mukosa von RDS Patienten hin, auch wenn in dieser Studie keine erhöhte Anzahl dieser Immunzellen festgestellt werden konnte (Klooker 2010). Diese vermeintliche erhöhte Aktivität von Immunzellen in direkter Umgebung der enterischen Ganglien kann in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die quantitative Beschreibung der Antworten von nicht-neuronalen Zellen, die sich außerhalb der Ganglienhülle befinden, zeigte keine Unterschiede in der Aktivität dieser Zellen im Vergleich von gesunden Kontrollen und RDS Patienten. Sowohl die Anzahl als auch der gemessene intrazelluläre Calcium Anstieg waren nicht signifikant unterschiedlich, sowohl nach Applikation von Nikotin als auch des Mediator Cocktails. Die Tatsache, dass nur wenige Ganglien durch immunhistochemische Färbungen eindeutig identifiziert werden konnten, das Eindecken der Gewebe für die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop teilweise zu starker Verzerrung und veränderter Lage der Zellen führte, die geringe Auflösung der Hochgeschwindigkeitskamera keine genauen Umrisse der antwortenden Zellen erkennen lässt und zusätzlich die Zuordnung der Signale zu Mastzellen oder CD68+ Zellen kaum möglich war (Abbildung 24), ließ keine detailliertere Auswertung zu. Eine Lebendfärbung nach dem Versuch wäre eine zukünftige Alternative, um direkt die nicht-neuronalen Zellen zu identifizieren und deren Anzahl zu zählen sowie sie bildlich für eine spätere Überlagerung mit dem Calcium Imaging Bild festzuhalten.

Die Tatsache, dass die Überstände von Schleimhautbiopsien von Reizdarmpatienten und die darin enthaltenen Mediatoren nach akuter Applikation eine erregende Wirkung auf enterische Neurone von humanen und Meerschweinchen Präparaten (Buhner et al. 2009) sowie auf sensorische Neurone der DRG (Barbara et al. 2007; Hughes et al. 2013a) haben, führte zu der Hypothese, dass enterische Ganglien von RDS Patienten einer ständigen Aktivierung ausgesetzt und dadurch hypersensitiv sind. In den vorliegenden Versuchen an enterischen Neuronen und mit der angewendeten Technik konnte keine derartige Hypersensibilisierung festgestellt werden, stattdessen zeigte sich eine Desensibilisierung von Ganglien in Gewebeproben von RDS Patienten auf einen Cocktail aus Histamin, Serotonin, Tryptase und TNF- α . Die neuronale Aktivität von Ganglien in Biopsien von HC und RDS für die allgemeinen neuronalen Stimuli Nikotin und elektrische Stimulation war jeweils nicht unterschiedlich. Ein Vergleich der aktivierten Flächen in einzelnen Ganglien, die sowohl mit einer Nikotin Applikation als auch elektrischer Punktstimulation untersucht worden waren, zeigte, dass größtenteils die aktivierte Fläche durch elektrische Stimulation geringer war als durch die Druckapplikation von Nikotin. Dies war gleichermaßen für Ganglien von gesunden Kontrollen und RDS Patienten der Fall. Eine Vermutung für die Ursache dieser Diskrepanz ist die Tatsache, dass mit der Punktelektrode nur ein einzelner interganglionärer Faserstrang direkt stimuliert werden kann, obwohl teilweise bis zu 6 dieser Stränge ein Ganglion in das Netzwerk einbinden (siehe Abbildung 19). Dadurch kann es vorkommen, dass nicht alle neuronalen Somata innerhalb des betrachteten Ganglions aktiviert werden, weil sie keine Synapsen mit den stimulierten Fasern bilden. Allerdings konnte in den vorliegenden Versuchen keine Korrelation zwischen der aktivierten Fläche pro Ganglion und der Anzahl der Nervenstränge gefunden werden (siehe Abbildung 20). Einen weiteren Einfluss kann das umgebende Bindegewebe darstellen, welches die Nervenstränge bedeckt und dadurch isolierend wirkt, wodurch die Stromstärke eventuell zu gering sein kann, um alle Fasern zu aktivieren. Die Tatsache, dass die aktivierte Fläche sowohl in der Gruppe der HC als auch der RDS Patienten kleiner war, zeigt, dass dieser Effekt in den Geweben beider Kohorten gleichermaßen aufgetreten sein muss. Die Verwendung einer Feldstimulation, bei der eine elektrische Spannung über einen größeren Bereich des Gewebes angelegt wird und damit alle vorhandenen Fasern gleichermaßen aktiviert werden, sollte diesen Effekt eliminieren. Aus den vorliegenden Untersuchungen lässt sich jedenfalls keine gestörte synaptische Übertragung oder eine Veränderung an den postsynaptischen nAChR feststellen, da weder die elektrische Stimulation noch die Spritzapplikation von Nikotin einen Unterschied zwischen HC und RDS gezeigt haben.

Die akute Druckapplikation des Mediator Cocktails erzeugte deutliche Antworten in Ganglien von HC. Die induzierte neuronale Aktivität in Gewebeproben von RDS Patienten hingegen war signifikant reduziert im Vergleich zu HC. Diese Desensibilisierung war in allen

untersuchten Subgruppen, nämlich RDS-D, RDS-C und RDS-Blähtyp, präsent. Dieser Umstand deckt sich mit den Ergebnissen aus Studien mit Schleimhautüberständen, die keinen Unterschied im Grad der Aktivierung für die Untergruppen des RDS gefunden haben (Buhner et al. 2009).

Dies konnte auch in Experimenten mit submukösem Gewebe von Meerschweinchen reproduziert werden. Diese waren durch Inkubation mit RDS oder HC Überständen über Nacht konditioniert worden. Analog zu den Ergebnissen der Versuche mit Biopsien, zeigten sich keine Unterschiede in der neuronalen Aktivität als Antwort auf Nikotin Applikation. Die Aktivität auf die akute Applikation des RDS Überstands hingegen konnte in den Geweben, die mit diesem RDS-Überstand inkubiert worden waren, signifikant weniger Aktivität auslösen als in denjenigen, die mit dem HC Überstand inkubiert worden waren.

Obwohl es den Anschein erwecken mag, widersprechen diese Ergebnisse keineswegs den bisherigen Erkenntnissen, dass Mediatoren in Schleimhautbiopsien aktivierend auf enterische Neurone und DRG Neurone wirken (Buhner et al. 2009; Buhner et al. 2012; Buhner et al. 2014; Hughes et al. 2013a). Die Applikation des Mediator Cocktails und auch des RDS Überstands konnte in gesunden Kontrollgeweben (von HC Biopsien oder HC inkubiertem Meerschweinchen SMP) eindeutige Antworten der Neurone erzeugen. Dies zeigt zum einen, dass der entworfene Mediator Cocktail erfolgreich das Milieu von Schleimhautbiopsien von RDS Patienten nachahmt. Zum anderen konnten die vormals erworbenen Erkenntnisse mit der neuen, hier erstmals angewendeten Methode, reproduziert werden. Dass die Applikation des Mediator Cocktails oder des RDS Überstands keine oder eine deutlich geringere Aktivität nach Applikation auf RDS Ganglien (RDS Biopsien oder RDS inkubiertem Meerschweinchen SMP) zeigte, stellt eine neue Erkenntnis dar und deutet auf Prozesse der Desensibilisierung hin. Alle im Mediator Cocktail enthaltenen Substanzen führen zu einer Desensibilisierung oder Internalisierung ihrer Rezeptoren auf enterischen Neuronen (O'Malley et al. 2011; Michel et al. 2005; Mueller et al. 2011; Breunig et al. 2007), nachdem sie den Rezeptor aktiviert und damit neuronale Aktivität ausgelöst haben. Aus diesem Grund scheint es verständlich, dass Neurone nach konstanter Exposition mit verminderter Aktivität reagieren, da vermutlich die entsprechenden Rezeptoren eine Desensibilisierung oder Internalisierung erfahren haben. Vor allem PAR Rezeptoren internalisieren sobald der Ligand an den Rezeptor gebunden hat (Déry et al. 1998). Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass Proteasen wesentlich an der Wirkung des Mediator Cocktails beteiligt sind, führt im Umkehrschluss eine PAR Desensibilisierung zu einer massiven Reduzierung der Antwort. Erst nach dem Wiedereinbau in die Membran ist der Rezeptor wieder aktivierbar (Déry et al. 1998; Ossovskaya und Bunnnett 2004). Die Tatsache, dass nicht nur die Konzentration mancher Proteasen sondern auch deren Aktivität im

Darmlumen von RDS Patienten erhöht ist im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Tooth et al. 2014), unterstützt die Vermutung, dass hier die Ursache für die verminderte Aktivierbarkeit liegen könnte. Eine Bestätigung dieser Hypothese könnten weiterführende Experimente bringen, wie beispielsweise immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern für die Rezeptoren, die zeigen könnten, ob diese bei Reizdarmpatienten signifikant häufiger internalisiert und damit nicht mehr aktivierbar sind. Es wäre auch eine Versuchsreihe denkbar, in der Proteasen allein aber in hoher Konzentration appliziert werden, um herauszufinden, ob die Rezeptoren von Kontrollpersonen häufiger aktiviert werden können als die von Reizdarmpatienten. Als Kontrollstimulus könnten spezifische PAR APs verwendet werden, um zu zeigen, ob nur die Aktivierung durch Proteasen unterbunden ist, weil beispielsweise der Ligand „disarmed“ ist.

Die Desensibilisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist ein physiologisches Instrument, um eine Übererregung zu vermeiden (Gainetdinov et al. 2004). Im Falle von PARs stellt Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren den Mechanismus dar, mit dem die Aktivierung des Rezeptors beendet werden kann (Ossovskaya und Bunnett 2004), da andernfalls die Bindung des Liganden an den Rezeptor zu einer dauerhaften Aktivierung führen würde. Abhängig davon, welche Funktion der stillgelegte Rezeptor eingenommen hat, führt seine Desensibilisierung entweder direkt zu einer fehlenden Erregbarkeit oder aber er greift dadurch in eine Feedback-Schleife ein, so wie es für die Entstehung von Depression und Angstzuständen beschrieben worden ist (vergleiche Boyer 2000), und verhindert beispielsweise die Terminierung einer Ausschüttung von Mediatoren. Da gerade die G-Protein gekoppelten Rezeptoren viele verschiedene Signalwege steuern und insbesondere PARs Einfluss auf diverse Rezeptoren haben können (vergleiche Ossovskaya und Bunnett 2004) sollte eine Desensibilisierung dieser Rezeptoren erwartungsgemäß Folgen für die Pathophysiologie haben.

Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen um eine unphysiologische Veränderung aufgrund der Entnahme der Biopsie handelt. Bei Biopsieentnahme könnte durch mechanische Stimulation Mediatoren freigesetzt werden, die dann zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren führen. Dies würde sowohl bei der Gewinnung von Schleimhautüberständen als auch von Biopsien für *in vitro* Versuche auftreten. Dies würde aber Biopsien von gesunden Kontrollen gleichermaßen betreffen wie RDS Patienten, denn es gibt keine Hinweise, dass die RDS Schleimhaut besonders fragil oder sensibel wäre.

Welche physiologischen Auswirkungen dieser Mechanismus haben könnte, der die Aktivität von submukösen Neuronen für Immun- und Schleimhautmediatoren desensibilisiert, während die allgemeine neuronale Aktivität unverändert bleibt, kann zum aktuellen Zeitpunkt

nur spekuliert werden, da genauere Erkenntnisse über die Bedeutung dieses Aktivierungsweges fehlen. Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um die erste, die Gewebeproben in Form von Biopsien von RDS Patienten direkt untersucht und spezifische Mediatoren als Stimulus verwendet hat. Auch handelt es sich um die erste Studie, die Neurone nach der Konditionierung mit einem Überstand eines RDS Patienten mit selbigem zu aktivieren versucht. Valdez-Morales et al. (2013) konditionierten in ihrer Studie kultivierte Neurone aus DRG mit einem Überstand von RDS-D Patienten und stellten anschließend eine erhöhte allgemeine Aktivität fest. Allerdings verwendeten sie weder den Schleimhautüberstand noch andere Mediatoren, wie beispielsweise Proteasen, zur Aktivierung der Neurone.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann spekuliert werden, dass die reduzierte Aktivität der Neurone nach Applikation der Mediatoren einen Schutzmechanismus gegen eine Überreizung der Neurone darstellt. Alle Teilnehmer der Studie mit Reizdarmsyndrom klagten aktiv über Beschwerden wie Durchfall, Obstipation und Schmerzen, obwohl manche von ihnen Medikamente eingenommen hatten, um ihre Beschwerden zu lindern (vgl. Tabelle 4 und Tabelle 5). Vermutlich fand demnach zu einem gewissen Zeitpunkt eine hohe Aktivität der submukösen Neurone statt. Ohne weitergehende Untersuchungen kann nicht endgültig geklärt werden, in welcher Weise eine reduzierte Erregung der submukösen Ganglien durch Mediatoren wie Histamin, Serotonin, Tryptase und TNF- α Einfluss auf das gesamte System nimmt. Ein wichtiger Ansatz wäre die Erkenntnis über sekretorische Funktionen in Biopsien von Reizdarmpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, die in Versuchen mit Ussing-Kammern gewonnen werden könnten. Untersuchungen über die Wirkung von PAR APs wurden in humanem Darmgewebe bereits durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass PAR2 eine prosekretorische Wirkung aufweist, die nicht neural vermittelt ist (Mueller et al. 2011). Ob auch diese Funktion in Reizdarmpatienten verändert ist, könnte erste Anhaltspunkte liefern.

4.3. Wechselwirkungen verschiedener Mediatoren

Neben der Frage bezüglich der neuronalen Aktivität von Ganglien in Biopsien von Reizdarmpatienten, sollte auch geklärt werden, ob potenzierende Wechselwirkungen zwischen Mediatoren, die in Schleimhautüberständen gefunden wurden, für die aktivierende Wirkung verantwortlich sind. Zum einen verwundert die Tatsache, dass die einzelnen Mediatoren, die in Überständen von Schleimhautbiopsien in sehr geringer Konzentration gemessen wurden, eine aktivierende Wirkung auf enterische Neurone haben (Buhner et al. 2009). Außerdem kann die Blockade eines einzelnen Mediators durch einen spezifischen Antagonist bereits dazu führen, die aktivierende Wirkung komplett zu unterbinden

beziehungsweise signifikant zu reduzieren (Buhner et al. 2012; Hughes et al. 2013a). Dies wurde in den erwähnten Arbeiten als Zeichen dafür gewertet, dass diese Mediatoren eine wichtige Rolle für die neuronale Aktivität spielen. Zugleich stellt sich aber die Frage wieso das Blockieren eines einzelnen Mediators die aktivierende Wirkung nahezu komplett blockiert bzw. signifikant reduziert, obwohl alle anderen Mediatoren nach wie vor an das Ganglion gelangen und an ihre Rezeptoren binden können. Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass eine synergistische Verstärkung vorliegen könnte, zu der alle beteiligten Substanzen beitragen.

Für alle untersuchten Substanzen, vor allem Histamin, Serotonin und Tryptase, sind bereits diverse Wechselwirkungen und Potenzierungen beschrieben worden. Serotonin, beispielsweise, potenzierte die durch Histamin und Thrombin induzierte Prostaglandin Produktion in humanen Endothelzellen (Kilbourne et al. 2001) und Tryptase verstärkt die durch Histamin ausgelöste Kontraktion in humanen Bronchien (Johnson et al. 1997). Cenac et al. (2010) beschrieben einen Potenzierungseffekt des TRPV4 Kanals auf DRG Neuronen der Maus durch Histamin und Serotonin. Auch Tryptase hat einen sensibilisierenden und potenzierenden Effekt auf den TRPV4 Kanal und steht damit durch die Verbindung zu Schmerz und Entzündungszuständen besonders im Fokus der Untersuchungen (Grant et al. 2007; Grace et al. 2014; Poole et al. 2013; Sipe, W. E. B. et al. 2008). Diese Verstärkung der TRPV4 Aktivität wurde außerdem für den "biased" Aktivator neutrophile Elastase beschrieben und ist ebenfalls über PAR2 vermittelt, ohne intrazellulären Calcium Einstrom auszulösen (Sostegni et al. 2014). Daher lag die Annahme nahe, dass diese unterschiedlichen Mediatoren, die alle in der Pathophysiologie von RDS eine Rolle zu spielen scheinen, sich auch in Bezug auf die Nervenaktivierung im enterischen Nervensystem gegenseitig verstärken. Eine derartige Potenzierung konnte für die Proteasen Tryptase und neutrophile Elastase in den vorliegenden Versuchen beobachtet werden. Beide Proteasen erzeugten in Kombination mit Histamin und Serotonin einen signifikant höheren intrazellulären Calcium Peak im Vergleich zu den Einzelapplikationen (vgl. Abbildung 27 und Abbildung 32). Es konnte gezeigt werden, dass die verstärkende Wirkung nicht durch die klassische Aktivierung der PARs ausgelöst wird. Der zu Grunde liegende Signalweg konnte in der vorliegenden Arbeit noch nicht identifiziert werden.

TRPV4 wird mit viszeraler Hypersensitivität bei RDS Patienten in Verbindung gebracht. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Cenac et al. (2015) zeigte eine deutlich erhöhte Ausprägung von TRPV4 aktivierenden Metaboliten in Biopsien von RDS Patienten und damit korrelierende Schmerz- und Blähungsbeschwerden. Wie oben bereits erwähnt, ist der PAR2 Rezeptor dafür bekannt, TRPV4 Kanäle zu sensibilisieren und durch Kopplung zu aktivieren. Dieser Kanal stellt daher einen potentiellen Mechanismus bei den beobachteten Effekten

dar. Bislang konnte die Exprimierung von TRPV4 Kanälen auf humanen submukösen Ganglien nicht gezeigt werden. Jedoch finden sich diese, neben PAR2, Histamin und Serotonin Rezeptoren, zahlreich auf DRG Neuronen und sensorischen Afferenzen, die den Darm innervieren (Grundy 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass auch die beobachtete Potenzierung durch Phosphorylierung und damit einhergehende Sensibilisierung entsteht. Hierfür wären TRPV4 Kanäle denkbar. Um dies näher zu spezifizieren, werden Experimente benötigt, bei denen TRPV 4 Kanäle mit einem Blocker gehemmt werden. Für den Fall, dass die Potenzierung dadurch reduziert oder gar komplett verhindert würde, hätte man einen deutlichen Hinweis darauf, dass TRPV4 Kanäle involviert sind. Auch wären Untersuchungen zu intrazellulären Vorgängen, wie Aktivierung der MAP Kinase, interessant, da diese durch „biased“ Aktivatoren beeinflusst werden.

Als wichtigster Mediator in der Potenzierung haben sich in den vorliegenden Versuchen Proteasen gezeigt. Sowohl Tryptase als auch neutrophile Elastase zeigten eine signifikante Potenzierung der Wirkung von Histamin und Serotonin. Die Potenzierung kann nicht auf die klassische Aktivierung des PAR1 oder PAR2 Rezeptors zurückgeführt werden, da sie nicht durch die entsprechenden PAR APs ausgelöst werden und auch nicht durch die Perfusion mit den spezifischen Antagonisten reduziert werden konnte. Desweiteren wurde gezeigt, dass neutrophile Elastase alleine keinen Calcium Einstrom in submuköse Neurone verursacht. Mögliche andere Signalwege, wie beispielsweise das direkte Eingreifen in intrazelluläre Prozesse durch zelluläre Aufnahme von Proteasen (Preston 2002) oder auch die Hypothese neuartiger proteolytisch aktivierter Kanäle (Tran und Stewart 2003; Brown 2005), durch die intrazelluläre Prozesse und eine Beeinflussung der Immunabwehr stattfinden können, sind denkbar. Am wahrscheinlichsten jedoch erscheint die Beeinflussung der neuronalen Aktivität über die von Ramachandran et al. (2011) und Mihara et al. (2013) beschriebene „biased“ Aktivierung des PAR2 und PAR1 Rezeptors. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass neutrophile Elastase keinen eindeutigen $[Ca^{2+}]_i$ Einstrom in enterischen submukösen Neuronen auslöst. Sie schneidet allerdings den PAR1 Rezeptor und hinterlässt ihn dadurch in einem nicht mehr aktivierbaren Zustand, wie durch die Applikation von Thrombin nach Inkubation mit neutrophiler Elastase gezeigt werden konnte.

Verwunderlich erscheint auf den ersten Blick die Tatsache, dass die Applikation von $1\mu M$ neutrophiler Elastase nicht ausreichend gewesen ist, um die Aktivierung des PAR1 Rezeptors durch Thrombin signifikant zu reduzieren (siehe Abbildung 15). Dies deutet darauf hin, dass nicht ausreichend Rezeptoren inaktiviert wurden, um die Wirkung durch Thrombin zu verändern. Dennoch zeigt sich eine Potenzierung bei Applikation von $100nM$ neutrophiler Elastase gemeinsam mit $1\mu M$ Histamin/ $1\mu M$ Serotonin. Diese Beobachtung kann allerdings

als Erklärung dafür dienen, dass sowohl Schleimhautüberstände als auch der Mediator Cocktail reproduzierbare Antworten bei wiederholter Applikation erzeugen können (vgl. 3.1.3.). Würde eine sehr große Anzahl an PARs bereits bei der ersten Applikation durch die enthaltene Protease aktiviert und der Rezeptor dadurch inaktiviert, so dürfte eine zweite Applikation auf dasselbe Ganglion nur noch eine deutlich geringere Antwort hervorrufen, so wie dies aus Versuchen mit Proteasen und auch PAR APs bekannt ist (Mueller et al. 2011). Diese Beobachtung und auch die Tatsache, dass sehr geringe, nahezu unterschwellige Konzentrationen für den Großteil der Substanzen verwendet wurden, deuten darauf hin, dass für den potenzierenden Effekt bereits eine Aktivierung einer geringen Anzahl jedes einzelnen Rezeptortyps ausreichend ist. Unklar bleibt jedoch weiterhin, ob ein intrazellulärer Mechanismus für die Potenzierung verantwortlich zu machen ist oder ob die „*biased*“ Aktivierung des g-Protein gekoppelten Rezeptors eine Phosphorylierung oder direkte Aktivierung eines anderen Rezeptors auslöst und damit die Reaktivität erhöht. Unterstrichen wird allerdings die wichtige Rolle von Proteasen in der Neuropathophysiologie der Magen-Darm Erkrankungen.

4.4. Verknüpfung der Ergebnisse und Ausblick

Proteasen zeigten sich in der vorliegenden Arbeit als zentraler Mediator neuronaler Aktivität in Entzündungszuständen. Die Proteasen neutrophile Elastase und Tryptase, beide von aktivierten Immunzellen ausgeschüttet, potenzierten die durch Histamin und Serotonin ausgelöste neuronale Aktivität submuköser Ganglien in humanen Darmresektaten. Die induzierte Antwort durch Histamin und Serotonin ohne zugefügte Protease hingegen war äußerst gering. Diese wichtige Rolle von Proteasen in der Vermittlung von neuronaler Aktivität durch einen Mediator Cocktail, der das Milieu in Schleimhautbiopsien von Reizdarmpatienten (Buhner et al. 2009) nachahmen soll, kann als Erklärung und Bekräftigung der Desensibilisierung submuköser Ganglien von Reizdarmpatienten dienen, wie sie in humanen Darmbiopsien beobachtet werden konnte. Die Vermutung liegt nahe, dass die Inaktivierung einer großen Zahl von PAR Rezeptoren durch die andauernde Präsenz von Proteasen im Lumen und in der Darmwand dazu führt, dass der Mediator Cocktail mit seinen geringen Konzentrationen der einzelnen Komponenten keine nennenswerte Aktivität mehr hervorrufen kann. Auch eine Desensibilisierung der 5-HT₃ Rezeptoren bei RDS Patienten ist denkbar. Ein derartiges Szenario wurde bereits von Gershon (2005) als mögliche Ursache für den Obstipationstyp bzw. den Wechsel zwischen Obstipation und Diarrhö, der in RDS Patienten häufig beobachtet wird, spekuliert. Allerdings konnte in der vorliegenden Studie, vergleichbar mit den vorangegangenen Untersuchungen an Schleimhautüberständen (Buhner et al. 2009; Buhner et al. 2012; Buhner et al. 2014), kein Unterschied bezüglich der neuronalen Aktivierbarkeit zwischen den RDS Untergruppen

festgestellt werden. In Versuchen mit Schleimhautüberständen konnte gezeigt werden, dass die spezifische Hemmung aller drei Mediatoren, Proteasen, Serotonin und Histamin, zu einer Reduktion oder sogar kompletten Unterbindung der neuronalen Aktivität führt (Buhner et al. 2012). Ist also jeweils nur einer der in Frage kommenden Rezeptortypen desensibilisiert, kann auch das bereits zur Reduktion der Aktivität führen. Da alle Patienten Symptome zum Zeitpunkt der Biopsie Entnahme hatten, ist es ebenfalls denkbar, dass eine Desensibilisierung vorhanden ist, nachdem kurz zuvor eine akute Überstimulation stattgefunden hatte. Diese Frage könnte durch die Untersuchung von Biopsien von Reizdarmpatienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, während akuter Beschwerden und ohne Beschwerden, adressiert werden.

Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von Proteasen im Krankheitsbild RDS bietet die Tatsache, dass TNF- α von Proteasen aus seiner Membran gebundenen Form gelöst und in die freie Form transformiert wird (Robache-Gallea et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hervorgerufene neuronale Aktivität eines Mediator Cocktails nach Applikation auf submuköse Ganglien des Meerschweinchens signifikant reduziert werden konnte, wenn TNF- α entweder durch den Antikörper Adalimumab gebunden oder nicht in der Lösung enthalten war. Ob auch in Schleimhautüberständen von RDS Patienten eine relevante Konzentration von TNF- α enthalten ist und eine Rolle bei der induzierten neuronalen Aktivität spielt, kann durch Experimente mit Schleimhautüberständen und Adalimumab nach dem in dieser Arbeit eingeführten Protokoll untersucht werden.

Eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen Mediatoren und Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Reizdarmsyndroms und entzündlicher Darmkrankheiten. Die vorliegende Arbeit konnte neue Erkenntnisse bezüglich dieser Wechselwirkungen und deren Effekt auf neuronale Aktivität präsentieren und die Neuropathophysiologie des RDS mithilfe einer Anpassung der Neuroimaging Technik auf die Verwendung von Biopsien beschreiben.

Literaturverzeichnis

- Ahn, Ho-Sam; Foster, Carolyn; Boykow, George; Stamford, Andrew; Manna, Mahua; Graziano, Michael (2000): Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. In: *Biochemical Pharmacology* 60 (10), S. 1425–1434.
- Amadesi, S. (2004): Protease-Activated Receptor 2 Sensitizes the Capsaicin Receptor Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1 to Induce Hyperalgesia. In: *Journal of Neuroscience* 24 (18), S. 4300–4312.
- Annaházi, Anita; Gecse, Krisztina; Dabek, Marta; Ait-Belgnaoui, Afifa; Rosztóczy, András; Róka, Richárd et al. (2009): Fecal proteases from diarrheic-IBS and ulcerative colitis patients exert opposite effect on visceral sensitivity in mice. In: *Pain* 144 (1), S. 209–217.
- Auerbach, Leopold (1862): Ueber einen Plexus myentericus: einer bisher unbekanntem ganglio-nervösen Apparat im Darmkanal der Wirbelthiere: Verlag von E. Morgenstern.
- Balestra, B.; Vicini, R.; Cremon, C.; Zecchi, L.; Dothel, G.; Vasina, V. et al. (2012): Colonic mucosal mediators from patients with irritable bowel syndrome excite enteric cholinergic motor neurons. In: *Neurogastroenterology & Motility* 24 (12), S. 1118–e570.
- Barbara, Giovanni; Cremon, Cesare; Carini, Giovanni; Bellacosa, Lara; Zecchi, Lisa; Giorgio, Roberto de et al. (2011): The Immune System in Irritable Bowel Syndrome. In: *J Neurogastroenterol Motil* 17 (4), S. 349–359.
- Barbara, Giovanni; Stanghellini, Vincenzo; Giorgio, Roberto de; Cremon, Cesare; Cottrell, Graeme S.; Santini, Donatella et al. (2004): Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. In: *Gastroenterology* 126 (3), S. 693–702.
- Barbara, Giovanni; Wang, Bingxian; Stanghellini, Vincenzo; Giorgio, Roberto de; Cremon, Cesare; Di Nardo, Giovanni et al. (2007): Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome. In: *Gastroenterology* 132 (1), S. 26–37.
- Barkhordari, Elham; Rezaei, Nima; Ansari-pour, Bitá; Larki, Pegah; Alighardashi, Maryam; Ahmadi-Ashtiani, Hamid Reza et al. (2010): Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms in Irritable Bowel Syndrome. In: *J Clin Immunol* 30 (1), S. 74–79.

- Barry, Grant D.; Suen, Jacky Y.; Le, Giang T.; Cotterell, Adam; Reid, Robert C.; Fairlie, David P. (2010): Novel Agonists and Antagonists for Human Protease Activated Receptor 2. In: *J. Med. Chem.* 53 (20), S. 7428–7440.
- Bashashati, M.; Rezaei, N.; Bashashati, H.; Shafieyoun, A.; Daryani, N. E.; Sharkey, K. A.; Storr, M. (2012): Cytokine gene polymorphisms are associated with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. In: *Neurogastroenterology & Motility* 24 (12), S. 1102–e566.
- Bashashati, M.; Rezaei, N.; Shafieyoun, A.; McKernan, D. P.; Chang, L.; Öhman, L. et al. (2014): Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. In: *Neurogastroenterol. Motil.* 26 (7), S. 1036–1048.
- Bayliss, W. M.; Starling, E. H. (1899): The movements and innervation of the small intestine. In: *J Physiol* 24 (2), S. 99–143.
- Bergmann, J. F. (1999): Inclusion and exclusion criteria of importance in irritable bowel syndrome trials. In: *Am J Med* 107 (5A), S. 59S-64S.
- Bernard, Cheryl E.; Gibbons, Simon J.; Gomez-Pinilla, Pedro J.; Lurken, Matthew S.; Schmalz, Philip F.; Roeder, Jaime L. et al. (2009): Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. In: *Neurogastroenterology & Motility* 21 (7), S. 746-e46.
- Bouchaud, Gregory; Mortier, Erwan; Flamant, Mathurin; Barbieux, Isabelle; Plet, Ariane; Galmiche, Jean-Paul et al. (2010): Interleukin-15 and Its Soluble Receptor Mediate the Response to Infliximab in Patients With Crohn's Disease. In: *Gastroenterology* 138 (7), S. 2378–2387.
- Boyer, P. (2000): Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? In: *Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum* (406), S. 24–29.
- Braun, Thomas; Volland, Petra; Kunz, Lars; Prinz, Christian; Gratzl, Manfred (2007): Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants. In: *Gastroenterology* 132 (5), S. 1890–1901.
- Breunig, Eva; Michel, Klaus; Zeller, Florian; Seidl, Stefan; Weyhern, Claus Werner Hann v.; Schemann, Michael (2007): Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H 1, H 2, H 3 and H 4 receptors. In: *The Journal of Physiology* 583 (2), S. 731–742.
- Brown, J. K. (2005): Tryptase activates phosphatidylinositol 3-kinases proteolytically independently from proteinase-activated receptor-2 in cultured dog airway smooth muscle cells. In: *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (2), S. L259.

- Buhner, S.; Li, Q.; Berger, T.; Vignali, S.; Barbara, G.; Giorgio, R. de et al. (2012): Submucous rather than myenteric neurons are activated by mucosal biopsy supernatants from irritable bowel syndrome patients. In: *Neurogastroenterology & Motility* 24 (12), S. 1134–e572.
- Buhner, Sabine; Braak, Breg; Li, Qin; Kugler, Eva Maria; Klooker, Tamira; Wouters, Mira et al. (2014): Neuronal activation by mucosal biopsy supernatants from irritable bowel syndrome patients is linked to visceral sensitivity. In: *Exp Physiol* 99 (10), S. 1299–1311.
- Buhner, Sabine; Li, Qin; Vignali, Sheila; Barbara, Giovanni; Giorgio, Roberto de; Stanghellini, Vincenzo et al. (2009): Activation of Human Enteric Neurons by Supernatants of Colonic Biopsy Specimens From Patients With Irritable Bowel Syndrome. In: *Gastroenterology* 137 (4), S. 1425–1434.
- Buhner, Sabine; Schemann, Michael (2012): Mast cell–nerve axis with a focus on the human gut. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822 (1), S. 85–92.
- Carbone, Simona E.; Wattoo, David A.; Spencer, Nick J.; Hibberd, Timothy J.; Brookes, Simon J H (2014): Damage from dissection is associated with reduced neuro-muscular transmission and gap junction coupling between circular muscle cells of guinea pig ileum, in vitro. In: *Frontiers in physiology* 5, S. 319.
- Cenac, N.; Altier, C.; Motta, J.-P.; d'Aldebert, E.; Galeano, S.; Zamponi, G. W.; Vergnolle, N. (2010): Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. In: *Gut* 59 (4), S. 481–488.
- Cenac, Nicolas; Andrews, Christopher N.; Holzhausen, Marinella; Chapman, Kevin; Cottrell, Graeme; Andrade-Gordon, Patricia et al. (2007): Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. In: *J. Clin. Invest.* 117 (3), S. 636–647.
- Cenac, Nicolas; Bautzova, Tereza; Le Faouder, Pauline; Veldhuis, Nicholas A.; Poole, Daniel P.; Rolland, Corinne et al. (2015): Quantification and Potential Functions of Endogenous Agonists of Transient Receptor Potential Channels in Patients With Irritable Bowel Syndrome. In: *Gastroenterology* 149 (2), S. 433–444.e7.
- Chen, Y.; Yang, C.; Wang, Z. J. (2011): Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. In: *Neuroscience* 193, S. 440–451.
- Cirillo, C.; Tack, J.; Vanden Berghe, P. (2013): Nerve activity recordings in routine human intestinal biopsies. In: *Gut* 62 (2), S. 227–235.

Cirillo, Carla; Bessissow, Talat; Desmet, An-Sofie; Vanheel, Hanne; Tack, Jan; Vanden Berghe, Pieter (2015): Evidence for Neuronal and Structural Changes in Submucous Ganglia of Patients With Functional Dyspepsia. In: *Am J Gastroenterol*.

Coates, Matthew D.; Mahoney, Christine R.; Linden, David R.; Sampson, Joanna E.; Chen, Jason; Blaszyk, Hagen et al. (2004): Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome 1 ☆. In: *Gastroenterology* 126 (7), S. 1657–1664.

Corsetti, M.; van Oudenhove, L.; Tack, J. (2014): The quest for biomarkers in IBS-where should it lead us? In: *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 26 (12), S. 1669–1676.

Costa, M.; Brookes, S.J.H.; Steele, P. A.; Gibbins, I.; Burcher, E.; Kandiah, C. J. (1996): Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. In: *Neuroscience* 75 (3), S. 949–967.

Cremon, Cesare; Gargano, Luciana; Morselli-Labate, Antonio M.; Santini, Donatella; Cogliandro, Rosanna F.; Giorgio, Roberto de et al. (2009): Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. In: *The American Journal of Gastroenterology* 104 (2), S. 392–400.

Crowell, Michael D. (2004): Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. In: *British Journal of Pharmacology* 141 (8), S. 1285–1293.

D'andrea, Michael R.; Rogahn, Christina J.; Andrade-Gordon, Patricia (2000): Localization of protease-activated receptors-1 and-2 in human mast cells: indications for an amplified mast cell degranulation cascade. In: *Biotechnic & Histochemistry* 75 (2), S. 85–90.

Déry, Olivier; Corvera, Carlos U.; Steinhoff, Martin; Bunnett, Nigel W. (1998): Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. In: *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 274 (6), S. C1429-C1452.

Dogiel, A. S. (1895): Zur Frage über die Ganglien der Darmgeflechte bei den Säugetieren. In: *Anat. Anz* 10, S. 517–528.

Dömötör, Eszter; Bartha, Katalin; Machovich, Raymund; Adam-Vizi, Vera (2002): Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in brain microvascular endothelium and its regulation by plasmin and elastase. In: *Journal of neurochemistry* 80 (5), S. 746–754.

Drossman, Douglas A. (2006): The Functional Gastrointestinal Disorders and the Rome III Process. In: *Gastroenterology* 130 (5), S. 1377–1390.

Dulon, Sophie; Leduc, Dominique; Cottrell, Graeme S.; D'Alayer, Jacques; Hansen, Kristina K.; Bunnett, Nigel W. et al. (2005): Pseudomonas aeruginosa Elastase Disables Proteinase-

Activated Receptor 2 in Respiratory Epithelial Cells. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 32 (5), S. 411–419.

Furness, J. B.; Costa, M. (1980): Types of nerves in the enteric nervous system. In: *Neuroscience* 5 (1), S. 1–20.

Furness, J.B (2000): Types of neurons in the enteric nervous system. In: *Journal of the Autonomic Nervous System* 81 (1-3), S. 87–96.

Gainetdinov, Raul R.; Premont, Richard T.; Bohn, Laura M.; Lefkowitz, Robert J.; Caron, Marc G. (2004): Desensitization of G Protein–Coupled Receptors and Neuronal Functions. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 27 (1), S. 107–144.

Galligan, James J.; LePard, Kathy J.; Schneider, David A.; Zhou, Xiaoping (2000): Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. In: *Journal of the Autonomic Nervous System* 81 (1-3), S. 97–103.

Gecse, K.; Roka, R.; Ferrier, L.; Leveque, M.; Eutamene, H.; Cartier, C. et al. (2008): Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. In: *Gut* 57 (5), S. 591–599.

Gershon, M. D. (1999): The enteric nervous system: a second brain. In: *Hosp Pract (1995)* 34 (7), S. 31-2, 35-8, 41-2 passim.

Gershon, Michael D. (2005): Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. In: *J Clin Gastroenterol* 39 (5 Suppl 3), S. S184-93.

Grace, M.; Birrell, M. A.; Dubuis, E.; Maher, S. A.; Belvisi, M. G. (2012): Transient receptor potential channels mediate the tussive response to prostaglandin E2 and bradykinin. In: *Thorax* 67 (10), S. 891–900.

Grace, M. S.; Lieu, Tina; Darby, Bill; Abogadie, F. C.; Veldhuis, Nicholas; Bunnett, N. W.; McIntyre, Peter (2014): The tyrosine kinase inhibitor bafetinib inhibits PAR2-induced activation of TRPV4 channels in vitro and pain in vivo. In: *British Journal of Pharmacology* 171 (16), S. 3881–3894.

Grant, Andrew D.; Cottrell, Graeme S.; Amadesi, Silvia; Trevisani, Marcello; Nicoletti, Paola; Materazzi, Serena et al. (2007): Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. In: *The Journal of Physiology* 578 (3), S. 715–733.

Grundy, D. (2004): What activates visceral afferents? In: *Gut* 53 (90002), S. 5ii.

Hofstra, Claudia L.; Desai, Pragnya J.; Thurmond, Robin L.; Fung-Leung, Wai-Ping (2003): Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305 (3), S. 1212–1221.

- Hollenberg, Morley D.; Compton, Steven J. (2002): International union of pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. In: *Pharmacological reviews* 54 (2), S. 203–217.
- Hollenberg, Morley D.; Saifeddine, Mahmoud; Al-Ani, Bahjat; Kawabata, Atsufumi (1997): Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 75 (7), S. 832–841.
- Hughes, P. A.; Harrington, A. M.; Castro, J.; Liebrechts, T.; Adam, B.; Grasby, D. J. et al. (2013a): Sensory neuro-immune interactions differ between Irritable Bowel Syndrome subtypes. In: *Gut* 62 (10), S. 1456–1465.
- Hughes, Patrick A.; Zola, Heddy; Penttila, Irmeli A.; Blackshaw, L. Ashley; Andrews, Jane M.; Krumbiegel, Doreen (2013b): Immune Activation in Irritable Bowel Syndrome: Can Neuroimmune Interactions Explain Symptoms? In: *Am J Gastroenterol* 108 (7), S. 1066–1074.
- Ikegaya, Yuji; Le Bon-Jego, Morgane; Yuste, Rafael (2005): Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. In: *Neuroscience Research* 52 (2), S. 132–138.
- Ikehara, Osamu; Hayashi, Hisayoshi; Waguri, Toshiharu; Kaji, Izumi; Karaki, Shin-ichiro; Kuwahara, Atsukazu; Suzuki, Yuichi (2012): Subepithelial trypsin induces enteric nerve-mediated anion secretion by activating proteinase-activated receptor 1 in the mouse cecum. In: *J Physiol Sci* 62 (3), S. 211–219.
- Ishihara, Hiroaki; Connolly, Andrew J.; Zeng, Dewan; Kahn, Mark L.; Zheng, Yao Wu; Timmons, Courtney et al. (1997): Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans.
- Johnson, P.R.A.; Ammit, A. J.; Carlin, S. M.; Armour, C. L.; Caughey, G. H.; Black, J. L. (1997): Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus. In: *European Respiratory Journal* 10 (1), S. 38–43.
- Kapeller, Johannes; Houghton, Lesley A.; Monnikes, Hubert; Walstab, Jutta; Moller, Dorothee; Bonisch, Heinz et al. (2008): First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. In: *Hum Mol Genet* 17 (19), S. 2967–2977.
- Kayssi, Ahmed; Amadesi, Silvia; Bautista, Francisco; Bunnett, Nigel W.; Vanner, Stephen (2007): Mechanisms of protease-activated receptor 2-evoked hyperexcitability of nociceptive neurons innervating the mouse colon. In: *The Journal of Physiology* 580 (3), S. 977–991.

- Kilbourne, Edward J.; Winneker, Richard C.; others (2001): Serotonin 5-HT 1 Receptors Potentiate Histamine and Thrombin Stimulated Prostaglandin Synthesis in Endothelial Cells. In: *Thromb Haemost* 85 (5), S. 924–928.
- Krueger, D.; Michel, K.; Allam, S.; Weiser, T.; Demir, I. E.; Ceyhan, G. O. et al. (2013): Effect of hyoscine butylbromide (Buscopan(R)) on cholinergic pathways in the human intestine. In: *Neurogastroenterol Motil* 25 (8), S. e530-9.
- Kwong, Kevin; Nassenstein, Christina; Garavilla, Lawrence de; Meeker, Sonya; Udem, Bradley J. (2010): Thrombin and trypsin directly activate vagal C-fibres in mouse lung via protease-activated receptor-1. In: *The Journal of Physiology* 588 (7), S. 1171–1177.
- Layer, P.; Andresen, V.; Pehl, C.; Allescher, H.; Bischoff, S. C.; Classen, M. et al. (2011): S3-Leitlinie Reizdarmsyndrom: Definition, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Gemeinsame Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs-und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität (DGNM)[Irritable Bowel Syndrome: German Consensus Guidelines on Definition, Pathophysiology and Management. German Society of Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) and German Society of Neurogastroenterology and Motility (DGNM)]. In: *Z Gastroenterol* 49 (2), S. 237–293.
- Lebouvier, Thibaud; Coron, Emmanuel; Chaumette, Tanguy; Paillusson, Sébastien; Des Varannes, S.; Neunlist, M.; Derkinderen, Pascal (2009): Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. In: *Neurogastroenterology & Motility*.
- Lebouvier, Thibaud; Neunlist, Michel; Bruley des Varannes, Stanislas; Coron, Emmanuel; Drouard, Anne; N'Guyen, Jean-Michel et al. (2010): Colonic Biopsies to Assess the Neuropathology of Parkinson's Disease and Its Relationship with Symptoms. In: *PLoS ONE* 5 (9), S. e12728.
- Linden, David R.; Manning, Brian P.; Bunnett, Nigel W.; Mawe, Gary M. (2001): Agonists of proteinase-activated receptor 2 excite guinea pig ileal myenteric neurons. In: *European Journal of Pharmacology* 431 (3), S. 311–314.
- Longstreth, George F.; Thompson, W. Grant; Chey, William D.; Houghton, Lesley A.; Mearin, Fermin; Spiller, Robin C. (2006): Functional Bowel Disorders. In: *Gastroenterology* 130 (5), S. 1480–1491.
- Löser, C.; Möllgaard, A.; Fölsch, U. R. (1996): Faecal elastase 1: a novel, highly sensitive, and specific tubeless pancreatic function test. In: *Gut* 39 (4), S. 580–586.
- Magrassi, Lorenzo; Purves, Dale; Lichtman, Jeff W. (1987): Fluorescent probes that stain living nerve terminals. In: *The Journal of neuroscience* 7 (4), S. 1207–1214.

- Mease, Philip J. (2007): Adalimumab in the treatment of arthritis. In: *Therapeutics and clinical risk management* 3 (1), S. 133–148.
- Mease, Philip J.; Gladman, Dafna D.; Ritchlin, Christopher T.; Ruderman, Eric M.; Steinfeld, Serge D.; Choy, Ernest H. S. et al. (2005): Adalimumab for the treatment of patients with moderately to severely active psoriatic arthritis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. In: *Arthritis & Rheumatism* 52 (10), S. 3279–3289.
- Meissner, Georg (1857): Über die Nerven der Darmwand. In: *Z Ration Med NF* 8 (1857), S. 364–366.
- Michel, K.; Michaelis, M.; Mazzuoli, G.; Mueller, K.; Vanden Berghe, P.; Schemann, M. (2011): Fast calcium and voltage-sensitive dye imaging in enteric neurones reveal calcium peaks associated with single action potential discharge. In: *The Journal of Physiology* 589 (24), S. 5941–5947.
- Michel, Klaus; Zeller, Florian; Langer, Rupert; Nekarda, Hjalmar; Kruger, Dagmar; Dover, Terri J. et al. (2005): Serotonin Excites Neurons in the Human Submucous Plexus via 5-HT₃ Receptors. In: *Gastroenterology* 128 (5), S. 1317–1326.
- Mihara, K.; Ramachandran, R.; Renaux, B.; Saifeddine, M.; Hollenberg, M. D. (2013): Neutrophil Elastase and Proteinase-3 Trigger G Protein-biased Signaling through Proteinase-activated Receptor-1 (PAR1). In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (46), S. 32979–32990.
- Mueller, Kerstin; Michel, Klaus; Krueger, Dagmar; Demir, Ihsan Ekin; Ceyhan, Güralp Onur; Zeller, Florian et al. (2011): Activity of Protease-Activated Receptors in the Human Submucous Plexus. In: *Gastroenterology* 141 (6), S. 2088–2097.e1.
- Muller, Paul Andrew; Koscsó, Balázs; Rajani, Gaurav Manohar; Stevanovic, Korey; Berres, Marie-Luise; Hashimoto, Daigo et al. (2014): Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility. In: *Cell* 158 (2), S. 300–313.
- Nasser, Y.; Boeckxstaens, G. E.; Wouters, M. M.; Schemann, M.; Vanner, S. (2014): Using human intestinal biopsies to study the pathogenesis of irritable bowel syndrome. In: *Neurogastroenterol. Motil.* 26 (4), S. 455–469.
- Nemethova, Andrea; Michel, Klaus; Gomez-Pinilla, Pedro J.; Boeckxstaens, Guy E.; Schemann, Michael; Tache, Yvette (2013): Nicotine Attenuates Activation of Tissue Resident Macrophages in the Mouse Stomach through the $\alpha 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. In: *PLoS ONE* 8 (11), S. e79264.

- Neunlist, M.; Peters, S.; Schemann, M. (1999): Multisite optical recording of excitability in the enteric nervous system. In: *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 11 (5), S. 393–402.
- Nystedt, Sverker; Emilsson, Kjell; Larsson, Anna-Karin; Strömbeck, Bodil; Sundelin, Johan (1995): Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. In: *European Journal of Biochemistry* 232 (1), S. 84–89.
- Olafsdottir, Linda Bjork (2012): Irritable bowel syndrome: Physicians' awareness and patients' experience. In: *WJG* 18 (28), S. 3715.
- O'Malley, D.; Liston, M.; Hyland, N. P.; Dinan, T. G.; Cryan, J. F. (2011): Colonic soluble mediators from the maternal separation model of irritable bowel syndrome activate submucosal neurons via an interleukin-6-dependent mechanism. In: *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 300 (2), S. G241.
- Ossovskaya, Valeria S.; Bunnett, Nigel W. (2004): Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. In: *Physiological Reviews* 84 (2), S. 579–621.
- Park, Jung Ho; Rhee, Poong-Lyul; Kim, Hyun Seo; Lee, Jun Haeng; Kim, Young-Ho; Kim, Jae Jun; Rhee, Jong Chul (2006): Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21 (1 Pt 1), S. 71–78.
- Poole, D. P.; Amadesi, S.; Veldhuis, N. A.; Abogadie, F. C.; Lieu, T.; Darby, W. et al. (2013): Protease-activated Receptor 2 (PAR2) Protein and Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Protein Coupling Is Required for Sustained Inflammatory Signaling. In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (8), S. 5790–5802.
- Pouclet, Hélène; Lebouvier, Thibaud; Coron, Emmanuel; Bruley des Varannes, Stanislas; Rouaud, Tiphaine; Roy, Monica et al. (2012): A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. In: *Neurobiology of Disease* 45 (1), S. 305–309.
- Preston, G. A. (2002): Novel Effects of Neutrophil-Derived Proteinase 3 and Elastase on the Vascular Endothelium Involve In Vivo Cleavage of NF- κ B and Proapoptotic Changes in JNK, ERK, and p38 MAPK Signaling Pathways. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 13 (12), S. 2840–2849.
- Ramachandran, R.; Mihara, K.; Chung, H.; Renaux, B.; Lau, C. S.; Muruve, D. A. et al. (2011): Neutrophil Elastase Acts as a Biased Agonist for Proteinase-activated Receptor-2 (PAR2). In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (28), S. 24638–24648.

- Rehn, M.; Hubschle, T.; Diener, M. (2004): TNF-alpha hyperpolarizes membrane potential and potentiates the response to nicotinic receptor stimulation in cultured rat myenteric neurones. In: *Acta physiologica Scandinavica* 181 (1), S. 13–22.
- Rehn, Matthias; Hild, Daniela; Diener, Martin (2005): Upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 production mediate the action of tumor necrosis factor-alpha in isolated rat myenteric ganglia. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 289 (3), S. G586-91.
- Robache-Gallea, S.; Morand, V.; Bruneau, J. M.; Schoot, B.; Tagat, E.; Realo, E. et al. (1995): In vitro processing of human tumor necrosis factor-alpha. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (40), S. 23688–23692.
- Saito, Yuri A.; Schoenfeld, Philip; Locke, G Richard 3rd (2002): The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. In: *The American Journal of Gastroenterology* 97 (8), S. 1910–1915.
- Sandborn, William J. (2003): Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD. In: *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17 (1), S. 105–117.
- Schemann, M.; Michel, K.; Ceregrzyn, M.; Zeller, F.; Seidl, S.; Bischoff, S. C. (2005): Human mast cell mediator cocktail excites neurons in human and guinea-pig enteric nervous system. In: *Neurogastroenterol Motil* 17 (2), S. 281–289.
- Schemann, M.; Neunlist, M. (2004): The human enteric nervous system. In: *Neurogastroenterology & Motility* 16 (s1), S. 55–59.
- Schemann, Michael; Michel, Klaus; Peters, Saskia; Bischoff, Stephan C.; Neunlist, Michel (2002): III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282 (6), S. G919.
- Schiff, Michael H.; Burmester, Gerd R.; Kent, J. D.; Pangan, Aileen L.; Kupper, Hartmut; Fitzpatrick, Sherahe B.; Donovan, Claire (2006): Safety analyses of adalimumab (HUMIRA) in global clinical trials and US postmarketing surveillance of patients with rheumatoid arthritis. In: *Annals of the Rheumatic Diseases* 65 (7), S. 889–894.
- Schneider, Caroline A.; Rasband, Wayne S.; Eliceiri, Kevin W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. In: *Nature methods* 9 (7), S. 671–675.
- Schneider, J.; Jehle, E. C.; Starlinger, M. J.; Neunlist, M.; Michel, K.; Hoppe, S.; Schemann, M. (2001): Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. In: *Neurogastroenterology & Motility* 13 (3), S. 255–264.

- Sipe, W. E. B.; Brierley, S. M.; Martin, C. M.; Phillis, B. D.; Cruz, F. B.; Grady, E. F. et al. (2008): Transient receptor potential vanilloid 4 mediates protease activated receptor 2-induced sensitization of colonic afferent nerves and visceral hyperalgesia. In: *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 294 (5), S. G1288.
- Sostegni, Silvia; Diakov, Alexei; McIntyre, Peter; Bunnett, Nigel; Korbmacher, Christoph; Haerteis, Silke (2014): Sensitisation of TRPV4 by PAR2 is independent of intracellular calcium signalling and can be mediated by the biased agonist neutrophil elastase. In: *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 467 (4), S. 687–701.
- Sudheer, P. S.; Hall, J. E.; Donev, R.; Read, G.; Rowbottom, A.; Williams, Paul Eirian (2006): Nicotinic acetylcholine receptors on basophils and mast cells. In: *Anaesthesia* 61 (12), S. 1170–1174.
- Swan, C.; Duroudier, N. P.; Campbell, E.; Zaitoun, A.; Hastings, M.; Dukes, G. E. et al. (2013): Identifying and testing candidate genetic polymorphisms in the irritable bowel syndrome (IBS): association with TNFSF15 and TNF. In: *Gut* 62 (7), S. 985–994.
- Takahashi, Akiyuki; Camacho, Patricia; Lechleiter, James D.; Herman, Brian (1999): Measurement of intracellular calcium. In: *Physiological Reviews* 79 (4), S. 1089–1125.
- Tooth, D.; Garsed, K.; Singh, G.; Marciani, L.; Lam, C.; Fordham, I. et al. (2014): Characterisation of faecal protease activity in irritable bowel syndrome with diarrhoea: origin and effect of gut transit. In: *Gut* 63 (5), S. 753–760.
- Tran, Thai; Stewart, Alastair G. (2003): Protease-activated receptor (PAR)-independent growth and pro-inflammatory actions of thrombin on human cultured airway smooth muscle. In: *British Journal of Pharmacology* 138 (5), S. 865–875.
- Valdez-Morales, Eduardo E.; Overington, Jeff; Guerrero-Alba, Raquel; Ochoa-Cortes, Fernando; Ibeakanma, Charles O.; Spreadbury, Ian et al. (2013): Sensitization of Peripheral Sensory Nerves by Mediators From Colonic Biopsies of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Patients: A Role for PAR2. In: *Am J Gastroenterol* 108 (10), S. 1634–1643.
- van der Veek, Patrick; van den Berg, Marlies; de Kroon, Yvette E.; Verspaget, Hein W.; Masclee, Ad A.M. (2005): Role of Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-10 Gene Polymorphisms in Irritable Bowel Syndrome. In: *Am J Gastroenterology* 100 (11), S. 2510–2516.
- Vanden Berghe, Pieter; Bisschops, Raf; Tack, Jan (2001): Imaging of neuronal activity in the gut. In: *Current Opinion in Pharmacology* 1 (6), S. 563–567.
- Vergnolle, N. (2000): novel signals for gastrointestinal pathophysiology. In: *Aliment Pharmacol Ther* 14, S. 257–266.

Vergnolle, N. (2005): Clinical Relevance of Proteinase Activated Receptors (PARs) in the Gut. In: *Gut* 54 (6), S. 867–874.

Vergnolle, Nathalie; Wallace, John L.; Bunnett, Nigel W.; Hollenberg, Morley D. (2001): Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 22 (3), S. 146–152.

Vignali, Sheila; Peter, Nadine; Ceyhan, Güralp; Demir, Ihsan Ekin; Zeller, Florian; Senseman, David et al. (2010): Recordings from human myenteric neurons using voltage-sensitive dyes. In: *Journal of Neuroscience Methods* 192 (2), S. 240–248.

Vu, Thien-Khai H.; Hung, David T.; Wheaton, Virginia I.; Coughlin, Shaun R. (1991): Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. In: *Cell* 64 (6), S. 1057–1068.

Wang, Hong; Yu, Man; Ochani, Mahendar; Amella, Carol Ann; Tanovic, Mahira; Susarla, Seenu et al. (2003): Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. In: *Nature* 421 (6921), S. 384–388.

Wang, Ke-Yong; Arima, Nobuyuki; Higuchi, Satoshi; Shimajiri, Shohei; Tanimoto, Akihide; Murata, Yoshitaka et al. (2000): Switch of histamine receptor expression from H2 to H1 during differentiation of monocytes into macrophages. In: *FEBS letters* 473 (3), S. 345–348.

Wedel, T.; Roblick, U.; Gleiss, J.; Schiedeck, T.; Bruch, H. P.; Kuhnel, W.; Krammer, H. J. (1999): Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 181 (4), S. 327–337.

Wood, J. D. (1981): Intrinsic neural control of intestinal motility. In: *Annual review of physiology* 43 (1), S. 33–51.

Wood, Jackie D. (2004): Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. In: *Gastroenterology* 127 (2), S. 635–657.

Wood, Jackie D. (2007): Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. In: *World J Gastroenterol* 13 (9), S. 1313–1332.

Xu, Wen-feng; Andersen, Henrik; Whitmore, Theodore E.; Presnell, Scott R.; Yee, David P.; Ching, Andrew et al. (1998): Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (12), S. 6642–6646.

Zhao, Peishen; Lieu, TinaMarie; Barlow, Nicholas; Sostegni, Silvia; Haerteis, Silke; Korbmayer, Christoph et al. (2015): Neutrophil Elastase Activates Protease-activated

Receptor-2 (PAR 2) and Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) to Cause Inflammation and Pain. In: *J. Biol. Chem.* 290 (22), S. 13875–13887.

Zhao, Peishen; Metcalf, Matthew; Bunnett, Nigel W. (2014): Biased Signaling of Protease-Activated Receptors. In: *Front. Endocrinol.* 5.

Anhang

IBS Module		
1. In the last 3 months, how often did you have discomfort or pain anywhere in your abdomen?	<input type="radio"/> Never <input type="radio"/> Less than one day a month <input type="radio"/> One day a month <input type="radio"/> Two to three days a month <input type="radio"/> One day a week <input type="radio"/> More than one day a week <input type="radio"/> Every day	<i>Skip remaining questions</i>
2. For women: Did this discomfort or pain occur only during your menstrual bleeding and not at other times?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> Does not apply because I have had the change in life (menopause) or I am a male	
3. Have you had this discomfort or pain 6 months or longer?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	
4. How often did this discomfort or pain get better or stop after you had a bowel movement?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
5. When this discomfort or pain started, did you have more frequent bowel movements?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
6. When this discomfort or pain started, did you have less frequent bowel movements?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
7. When this discomfort or pain started, were your stools (bowel movements) looser?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
8. When this discomfort or pain started, how often did you have harder stools?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
9. In the last 3 months, how often did you have hard or lumpy stools?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	Alternative scale: <input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> About 25% of the time <input type="radio"/> About 50% of the time <input type="radio"/> About 75% of the time <input type="radio"/> Always, 100% of the time
10. In the last 3 months, how often did you have loose, mushy or watery stools?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	Alternative scale: <input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> About 25% of the time <input type="radio"/> About 50% of the time <input type="radio"/> About 75% of the time <input type="radio"/> Always, 100% of the time

C1. Irritable Bowel Syndrome

Diagnostic Criteria*

Recurrent abdominal pain or discomfort** at least 3 days/month in last 3 months associated with two or more of criteria #1 - #3 below:

Pain or discomfort at least 2-3 days/month (question 1>2)

For women, does pain occur only during menstrual bleeding? (question 2=0 or 2)

1. Improvement with defecation

Pain or discomfort gets better after BM at least sometimes (question 4>0)

2. Onset associated with a change in frequency of stool

Onset of pain or discomfort associated with more stools at least sometimes (question 5>0), OR

Onset of pain or discomfort associated with fewer stools at least sometimes (question 6>0)

3. Onset associated with a change in form (appearance) of stool

Onset of pain or discomfort associated with looser stools at least sometimes (question 7>0), OR

Onset of pain or discomfort associated with harder stools at least sometimes (question 8>0)

* Criteria fulfilled for the last 3 months with symptom onset at least 6 months prior to diagnosis

Yes. (question 3=1)

**"Discomfort" means an uncomfortable sensation not described as pain.

In pathophysiology research and clinical trials, a pain/discomfort frequency of at least two days a week is recommended for subject eligibility.

Pain or discomfort more than one day per week (question 1>4)

Criteria for IBS-C

(question 9>0) and (question 10=0)

Criteria for IBS-D

(question 9=0) and (question 10>0)

Criteria for IBS-M

(question 9>0) and (question 10>0)

Criteria for IBS-U

(question 9=0) and (question 10=0)

Abbildung 36: Fragebogenmodul ROME III für RDS (nur auf Englisch verfügbar). Die Fragen finden sich in der deutschen Übersetzung im verwendeten Online Fragebogen wieder. Es wurden die angegebenen Kriterien zur Auswertung des Online Fragebogens verwendet.

Fortschritt

Fragebogen zum Reizdarmsyndrom (RDS Project Web Questionnaire)

Dieser Abschnitt fragt nach Ihrer früheren Gesundheit.

1. Hatten Sie in der Vergangenheit eine der folgenden Operationen?

Gallenblasenoperation

ja

nein

Blinddarmoperation

ja

nein

Gebärmutteroperation

ja

nein

andere Operationen, nämlich...

Antwort ist optional
maximal 255 Zeichen

2. Sind Sie in der Vergangenheit wegen einer psychischen Erkrankung behandelt worden? Falls ja, war dies wegen...

Depressionen

ja

nein

Angststörung

ja

nein

anderes, nämlich...

Antwort ist optional
maximal 255 Zeichen

Fortschritt

Fragebogen zum Reizdarmsyndrom (RDS Project Web Questionnaire)

Dieser Abschnitt fragt nach eventuellen Beschwerden in den letzten 3 Monaten.

1. Wie oft hatten Sie in den vergangenen 3 Monaten Bauchschmerzen und Bauchbeschwerden? (falls nie, können Sie die Fragen 2. bis 8. auf dieser Seite überspringen)	nie <input type="radio"/>	weniger als 1 Tag pro Monat <input type="radio"/>	ein Tag pro Monat <input type="radio"/>	zwei bis drei Tage pro Monat <input type="radio"/>	ein Tag pro Woche <input type="radio"/>	mehr als 1 Tag pro Woche <input type="radio"/>	jeden Tag <input type="radio"/>
2. Für Frauen: Sind diese Beschwerden nur während der Monatsblutungen aufgetreten und nicht zu anderen Zeiten? (falls Sie ein Mann sind, kreuzen Sie bitte "trifft nicht zu" an)		nein <input type="radio"/>	ja <input type="radio"/>	trifft nicht zu (weil ich in die Wechseljahre gekommen bin) <input type="radio"/>		trifft nicht zu <input type="radio"/>	
3. Hatten Sie diese Beschwerden oder Schmerzen 6 Monate oder länger?					nein <input type="radio"/>	ja <input type="radio"/>	
4. Wie oft wurden diese Beschwerden oder Schmerzen mit einem Stuhlgang besser?	nie oder selten <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	oft <input type="radio"/>	meistens <input type="radio"/>	immer <input type="radio"/>		
5. Wenn diese Beschwerden oder Schmerzen auftraten, hatten Sie dann häufiger Stuhlgang?	nie oder selten <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	oft <input type="radio"/>	meistens <input type="radio"/>	immer <input type="radio"/>		
6. Wenn diese Beschwerden oder Schmerzen auftraten, hatten Sie dann seltener Stuhlgang?	nie oder selten <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	oft <input type="radio"/>	meistens <input type="radio"/>	immer <input type="radio"/>		
7. Wenn diese Beschwerden oder Schmerzen auftraten, war Ihr Stuhl dann weicher?	nie oder selten <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	oft <input type="radio"/>	meistens <input type="radio"/>	immer <input type="radio"/>		
8. Wenn diese Beschwerden oder Schmerzen auftraten, war Ihr Stuhl dann härter?	nie oder selten <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	oft <input type="radio"/>	meistens <input type="radio"/>	immer <input type="radio"/>		
9. Wie oft hatten Sie in den vergangenen 3 Monaten harten oder festen Stuhl?	nie oder selten <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	oft <input type="radio"/>	meistens <input type="radio"/>	immer <input type="radio"/>		
10. Wie oft hatten Sie in den vergangenen 3 Monaten weichen, breiigen oder flüssigen Stuhl?	nie oder selten <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	oft <input type="radio"/>	meistens <input type="radio"/>	immer <input type="radio"/>		
11. Wie oft in der Woche haben Sie Stuhlgang?						<input type="text"/>	
12. Wie oft in der Woche müssen Sie zur Toilette eilen?						<input type="text"/>	
13. Wie oft in der Woche haben Sie Blähungen?						<input type="text"/>	
14. Wie oft in der Woche haben Sie Schleimbeimengungen im Stuhl?						<input type="text"/>	

15. Welche der folgenden Beschreibungen treffen am besten auf Ihren Stuhl zu? (Bitte wählen Sie die ZWEI - und nur zwei - Beschreibungen aus, die am zutreffensten sind; zur Referenz können Sie die nachfolgende Grafik benutzen)

Bristol-Stuhlformen-Skala

Typ 1		Einzelne, feste Kügelchen, schwer auszuscheiden
Typ 2		Wurstartig, klumpig
Typ 3		Wurstartig mit rissiger Oberfläche
Typ 4		Wurstartig mit glatter Oberfläche
Typ 5		Einzelne weiche, glattrandige Klümpchen, leicht auszuscheiden
Typ 6		Einzelne weiche Klümpchen mit unregelmäßigem Rand
Typ 7		Flüssig, ohne feste Bestandteile

einzelne, feste Kügelchen, schwer auszuscheiden	trifft zu <input type="radio"/>	trifft nicht zu <input type="radio"/>
wurstartig, klumpig	trifft zu <input type="radio"/>	trifft nicht zu <input type="radio"/>
wurstartig mit rissiger Oberfläche	trifft zu <input type="radio"/>	trifft nicht zu <input type="radio"/>
wurstartig mit glatter Oberfläche	trifft zu <input type="radio"/>	trifft nicht zu <input type="radio"/>
einzelne weiche, glattrandige Klümpchen, leicht auszuscheiden	trifft zu <input type="radio"/>	trifft nicht zu <input type="radio"/>
einzelne weiche Klümpchen mit unregelmäßigem Rand	trifft zu <input type="radio"/>	trifft nicht zu <input type="radio"/>
wässrig, ohne feste Bestandteile	trifft zu <input type="radio"/>	trifft nicht zu <input type="radio"/>

Der folgende Abschnitt ist nur für Reizdarmpatienten relevant und sichtbar:

Fortschritt

Fragebogen zum Reizdarmsyndrom (RDS Project Web Questionnaire)

Dieser Abschnitt ist über Ihre Beschwerden zu dem Zeitpunkt, als Ihr Reizdarmsyndrom anfang.

1. In welchem Jahr fing Ihr Reizdarmsyndrom an?								<input type="text"/>
2. Kam es plötzlich an einem bestimmten Tag oder langsam?		fing plötzlich an		fing langsam an		kann mich nicht erinnern		
		<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		
3. Denken Sie, es fing mit einer Darminfektion an oder unmittelbar danach?		ja		nein		weiß nicht		
		<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		
3a. Falls ja, hat Ihr Arzt eine Stuhlprobe genommen und eine Analyse veranlasst?		ja		nein		trifft nicht zu/keine Infektion		
		<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		
3b. Falls ja, können Sie die Art der Infektion benennen?		Salmonellen	Shigellen	Campylobacter	Virus	andere	ich weiß nicht	trifft nicht zu/keine Infektion
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
andere Infektion, nämlich...		<input type="text"/>						
		Antwort ist optional maximal 255 Zeichen						
3c. Begannen Ihre Beschwerden während oder unmittelbar nach einer Auslandsreise?						ja		nein
						<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
3d. Wohin ging die Reise?		<input type="text"/>						
		Antwort ist optional						
4. Hatten Sie zu Beginn Ihrer Beschwerden...								
Fieber						ja		nein
						<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Durchfall						ja		nein
						<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Erbrechen						ja		nein
						<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Blut im Stuhl						ja		nein
						<input type="radio"/>		<input type="radio"/>

5. Erinnern Sie sich, wie der Arzt die Infektion behandelt hat?	keine Behandlung	Antibiotika	Probiotika	Loperamid (Imodium)	ich erinnere mich nicht
andere Behandlung, nämlich...					
Antwort ist optional maximal 255 Zeichen					

Fortschritt

Fragebogen zum Reizdarmsyndrom (RDS Project Web Questionnaire)

Dieser Abschnitt fragt nach Ihren Stuhlgangsgewohnheiten vor der Infektion.

1. Wie oft hatten Sie in den Monaten vor Ihrer Infektion Schmerzen oder Beschwerden irgendwo im Bauchbereich? (falls nie, kreuzen Sie bitte bei allen Fragen auf dieser Seite "trifft nicht zu" an)	nie	weniger als ein Tag pro Monat	ein Tag pro Monat	zwei bis drei Tage pro Monat	ein Tag pro Woche	mehr als ein Tag pro Woche	jeden Tag	trifft nicht zu
2. Für Frauen: Sind diese Beschwerden nur während der Monatsblutungen aufgetreten und nicht zu anderen Zeiten? (falls Sie ein Mann sind, kreuzen Sie bitte "trifft nicht zu" an)			nein	ja		trifft nicht zu (weil ich in die Wechseljahre gekommen bin)		trifft nicht zu
3. Hatten Sie vor Ihrer Infektion diese Beschwerden oder Schmerzen für 6 Monate oder länger?				nein	ja			trifft nicht zu
4. Wie oft hörten Beschwerden oder Schmerz auf oder wurden besser nach einem Stuhlgang?	nie oder selten	manchmal	oft	meistens	immer	trifft nicht zu		
5. Wie oft hatten Sie mehr Stuhlgang, wenn die Beschwerden oder Schmerzen angingen?	nie oder selten	manchmal	oft	meistens	immer	trifft nicht zu		
6. Wie oft hatten Sie weniger Stuhlgang, wenn die Beschwerden oder Schmerzen angingen?	nie oder selten	manchmal	oft	meistens	immer	trifft nicht zu		
7. Wie oft hatten Sie weicheren Stuhlgang, wenn die Beschwerden oder Schmerzen angingen?	nie oder selten	manchmal	oft	meistens	immer	trifft nicht zu		
8. Wie oft hatten Sie härteren Stuhlgang, wenn die Beschwerden oder Schmerzen angingen?	nie oder selten	manchmal	oft	meistens	immer	trifft nicht zu		
9. In den letzten Monaten vor Ihrer Infektion, wie oft hatten Sie harten oder klumpigen Stuhl?	nie oder selten	manchmal	oft	meistens	immer	trifft nicht zu		
10. In den letzten Monaten vor Ihrer Infektion, wie oft hatten Sie breiigen oder flüssigen Stuhl?	nie oder selten	manchmal	oft	meistens	immer	trifft nicht zu		

Dieser Abschnitt ist gültig für Reizdarmpatienten und Kontrollpersonen:

Fortschritt

Fragebogen zum Reizdarmsyndrom (RDS Project Web Questionnaire)

Dieser Abschnitt fragt danach, wie Sie sich in der letzten Zeit gefühlt haben.

Bitte kreuzen Sie jeweils die Antwort an, die Ihren Gefühlen **in den vergangenen 4 Wochen** am nächsten kommen.

1. Ich fühle mich angespannt oder überreizt.	meistens <input type="radio"/>	oft <input type="radio"/>	von Zeit zu Zeit/gelegentlich <input type="radio"/>	überhaupt nicht <input type="radio"/>
2. Ich kann mich heute noch so freuen wie früher.	ganz genau so <input type="radio"/>	nicht ganz so sehr <input type="radio"/>	nur noch ein wenig <input type="radio"/>	kaum oder gar nicht <input type="radio"/>
3. Mich überkommt eine ängstliche Vorahnung, dass etwas Schreckliches passieren könnte.	ja, sehr stark <input type="radio"/>	ja, aber nicht allzu stark <input type="radio"/>	etwas, aber es macht mir keine Sorgen <input type="radio"/>	überhaupt nicht <input type="radio"/>
4. Ich kann lachen und die lustige Seite der Dinge sehen.	ja, so viel wie immer <input type="radio"/>	nicht mehr ganz so viel <input type="radio"/>	inzwischen viel weniger <input type="radio"/>	überhaupt nicht <input type="radio"/>
5. Mir gehen beunruhigende Gedanken durch den Kopf.	einen Großteil der Zeit <input type="radio"/>	verhältnismäßig oft <input type="radio"/>	von Zeit zu Zeit, aber nicht allzu oft <input type="radio"/>	nur gelegentlich/nie <input type="radio"/>
6. Ich fühle mich glücklich.	überhaupt nicht <input type="radio"/>	selten <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	meistens <input type="radio"/>
7. Ich kann behaglich dasitzen und mich entspannen.	ja, natürlich <input type="radio"/>	gewöhnlich schon <input type="radio"/>	nicht oft <input type="radio"/>	überhaupt nicht <input type="radio"/>
8. Ich fühle mich in meinen Aktivitäten gebremst.	fast immer <input type="radio"/>	sehr oft <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	überhaupt nicht <input type="radio"/>
9. Ich habe manchmal ein ängstliches Gefühl in der Magengegend.	überhaupt nicht <input type="radio"/>	gelegentlich <input type="radio"/>	ziemlich oft <input type="radio"/>	sehr oft <input type="radio"/>
10. Ich habe das Interesse an meiner äußeren Erscheinung verloren.	ja, stimmt genau <input type="radio"/>	ich kümmere mich nicht so sehr darum, wie ich sollte <input type="radio"/>	möglicherweise kümmere ich mich zu wenig darum <input type="radio"/>	ich kümmere mich so viel darum wie immer <input type="radio"/>
11. Ich fühle mich rastlos, muss immer in Bewegung sein.	ja, tatsächlich sehr <input type="radio"/>	ziemlich <input type="radio"/>	nicht sehr <input type="radio"/>	überhaupt nicht <input type="radio"/>
12. Ich blicke mit Freude in die Zukunft.	ja, sehr <input type="radio"/>	eher weniger als früher <input type="radio"/>	viel weniger als früher <input type="radio"/>	kaum bis gar nicht <input type="radio"/>

13. Mich überkommt manchmal ein panikartiger Zustand.	ja, tatsächlich sehr oft <input type="radio"/>	ziemlich oft <input type="radio"/>	nicht sehr oft <input type="radio"/>	überhaupt nicht <input type="radio"/>
14. Ich kann mich an einem guten Buch, einer Radio- oder Fernsehsendung freuen.	oft <input type="radio"/>	manchmal <input type="radio"/>	eher selten <input type="radio"/>	sehr selten <input type="radio"/>
Dieser Abschnitt behandelt andere körperliche Beschwerden, die Sie haben könnten: Wie oft haben Sie sich in den vergangenen 4 Wochen durch die folgenden Probleme beeinträchtigt gefühlt?				
1. Bauchschmerzen		nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
2. Rückenschmerzen		nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
3. Schmerzen in Armen, Beinen oder Gelenken (Knie, Hüften usw.)		nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
4. Für Frauen: Menstruationsschmerzen oder andere Probleme mit der Menstruation (falls Sie ein Mann sind, kreuzen Sie bitte "trifft nicht zu" an)	trifft nicht zu <input type="radio"/>	nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
5. Schmerzen oder Probleme beim Geschlechtsverkehr		nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
6. Kopfschmerzen		nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
7. Schmerzen im Brustbereich		nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
8. Schwindel		nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
9. Ohnmachtsanfälle		nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>

10. Herzklopfen oder Herzrasen	nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
11. Kurzatmigkeit	nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
12. Verstopfung, nervöser Darm oder Durchfall	nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
13. Übelkeit, Blähungen oder Verdauungsbeschwerden	nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
14. Müdigkeit oder Energieverlust	nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>
15. Schlafprobleme	nicht beeinträchtigt <input type="radio"/>	wenig beeinträchtigt <input type="radio"/>	stark beeinträchtigt <input type="radio"/>

Abbildung 37: Schnappschüsse des Online-Fragebogens in der Variante für Reizdarmpatienten und Kontrollpersonen

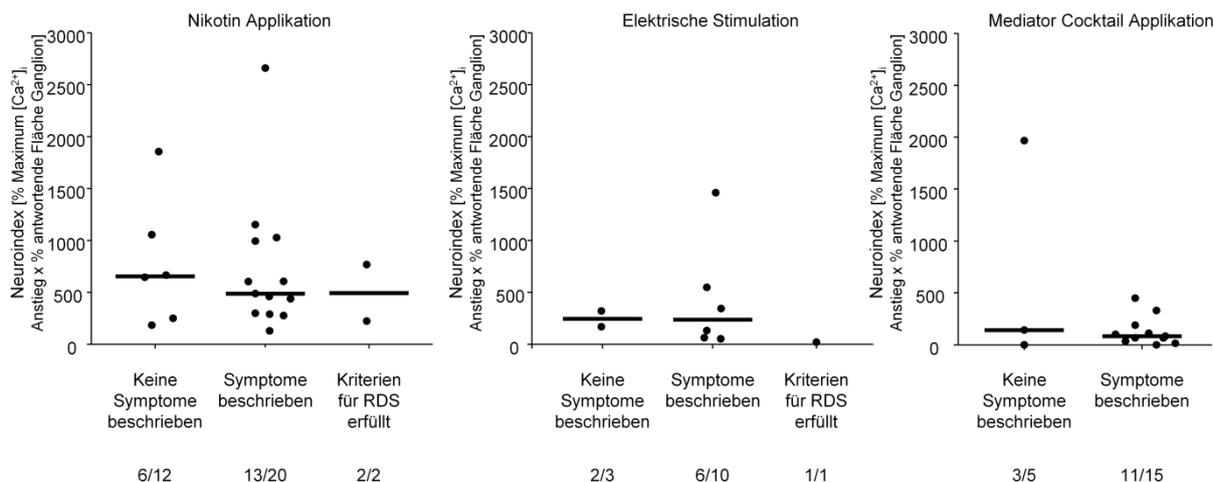


Abbildung 38: Darstellung des Neuroindex pro Teilnehmer, der nicht in die Analyse der Studie zur neuronalen Aktivität von Biopsien miteinbezogen werden konnte. Dargestellt ist jeweils der Neuroindex pro Person (jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert für eine Person) mit dem Mittelwert der gesamten Gruppe (Querbalken). Die erste Gruppe beinhaltet Personen, für die nicht definiert ist, ob Symptome vorhanden waren oder nicht. In der zweiten Gruppe sind alle Teilnehmer zusammengefasst, für die in irgendeiner Form Symptome beschrieben wurde, wobei bei der Großzahl der Teilnehmer nähere Informationen fehlen. Die letzte Gruppe beinhaltet Teilnehmer, die die ROME III Kriterien für RDS erfüllen, allerdings wurde das Vorliegen eines RDS nicht von einem Arzt bestätigt. Die Zahlen geben jeweils die Anzahl der Personen/Anzahl der Ganglien an.

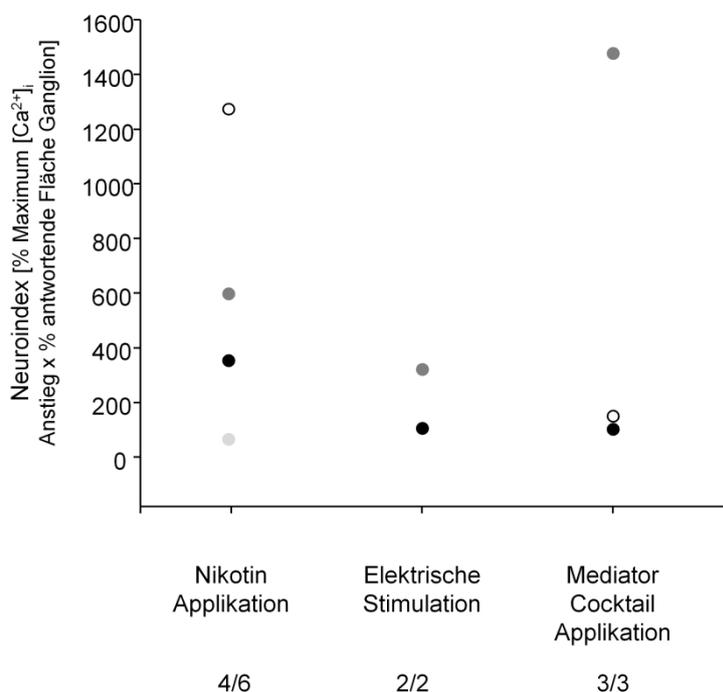


Abbildung 39: Darstellung des Neuroindex pro Teilnehmer mit unterschiedlichen Krankheiten. Dargestellt ist jeweils der Neuroindex pro Person (jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert für eine Person). Legende: leerer Kreis: Obstipation bei diabetisch autonomer Neuropathie; dunkelgrauer Kreis: RDS-D – Outlier für Mediator Cocktail; schwarzer Kreis: Slow-transit Obstipation mit Medikamenten Missbrauch; hellgrauer Kreis: Divertikulitis (mit entzündeten Divertikeln).

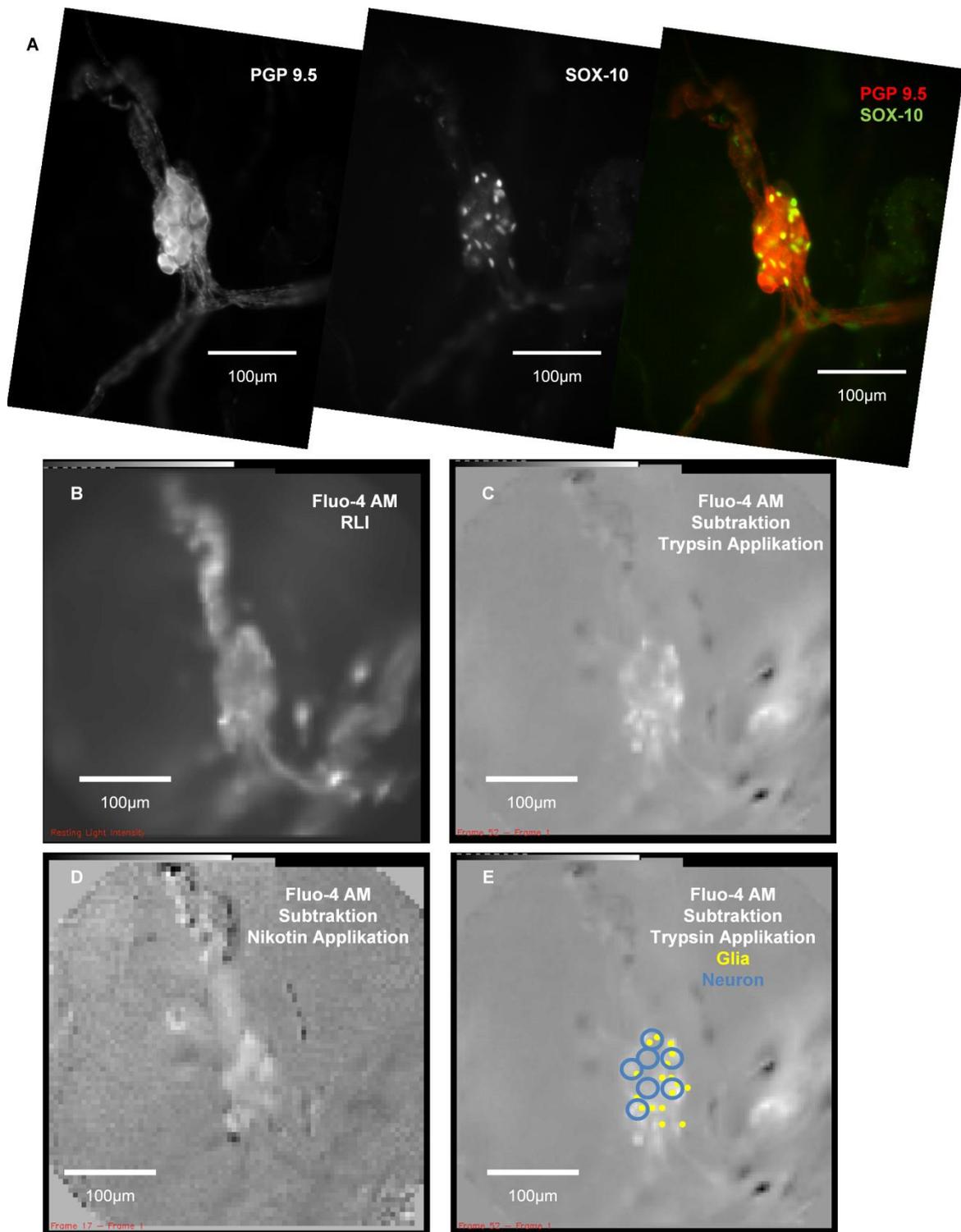


Abbildung 40: Beispiel einer positiven post-hoc Identifizierung eines Ganglions und der Neurone in einem Humandarm Resektat. Es handelt sich um ein Ganglion, an dem die Wirkung von Trypsin getestet worden war. Die erste Bildreihe (A) zeigt das Ganglion von links nach rechts gefärbt mit PGP 9.5, ein Marker für Neurone und Nervenfasern, SOX-10, ein Marker für enterische Gliazellen sowie eine Überlagerung beider Färbungen. Die Bilder wurden jeweils um 278° gedreht, so dass die Orientierung des Ganglions identisch zu der in der unteren Reihe ist. Die untere Reihe zeigt das RLI-Bild der Fluo-4 AM Färbung (B), das Subtraktionsbild nach Applikation von Trypsin (C) und Nikotin (D) sowie das Subtraktionsbild nach Trypsin mit Markierung der Stellen, an denen im SOX-10 Bild Gliazellen liegen (gelbe Punkte) und im Subtraktionsbild Nikotin Neurone identifiziert wurden (blaue Kreise). Dieses Beispiel zeigt ein Ganglion, welches eindeutig von seiner Morphologie in der post-hoc immunhistochemischen Färbung zugeordnet werden konnte. Die eindeutige Zuordnung von Antworten von Gliazellen im Subtraktionsbild ist dennoch nicht möglich, da Neurone und Gliazellen teilweise übereinander liegen, wie man an der teilweisen Überschneidung der blauen Kreise und gelben Punkte sehen kann.

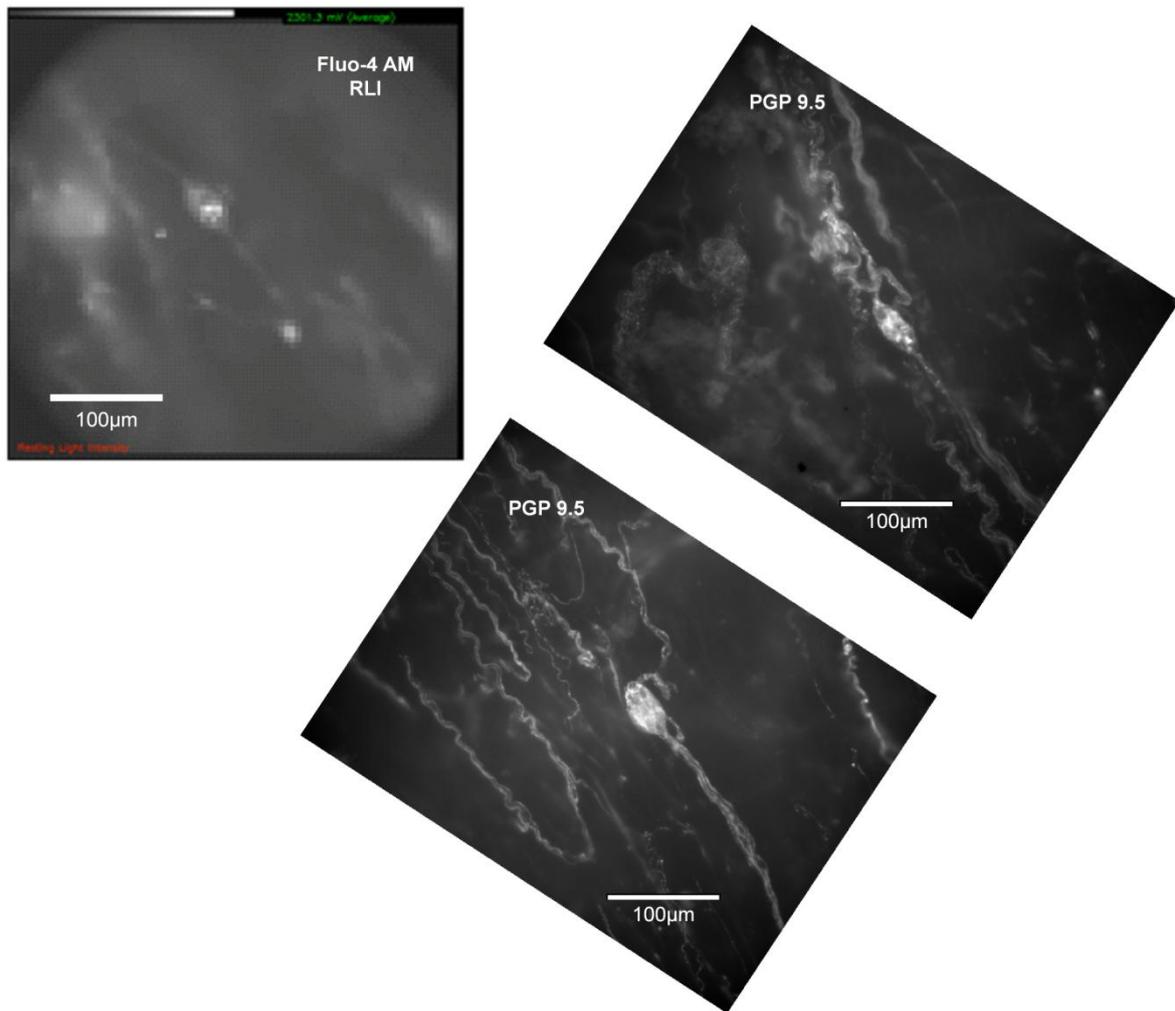


Abbildung 41: Beispiel einer nicht möglichen eindeutigen post-hoc Identifizierung eines Ganglions in einer Humandarm Biopsie. Es handelt sich um eine Biopsie von einer Kontrollperson. Auf der linken Seite dargestellt ist das RLI Bild, wie es aus dem Programm Neuroplex exportiert wurde. Auf der rechten Seite sind zwei Ganglien, die in der post-hoc Immunhistochemie gefunden wurden und dem Ganglion aus dem Versuch ähnlich sehen. Beide Bilder wurden um 33° gedreht, um die Orientierung des Ganglions im RLI Bild zu haben. Es kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob eines der beiden Ganglien das im Experiment bearbeitete ist.

Tabelle 4: Liste Probanden Reizdarmstudie (Gesunde Kontrollen)

Klinik Ort	Alter [Jahre]	Geschlecht	Diagnose
Freising	27	w	Gesunde Kontrolle
Freising	32	w	
Freising	62	w	
Freising	63	w	
Freising	47	m	
Freising	56	m	
Freising	59	m	
Freising	60	m	
Freising	64	m	
Freising	69	m	
Freising	76	m	
München	58	w	
München	59	w	
München	63	w	
München	58	m	
Vilsbiburg	58	m	
Vilsbiburg	67	m	
Mittelwert±STD	58±11		

Tabelle 5: Liste Probanden Reizdarmstudie (Reizdarmpatienten).

Klinik Ort	Alter [Jahre]	Geschlecht	Medikation	Diagnose
München	39	w	keine	RDS-Blähtyp
München	39	w	keine	RDS-Blähtyp
München	49	m	keine	RDS-Blähtyp
Vilsbiburg	62	w	keine	RDS-Blähtyp
Vilsbiburg	68	w	keine	RDS-Blähtyp
Freising	48	w	keine	RDS-O
München	43	w	keine	RDS-O
München	71	w	keine	RDS-O
München	53	m	keine	RDS-O
Vilsbiburg	27	w	Laxativ	RDS-O
Vilsbiburg	40	w	keine	RDS-O
Vilsbiburg	43	w	keine	RDS-O
Vilsbiburg	53	w	Bisacodyl	RDS-O
Vilsbiburg	71	w	keine	RDS-O
München	39	w	keine	RDS-D
München	42	w	keine	RDS-D
München	45	w	keine	RDS-D
München	47	w	keine	RDS-D
München	54	w	keine	RDS-D
München	67	w	keine	RDS-D
München	67	w	keine	RDS-D
München	31	m	keine	RDS-D
München	32	m	Loperamid	RDS-D
München	37	m	keine	RDS-D
München	48	m	keine	RDS-D
München	56	m	keine	RDS-D
Vilsbiburg	16	w	Butylscopolamin	RDS-D
Vilsbiburg	23	w	keine	RDS-D
Vilsbiburg	45	w	Mebeverin	RDS-D
Vilsbiburg	54	m	keine	RDS-D
München	41	w	keine	RDS-M
München	47	w	keine	RDS-M
München	52	w	keine	RDS-M
Vilsbiburg	36	w	keine	RDS-M
Vilsbiburg	57	m	Probiotica	RDS-M
Mittelwert±STD	48±13			

Tabelle 6: Rohdaten Kontrollen der Studie zum Reizdarmsyndrom. Dargestellt sind jeweils der Neuroindex, maximaler Calcium-Anstieg und antwortende Fläche des Ganglions pro Patient sowie die Mediane für die einzelnen Stimuli. Die Patientenummer setzt sich aus dem Ort der Klinik/Alter/Geschlecht zusammen, wie in Tabelle 4 zu finden. Wurde für einen Patient mehr als ein Ganglion getestet, so wurde jeweils der Mittelwert aus den Einzelwerten pro Ganglion als Wert pro Patient verwendet. Auch für den Neuroindex wurde der Mittelwert aus den Einzelwerten pro Ganglion verwendet. Die Werte werden gerundet ohne Nachkommastelle angegeben. n.v.= nicht vorhanden

Stimulus/ Patientennr.	Neuroindex			Max. $[Ca^{2+}]_i$ [%]			Antwortende Fläche [%]		
	Nikotin	Elektrische Stimulation	Mediator Cocktail	Nikotin	Elektrische Stimulation	Mediator Cocktail	Nikotin	Elektrische Stimulation	Mediator Cocktail
FS 27w	366	648	0	14	8	0	27	82	0
FS 32w	1494	1019	180	25	18	15	59	57	12
FS 62w	2181	515	n.v.	23	9	n.v.	96	60	n.v.
FS 63w	190	n.v.	n.v.	9	n.v.	n.v.	21	n.v.	n.v.
FS 47m	770	86	n.v.	9	5	n.v.	78	17	n.v.
FS 56m	845	0	0	10	0	0	88	0	0
FS 59m	852	357	228	9	4	5	90	84	25
FS 60m	105	44	478	2	2	5	45	30	99
FS 64m	627	n.v.	n.v.	10	n.v.	n.v.	63	n.v.	n.v.
FS 69m	474	38	0	17	5	0	28	4	0
FS 76m	302	0	0	7	0	0	35	0	0
M 58w	2703	869	54	34	17	5	81	50	10
M 59w	780	101	100	17	3	5	33	11	13
M 63w	1015	198	86	14	4	2	64	40	13
M 58m	532	n.v.	0	10	n.v.	0	51	n.v.	0
VB 58m	662	0	n.v.	20	0	n.v.	33	0	n.v.
VB 67m	786	0	366	15	0	18	53	0	18
Median [25%/75%]	770 [420/934]	93 [0/548]	70 [0/216]	14 [9/18]	4 [0/8]	3 [0/5]	53 [33/79]	23 [0/56]	11 [0/17]

Tabelle 7: Rohdaten der Reizdarmpatienten der Studie zum Reizdarmsyndrom. Dargestellt sind jeweils der Neuroindex, maximaler Calcium-Anstieg und antwortende Fläche des Ganglions pro Patient sowie die Mediane für die einzelnen Stimuli. Die Patientenummer setzt sich aus dem Ort der Klinik/Alter/Geschlecht/Subtyp zusammen, wie in Tabelle 5 zu finden. Wurde für einen Patient mehr als ein Ganglion getestet, so wurde jeweils der Mittelwert aus den Einzelwerten pro Ganglion als Wert pro Patient verwendet. Auch für den Neuroindex wurde der Mittelwert aus den Einzelwerten pro Ganglion verwendet. Die Werte werden gerundet ohne Nachkommastelle angegeben. n.v.= nicht vorhanden

Stimulus/ Patientennr.	Neuroindex			Max. $[Ca^{2+}]_i$ [%]			Antwortende Fläche [%]		
	Nikotin	Elektrische Stimulation	Mediator Cocktail	Nikotin	Elektrische Stimulation	Mediator Cocktail	Nikotin	Elektrische Stimulation	Mediator Cocktail
M39wB	251	38	0	14	4	0	18	9	0
M39wB	515	340	0	9	4	0	55	91	0
M49mB	588	141	19	9	5	2	62	30	9
VB62wB	903	n.v.	n.v.	10	n.v.	n.v.	58	n.v.	n.v.
VB68wB	251	n.v.	27	14	n.v.	3	18	n.v.	8
FS48wO	234	n.v.	0	6	n.v.	0	38	n.v.	0
M43wO	1670	n.v.	0	17	n.v.	0	99	n.v.	0
M71wO	38	n.v.	n.v.	1	n.v.	n.v.	37	n.v.	n.v.
M53mO	932	391	14	15	9	2	72	45	3
VB27wO	2050	131	0	45	5	0	45	13	0
VB40wO	154	n.v.	n.v.	30	n.v.	n.v.	5	n.v.	n.v.
VB43wO	189	205	0	19	11	0	10	18	0
VB53wO	1906	365	66	26	6	3	73	61	18
VB71wO	229	n.v.	n.v.	4	n.v.	n.v.	64	n.v.	n.v.
M39wD	32	0	n.v.	5	0	n.v.	3	0	n.v.
M42wD	951	110	143	19	6	11	51	17	14
M45wD	347	n.v.	0	8	n.v.	0	49	n.v.	0
M47wD	184	163	0	7	6	0	29	6	0
M54wD	260	0	n.v.	3	0	n.v.	46	0	n.v.
M67wD	345	66	n.v.	5	2	n.v.	72	21	n.v.
M67wD	988	88	39	16	3	1	56	17	9
M31mD	533	92	0	16	2	0	27	26	0
M32mD	688	n.v.	30	14	n.v.	4	31	n.v.	4

M37mD	41	n.v.	0	5	n.v.	0	9	n.v.	0
M48mD	884	26	0	32	3	0	31	4	0
M56mD	500	0	85	6	0	3	89	0	27
VB16wD	228	0	0	13	0	0	18	0	0
VB23wD	637	n.v.	n.v.	12	n.v.	n.v.	54	n.v.	n.v.
VB45wD	635	n.v.	0	10	n.v.	0	63	n.v.	0
VB54mD	219	73	0	13	5	0	14	15	0
M41wM	68	n.v.	n.v.	3	n.v.	n.v.	26	n.v.	n.v.
M47wM	2017	5	33	29	3	4	69	1	8
M52wM	243	n.v.	n.v.	5	n.v.	n.v.	51	n.v.	n.v.
VB36wM	934	n.v.	0	10	n.v.	0	89	n.v.	0
VB57mM	487	0	n.v.	12	0	n.v.	41	0	n.v.
Median [25%/75%]	532 [234/884]	80 [1/158]	0 [0/29]	12 [6/16]	4 [0/6]	0 [0/3]	46 [26/63]	16 [0/26]	0 [0/7]

Tabelle 8: Vergleich der aktivierten Fläche pro Ganglion für die Stimuli Nikotin und elektrische Stimulation. Es wurden alle Ganglien herangezogen, bei denen sowohl eine Applikation von Nikotin als auch elektrische Stimulation verwendet worden war. Die Fläche ist angegeben als Prozent der gesamten Fläche des Ganglions. Desweiteren wurde jeweils die Anzahl der interganglionären Fasern pro Ganglion gezählt.

Ganglion	Antwortende Nikotin [%]	Fläche	Antwortende Fläche elektrische Stimulation [%]	Anzahl interganglionärer Fasern
HC				
1	61,1		16,7	4
2	90,4		81,2	2
3	47,4		14,2	3
4	28,4		7,3	6
5	59,0		57,1	n.v.
6	100		60	3
7	57,3		69,4	2
8	84,2		49,4	3
9	80,5		50,2	3
10	46,9		33,9	2
11	26,9		81,7	2
12	33,4		0	2
13	36,9		0	2
14	88,3		0	n.v.
15	55,3		0	3
Median [25%/75%]	57,3 [36,9/84,2]		33,9 [0/60]	3 [2/3]
RDS				
1	49,1		42,8	2
2	38,9		28,2	2
3	32,9		27,3	2
4	14,7		21,9	4
5	22,4		14,9	3
6	51,4		17,0	3
7	61,8		34,3	3
8	17,9		51,2	2
9	42,9		8,8	3
10	60,9		45,4	4
11	95,8		60,6	3
12	45,1		25,4	4
13	9,8		18,2	4
14	69,2		1,4	n.v.
15	18,4		8,8	5
16	62,1		29,5	3
17	54,9		91,1	2
18	92,4		0,0	3
19	6,6		0,0	3
20	88,6		0,0	2
21	41,3		0,0	3
Median [25%/75%]	45,1 [20,4/62]		21,9 [5,1/38,6]	3 [2/3,8]

Tabelle 9: Rohdaten der Probanden, die nicht in die Studie Reizdarmsyndrom eingeschlossen werden konnten. Die Patientenummer setzt sich zusammen aus Ort der Entnahme/Alter/Geschlecht. Angegeben sind gerundete Werte pro Patient.

Patientengruppe/ Patientenummer	Nikotin Neuroindex	Elektr. Stimulation Neuroindex	Mediator Cocktail Neuroindex
Keine Symptome beschrieben			
FS67w	182	169	142
FS43m	643	320	n.v.
FS63w	664	n.v.	0
FS38m	248	n.v.	1967
FS32m	1854	n.v.	n.v.
FS65m	1053	n.v.	n.v.
Median [25%/75%]	653 [231/1253]	244 [169/320]	142 [0/1967]
Symptome beschrieben			
FS77w	288	343	n.v.
M74w	2657	1460	330
FS78w	458	n.v.	n.v.
FS70w	436	63	15
FS34w	1025	n.v.	190
FS60w	486	n.v.	449
FS62w	127	n.v.	n.v.
FS61m	602	n.v.	35
FS72w	604	133	66
FS71m	296	n.v.	0
FS66m	992	548	111
FS68w	1151	n.v.	n.v.
FS70w	275	n.v.	84
FS76w	n.v.	n.v.	100
FS71w	n.v.	52	67
Median [25%/75%]	486 [292/1009]	238 [60/776]	84 [35/190]
ROME III Kriterien für RDS erfüllt			
FS42m	221	n.v.	n.v.
FS53w	765	19	n.v.
Median [25%/75%]	493 [221/765]	-	n.v.
Sonstige Erkrankungen			
VB38m	1274	n.v.	152
FS79w	355	107	103
VB50m	599	322	1478
FS67m	67	n.v.	n.v.
Median [25%/75%]	477 [139/1105]	214 [107/322]	152 [102/1478]

Tabelle 10: Rohdaten der Versuche zur Wirkung von TNF- α an Präparaten des Meerschweinchen Darms. Aufgeführt sind die Aktionspotentialfrequenzen in Hz für den gepaarten Versuch Mediator Cocktail vs. Mediator Cocktail mit Adalimumab sowie Mediator Cocktail vs. Mediator Cocktail ohne TNF- α . Die Zusammensetzung des Mediatorcocktails lautet: 1 μ M Histamin, 1 μ M Serotonin, 10nM Tryptase, 150pg/ml TNF- α . Sie entspricht der Zusammensetzung, wie sie auch für die Versuche an Humandarm Biopsien für die Studie Reizdarmsyndrom verwendet worden ist.

Neurone	Mediator Cocktail (1:10 mit Krebslösung verdünnt) [Hz]	Mediator Cocktail (1:10 mit 50 μ g/ml Adalimumab/Krebslösung Verdünnt) [Hz]	Mediator Cocktail [Hz]	Mediator Cocktail ohne TNF- α [Hz]
1	5,63	0,00	10,84	4,22
2	2,50	4,38	14,46	0,00
3	6,25	6,25	0,00	9,04
4	0,00	9,38	12,05	1,20
5	11,25	0,00	1,81	0,00
6	8,75	5,00	5,42	0,60
7	13,75	7,50	2,41	0,60
8	8,75	5,00	8,43	2,41
9	6,88	0,00	10,84	1,81
10	13,75	10,63	1,20	0,00
11	11,25	6,25	3,01	0,60
12	7,50	3,13	2,41	0,00
13	5,00	0,00	7,83	0,60
14	1,88	1,88	5,42	0,00
15	2,50	0,00	6,02	0,60
16	3,13	1,88	7,23	0,00
17	5,63	1,88	18,07	0,00
18	3,75	0,00	8,43	0,60
19	1,88	0,00		
20	2,50	0,00		
21	2,50	0,00		
22	1,25	0,00		
23	3,13	0,00		
24	3,13	0,00		
25	1,88	0,00		
26	3,75	1,88		
27	3,13	0,00		
28	2,50	0,00		
29	1,25	0,00		
30	2,50	0,00		
31	5,63	0,00		
32	3,13	1,88		
33	6,25	0,63		
Median	3,13	0	6,63	0,60
[25%/75%]	[2,5/6,56]	[0/3,75]	[2,4/10,84]	[0/1,36]

Tabelle 11: Rohdaten der Versuche mit konditioniertem Darmgewebe des Meerschweinchens und Nikotin Applikation. Dargestellt sind jeweils die Werte für die Applikation von Nikotin als Neuroindex, Aktionspotential Frequenz und Anteil antwortender Zellen pro Ganglion.

Ganglion	HC Neuroindex	RDS Neuroindex	HC AP Frequenz [Hz]	RDS AP Frequenz [Hz]	HC Antwortende Zellen [%]	RDS Antwortende Zellen [%]
1	592	439	6,5	7,7	92	57
2	355	1213	8,9	13,1	40	92
3	135	1017	1,8	11,4	75	89
4	1192	858	11,9	8,6	100	100
5	569	1230	6,4	12,3	89	100
6	533	367	9,3	4,0	57	91
7	759	211	8,4	4,2	90	50
8	411		6,2		67	
Median [25%/75%]	551 [369/717]	858 [367/1213]	7,4 [6,2/9,2]	8,6 [4,2/12,3]	82 [60/91]	91 [57/100]

Tabelle 12: Rohdaten der Versuche mit konditioniertem Darmgewebe des Meerschweinchens und der Applikation des Supernatants. Dargestellt sind jeweils die Werte für die Applikation des Supernatants als Neuroindex, Aktionspotential Frequenz und Anteil antwortender Zellen pro Ganglion. Für die Analyse wurden Ganglien, die mit einer AP Frequenz von 0 auf die Applikation des Supernatants geantwortet haben, nicht mitberücksichtigt, um einen Vergleich für die tatsächliche Stärke der Antwort zu haben. In der Tabelle sind die Ganglion als 0 mit aufgeführt (grau). Als Mediane findet sich zum einen der Wert exklusive der nicht antwortenden Ganglien (schwarz) sowie der Wert inklusive der nicht antwortenden Ganglien (grau).

Ganglion	HC Neuroindex	RDS Neuroindex	HC AP Frequenz [Hz]	RDS AP Frequenz [Hz]	HC Antwortende Zellen [%]	RDS Antwortende Zellen [%]
1	130	0	2,2	0	58	0
2	60	11	2,0	0,6	30	18
3	367	105	5,0	2,1	73	50
4	0	0	0	0	0	0
5	650	27	6,5	1,5	100	18
6	0	44	0	2,4	0	18
7	0		0		0	
8	452		6,5		70	
9	140		4,2		33	
Median	254 130	36 19	4,6 2,2	1,8 1,1	64 33	18 18
[25%/75%]	[113/501]	[15/90]	[2,2/6,5]	[0,8/2,3]	[33/80]	[18/42]
	[0/409]	[0/59]	[0/5,7]	[0/2,2]	[0/71]	[0/26]

Tabelle 13: Rohdaten der Versuche mit 100nM Trypsin und dem PAR1 Antagonist SCH79797 (5µM). Dargestellt sind jeweils die Werte für die Applikation von 100nM Trypsin mit und ohne Perfusion von 5µM SCH79797 als Neuroindex, maximaler intrazellulärer Calcium Anstieg und Anteil antwortender Zellen pro Ganglion. Die Versuche wurden nicht gepaart durchgeführt.

Ganglion	100nM Trypsin Neuroindex	100nM Trypsin mit SCH79797 Neuroindex	100nM Trypsin [Ca ²⁺] _i [%]	100nM Trypsin mit SCH79797 [Ca ²⁺] _i [%]	100nM Trypsin Antwortende Zellen [%]	100nM Trypsin mit SCH79797 Antwortende Zellen [%]
1	5465	0	54,6	0	100	0
2	11679	0	116,8	0	100	0
3	5262	172	52,6	6,0	100	29
4	404	57	6,1	2,3	67	25
5	581	151	7,0	4,5	83	33
6	4162	327	41,6	16,4	100	20
7	2601	345	26,0	17,3	100	20
8	4473		44,7		100	
9	2122		21,2		100	
10	3374		33,7		100	
Median	3768	151	37,7	4,5	100	20
[25%/75%]	[1737/5312]	[0/327]	[17,7/53,1]	[0/16,4]	[96/100]	[0/29]

Tabelle 14: Rohdaten der Versuche zur Wirkung von Elastase nach Applikation auf den PAR1 Rezeptor. Dargestellt sind jeweils die Werte für die Applikation von 100nM Thrombin vor und nach der Applikation von 1µM Elastase als Neuroindex, maximaler intrazellulärer Calcium Anstieg und Anteil antwortender Zellen pro Ganglion. Die Versuche wurden nicht gepaart durchgeführt

Ganglion	100nM Thrombin Neuroindex	100nM Thrombin nach Elastase Applikation Neuroindex	100nM Thrombin [Ca²⁺]_i [%]	100nM Thrombin nach Elastase Applikation [Ca²⁺]_i [%]	100nM Thrombin Antwortende Zellen [%]	100nM Thrombin nach Elastase Applikation Antwortende Zellen [%]
1	6268	417	87,5	28,9	72	14
2	407	1433	32,8	36,6	12	39
3	5869	5738	58,7	59,6	100	96
4	1405	2740	21,9	27,4	64	100
5	4104	3125	52,8	41,4	78	75
6	2322		32,5		71	
Median [25%/75%]	3212 [1155/5969]	2740 [925/4431]	42,8 [29,8/65,9]	36,6 [28,2/50,5]	72 [51/83]	75 [27/98]

Tabelle 15: Rohdaten der Versuche zur Wirkung von Elastase nach Inkubation auf den PAR1 Rezeptor. Dargestellt sind jeweils die Werte für die Applikation von 100nM Thrombin vor und nach der Applikation von 1µM Elastase als Neuroindex, maximaler intrazellulärer Calcium Anstieg und Anteil antwortender Zellen pro Ganglion. Die Versuche wurden nicht gepaart durchgeführt

Ganglion	100nM Thrombin Neuroindex	100nM Thrombin nach Elastase Inkubation Neuroindex	100nM Thrombin [Ca²⁺]_i [%]	100nM Thrombin nach Elastase Inkubation [Ca²⁺]_i [%]	100nM Thrombin Antwortende Zellen [%]	100nM Thrombin nach Elastase Inkubation Antwortende Zellen [%]
1	9030	0	90,3	0	100	0
2	4589	0	45,9	0	100	0
3	1144	40	13,7	2,0	83	20
4	574	0	14,4	0	40	0
5	3346	0	37,2	0	90	0
6	5367		53,7		100	
7	5107		51,1		100	
Median [25%/75%]	4589 [1144/5367]	0 [0/20]	45,9 [14,4/53,7]	0 [0/1,0]	100 [83/100]	0 [0/10]

Tabelle 16: Rohdaten der Experimente zur Untersuchung der Wechselwirkung einzelner Mediatoren. Dargestellt sind jeweils die Werte für die Applikation der Substanzen als Einzelapplikation oder als Mischung (dargestellt durch X/X) als Neuroindex, maximaler intrazellulärer Calcium Anstieg und Anteil antwortender Zellen pro Ganglion. Die Versuche wurden nicht gepaart durchgeführt.

Ganglion	Neuroindex			Max. [Ca ²⁺] _i [%]			Antwortende Fläche [%]		
	Histamin	Serotonin	Histamin/ Serotonin	Histamin	Serotonin	Histamin/ Serotonin	Histamin	Serotonin	Histamin/ Serotonin
1	0	85	113	0	5,1	7,9	0	17	14
2	0	372	513	0	5,0	5,1	0	75	100
3	0	1039	82	0	11,9	4,9	0	88	17
4	198	0	745	5,7	0	8,7	43	0	86
5		0	0		0	0		0	0
6			0			0			0
7			0			0			0
8			523			5,2			100
9			693			6,9			100
10			255			5,1			50
11			177			10,6			17
12			2053			20,5			100
Medain	0	85	216	0	5,0	5,2	0	17	33
[25%/75%]	[0/148]	[0/705]	[21/651]	[0/4,3]	[0/8,5]	[1,2/8,5]	[0/32]	[0/81]	[4/100]

Ganglion	Neuroindex				Max. $[Ca^{2+}]_i$ [%]				Antwortende Fläche [%]			
	Tryptase	Histamin/ Serotonin/ Tryptase	PAR2 AP	Histamin/ Serotonin/ PAR2 AP	Tryptase	Histamin/ Serotonin/ Tryptase	PAR2 AP	Histamin/ Serotonin/ PAR2 AP	Tryptase	Histamin/ Serotonin/ Tryptase	PAR2 AP	Histamin/ Serotonin/ PAR2 AP
1	98	719	1100	2613	2,3	7,2	11,0	26,1	43	100	100	100
2	255	5772	797	2676	3,2	57,7	9,6	26,8	80	100	83	100
3	0	5832	1157	1439	0	58,3	14,5	18,0	0	100	80	80
4	867	1626	65	197	8,7	16,3	1,9	5,9	100	100	33	33
5	755	1014	0	668	9,1	11,6	0	6,7	83	88	0	100
6	644	431	1542	322	6,4	8,6	15,4	8,1	100	50	100	40
7		1401	0	249		14,0	0	5,8		100	0	43
8		2378	0	134		23,8	0	4,0		100	0	33
9		1165	0	1385		11,7	0	13,9		100	0	100
10				1691				19,3				88
11				0				0				0
12				0				0				0
13				0				0				0
Medain	450	1401	65	322	4,8	14,0	1,9	6,7	82	100	33	43
[25%/75%]	[74/783]	[867/4075]	[0/1129]	[67/1565]	[1,7/8,8]	[10,1/40,7]	[0/12,7]	[2,0/18,7]	[32/100]	[94/100]	[0/92]	[17/100]

Ganglion	Neuroindex				Max. $[Ca^{2+}]_i$ [%]				Antwortende Fläche [%]			
	PAR1 AP 1 μ M	Histamin/Serotonin/PAR1 AP 1 μ M	PAR1 AP 10 μ M	Histamin/Serotonin/PAR1 AP 10 μ M	PAR1 AP 1 μ M	Histamin/Serotonin/PAR1 AP 1 μ M	PAR1 AP 10 μ M	Histamin/Serotonin/PAR1 AP 10 μ M	PAR1 AP 1 μ M	Histamin/Serotonin/PAR1 AP 1 μ M	PAR1 AP 10 μ M	Histamin/Serotonin/PAR1 AP 10 μ M
1	0	2030	2087	4072	0	20,3	20,9	40,7	0,0000	100,0000	100,0000	100,0000
2	0	408	8607	1724	0	5,4	86,1	17,2	0,0000	75,0000	100,0000	100,0000
3	0	273	1768	4355	0	8,2	19,9	49,0	0,0000	33,3333	88,8889	88,8889
4	89	0	4323	4414	4,4	0	43,2	44,1	20,0000	0,0000	100,0000	100,0000
5	348	346	4110	2735	7,0	3,5	41,1	27,4	50,0000	100,0000	100,0000	100,0000
6		1287	4827	2019		14,5	48,3	26,9		88,8889	100,0000	75,0000
7		721				10,8				66,6667		
Medain [25%/75%]	0 [0/218]	408 [273/1287]	4216 [2007/5772]	3403 [1945/4370]	0 [0/5,7]	8,2 [3,5/14,5]	42,2 [20,6/57,7]	34,0 [24,5/45,4]	0 [0/35]	75 [33/100]	100 [97/100]	100 [85/100]

Ganglion	Neuroindex				Max. [Ca ²⁺] _i [%]				Antwortende Fläche [%]			
	Trypsin	Histamin/ Serotonin/ Trypsin	Elastase	Histamin/ Serotonin/ Elastase	Trypsin	Histamin/ Serotonin/ Trypsin	Elastase	Histamin/ Serotonin/ Elastase	Trypsin	Histamin/ Serotonin/ Trypsin	Elastase	Histamin/ Serotonin/ Elastase
1	424,3636	177,2857	0	2145,2500	15,5600	6,2050	0	21,4525	27,2727	28,5714	0	100,0000
2	1922,7143	1080,6000	0	0,0000	19,2271	10,8060	0	11,0000	100,0000	100,0000	0	0,0000
3	816,4286	918,1429	0	1405,0000	9,5250	10,7117	0	14,0500	85,7143	85,7143	0	100,0000
4	1764,7000	2919,3636	0	3063,6000	17,6470	29,1936	0	30,6360	100,0000	100,0000	0	100,0000
5	0,0000	8943,2500		1592,0000	0	89,4325		15,9200	0,0000	100,0000		100,0000
6	0,0000	4895,0000		1193,8889	0	48,9500		11,9389	0,0000	100,0000		100,0000
7	10862,2500	853,0000		2008,7500	108,6225	8,5300		20,0875	100,0000	100,0000		100,0000
8	1724,3333	2422,5000		596,6667	17,2433	24,2250		8,9500	100,0000	100,0000		66,6667
9	8943,25				90,6450				100,0000			
10	677,4000				33,8700				20,0000			
11	0,0000				0				0,0000			
12	955,6000				15,9267				60,0000			
Medain	886	1752	0	1499	16,6	17,5	0	15,0	73	100	0	100
[25%/75%]	[106/1883]	[869/4401]	[0/0]	[746/2111]	[2,4/30,2]	[9,1/44,0]	[0/0]	[11,2/21,1]	[5/100]	[89/100]	[0/0]	[75/100]

Tabelle 17: Rohdaten zu den Experimenten zur Untersuchung der PAR Beteiligung durch Perfusion des PAR1 Antagonist SCH79797. Dargestellt sind jeweils die Werte für die Applikation der Substanzen vor und nach der Perfusion von 10µM SCH79797 als Neuroindex, maximaler intrazellulärer Calcium Anstieg und Anteil antwortender Zellen pro Ganglion. Die Versuche wurden nicht gepaart durchgeführt.

Ganglion	Neuroindex				Max. [Ca ²⁺] _i [%]				Antwortende Fläche [%]			
	Histamin/ Serotonin/ Trypsin	Histamin/ Serotonin/ Trypsin mit SCH79797	Histamin/ Serotonin/ Elastase	Histamin/ Serotonin/ Elastase mit SCH79797	Histamin/ Serotonin/ Trypsin	Histamin/ Serotonin/ Trypsin mit SCH79797	Histamin/ Serotonin/ Elastase	Histamin/ Serotonin/ Elastase mit SCH79797	Histamin/ Serotonin/ Trypsin	Histamin/ Serotonin/ Trypsin mit SCH79797	Histamin/ Serotonin/ Elastase	Histamin/ Serotonin/ Elastase mit SCH79797
1	2963	454	1056	309	29,6	4,5	10,6	4,6	100	100	100	67
2	3248	1702	542	956	32,5	19,5	5,4	9,6	100	88	100	100
3	1749	2085	1133	1134	17,5	20,8	11,3	11,3	100	100	100	100
4	2567	1431	632	1198	25,7	14,3	8,4	12,0	100	100	75	100
5	1348	1276	1188	119	13,5	21,3	11,9	3,5	100	100	100	33
6	6253	776	1092	420	62,5	8,9	10,9	7,4	100	88	100	57
7		383	767	1384		3,8	7,7	13,8		100	100	100
8			1108	584			11,1	6,3			100	92
9			1597	2549			18,2	31,9			88	80
10			3130				31,3				100	
11			583				11,7				50	
Median	2765	1276	1092	956	27,6	14,3	11,1	9,6	100	100	100	92
[25%/75%]	[1649/3999]	[454/1702]	[632/1188]	[365/1291]	[16,5/40,0]	[4,5/20,8]	[8,4/11,9]	[5,5/12,9]	[100/100]	[88/100]	[88/100]	[62/100]

Tabelle 18: Rohdaten zu den Experimenten zur Untersuchung der PAR Beteiligung durch Perfusion des PAR2 Antagonist GB83. Dargestellt sind jeweils die Werte für die Applikation der Substanzen vor und nach der Perfusion von 2µM GB83 als Neuroindex, maximaler intrazellulärer Calcium Anstieg und Anteil antwortender Zellen pro Ganglion. Die Versuche wurden nicht gepaart durchgeführt.

Ganglion	Neuroindex		Max. $[Ca^{2+}]_i$ [%]		Antwortende Fläche [%]	
	Histamin/ Serotonin/ Tryptase	Histamin/ Serotonin/ Tryptase mit GB83	Histamin/ Serotonin/ Tryptase	Histamin/ Serotonin/ Tryptase mit GB83	Histamin/ Serotonin/ Tryptase	Histamin/ Serotonin/ Tryptase mit GB83
1	1147	676	11,5	10,1	100	67
2	1539	432	15,4	8,6	100	50
3	435	0	6,1	0	57	0
4	0	365	0	7,3	0	50
5	1576	1089	15,8	10,9	100	100
6		2339		23,4		100
7		1690		20,3		83
Median	1147	676	11,5	10,1	100	67
[25%/75%]	[218/1557]	[365/1690]	[3,0/15,6]	[7,3/20,3]	[29/100]	[50/100]

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste aller verwendeter Substanzen und Konzentrationen zur Untersuchung der Wechselwirkung der entsprechenden Substanzen.	27
Tabelle 2: Liste aller verwendeter Antikörper.....	31
Tabelle 3: Liste verwendeter Antikörper für dreifache Färbung.....	31
Tabelle 4: Liste Probanden Reizdarmstudie (Gesunde Kontrollen).....	115
Tabelle 5: Liste Probanden Reizdarmstudie (Reizdarmpatienten).	116
Tabelle 6: Rohdaten Kontrollen der Studie zum Reizdarmsyndrom.	117
Tabelle 7: Rohdaten der Reizdarmpatienten der Studie zum Reizdarmsyndrom.	118
Tabelle 8: Vergleich der aktivierten Fläche pro Ganglion für die Stimuli Nikotin und elektrische Stimulation.....	120
Tabelle 9: Rohdaten der Probanden, die nicht in die Studie Reizdarmsyndrom eingeschlossen werden konnten.	121
Tabelle 10: Rohdaten der Versuche zur Wirkung von TNF- α an Präparaten des Meerschweinchen Darms.	122
Tabelle 11: Rohdaten der Versuche mit konditioniertem Darmgewebe des Meerschweinchens und Nikotin Applikation.....	123
Tabelle 12: Rohdaten der Versuche mit konditioniertem Darmgewebe des Meerschweinchens und der Applikation des Supernatants.....	124
Tabelle 13: Rohdaten der Versuche mit 100nM Trypsin und dem PAR1 Antagonist SCH79797 (5 μ M).	125
Tabelle 14: Rohdaten der Versuche zur Wirkung von Elastase nach Applikation auf den PAR1 Rezeptor.	126
Tabelle 15: Rohdaten der Versuche zur Wirkung von Elastase nach Inkubation auf den PAR1 Rezeptor.	127
Tabelle 16: Rohdaten der Experimente zur Untersuchung der Wechselwirkung einzelner Mediatoren.	128
Tabelle 17: Rohdaten zu den Experimenten zur Untersuchung der PAR Beteiligung durch Perfusion des PAR1 Antagonist SCH79797.	132
Tabelle 18: Rohdaten zu den Experimenten zur Untersuchung der PAR Beteiligung durch Perfusion des PAR2 Antagonist GB83.	133

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biopsien mit und ohne Mukosa aufgespannt auf Versuchsplättchen.....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schichten, die sich in einer Biopsie befinden können.	13
Abbildung 3: Aufsetzen der Inkubationskammer auf das Plättchen mit aufgespanntem Gewebe.....	16
Abbildung 4: Fluoreszierende Farbstoffe.	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Setups mit dem aufrechten Mikroskop für das Beispiel Calcium Imaging.	22
Abbildung 6: Submuköses Ganglion aus dem Meerschweinchen distalen Colon gefärbt mit di-8-ANEPPS und Beispiel Trace nach Nikotinapplikation.	32
Abbildung 7: Humanes submuköses Ganglion immunhistochemisch mit PGP 9.5 und Fluo-4 AM gefärbt.....	34
Abbildung 8: Vermessen der Fläche von mukosalem und submukösem Gewebe einer Biopsie.	36
Abbildung 9: Humanes submuköses Ganglion aus einer Biopsie mit di-8-ANEPPS gefärbt und Beispieltrace nach Applikation von Nikotin.....	41
Abbildung 10: Inkubation von Meerschweinchen SMP mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Adalimumab.....	42
Abbildung 11: Applikation des RDS-Mediator Cocktails mit und ohne Adalimumab.....	43
Abbildung 12: Applikation des RDS-Mediator Cocktails mit und ohne TNF- α	44
Abbildung 13: Effekt von Trypsin auf humane submuköse Ganglien.	45
Abbildung 14: Beispielsignale für eine 2s dauernde Applikation von 100nM neutrophiler Elastase.	46
Abbildung 15: Die Wirkung von neutrophiler Elastase auf den PAR1 Rezeptor im humanen submukösen Gewebe.....	47
Abbildung 16: Verlaufs bild aller Studienteilnehmer.....	50
Abbildung 17: Nikotin Applikation auf Ganglien von gesunden Kontrollen und RDS Patienten.	53
Abbildung 18: Elektrische-Punkt-Stimulation in Geweben von gesunden Kontrollen und RDS Patienten.....	54
Abbildung 19: Vergleich der aktivierten Fläche durch Nikotin Applikation und elektrische Stimulation.	55
Abbildung 20: Korrelation der antwortenden Fläche des Ganglions auf elektrische Stimulation und der Anzahl an interganglionären Fasersträngen des Ganglions.....	56

Abbildung 21: Korrelation zwischen Alter und Neuroindex nach Mediator Cocktail Applikation in humanen submukösen Ganglien aus Biopsien von HC und RDS.	57
Abbildung 22: Applikation des Mediator Cocktails auf Ganglien von gesunden Kontrollen und RDS Patienten.....	58
Abbildung 23: Übernacht Inkubation von submukösem Gewebe des Meerschweinchen Colons.....	60
Abbildung 24: Identifikation von reaktiven Zellen außerhalb des Ganglions.....	63
Abbildung 25: Korrelation zwischen Alter und maximalem Calcium Anstieg nach Nikotin Applikation in humanen submukösen Ganglien von operativ entfernten Darmstücken.	64
Abbildung 26: Einzelapplikation und Kombination von Histamin und Serotonin, jeweils in der Konzentration 1µM.	65
Abbildung 27: Einzelapplikation und Kombination von 10nM Tryptase sowie Histamin/Serotonin/Tryptase.	66
Abbildung 28: Einzelapplikation und Kombination von 10µM PAR2 AP (SLIGKV-NH ₂) sowie Histamin/Serotonin/PAR2 AP.	67
Abbildung 29: Einzelapplikation und Kombination von 10nM Trypsin sowie Histamin/Serotonin/Trypsin.....	68
Abbildung 30: Einzelapplikation und Kombination von 10µM PAR1 AP (TFLLR-NH ₂) sowie Histamin/Serotonin/PAR1 AP.	69
Abbildung 31: Einzelapplikation und Kombination von 1µM PAR1 AP (TFLLR-NH ₂) sowie Histamin/Serotonin/PAR1 AP.	70
Abbildung 32: Einzelapplikation und Kombination von 100nM neutrophiler Elastase sowie Histamin/Serotonin/Elastase.....	71
Abbildung 33: Verwendung des PAR2 Antagonisten GB83 (2µM) mit der Mischung Histamin/Serotonin/Tryptase.	72
Abbildung 34: Verwendung des PAR1 Antagonisten SCH79797 (10µM) mit der Mischung Histamin/Serotonin/Trypsin.....	73
Abbildung 35: Verwendung des PAR1 Antagonisten SCH79797 (10µM) mit der Mischung Histamin/Serotonin/Elastase.....	74
Abbildung 36: Fragebogenmodul ROME III für RDS.....	102
Abbildung 37: Schnappschüsse des Online-Fragebogens in der Variante für Reizdarmpatienten und Kontrollpersonen.....	111
Abbildung 38: Darstellung des Neuroindex pro Teilnehmer, der nicht in die Analyse der Studie zur neuronalen Aktivität von Biopsien miteinbezogen werden konnte.....	112
Abbildung 39: Darstellung des Neuroindex pro Teilnehmer mit unterschiedlichen Krankheiten.....	112

Abbildung 40: Beispiel einer positiven post-hoc Identifizierung eines Ganglions und der Neurone in einem Humandarm Resektat.....	113
Abbildung 41: Beispiel einer nicht möglichen eindeutigen post-hoc Identifizierung eines Ganglions in einer Humandarm Biopsie.....	114

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Michael Schemann für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe an diesem äußerst spannenden Thema promovieren zu dürfen. Die Arbeit am Mikroskop hat mir schon immer Spaß gemacht und die Technik des Neuroimaging mit VSD oder Calcium sensitiven Farbstoffen hat mich besonders begeistert. Die teils fordernden Diskussionen mit Prof. Schemann haben mich stets dazu motiviert, mich noch tiefer in meine Daten einzugraben und mich möglichst umfassend über die einzelnen Themenbereiche zu informieren. Die gesamte Promotion war ein Prozess der Entwicklung für mich und ich möchte die Erfahrungen, die ich hier sammeln konnte, nicht missen.

Zu dieser tollen Erfahrung haben natürlich auch viele Kollegen am Lehrstuhl für Humanbiologie einen nicht unerheblichen Anteil. Auch die Diskussionen mit Dr. Klaus Michel haben mich stets weiter gebracht und darüber hinaus auch oft sehr viel Spaß gemacht. Vielen Dank Klaus, dass auch du immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Ideen hattest und sie kritisch mit mir diskutiert hast.

Es würde den Rahmen sprengen, hier alle für mich wichtigen Personen aus der Arbeitsgruppe namentlich zu nennen. Daher möchte ich mich kollektiv bei allen Bürokollegen aus dem International Office und der Caro Gruppe bedanken, die für den entspannten und lockeren Rahmen gesorgt haben, der hin und wieder einmal notwendig ist. Auch meine „Ökokisten Gruppe“ war essentiell und hat mir über viele frustrierende und schwierige Passagen hinweg geholfen.

Ich möchte mich auch ganz besonders bei meiner Mutter bedanken, die es mir durch ihren aufopfernden Einsatz erst ermöglicht hat, diesen Bildungsweg überhaupt einzuschlagen. Auch meinem Ehemann Markus möchte ich meinen Dank aussprechen, der mich über die gesamte Zeit in vielerlei Hinsicht unterstützt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ostertag
Vorname: Daniela Gisela Rosa
Geburtsdatum: 17.07.1984

Ausbildung:

Seit 09/11 Promotion, Lehrstuhl für Humanbiologie (Technische Universität München)

Thema: Neuroimaging enterischer Neurone in humanen intestinalen Biopsien von Reizdarmpatienten und Kontrollpersonen

10/04 – 08/09 Studium der Biologie an der Technischen Universität München

Hauptfach: Zoologie

1. Nebenfach: Humanbiologie

2. Nebenfach: Tierzucht/Haustiergenetik

Abschluss: Diplom (Note: 1,3)

Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung des Eistiels und der Eiablage von *Chrysoperla carnea* (Stephens)

09/95 bis 07/04 Allgemeine Hochschulreife, Oskar-von-Miller-Gymnasium in München (Abiturnote: 2,4)

Berufserfahrung:

11/10 bis 08/11 Wissenschaftliche Assistentin, Beratung
Zentrale Studienberatung, Technische Universität München (Teilzeit)

07/10 bis 08/10 Durchführung einer Machbarkeitsstudie mit ersten Resultaten
Lehrstuhl für Tierökologie, Technische Universität München (Teilzeit)
Thema: Primer Design und Optimierung für sieben Pilzarten

04/08 bis 08/11 Content-Managerin und Team-Assistentin
MovieMaze.de, München (Teilzeit)