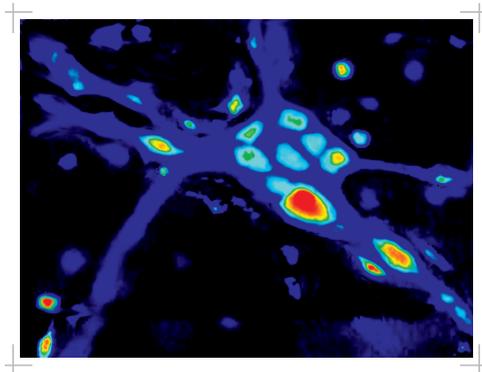


JASMIN BALLOUT

Interaktionen zwischen Mastzellen und submukösen Neuronen unter Entzündungsbedingungen ex vivo und in vitro



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

**Interaktionen zwischen Mastzellen und submukösen
Neuronen unter Entzündungsbedingungen
ex vivo und in vitro**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Jasmin Ballout

Tierärztin aus Hachenburg

Gießen, 2019

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Diener

PD Dr. Katja Roscher

Tag der Disputation: 27.11.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Abkürzungsverzeichnis	- 1 -
2. Einleitung.....	- 5 -
2.1 Das enterische Nervensystem	- 5 -
2.2 Aufbau und Funktion des Darmepithels	- 7 -
2.3 Intestinale Mastzellen: Morphologie, Funktion und ihre Rolle bei Überempfindlichkeitsreaktionen	- 12 -
2.4 Mastzell-Neuron-Interaktionen	- 16 -
2.5 Problematik bei chronischen Darmentzündungen im Hinblick auf Mastzell-Neuron-Interaktionen	- 19 -
2.6 Fragestellung der Dissertation.....	- 25 -
3. Material und Methoden	- 26 -
3.1 Versuchstiere.....	- 26 -
3.2 Tiermodell zur Sensibilisierung und Kolitis-Induktion	- 26 -
3.3 Lösungen	- 28 -
3.3.1 Lösungen für die Ussing-Kammer	- 28 -
3.3.2 Lösungen für das Ca ²⁺ -Imaging	- 28 -
3.3.3 Lösungen für die Zellkultur	- 29 -
3.3.4 Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenz	- 30 -
3.3.5 Lösungen für den Western Blot	- 32 -
3.4 Substanzen.....	- 33 -
3.5 Beschichtung der Glasplättchen.....	- 34 -
3.6 Präparation	- 34 -

Inhaltsverzeichnis

3.6.1	Präparation für die Ussing-Kammer	34 -
3.6.2	Herstellung eines sogenannten „Stufenpräparates“	35 -
3.6.3	Präparation für das Ca ²⁺ -Imaging	36 -
3.7	Zellkultur	37 -
3.7.1	Primäre Kultivierung submuköser Neurone	37 -
3.7.2	Kultivierung der RBL-2H3	38 -
3.7.3	Cokultur aus isolierten submukösen Neuronen und RBL-2H3	39 -
3.7.4	Cokultur aus intakter Submukosa und RBL-2H3	40 -
3.8	Ussing-Kammer	41 -
3.8.1	Prinzip	41 -
3.8.2	Aufbau	43 -
3.8.3	Versuchsdurchführung	44 -
3.8.4	Messung der parazellulären Permeabilität mittels Fluorescein	46 -
3.9	Ca ²⁺ -Imaging	47 -
3.9.1	Theorie des Ca ²⁺ -Imaging	47 -
3.9.2	Fura-2	48 -
3.9.3	Messstand	50 -
3.9.4	Messkammer und Halterung für die elektrische Feldstimulation	51 -
3.9.5	Durchführung	52 -
3.9.6	Elektrische Feldstimulation (EFS)	54 -
3.10	Indirekte Immunfluoreszenz	55 -
3.10.1	Grundlagen	55 -
3.10.2	Verwendete Antikörper	56 -
3.10.3	Herstellung der Gewebeblöckchen	58 -

Inhaltsverzeichnis

3.10.4	Herstellung der Schnitte.....	- 59 -
3.10.5	Protokoll für die indirekte Immunfluoreszenz von Geweben.....	- 59 -
3.10.6	Protokoll für die indirekte Immunfluoreszenz von Zellen.....	- 60 -
3.10.7	Mikroskopie	- 60 -
3.11	Toluidinblau-Färbung	- 63 -
3.11.1	Prinzip	- 63 -
3.11.2	Durchführung der Färbung.....	- 63 -
3.12	Western Blot.....	- 64 -
3.12.1	Grundlagen.....	- 64 -
3.12.2	Proteinextraktion	- 65 -
3.12.3	Durchführung des Western Blots.....	- 65 -
3.12.4	Auswertung und Ergebnisse des Western Blots	- 67 -
3.13	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	- 68 -
3.13.1	Prinzip der qPCR.....	- 68 -
3.13.2	Isolation der RNA	- 70 -
3.13.3	Bestimmung der RNA-Integrität mittels Gelelektrophorese	- 70 -
3.13.4	cDNA-Synthese.....	- 72 -
3.13.5	Bestimmung der Referenzgene und Normalisierung	- 73 -
3.13.6	Durchführung der qPCR	- 74 -
3.13.7	Auswertung der qPCR-Ergebnisse.....	- 75 -
4.	Statistik	- 77 -
5.	Ergebnisse.....	- 78 -
5.1	Induktion einer Sensibilisierung und Kolitis im Tiermodell	- 78 -

5.2	Sensibilisierung und Kolitis beeinflussen die Anionensekretion und epitheliale Permeabilität.....	- 79 -
5.3	Detektion von Mastzellen	- 85 -
5.4	Segmentabhängige Unterschiede in der Mastzellanzahl.....	- 85 -
5.5	Geänderte epitheliale Barrierefunktion	- 87 -
5.6	Genexpressionslevel von Mastzellproteasen und Claudinen	- 91 -
5.7	Der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf Sekretion und Permeabilität im distalen Kolon.....	- 94 -
5.8	Der Effekt des Zytokin-Cocktails auf die intestinale Sekretion und Permeabilität.....	- 99 -
5.9	Die Antwort submuköser Neurone auf Mastzellmediatoren wird durch Zytokine moduliert.....	- 102 -
5.10	Der Zytokinmix induziert Apoptose in RBL-2H3	- 106 -
5.11	Die Mastzell-vermittelte Anionensekretion wird durch Neurotransmitter verändert	- 107 -
5.12	Die Wirkung von Agonisten auf die basale zytosolische Ca ²⁺ -Konzentration in RBL-2H3	- 111 -
5.13	Eine Aktivierung von Rezeptoren für Neurotransmitter modifiziert die RBL-2H3-Antwort auf Compound 48/80	- 113 -
6.	Diskussion	- 117 -
6.1	Methodische Betrachtungen.....	- 117 -
6.1.1	Das Kolitismodell.....	- 117 -
6.1.2	Heterogenität von Mastzellen	- 118 -
6.2	Die intestinale Epithelbarriere: Aufbau und Veränderungen unter Entzündungsbedingungen	- 120 -
6.3	Änderung der epithelialen Sekretion unter Entzündungsbedingungen....	- 126 -

Inhaltsverzeichnis

6.3.1	Einfluss auf die basale Sekretion	126 -
6.3.2	Interaktion mit Sekretagoga	128 -
6.4	Mastzell-dichte und Mastzell-vermittelte Sekretionsprozesse am Darmepithel unter Entzündungsbedingungen	130 -
6.5	Der Effekt von Neurotransmittern auf die Mastzellfunktion und die Mastzell-vermittelte Sekretion	134 -
6.6	Wirkung proinflammatorischer Zytokine auf die Mastzell-Neuron- Interaktionen.....	137 -
7.	Zusammenfassung	140 -
8.	Summary	142 -
9.	Verzeichnisse	144 -
9.1	Abbildungsverzeichnis	144 -
9.2	Tabellenverzeichnis.....	146 -
10.	Literaturverzeichnis	147 -
11.	Eigene Publikationen	163 -
12.	Danksagung	164 -
13.	Erklärung	166 -

1. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AH	After hyperpolarization (AH-Neurone)
ANOVA	Analysis of variance
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B2m	β2-Mikroglobulin
Bidest.	Bidestilliert
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Cas3	Caspase 3
CCD	Charged coupled device
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cldn	Claudin
CPA	Cyclopiazonsäure
CRF	Corticotropin releasing factor
C_T	Cycle threshold
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Dextran sulfat sodium
ECL	Extracellular loop; Extrazelluläre Schleife

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	Elektrische Feldstimulation
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ENS	Enterisches Nervensystem
ERK	Extracellular signal-regulating kinase
FcεR	Fc epsilon Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G_t	Tissue conductance; Gewebeleitfähigkeit
H₁ / H₂	Histaminrezeptor 1 / 2
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
IBD	Inflammatory bowel disease
ICC	Interstitial cells of Cajal
IgE / IgG	Immunglobulin E / Immunglobulin G
IFN-α / IFN-γ	Interferon alpha / Interferon gamma
IL	Interleukin
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
I_{sc}	Short-circuit current; Kurzschlussstrom
JAM	Junctional adhesion molecules
LSD	Least Significant Difference
LT	Leukotrien
M₁ / M₃	Muskarinrezeptor 1 / 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

Abkürzungsverzeichnis

MEMα	Minimum Essential Medium alpha
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase
M-Zellen	M für microfold; spezialisierte Epithelzellen
NB-A	Neurobasal A (Medium)
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGF	Nerve growth factor
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ exchanger 3
NKCC1	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -Cotransporter Typ 1
nmMLCK	Nicht-muskuläre Myosinleichtkettenkinase
OVA	Ovalbumin
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatpuffersalz
PBS-T	Phosphatpuffersalzlösung mit Triton-X
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PKA / PKC	Proteinkinase A / C
PLA / PLC	Phospholipase A / C
Ppia	Peptidylprolyl Isomerase A (Cyclophilin A)
PSB	Protein Solving Buffer
PSB-TCEP	Protein Solving Buffer mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RBL-2H3	Rat basophilic leukemia cells, Mastzelläquivalente Zelllinie
rMcpt	Rat mast cell protease
ROI	Region of interest

Abkürzungsverzeichnis

Rplp2	Ribosomal protein, large, P2
R_t	Gewebewiderstand
SCF	Stem cell factor
SDS	Sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
S-Neurone	S für synaptic
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMPs	Tight junction-associated Marvel proteins
TBS	Tris buffered saline; Tris-gepufferte NaCl-Lösung
TBS-T	Tris-gepufferte NaCl-Lösung mit Tween-20
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor alpha Rezeptor
Tpsab1	Tryptase alpha/beta 1 (= rMcpt-7)
Tpsb2	Tryptase beta 2 (= rMcpt-6)
Treg	Regulatorische T-Zelle (Suppressor-T-Zelle)
v/v	Volumen/Volumen
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VPACR	VIP-Rezeptor
w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens Protein

2. Einleitung

2.1 Das enterische Nervensystem

Das enterische Nervensystem (ENS) zählt – neben Sympathikus und Parasympathikus – zum vegetativen Nervensystem, arbeitet autonom und wird durch das zentrale Nervensystem (ZNS) lediglich beeinflusst. Es koordiniert gastrointestinale Funktionen wie den Nährstofftransport, die Motilität sowie den Blutfluss und steuert neben enteroendokrinen auch intestinale Immun- und Entzündungszellen (Goyal und Hirano 1996). Fast alle Neurone des ENS liegen gebündelt in Ganglien vor, welche in zwei Hauptgruppen angeordnet sind: der Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) zwischen der Ring- und Längsmuskelschicht der Tunica muscularis zur Steuerung der Motilität, sowie der Plexus submucosus (Meissner-Plexus) eingebettet in der Submukosa, welcher mit seinen Axonen die Mukosa und Blutgefäße innerviert und somit für die Steuerung der Epithelfunktion verantwortlich ist (Furness 2006). Die Ganglien eines jeden Plexus sind über ein Nervengeflecht untereinander vernetzt und durchziehen so den gesamten Darmtrakt (Abb. 1).

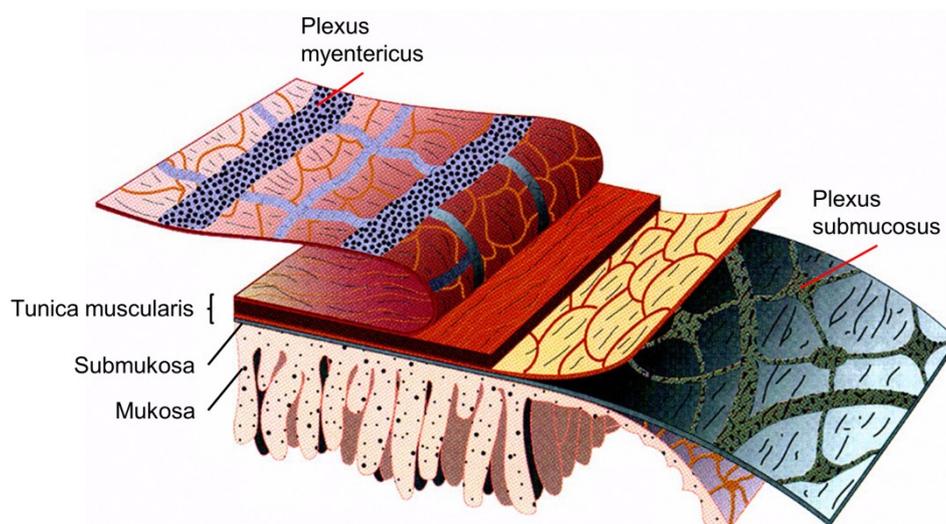


Abb. 1. Schematische Darstellung der einzelnen Schichten der Darmwand (modifiziert nach Furness 2006).

Morphologisch wurden die Neurone bereits 1899 von dem Anatom Dogiel in verschiedene Typen klassifiziert, welche sich hauptsächlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge und Verzweigung der Dendriten unterscheiden (Furness 2006). Obwohl mehrere verschiedene Neuronentypen im Darm bekannt sind, werden die meisten Neurone in Typ I und II unterteilt. Elektrophysiologisch werden S- und AH-Neurone unterschieden, wobei letztere durch ein Aktionspotential mit langer Nachhyperpolarisation gekennzeichnet sind (AH für after hyperpolarization) und morphologisch die Typ-II-Struktur aufweisen. Zu diesen zählen sensorische sowie sekretomotorische Neurone. S-Neurone (S für synaptic) sind Dogiel-Typ-I-Neurone und zeichnen sich durch schnelle synaptische Potentiale aus; diesen Typ findet man bei motorischen Neuronen (Goyal und Hirano 1996; Furness 2006). Funktionell werden enterische Nervenzellen in sensorische (oder primär afferente) Neurone, Interneurone und Motoneurone unterteilt (Furness 2000). Diese bilden eigenständige Regelkreise, wodurch vielfältige Funktionen in Abhängigkeit von den Neuronentypen und den freigesetzten Neurotransmittern gesteuert werden (Wood 2004). So werden sensorische Neurone durch chemische oder mechanische Stimuli, wie z. B. die Freisetzung von Serotonin aus enteroendokrinen Zellen oder eine Dehnung der Darmwand, aktiviert. Die Informationen werden synaptisch an den Interneuronen verschaltet und an Motoneurone weitergeleitet, welche dann zu den jeweiligen Effektoren ziehen (Cooke 1994; Furness 2006). Je nach Funktion werden Motoneurone in sekretomotorische, vasomotorische und motomotorische Neurone unterteilt. Letztere innervieren die glatte Muskulatur der Darmwand und wirken exzitatorisch durch den cholinergen Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) und Tachykinine (Substanz P, Neurokinine) sowie inhibitorisch über die Freisetzung von NO, VIP (Vasoaktives intestinales Peptid) und ATP (Adenosintriphosphat) (Goyal und Hirano 1996; Costa et al. 2000). Die Sekretion und die Blutversorgung des Darmepithels werden von sekretomotorischen bzw. vasomotorischen Neuronen gesteuert, welche auf einen Stimulus hin die Neurotransmitter ACh und VIP freisetzen. Beide Neurotransmitter führen daraufhin über eine Aktivierung cholinerg (ACh-) bzw. VIP-Rezeptoren (VPACR) zu einer Vasodilatation sowie Sekretion von

Ionen (v. a. Chlorid und Natrium) und Wasser in das Darmlumen (Javed et al. 1992; Furness 2006; Schneider et al. 2019) (s. auch Abb. 2, S. 11).

Das enterische Nervensystem leitet zudem über afferente Nervenfasern Informationen an das zentrale Nervensystem sowie zum Sympathikus und Parasympathikus, wird aber auch durch diese beeinflusst (Abb. 4, S. 18). So werden die enterischen Neurone zur Steuerung der Darmfunktionen durch sympathische (adrenerge) und parasympathische (cholinerge) Efferenzen innerviert (Yoo und Mazmanian 2017; Schneider et al. 2019). Das Katecholamin Noradrenalin ist dabei der Haupttransmitter des Sympathikus an den Effektororganen und wirkt über adrenerge Rezeptoren inhibitorisch auf die verschiedenen Darmfunktionen. Der Parasympathikus, welcher über den Nervus vagus den oberen und über sakrale Nervenendigungen den unteren Gastrointestinaltrakt innerviert, bedient sich ACh als Transmitter und fördert über die Aktivierung nikotinerger sowie muskarinerger Rezeptoren intestinal Vorgänge wie Sekretion, Motilität und den Blutfluss (Goyal und Hirano 1996; Shea-Donohue und Urban, 2016).

So koordiniert das enterische Nervensystem zahlreiche Darmfunktionen, indem es sowohl mit Immunzellen als auch mit Epithelzellen des Darms interagiert und deren Funktion steuert. Zudem stellt es einen zentralen Punkt in der Interaktion mit dem Sympathikus und Parasympathikus sowie dem zentralen Nervensystem dar.

2.2 Aufbau und Funktion des Darmepithels

Der Darm stellt das Organ dar, welches zum einen die Nährstoffversorgung des Organismus sichert, aber auch eine effektive Schutzbarriere gegen die Außenwelt bilden muss. Die Mukosa mit ihrer Muzinschicht und dem Mikrobiom bildet dabei die äußere Grenzschicht und besteht aus dem Darmepithel und der Lamina propria, in welcher zahlreiche Immunzellen zu finden sind. Das Darmepithel setzt sich aus

verschiedenen Zelltypen zusammen, welche unterschiedliche Funktionen erfüllen: die Enterozyten sind für Absorptions- und Sekretionsvorgänge zuständig, Becherzellen bilden die Muzinschicht und enteroendokrine Zellen produzieren und sezernieren neuroendokrine Substanzen wie z. B. Serotonin. Zuletzt nehmen Paneth-Zellen, welche antimikrobielle Substanzen sezernieren, sowie M-Zellen eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr ein (Kunzelmann und Mall 2002; Yoo und Mazmanian 2017). In die Submukosa ist das darmeigene Immunsystem (das sogenannte GALT = Gut Associated Lymphoid Tissue) eingebettet und stellt die vorrangige Abwehrfunktion gegenüber unerwünschten Antigenen dar (Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

Anatomisch unterteilt man den Darm in den Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum) sowie den Dickdarm (Zäkum, Kolon, Rektum). Das permeablere Darmepithel des Dünndarms weist histologisch sowohl Zotten als auch Krypten auf, die zur Oberflächenvergrößerung dienen und einen hohen Nährstofftransport ermöglichen. Im Dickdarm hingegen findet man nur Krypten und die Permeabilität des Epithels ist aufgrund der dichteren parazellulären Schranke deutlich geringer. Die Durchlässigkeit der Epithelbarriere wird hauptsächlich durch die Tight Junction Proteine bestimmt, welche in Claudine und TAMPs (tight junction-associated Marvel proteins) unterteilt werden, wobei letztere JAMs (junctional adhesion molecules), Occludin, Tricellulin und MarvelD3-Proteine umfassen (Lu et al. 2013). Claudine spielen bei der Aufrechterhaltung der Epithelbarriere die wichtigste Rolle und tragen zur Polarität der Epithelzellen bei (Barmeyer et al. 2017). Sie sind integrale Membranproteine mit vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen sowie intrazellulär gelegenen N- und C-Enden, wobei letzteres mit dem Zytoskelett verbunden ist (Groschwitz und Hogan 2009) (Abb. 41, S. 121). Spezies- und segmentabhängig findet man eine unterschiedliche Anzahl an Claudinen, die funktionell in abdichtende, porenbildende oder ambige Claudine unterteilt werden. Claudin-2 und -15 bilden Poren, welche selektiv für Kationen sind; Claudin-17 hingegen ist selektiv für Anionen (Amasheh et al. 2002; Günzel und Yu 2013). Eine abdichtende Funktion ist für die meisten Claudine beschrieben, wobei vor allem Claudin-1, -3, -4, -5 und -8 im Kolon der Ratte

stärker exprimiert werden (Markov et al. 2010). Bei der Ratte sind insgesamt Claudin-1 bis -19 bekannt, welche segmentabhängig und entlang der Villus-Krypten-Achse in unterschiedlichem Ausmaß vorkommen (Markov et al. 2010; Günzel und Yu 2013). Das Expressionsmuster der Claudine reguliert somit die Durchlässigkeit der parazellulären Darmbarriere und kann unter entzündlichen Bedingungen verändert sein (Markov et al. 2010; Garcia-Hernandez et al. 2017) oder durch Immunmediatoren sowie Zytokine beeinflusst werden (Keita und Söderholm 2010; Fernández-Blanco et al. 2015).

Für den Elektrolyttransport spielen nicht nur parazelluläre Wege eine wichtige Rolle (besonders im Dünndarm), sondern auch transzelluläre Prozesse, welche über verschiedene Membranproteine und Kanäle vermittelt werden. Verschiedene Resorptions- und Sekretionsvorgänge werden durch das Zusammenspiel zwischen Enterozyten und dem ENS gesteuert und dienen als Grundlage für die Nährstoff- und Elektrolytversorgung des Körpers. Dabei folgt Wasser aus osmotischen Gründen der jeweiligen Sekretion oder Resorption von Ionen (v. a. Na^+ und Cl^-). Resorptionsvorgänge werden am Darmepithel elektrogen durch die Aufnahme von Na^+ über epitheliale Natriumkanäle (ENaC = epithelial sodium channel) oder elektroneutral über verschiedene Na^+/H^+ -Austauscher (v. a. NHE3) sowie $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (DRA = downregulated in adenoma) getragen (Kunzelmann und Mall 2002; Martínez-Augustin et al. 2009). Unter physiologischen Bedingungen laufen Resorptions- und Sekretionsvorgänge parallel ab, wobei die Nettoresorption am Darm überwiegt. Die Sekretionsvorgänge zeigen sich hingegen erst nach Stimulation mit verschiedenen Sekretagoga, wie z. B. Immun- oder Entzündungsmediatoren (Kunzelmann und Mall 2002).

Die Sekretion im Darm wird hauptsächlich durch den Transport von Chlorid (Cl^-) und zu geringeren Teilen von Bicarbonat (HCO_3^-) in das Darmlumen bestimmt, wodurch eine Befeuchtung der Mukosa gewährleistet wird. Zunächst wird Cl^- sekundär aktiv über einen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC1) an der basolateralen Seite in die Enterozyten aufgenommen, wodurch es im Zytoplasma akkumuliert. Dabei

baut die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase den elektrochemischen Gradienten für den sekundär aktiven Transport auf (Abb. 2). Abhängig von dem darauffolgenden Stimulus kommt es zu einem Anstieg der Konzentration verschiedener Second messenger (v. a. Ca^{2+} und cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)), welche die Cl^- -Sekretion induzieren.

Physiologischerweise bilden prosekretorische Neurotransmitter, wie Acetylcholin (ACh) und Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), den primären Stimulus für die aktive Chloridsekretion nach deren Freisetzung aus sekretomotorischen Neuronen. Dabei führt ACh am Darm zu einer Aktivierung muskarinergere M_1 - und M_3 -Rezeptoren (und zu einem geringeren Anteil auch nikotinerger Rezeptoren) auf der basolateralen Seite der Enterozyten (O'Malley et al. 1995; Lindqvist et al. 1998). Die Stimulation der G-Protein-gekoppelten Muskarinrezeptoren führt zu einer Aktivierung von Phospholipase C (PLC), wodurch Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) intrazellulär ansteigen (Hirota und McKay 2006). Rezeptor-vermittelt induziert IP_3 dann eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum; DAG hingegen aktiviert bestimmte Typen der Proteinkinase C (PKC) (Caulfield 1993). Dies führt zu einem Öffnen basolateraler K^+ -Kanäle und demzufolge zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Zudem werden an der apikalen Seite Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle geöffnet, sodass Cl^- – angetrieben durch den elektrochemischen Gradienten – ausströmen kann (Abb. 2) (Böhme et al. 1991; Barrett und Keely 2000). Experimentell kann dieser Stimulus über stabile Acetylcholin-derivate, wie z. B. Carbachol, induziert werden (O'Malley et al. 1995; Frings et al. 1999; Hirota und McKay 2006).

Einleitung

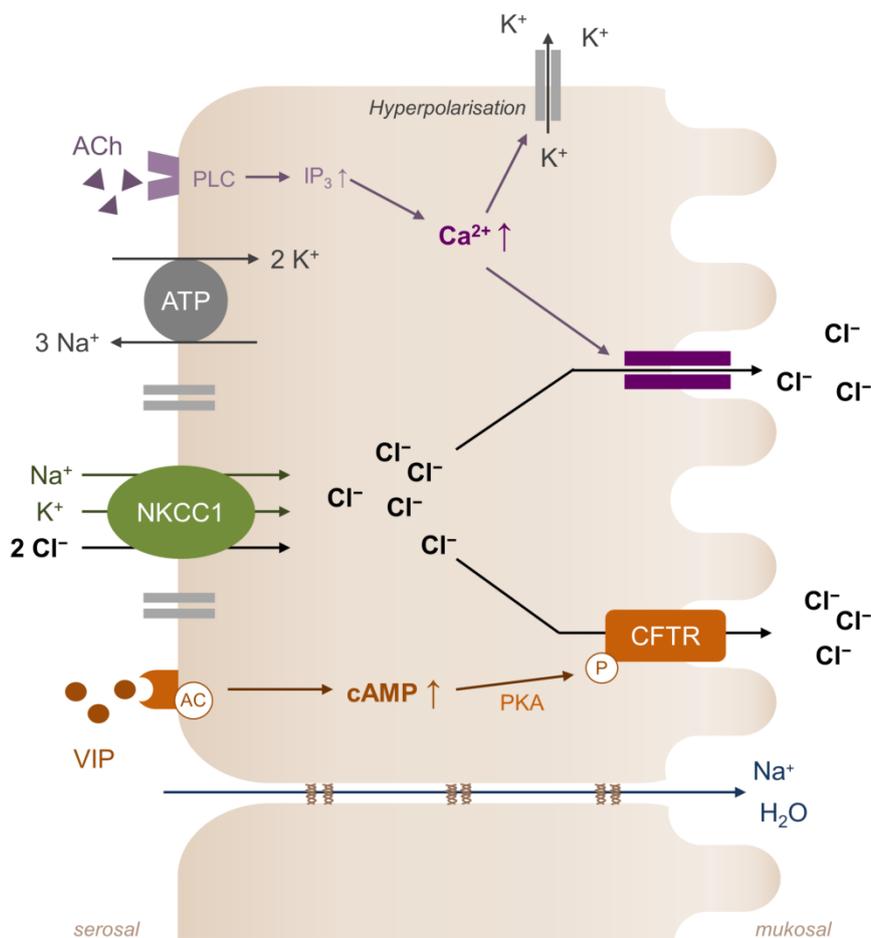


Abb. 2. Vereinfachte Darstellung der aktiven Chloridsekretion am Darm. Chlorid wird sekundär aktiv über den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC1) in die Zelle aufgenommen. Über prosekretorische Neurotransmitter – wie z. B. Acetylcholin (ACh) oder Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) – kommt es Rezeptor-vermittelt zu einem Anstieg von Ca^{2+} bzw. cAMP (produziert von der Adenylatzyklase; AC) im Zytosol. Dadurch werden zum einen apikale Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle und basolaterale K^+ -Kanäle geöffnet, sodass Cl^- entlang des elektrochemischen Gradienten ausströmen kann. Zum anderen werden CFTR-Kanäle über einen cAMP-Anstieg phosphoryliert und es kommt zu einem Cl^- -Ausstrom, gefolgt von einem parazellulären Fluss von Na^+ und Wasser in das Darmlumen.

Ein weiterer prosekretorischer Neurotransmitter im Darm ist VIP, welches G-Protein-gekoppelte VIP-Rezeptoren (VPACR) an der basolateralen Seite der Enterozyten stimuliert (Abb. 2). Diese sind an eine Adenylatzyklase gekoppelt, deren Aktivierung zu einem cAMP-Anstieg im Zytosol führt (Barrett und Keely 2000). Der Second messenger cAMP phosphoryliert daraufhin über eine Stimulation der

Proteinkinase A (PKA) die apikalen CFTR-Kanäle (CFTR = Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), wodurch es zu einem weiteren Cl^- -Ausstrom kommt (Greger 2000). Experimentell lässt sich diese Signalkaskade über Stimulatoren der Adenylatzyklase, wie z. B. Forskolin, auslösen. Die Cl^- -Sekretion hat zur Folge, dass Kationen (v. a. Na^+) und Wasser aus elektroneutralen bzw. osmotischen Gründen parazellulär ins Darmlumen fließen (Barrett und Keely 2000).

Beide Wege gewährleisten physiologischerweise eine permanente Chlorid- und Wassersekretion und demzufolge eine Befeuchtung der Mukosa. Sie bilden jedoch auch wichtige Angriffspunkte für pathologische Veränderungen, da auch Immun- und Entzündungsmediatoren sowie verschiedene bakterielle oder virale Enterotoxine eine Hochregulation der beteiligten Second-messenger-Systeme induzieren können. Pathologisch manifestiert sich dies als sekretorische Diarrhö, was mit einem massiven Flüssigkeitsverlust einhergeht (Barrett und Keely 2000; Thiagarajah und Verkman 2013).

2.3 Intestinale Mastzellen: Morphologie, Funktion und ihre Rolle bei Überempfindlichkeitsreaktionen

Mastzellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab und sind überwiegend an Kontaktflächen zur Außenwelt lokalisiert, wie z. B. der Haut, den Luftwegen oder dem Gastrointestinaltrakt, und spielen so eine wichtige Rolle beim ersten Antigenkontakt (Galli et al. 2008). Als unreife Vorläuferzellen gelangen sie über die Blutbahn ins periphere Gewebe, wo sie sich je nach Mikroumgebung ausdifferenzieren. Dabei spielt bei der Mastzellentwicklung und deren Überleben der sogenannte Stem Cell Factor (SCF) eine entscheidende Rolle, welcher an den CD117/c-Kit-Rezeptor auf der Oberfläche von Mastzellen binden kann (da Silva et al. 2014). Auch andere Wachstumsfaktoren und verschiedene Zytokine führen dazu, dass Mastzellen eine sehr hohe Heterogenität aufweisen und je nach Umgebung eine

individuelle Mediatorenzusammensetzung aufweisen, sodass sie unterschiedlich mit anderen Zellen interagieren (Beil et al. 2000; Gallwitz et al. 2007).

In der Lamina propria der intestinalen Mukosa stellen Mastzellen ca. 2 - 3 % der in dieser Gewebeschicht lokalisierten Zellen dar. Dieser Anteil kann unter pathologischen Bedingungen, wie Nahrungsmittelallergien oder Darmentzündungen, um das Zehnfache ansteigen (Bischoff 2009). Im Darm der Ratte unterscheidet man in Bezug auf ihre Lokalisation zwei Typen von intestinalen Mastzellen: die mukosalen Mastzellen (MMC) und die Bindegewebsmastzellen (connective tissue mast cells; CTMC), wobei letztere in der Submukosa angesiedelt sind (da Silva et al. 2014). Mastzellen sind durch charakteristische zytoplasmatische Granula gekennzeichnet, in denen eine Vielfalt proinflammatorischer Mediatoren gespeichert oder de novo synthetisiert wird. Zu den in den Granula gespeicherten Mastzellmediatoren zählen unter anderem Histamin, Serotonin, Serinproteasen (Tryptase, Chymase, Thrombin, Trypsin) oder Zytokine wie der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α). Je nach Stimulus können einige Mediatoren aber auch bei Bedarf neu synthetisiert werden, wie z. B. Prostaglandine (PG), Leukotriene (LT), Plättchen-aktivierender Faktor oder diverse Chemokine und Zytokine (De Winter et al. 2012; Moon et al. 2014). Nach Aktivierung der Mastzellen werden diese Mediatoren durch Degranulation freigesetzt und agieren im parakrinen Umfeld mit anderen Zellen, wie z. B. submukösen Neuronen (Schemann und Camilleri 2013; Gaudenzio et al. 2016; Buhner et al. 2017). Dabei beeinflussen sie neben physiologischen Funktionen auch immunmodulatorische, pro- und anti-inflammatorische Prozesse (Galli et al. 2008; Bischoff 2009).

Eine wichtige Rolle spielen Mastzellen bei allergischen Reaktionen, bei denen es zu einer überschießenden Immunantwort gegen ein für den Körper eigentlich harmloses Antigen kommt. Bei Nahrungsmittelallergien existieren verschiedene Hypothesen zur Pathogenese, jedoch ist nach wie vor unklar, warum harmlose Nahrungsbestandteile von intestinalen Immunzellen als schädliche Antigene angesehen werden (für detailliertere Informationen zu Nahrungsmittelallergien s. Brandtzaeg 2010; Ćirković Veličković und Gavrović-Jankulović 2014).

Die klassische Aktivierung von Mastzellen (Abb. 3), wie bei Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktionen, findet durch die Kopplung von spezifischen Antigenen und Immunglobulin E (IgE) an den hoch affinen Fc-epsilon-Rezeptor (FcεR) statt, welcher an der Oberfläche von Mastzellen exprimiert wird (Bischoff 2007; Galli et al. 2011). So gelangen im Fall von Nahrungsmittelallergien intakte Proteine (z. B. durch Transzytose über die M-Zellen) in die Lamina propria und werden dort als Antigene erkannt, wodurch eine Immunreaktion ausgelöst wird. Nach erfolgreicher Antigen-Internalisierung, -Degradierung und -Präsentation durch spezielle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) werden die Antigenfragmente von naiven CD4⁺-T-Zellen erkannt, woraufhin diese sich in Th2-Zellen differenzieren. Diese sezernieren daraufhin Interleukin(IL)-4 und IL-13, wodurch es – im Fall von allergischen Reaktionen – in B-Zellen zu einer vermehrten Produktion und Freisetzung von IgE kommt (Abb. 3). Ein weiteres Aktivierungssignal für die IgE-Produktion besteht in der Interaktion des CD40-Liganden der Th2-Zellen mit CD40 auf B-Zellen (Ćirković Veličković und Gavrović-Jankulović 2014).

Die darauffolgende Aktivierung des FcεR auf Mastzellen durch den Antigen-IgE-Komplex setzt eine Signalkaskade in Gang, welche intrazellulär zu einer Ca²⁺-Mobilisierung führt. Dies geschieht hauptsächlich durch eine Aktivierung der PLC, was eine Produktion von IP₃ und DAG nach sich zieht. Durch Verschaltung weiterer Enzyme und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kommt es schließlich zu einer Degranulation bzw. Produktion der Mediatoren (Gilfillan und Tkaczyk 2006; da Silva et al. 2014). Die Mastzellaktivierung findet nicht nur auf dem klassischen IgE-vermittelten Weg statt, sondern kann auch über verschiedene Zytokine, Komplementfaktoren oder Neuropeptide initiiert werden (Moon et al. 2014; da Silva et al. 2014). Eine weitere wichtige Möglichkeit zur IgE-unabhängigen Mastzellaktivierung stellen die G-Protein-gekoppelten Mas-related-gene-Rezeptoren dar, welche sowohl auf Mastzellen als auch auf Neuronen speziesspezifisch und lokalisationsabhängig exprimiert werden und deren Subtypen unter entzündlichen Bedingungen im Darm der Maus hochreguliert sind (Avula et al. 2013).

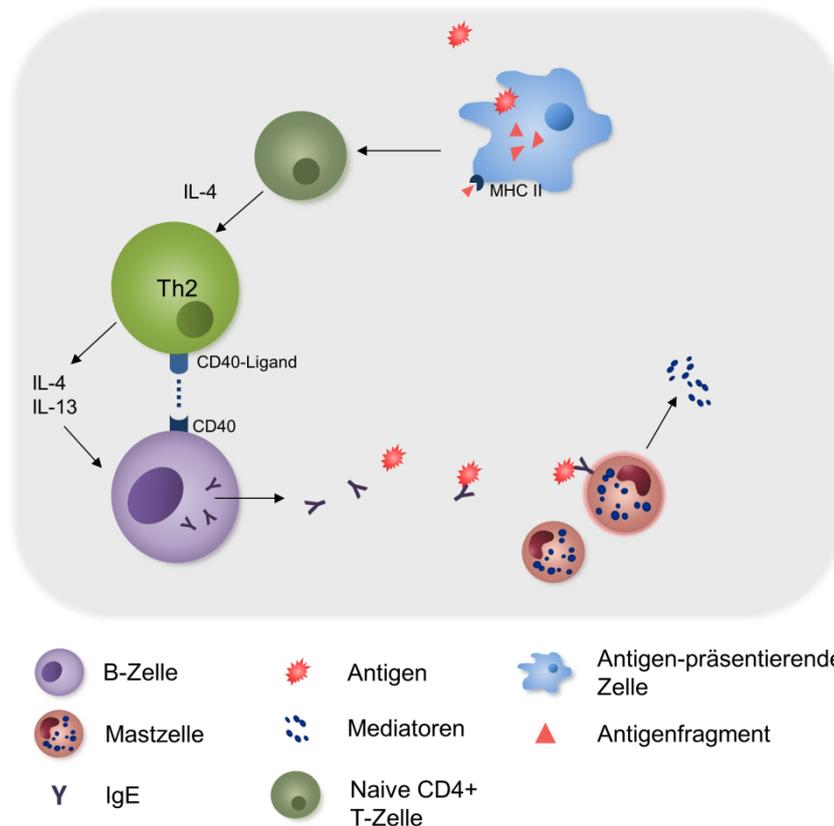


Abb. 3. Schematische Darstellung der Mastzellaktivierung bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ I. Nach Präsentation der Antigenfragmente durch den MHCII-Komplex (Major histocompatibility complex) der Antigen-präsentierenden Zellen differenzieren sich naive $CD4^+$ -Zellen in Th2-Zellen aus. Nach Zytokin-vermittelter Aktivierung produzieren B-Zellen spezifische Antikörper (hier: IgE), welche nach erneutem Kontakt die Antigene binden und über eine Aktivierung des FcεR auf Mastzellen deren Degranulation induzieren.

Aufgrund der vielfältigen Mediatoren, die diese Zellen sezernieren können, üben intestinale Mastzellen auch verschiedenste Funktionen aus. So beeinflussen sie am Darmepithel die Sekretion und Permeabilität, aber auch die Motilität, den Blutfluss sowie die Aktivierung weiterer Immun- und Entzündungszellen (Bischoff 2009). Histamin, einer der Hauptmediatoren von Mastzellen, wird bei Nahrungsmittelallergien im Darm freigesetzt und wirkt unter anderem prosekretorisch. Histaminrezeptoren sind G-Protein-gekoppelt und führen nach Aktivierung zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über den IP_3 -Weg. In den Enterozyten kommt es so nach Aktivierung von H_1 -Rezeptoren (und auch in geringerem Ausmaß

von H₂-Rezeptoren) zu einer gesteigerten Cl⁻-Sekretion gefolgt von einem Ausstrom von Na⁺ und Wasser (Schultheiss et al. 2006). Verstärkt wird dies durch eine Aktivierung membranständiger Histaminrezeptoren auf dem Plexus submucosus (Bell et al. 2015). Dies führt dann über eine Transmitterfreisetzung zu einer Aktivierung von z. B. Muskarinrezeptoren, welche auf der basolateralen Seite von Enterozyten lokalisiert sind (Abb. 2). Daraus resultiert eine sekretorische Diarrhö, welche durch eine gesteigerte Nettoanionensekretion hervorgerufen wird. Das Ziel der Mastzellvermittelten Verstärkung der Cl⁻-Sekretion ist die schnellstmögliche Entfernung der unerwünschten luminalen Antigene. Neben Histamin wirken auch Mediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene prosekretorisch auf das Darmepithel (Cooke 1994). Nicht nur die Sekretionsleistung des Epithels wird durch Mastzellmediatoren beeinflusst, sondern auch die Permeabilität (Abb. 5, S. 22). So modifizieren freigesetzte Mastzellproteasen und Zytokine (z. B. TNF α) die epitheliale Barriere und führen zu einem erhöhten parazellulären Fluss (Scudamore et al. 1995; Perrier und Corthésy 2011).

2.4 Mastzell-Neuron-Interaktionen

Die vielfältigen Wirkungen der Mastzellmediatoren im Darm schließen auch diverse Interaktionen mit anderen Zellen ein. So ist bekannt, dass eine enge Verbindung zum ENS und anderen Immun-/Entzündungszellen besteht. In Zellkulturmodellen konnte gezeigt werden, dass Mastzellen und Neurone über ihre Fortsätze miteinander in Kontakt treten sowie über die Transmitterfreisetzung miteinander kommunizieren (Nakanishi und Furuno 2008; Buhner und Schemann 2012).

Wie bereits am Beispiel der Histamin-induzierten Chloridsekretion am Darm erwähnt, führt eine Mastzellaktivierung und die damit verbundene Freisetzung der Mediatoren auch zu einer Erregung von enterischen Neuronen (Wood 2004). Neben Histamin führen auch verschiedene Proteasen, Serotonin, Prostaglandine und

Leukotriene zu einer neuronalen Stimulation (Abb. 4, S. 18) (van Nassauw et al. 2007; Buhner und Schemann 2012; Bell et al. 2015). Auf der Oberfläche enterischer Neurone wurden die Histaminrezeptoren H_1 - H_4 nachgewiesen, jedoch mit speziesspezifischen Unterschieden (van Nassauw et al. 2007; Bell et al. 2015). Dabei weisen H_1 - und H_2 -Rezeptoren exzitatorische Eigenschaften auf, wohingegen H_3 -Rezeptoren inhibitorisch wirken (Wood 2004). Über eine Aktivierung neuronaler 5-HT-Rezeptoren durch Serotonin, welches aus Mastzellen und enterochromaffinen Zellen im Darmepithel freigesetzt wird, kommt es ebenfalls zu einer neuronalen Stimulation (Wood 2004).

Weitere Mastzellmediatoren sind Proteasen, welche 25 % des Proteingehaltes in Mastzellen ausmachen und bei entzündlichen Vorgängen eine wichtige Rolle spielen (Beil et al. 2000; da Silva et al. 2014). Die Zusammensetzung der Proteasen variiert dabei stark je nach Spezies und Lokalisation: bei der Ratte findet man in den Bindegewebsmastzellen sowohl Trypsasen als auch Chymasen, in den mukosalen Mastzellen nur Chymasen, welche je nach Untereinheit unterschiedlich verteilt sind (Gallwitz et al. 2007). Insgesamt sind vier verschiedene Rezeptoren für Proteasen bekannt (PAR_1 - PAR_4), wobei PAR_2 dabei die vorrangige Rolle bei der Aktivierung enterischer Neurone durch Trypsasen spielt (van Nassauw et al. 2007). Für proinflammatorische Zytokine wie $TNF\alpha$, welches unter anderem von Mastzellen freigesetzt wird, tragen enterische Neurone ebenfalls Rezeptoren auf ihrer Oberfläche ($TNFR_1$ und $TNFR_2$). Neben den in der Granula gespeicherten Mediatoren, können auch die de novo synthetisierte Substanzen umliegende Zellen stimulieren. So steigern Prostaglandine und Leukotriene direkt die Sekretion am Darmepithel der Ratte und wirken zudem exzitatorisch auf enterische Neurone (v. a. PGD_2 , PGE_2 und LTD_4) (Cooke 1994; Buhner und Schemann 2012).

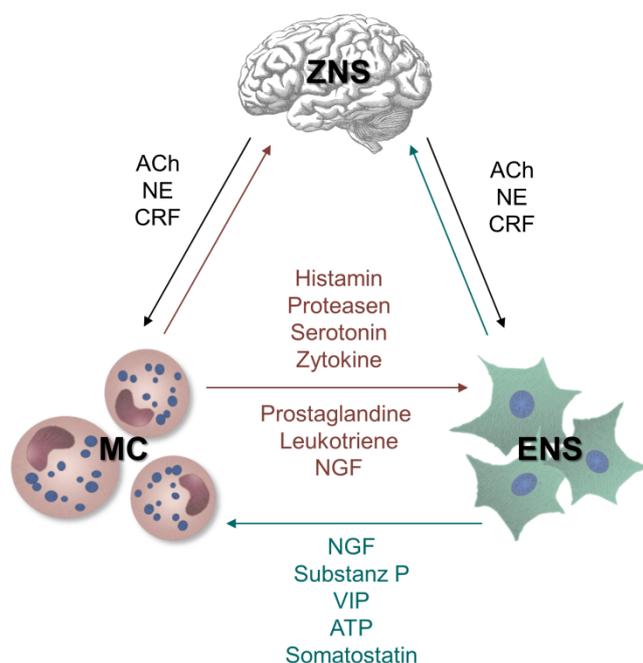


Abb. 4. Schematische Darstellung der Mastzell-Neuron-Interaktion über die Freisetzung verschiedener Mediatoren bzw. Neurotransmitter. ACh = Acetylcholin, ATP = Adenosintriphosphat, CRF = Corticotropin Releasing Factor, ENS = Enterisches Nervensystem, MC = Mastzellen, NE = Noradrenalin, NGF = Nerve growth factor, VIP = Vasoaktives intestinales Peptid, ZNS = Zentrales Nervensystem.

Da die Interaktion von Mastzellen und Neuronen auf bidirektionalem Wege abläuft (Abb. 4), sind auch verschiedene Neurotransmitter in der Lage eine Mastzelldegranulation hervorzurufen (Cooke 1994; van Nassauw et al. 2007). Ein Wachstumsfaktor, der Nerve growth factor (NGF), aktiviert NGF-Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen, wobei Mastzellen gleichermaßen als Quelle für NGF dienen können (Skaper 2001). Ein weiteres wichtiges Neuropeptid im Darm ist Substanz P. Dieses wird von Nervenendigungen freigesetzt und aktiviert Rezeptoren auf Mastzellen, wodurch vor allem Proteasen freigesetzt werden, welche wiederum an PAR₁ und PAR₂ auf submukösen Neuronen binden (Buhner und Schemann 2012). Substanz P löst dabei nicht nur eine Degranulation von Mastzellen aus, sondern kann diese auch sensibilisieren (van Nassauw et al. 2007). Das Peptid Corticotropin Releasing Factor (CRF), welches eine zentrale Rolle bei Stress-induzierten Vorgängen

einnimmt, konnte zusammen mit seinen Rezeptoren sowohl in enterischen Neuronen als auch in Mastzellen nachgewiesen werden (van Nassauw et al. 2007).

Nicht nur das enterische Nervensystem, sondern auch Sympathikus und Parasympathikus beeinflussen die Mastzellfunktion (Abb. 4). So konnte gezeigt werden, dass das Katecholamin Noradrenalin an β_2 -Rezeptoren auf pulmonalen Mastzellen bindet (Butchers et al. 1991). Zudem moduliert Noradrenalin epitheliale Sekretionsvorgänge im distalen Kolon der Ratte (Schultheiss und Diener 2000). Neben der sympathischen Wirkung auf Mastzellen führen cholinerge Agonisten, wie ACh, konzentrationsabhängig zu einer Freisetzung von Histamin über die Aktivierung muskarinerger Rezeptoren (Blandina et al. 1980). Zudem konnten nikotinerge ACh-Rezeptoren (α_7 , α_9 und α_{10}) auf der Oberfläche von Mastzellen nachgewiesen werden, deren Aktivierung sich inhibitorisch auf die Mastzelldegranulation auswirkt (Mishra et al. 2010; Yamamoto et al. 2014).

Dass Mastzellen und Neurone nicht nur untereinander kommunizieren, sondern auch die Sekretionsleistung des Epithels beeinflussen, konnte durch Studien mit sensibilisierten Tieren belegt werden: eine Hemmung erregbarer Zellen durch das Neurotoxin Tetrodotoxin führte zu einer reduzierten Anionensekretion nach Antigenkontakt im Kolon sensibilisierter Tiere (Wang et al. 1991; Javed et al. 1992). Jedoch liegen bisher kaum Informationen darüber vor, inwieweit die Mastzell-Neuron-vermittelten Epithelfunktionen durch Entzündungsmediatoren beeinflusst werden.

2.5 Problematik bei chronischen Darmentzündungen im Hinblick auf Mastzell-Neuron-Interaktionen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease, IBD) spielen sowohl beim Menschen als auch bei Hund und Katze eine wichtige Rolle (Jergens und Simpson 2012). Beim Menschen unterscheidet man die Krankheitsbilder

Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, welche sich durch eine dauerhafte Dysregulation der Darmfunktion und Veränderungen der Darmwand auszeichnen. Bei Morbus Crohn sind alle Schichten der Darmwand betroffen, jedoch ist dies auf das terminale Ileum und das Kolon begrenzt; wohingegen bei Colitis Ulcerosa meist nur die Mukosa verändert ist und die Entzündung ausgehend vom distalen Kolon und Rektum in weiter oral gelegene Segmente ausstrahlt (Yadav et al. 2016). Allein in Europa und den USA leiden mehr als 5 Millionen Menschen an IBD, Tendenz steigend. Symptomatisch zeigen die betroffenen Patienten Abdominalkrämpfe und -schmerzen, Gewichtsverlust und sekretorische bis blutige Diarrhö (Anbazhagan et al. 2018). Obwohl einige Therapieansätze vorhanden sind, konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine kausale Therapie entwickelt werden. Substanzen wie z. B. Kortison, Mastzellstabilisatoren oder neutralisierende TNF α -Antikörper werden als symptomatische Therapie eingesetzt, jedoch mit unerwünschten Nebenwirkungen oder einer relativ hohen Rückfallquote nach Absetzen der Medikamente (Yadav et al. 2016; Coskun et al. 2017).

Die exakte Ätiologie von IBD ist bis heute unklar; vermutet wird ein Zusammenspiel genetischer, immunologischer, mikrobieller und umweltbedingter Einflüsse, die zu einer chronischen Darmentzündung führen (Zhang und Li 2014; Yadav et al. 2016). Ein 20 - 40 % höheres Risiko an IBD zu erkranken, wurde bei Patienten festgestellt, welche eine homozygote Mutation im CARD15/NOD2-Gen tragen. NOD2 wird unter anderem in Antigen-präsentierenden Zellen sowie Epithelzellen im Darm exprimiert und führt zu einer Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade, welche eine zentrale Rolle in Entzündungsreaktionen einnimmt (Strober et al. 2007). Andere Studien konnten zeigen, dass Zigarettenrauchen interessanterweise eine protektive Rolle bei der Entwicklung und dem Verlauf von Colitis Ulcerosa einnimmt, jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf von Morbus Crohn hat (Berkowitz et al. 2018). Zudem existieren kontroverse Aussagen darüber, ob das Mikrobiom auch als Auslöser für IBD infrage kommt oder ob dies sekundär durch die Entzündung beeinflusst wird. Die Hauptproblematik bei IBD liegt jedoch in einer inadäquaten Immunreaktion mit einem Ungleichgewicht in der Th1-/Th2-Anwort sowie in einem veränderten Th17/Treg-

Verhältnis, wodurch der Verlauf und die Aufrechterhaltung der intestinalen Entzündung maßgeblich beeinflusst wird (Strober et al. 2007; Neurath 2014; Silva et al. 2016). Dabei zeigt sich bei Morbus Crohn eine Th1-gewichtete Immunantwort, an der Zytokine wie TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, Interferon(IFN)- α , IFN- γ und andere beteiligt sind. Bei Colitis Ulcerosa hingegen werden vermehrt Zytokine der Th2-Immunantwort, wie IL-4, IL-5, IL-13 und TGF(Transforming growth factor)- β , gebildet (Silva et al. 2016; Li und Shi 2018).

Allgemein wird angenommen, dass eine gestörte Epithelbarriere der erste Schritt in der Pathogenese dieser Erkrankungen ist (Abb. 5). Daraufhin gelangen Antigene in die Submukosa, wo sie eine Immunreaktion auslösen, gefolgt von einer intestinalen Entzündung. Die Folge ist eine Verschlimmerung der Erkrankung durch eine weitere Schädigung der Epithelbarriere und einem damit verbundenen höheren Antigengehalt in der Submukosa (Abb. 6) (Rijnierse et al. 2007; Capaldo et al. 2017). Einen wichtigen Schlüsselfaktor bei diesen Vorgängen spielen intestinale Mastzellen, da diese eine Vielfalt proinflammatorischer Mediatoren besitzen und durch den Antigenkontakt aktiviert werden (s. auch Kapitel 2.3 und Abb. 3). So konnte bei einigen humanen IBD-Patienten nicht nur eine erhöhte Mastzellanzahl im Darm festgestellt werden, sondern auch eine veränderte Mediatorenzusammensetzung, wie z. B. erhöhte Level an TNF α , Substanz P, Histamin oder Tryptase (Stoyanova und Gulubova 2002; Rijnierse et al. 2007; De Winter et al. 2012). Zudem tragen intestinale Mastzellen Histamin- und Protease-Rezeptoren, sodass es aufgrund eines positiven Feedbacks zu einer langanhaltenden Mastzellwirkung kommen kann (He 2004). Diese Hypothese kann auch dadurch bekräftigt werden, dass es in einem Kolitismodell bei der Ratte nach Behandlung mit sogenannten Mastzellstabilisatoren (z. B. Ketotifen) zu einem Abschwächen der Symptome kam (Eliakim et al. 1992).

Nicht nur die Mastzellaktivität/-funktion, sondern auch deren Interaktion mit dem enterischen Nervensystem kann unter Entzündungsbedingungen verändert sein. So konnte gezeigt werden, dass es bei Menschen, die an IBD leiden, zu einem Annähern von Mastzellen an enterische Neurone kommt im Vergleich zu Gewebeproben von

Patienten mit nicht-entzündlichen Darmerkrankungen (Dvorak et al. 1992). Enterische Neurone selbst zeigen ein sehr heterogenes Bild unter Entzündungsbedingungen. Neben einer Hyperplasie oder Atrophie, einer Nekrose der Axone sowie einer unveränderten oder reduzierten Anzahl an enterischen Neuronen wurden Änderungen im Gehalt an Neurotransmittern berichtet: so weisen enterische Neurone bei IBD-Patienten sowohl erhöhte als auch erniedrigte VIP-Level auf (Lakhan und Kirchgessner 2010; Gougeon et al. 2013). Ebenfalls konnten spezie- und zeitabhängig zur induzierten Entzündung entweder erhöhte oder erniedrigte Substanz-P-Level festgestellt werden (Sharkey und Kroese 2001; Bernardazzi et al. 2016).

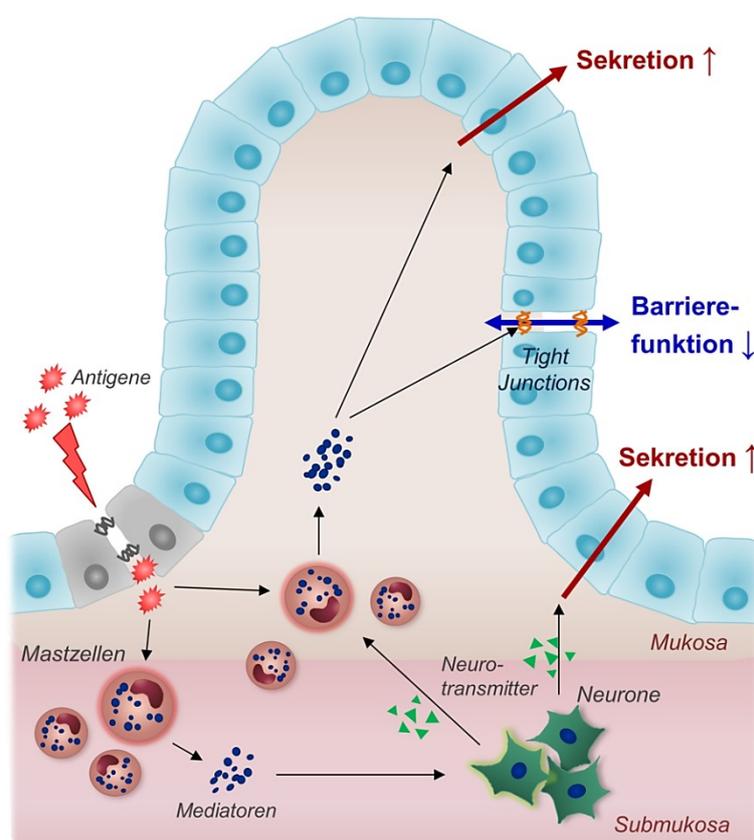


Abb. 5. Vereinfachte Darstellung der Mastzell-Neuron-Interaktionen am Darmepithel. Durch eine defekte Epithelbarriere kommt es zu einem erhöhten Antigenkontakt in der Submukosa gefolgt von einer Degranulation intestinaler Mastzellen. Die freigesetzten Mediatoren wirken zum einen prosekretorisch auf das Darmepithel und erhöhen die Durchlässigkeit der Epithelbarriere, zum anderen werden auch submuköse Neurone stimuliert. Deren Neurotransmitter wirken ebenfalls prosekretorisch und aktivieren weitere Mastzellen.

Wie bereits erwähnt, interagieren intestinale Mastzellen und enterische Neurone eng miteinander und beeinflussen so die Sekretion und Resorption, aber auch die Permeabilität des Darmepithels. Nach Stimulation der Mastzellen durch Antigenkontakt kommt es so zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (z. B. Histamin oder Proteasen). Diese führen zu einer Sekretions- und Permeabilitätssteigerung; entweder direkt über die Enterozyten oder indirekt über eine Aktivierung sekretomotorischer Neurone (Abb. 5). Hinzu kommt, dass dadurch weitere Immun- und Entzündungszellen aktiviert werden und die freigesetzten Zytokine mit einer Verschlimmerung der Symptomatik einhergehen. So wurden sowohl bei humanen IBD-Patienten als auch in verschiedenen Kolitismodellen erhöhte Level an Zytokinen im betroffenen Gewebe sowie im Blut festgestellt (Neurath 2014; Singh et al. 2016). Zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen im Darm zählen $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und $\text{IFN-}\gamma$. $\text{TNF}\alpha$ ist ein weit verbreitetes Zytokin und aktiviert diverse Zellen über zwei verschiedene Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2), welche auf fast allen Zelloberflächen zu finden sind. Dabei kann $\text{TNF}\alpha$ zum einen das Überleben der Zellen sicherstellen (über den $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Weg), zum anderen aber auch deren Apoptose induzieren (Gupta 2002; Aggarwal 2003). Am Darmepithel des Menschen konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration zu einer gesteigerten Sekretion und Permeabilität führt (Schmitz et al. 1996; Schmitz et al. 1999). Synergistische Effekte von Zytokinen auf die Epithelfunktion sind ebenfalls beschrieben: so kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung durch die gemeinsame Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ über einer Verminderung der Expression von Occludinen oder auch zu einer Induktion epithelialer TNFR2 durch $\text{IFN-}\gamma$ (McKay und Baird 1999; Onyiah und Colgan 2016). Zudem stimulieren $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ das Wachstum der Neurite myenterischer Neurone aus dem Darm des Meerschweinchens ohne jedoch die Neuronenanzahl zu beeinflussen (Gougeon et al. 2013).

Das komplexe Zusammenspiel des Immun- und Nervensystems sowie dem Darmepithel unter Entzündungsbedingungen ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Insbesondere ist unklar, ob Mastzellen nur eine Art „Bystander“ im Krankheitsgeschehen darstellen oder ob eine gesteigerte Mastzellendichte und/oder

-aktivität in der Darmwand durch vermehrte Freisetzung von Mastzellmediatoren zu einer Störung der Epithelbarriere beiträgt (Abb. 6). Über die Dichte intestinaler Mastzellen bei IBD liegen kontroverse Aussagen vor: so konnte in verschiedenen Studien sowohl eine erhöhte als auch eine unveränderte oder sogar verminderte Anzahl von Mastzellen im Gewebe von IBD-Patienten gefunden werden (Bischoff et al. 1996; Andoh et al. 2006; Rijniere et al. 2007). Ähnliches wurde in einem Tiermodell festgestellt, wo es nach Kolitis-Induktion mit TNBS (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) zu einer biphasischen Änderung der Mastzellendichte (initialer Abfall in der ersten Woche gefolgt von einem Anstieg mit einem Maximum nach 60 Tagen) kam (Menozzi et al. 2006). Aufgrund dieser Diskrepanzen in der Literatur habe ich in meiner Arbeit einen „reversen“ Versuchsansatz gewählt: wenn nach Induktion einer Kolitis die Mastzellendichte oder deren Aktivität steigt, so müssten demnach in einem Allergiemodell die Antworten auf eine Antigenexposition verstärkt sein.

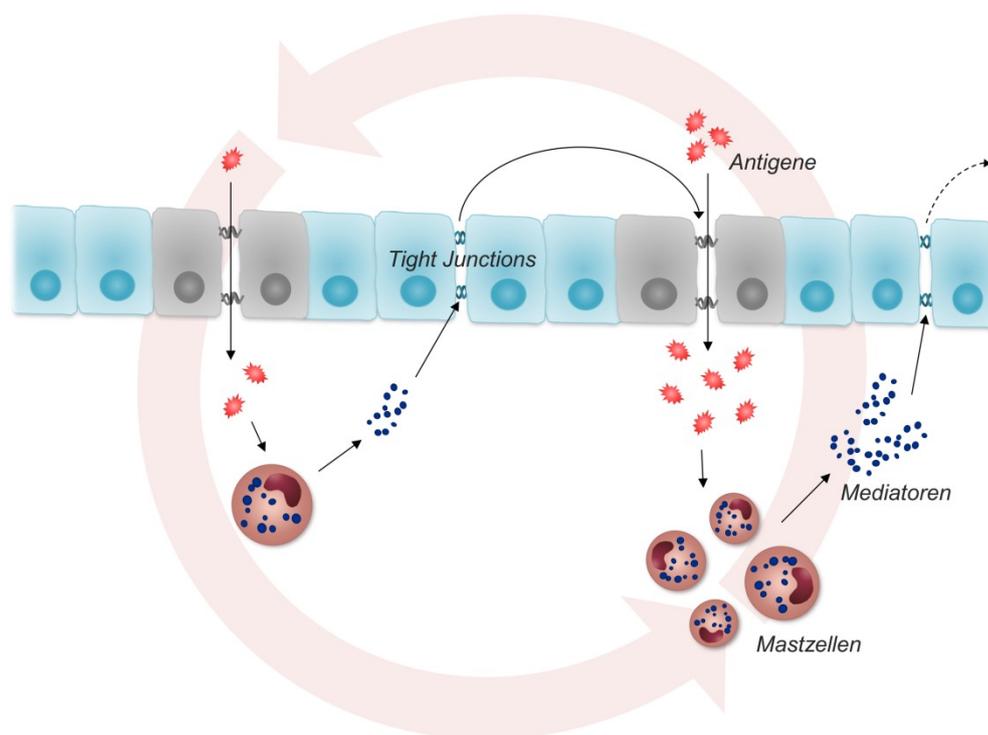


Abb. 6. Schematische Darstellung des hypothetischen Circulus vitiosus zwischen Mastzellen und dem Darmepithel. Die Mastzellaktivierung nach Antigenkontakt führt zu einem Öffnen der Tight Junctions, wodurch es zu einem positiven Feedback kommt einhergehend mit einer erhöhten Mastzellanzahl und -aktivierung sowie einer geschwächten Epithelbarriere.

2.6 Fragestellung der Dissertation

Ziel dieser Dissertation war es die Interaktion von Mastzellen und Zielzellen, wie enterische Neurone und Epithelzellen, in der Darmwand unter Entzündungsbedingungen näher zu beleuchten. Dies sollte in vitro an Zellkulturen und ex vivo an Darmsegmenten von Versuchstieren untersucht werden, welche zusätzlich zu einer lokalen Kolitis-Induktion gegen ein bestimmtes Antigen sensibilisiert wurden. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- ❖ Welche Auswirkungen hat die lokale Induktion einer milden Kolitis auf die Sensibilisierungsantwort gegen ein spezifisches Antigen (hier: Ovalbumin)?
- ❖ Wie wird dadurch die Epithelfunktion im Hinblick auf Sekretion und Permeabilität beeinflusst?
- ❖ Inwieweit ändert sich durch die Sensibilisierung \pm Kolitis die Mastzellichte im Kolon und in weiter oral gelegenen, nicht von der Entzündung betroffenen Darmabschnitten (Jejunum)?
- ❖ Verändert eine Vorinkubation mit proinflammatorischen Zytokinen in vitro die Mastzell-Neuron-Interaktionen?
- ❖ Wie wirken proinflammatorische Zytokine auf die Epithelfunktionen und beeinflussen sie die Antwort verschiedener Sekretagoga?
- ❖ Können Neurotransmitter die Mastzellfunktion bzw. die Mastzell-vermittelte Sekretion am Darm verändern?

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für alle Experimente wurden sowohl männliche als auch weibliche Wistar-Ratten aus eigener Zucht des Instituts für Veterinär-Physiologie und -Biochemie verwendet. Die nach Geschlecht getrennten Tiere wurden in Kleingruppen unter standardisierten Bedingungen gehalten (22,5 °C Raumtemperatur, 50 - 55 % relative Luftfeuchtigkeit, 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus) mit Zugang zu Wasser und Futter ad libitum. Der Tierversuch zur Sensibilisierung und Kolitis wurde mit 6 - 8 Wochen alten Tieren durchgeführt. Für die Isolation submuköser Neurone wurden 4 - 6 Wochen alte Ratten verwendet; für alle weiteren Experimente wurde ein beliebiges Alter gewählt. Die Tiere wurden mittels Isofluran (Sensibilisierungsversuche) bzw. CO₂ (alle anderen Versuche zwecks Tötung und Organentnahme) anästhesiert, durch zervikale Dislokation getötet und anschließend entblutet. Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium genehmigt (GI 18/2 Nr. 3/2016). Tötung und Organentnahme waren durch die Tierschutzbeauftragten der Universität Gießen genehmigt (Aktenzeichen 577_M). Alle Experimente wurden unter Beachtung aller tierschutzrechtlichen Vorschriften durchgeführt.

3.2 Tiermodell zur Sensibilisierung und Kolitis-Induktion

Für das Tierexperiment wurden 6 - 8 Wochen alte Ratten zufällig in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt. In der ersten Gruppe wurden alle Tiere durch zweimalige subkutane Applikation (Tag -15 und Tag -1 vor der Euthanasie) einer Immunisierungslösung gegen Ovalbumin sensibilisiert (OVA-sensibilisiert; s. Abb. 7). Diese setzte sich aus 10 µg Ovalbumin (grade V) gelöst in 50 µl steriler 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung und 60 µl des Adjuvants Stimune® zusammen. Stimune® ist eine

ausgewählte Wasser-in-Öl-Emulsion (für die Zusammensetzung s. Bokhout et al. 1981), welche weniger Nebenwirkungen aufweist als Freund's Adjuvans (Leenaars et al. 1994) und eine Erhöhung der Sensibilisierungsrate von ca. 85 % (Hug et al. 1996; Amstutz und Diener 1997) auf 100 % bewirkt (Bell et al. 2015). Alle Tiere wurden erfolgreich gegen Ovalbumin sensibilisiert, was an einem Anstieg des Kurzschlussstroms (I_{sc}) nach Antigenkontakt ex vivo in Ussing-Kammer-Experimenten zu erkennen ist (s. 5.2).

Gruppe 1: OVA-Sensibilisierung



Gruppe 2: OVA+Kolitis

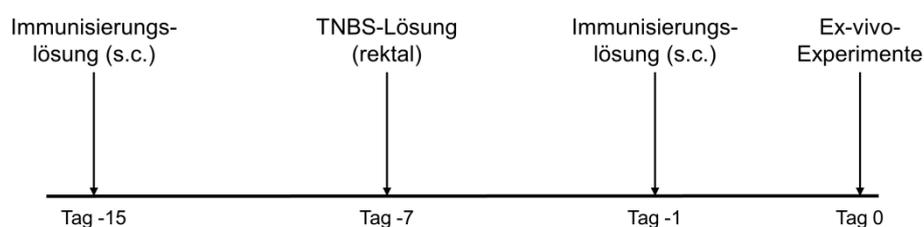


Abb. 7. Zeitlicher Verlauf des durchgeführten Tierversuchs. s.c. = subkutan.

In der zweiten Gruppe wurde zusätzlich zur Sensibilisierung an Tag 8 (Tag -7 vor Euthanasie) eine milde Kolitis unter Isoflurannarkose (2 %, v/v) induziert (OVA+Kolitis; s. Abb. 7). Dafür wurden 10 mg 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) in 250 µl Ethanol (50 %, v/v) gelöst und rektal mittels Katheter (Durchmesser 1 mm) im Abstand von 8 cm zum Anus in das Darmlumen appliziert. Während und unmittelbar nach diesem Vorgang wurden die Ratten leicht kopfüber gelagert, um ein Zurückfließen der TNBS-Lösung zu verhindern. Anschließend wurden die Tiere zurück in ihre Käfige verbracht, wo ihnen eine Wärmequelle zur Verfügung stand. Zusätzlich wurde allen Ratten beider Versuchsgruppen ab Tag 8 täglich Flupirtin (100

mg·l⁻¹) über das Trinkwasser verabreicht. Dabei handelt es sich um ein nicht-opioides, zentral wirksames Analgetikum, welches die Induktion einer Kolitis nicht beeinflusst (Steidle et al. 2013). Eine Woche nach Kolitis-Induktion entwickeln die Tiere eine leichte Kolitis, welche bereits detailliert von Steidle et al. (2013) beschrieben wurde (inkl. histologischer Index sowie Myeloperoxidase-Assay). Während des gesamten Experiments wurde eine tägliche Gesundheitskontrolle der Tiere durchgeführt, bei denen alle Ratten für die gesamte Dauer des Experiments ein ungestörtes Allgemeinbefinden aufwiesen; lediglich die Defäkationsfrequenz war geringfügig erhöht.

3.3 Lösungen

3.3.1 Lösungen für die Ussing-Kammer

3.3.1.1 Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung (Standard)

Als Standardlösung für die Ussing-Kammer-Versuche wurde hier Parsons-Puffer verwendet, der sich wie folgt zusammensetzt (mmol·l⁻¹): 107 NaCl, 4,5 KCl, 25 NaHCO₃, 1,8 Na₂HPO₄, 0,2 NaH₂PO₄, 1,25 CaCl₂, 1 MgSO₄ und 12,2 Glucose. Unter Carbogen-Begasung (5 % (v/v) CO₂, 95 % (v/v) O₂) wurde der pH mittels HCl (1 mol·l⁻¹) auf 7,4 eingestellt und der Puffer auf 37 °C temperiert.

3.3.2 Lösungen für das Ca²⁺-Imaging

3.3.2.1 Standard-Tyrodelösung

Für Ca²⁺-Imaging-Messungen wurde eine Standard-Tyrodelösung verwendet, bestehend aus (mmol·l⁻¹) 140 NaCl, 5,4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES und 12,2 Glucose. Mittels NaOH (1 mol·l⁻¹) wurde der pH auf 7,4 eingestellt.

3.3.2.2 Färbelösung mit Fura-2-AM und Pluronic Acid

1 mg des Farbstoffs Fura-2-Acetomethoxyester (AM; Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) wurde in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Für Ca^{2+} -Imaging-Messungen an isolierten Zellen wurde die benötigte Menge an Tyrode mit der Fura-2-AM-Lösung ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und Pluronic ($3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) versetzt. Pluronic (F-127, 20 % (w/v), gelöst in DMSO; Thermo Fisher Scientific) erleichtert die Löslichkeit des Fura-2-AM und somit die Aufnahme des Farbstoffes in die Zelle. Für die Imaging-Versuche der Stufenpräparate sowie für die Monokultur der RBL-2H3 wurde die Konzentration der Färbelösung erhöht, sodass $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Fura-2-AM und $6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Pluronic in dem benötigten Volumen Standardtyrode gelöst wurden. Aufgrund der hohen Gewebedicke sowie Zelldichte der Cokultur aus intakter Submukosa und RBL-2H3 mussten hier die Konzentrationen für Fura-2-AM auf $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ sowie für Pluronic auf $12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ erhöht werden.

3.3.3 Lösungen für die Zellkultur

3.3.3.1 Neurobasal-A-Medium zur Kultivierung submuköser Neurone

Neurobasal-A-Medium (NB-A; Thermo Fisher Scientific) wurde mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS; Life Technologies), 1 % (v/v) Glutamin ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin ($10.000 \text{ E} \cdot \text{ml}^{-1}$ bzw. $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) versetzt. Anschließend wurden die primär isolierten submukösen Neurone aus dem distalen Kolon der Ratte darin kultiviert.

3.3.3.2 MEM- α -Medium zur Kultivierung der Zelllinie RBL-2H3

Die Mastzell-äquivalente Zelllinie RBL-2H3 (rat basophilic leukemia cells) wurde in Minimum Essential Medium alpha ($\text{MEM}\alpha$; Thermo Fisher Scientific) kultiviert, dem 15 % (v/v) FKS, 1 % (v/v) Glutamin ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin ($10.000 \text{ E} \cdot \text{ml}^{-1}$ bzw. $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) zugesetzt wurden.

3.3.3.3 Einfriermedium für die Zelllinie RBL-2H3

MEM α wurde mit 10 % (v/v) sterilfiltriertem DMSO (Biozol, Eching, Deutschland) versetzt, um ein Einfrieren und Lagern der RBL-2H3 zu ermöglichen.

3.3.3.4 Enzymatische Digestionslösung

Um isolierte submuköse Neurone zu gewinnen, wurde das distale Kolon in enzymatischer Digestionslösung inkubiert. Diese bestand aus Ca²⁺- und Mg²⁺-freier Hank's balanced salt solution (HBSS), der Glucose ($7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), HEPES ($10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und Collagenase II ($1,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; $273 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; Biochrom, Berlin, Deutschland) zugesetzt wurden.

3.3.4 Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenz

3.3.4.1 Phosphatpuffer (PB)

Sowohl für die Fixation als auch für die Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten wurde Phosphatpuffer (PB) verwendet. Dafür wurden $8 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ und $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaHPO}_4$ in bidestilliertem Wasser gelöst und mit NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) oder HCl ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) auf einen pH von 7,4 eingestellt.

3.3.4.2 Phosphatpuffersalzlösung (PBS)

Als Grundlage für die Fixation sowie für die verwendeten Lösungen der indirekten Immunfluoreszenz von Zellen wurde eine $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PBS-Lösung hergestellt. Dafür wurde eine Tablette PBS in 200 ml Aqua bidest. unter ständigem Rühren gelöst. Die PBS-Lösung konnte bis zu 2 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.3.4.3 Fixationslösung

Das Gewebe bzw. die Zellen wurden in einer 4 % (w/v) Paraformaldehydlösung über Nacht fixiert. Dafür wurden 4 g Paraformaldehyd (PFA) in 100 ml PB (Gewebe) bzw. PBS (Zellen) gelöst, auf 55 °C erwärmt und anschließend filtriert, um eventuelle Partikel zu entfernen. Aufgrund der gesundheitsschädlichen Wirkung von PFA fanden

alle Arbeitsschritte, bei denen die Fixationslösung verwendet wurde, unter dem Abzug statt. Lichtgeschützt konnte die PFA-Lösung für mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

3.3.4.4 Einbettmedium

Die fixierten Gewebeproben wurden vor dem Einfrieren in einer gelatinehaltigen Lösung eingebettet. Dafür wurden 18 g Speisegelatine in 180 ml destilliertem Wasser gelöst, auf 37 °C erwärmt, gefiltert und in eine Petrischale gegossen. Die auf Plexiglashaltern fixierten Gewebeproben (s. Abb. 18) wurden in die noch flüssige Gelatinelösung gelegt und für 1 h bei 4 °C gelagert bis die Lösung sich verfestigt hatte.

3.3.4.5 Blockinglösung

Als Grundlage der Blockinglösung für die Gewebeschnitte diente PB, dem 0,1 % (v/v) Triton-X, 3 % (w/v) BSA (Bovines Serumalbumin) und 10 % (v/v) Eselserum zugesetzt wurden. Für die Zellen wurde eine Blockinglösung verwendet, welche sich aus PBS, 0,05 % (v/v) Triton-X und 10 % (v/v) Eselserum zusammensetzte.

3.3.4.6 Primärantikörperlösungen

Für die Gewebeschnitte wurden die jeweiligen Primärantikörper in einer Lösung aus PB, 0,1 % (v/v) Triton-X, 1 % (w/v) BSA, 0,5 % (w/v) Milchpulver und 1 % (v/v) Eselserum angesetzt. Für die Immunzytochemie wurde der Blockinglösung der entsprechende Primärantikörper zugesetzt (Primärantikörper s. Tabelle 1, S. 57).

3.3.4.7 Sekundärantikörperlösungen

Die entsprechenden Sekundärantikörper für die Gewebeschnitte wurden in einer Lösung angesetzt, bestehend aus PB, 0,1 % (v/v) Triton-X, 1 % (w/v) BSA und 0,5 % (w/v) Milchpulver. Für die Immunzytochemie wurde der Blockinglösung der entsprechende Sekundärantikörper zugesetzt (Sekundärantikörper s. Tabelle 1, S. 57).

3.3.4.8 DAPI-Lösungen für die Kernfärbung

Die $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ DAPI-Gebrauchslösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat) bestand aus PB, dem die DAPI-Stammlösung ($10,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) zugesetzt wurde. Zum Anfärben der Kerne nach Inkubation mit den Claudin-Antikörpern wurde ein gebrauchsfertiges Färbe- und Einbettmedium verwendet (RotiFluo mit DAPI; Roth, Karlsruhe, Deutschland).

3.3.5 Lösungen für den Western Blot

3.3.5.1 Puffer und sonstige Lösungen

Für den Trenngel- sowie Sammelgelpuffer wurde eine 0,4 % (w/v) SDS (Natriumlaurylsulfat = sodium dodecylsulfate)-Lösung, für den Laufpuffer eine 0,1 % (w/v) SDS-Lösung verwendet. Diese wurden aus einer 10 % (w/v) Stocklösung entsprechend verdünnt, welche aus 5 g SDS gelöst in 50 ml destilliertem Wasser bestand. Für den Trenngelpuffer wurde $1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris/HCl (pH 8,8) in 0,4 % (w/v) SDS gelöst. Der Sammelgelpuffer setzte sich aus $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris/HCl (pH 6,8), gelöst in 0,4 % (w/v) SDS, zusammen.

Der Laufpuffer, welcher zur Elektrophorese benötigt wurde, bestand aus $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris/HCl (pH 8,3), $0,192 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Glycin und 0,1 % (w/v) SDS-Lösung. Für den Transferpuffer diente der Laufpuffer, dem 20 % (v/v) Methanol zugesetzt wurden.

Zur Immunodetektion wurde ein TBS(Tris buffered saline)-Puffer verwendet, welcher sich aus $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris und $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl gelöst in destilliertem Wasser zusammensetzte (pH 7,6). Die verwendete TBS-T-Lösung bestand aus TBS-Puffer, welchem 0,1 % (v/v) Tween-20 zugesetzt wurde. Für die Blockinglösung wurden 10 % (w/v) Magermilchpulver (Biorad, Darmstadt, Deutschland) in TBS-T gelöst; für die Antikörperlösungen 5 % (w/v) Magermilchpulver (Biorad) in TBS-T.

3.3.5.2 Gele

Für beide Gele wurde zunächst eine 10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat(APS)-Lösung hergestellt, indem 1 g APS in 10 ml Aqua bidest. gelöst wurden. Diese Stocklösung wurde für den Ansatz des Trenngels verwendet, wohingegen für die Herstellung des Sammelgels die APS-Lösung mit Aqua bidest. auf 0,21 % (w/v) verdünnt wurde.

Zunächst wurde der Ansatz für ein 10%iges Trenngel hergestellt (Trennbereich 30 - 200 kDa), bestehend aus 4 ml Aqua bidest., 2 ml 40 % (w/v) Acrylamidlösung (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 2 ml Trenngelpuffer, 25 µl 10 % (w/v) APS sowie 5 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin; Applichem). Das 5%ige Sammelgel setzte sich aus 0,5 ml Aqua bidest., 0,5 ml 40 % (w/v) Acrylamid, 1 ml Sammelgelpuffer, 2 ml 0,21 % (w/v) APS sowie 5 µl TEMED zusammen. TEMED wurde als letzte Substanz hinzugefügt, da dadurch die Polymerisation einsetzte.

3.4 Substanzen

Folgende Substanzen wurden in wässrigen Stammlösungen gelöst: Carbachol, Compound 48/80 (Kondensationsprodukt aus p-Methoxy-N-Methylphenethylamin und Formaldehyd; Polymer aus 3 - 6 Monomeren; die Konzentrationsangaben im Text beziehen sich auf das Monomer), Fluorescein, Histamin, Nikotinhydrogentartrat, Noradrenalinbitartrat, Ovalbumin (grade V) und Pilocarpinhydrochlorid. Cyclopiazonsäure wurde in DMSO gelöst; Forskolin in 96 % (v/v) Ethanol. Substanz P wurde in einer herkömmlichen 0,1 % (w/v) BSA-Lösung gelöst, wohingegen die eingesetzten Zytokine in einer sterilen 0,1 % (w/v) BSA-Lösung gelöst wurden. Falls nicht anders angegeben, wurden die Substanzen von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

3.5 Beschichtung der Glasplättchen

Um die verwendeten Zellen bzw. Submukosastücke zu fixieren, wurden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 13 mm mit dem Gewebekleber Poly-L-Lysin (Molekulargewicht > 300.000 D; Biochrom, Berlin, Deutschland) beschichtet. Zur Fixation der 5 x 5 mm großen Submukosastücke wurden die Glasplättchen frisch mit einem Tropfen unverdünntem Poly-L-Lysin ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) versehen, welches möglichst großflächig darauf verteilt wurde und auf einer Heizplatte bei $38 \text{ }^\circ\text{C}$ verdampfen konnte. Zur Kultivierung von isolierten submukösen Neuronen sowie der Monokultur der RBL-2H3 für die Ca^{2+} -Imaging-Versuche wurden die Glasplättchen mit 70 % (v/v) Isopropanol gereinigt und anschließend mit sterilem Aqua bidest. gewaschen um mögliche Isopropanolreste zu entfernen. Anschließend wurde in einem 50-ml-Tube eine verdünnte Poly-L-Lysin-Lösung angesetzt, indem ein Teil Poly-L-Lysin mit vier Teilen sterilem Aqua bidest. gemischt wurde, um auf eine Endkonzentration von $0,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ zu gelangen. Nach ca. 15-minütigem Schütteln (200 rpm) der Glasplättchen in der Poly-L-Lysin-Lösung unter Lichtschutz konnten die beschichteten Glasplättchen in eine sterile Gaspetrischale mit Filterpapier verbracht werden und unter Lichtschutz bis zu 2 Wochen gelagert werden.

3.6 Präparation

3.6.1 Präparation für die Ussing-Kammer

Von den Ratten, welche zuvor sensibilisiert worden waren, sowie den Tieren, bei denen zusätzlich zur Sensibilisierung noch eine Kolitis induziert wurde, wurden sowohl das distale Kolon als auch das Jejunum (im Abstand von 10 cm zur Ileozäkklappe) entnommen. Die Segmente wurden mit kalter Parsons-Lösung gespült und auf einen Plastikstab gezogen. Am distalen Ende des Kolons wurde mit einem stumpfen Skalpell eine Inzision in die Tunica muscularis und die Serosa gesetzt,

sodass diese nun vorsichtig per Hand in proximale Richtung abgestreift werden konnten. Aus praktischen Gründen wurde auf das Entfernen dieser Schichten beim Jejunum verzichtet. Die Mukosa-Submukosa-Präparate des distalen Kolons sowie die Jejunumsegmente wurden an ihrer mesenterialen Seite in longitudinale Richtung eröffnet, in ca. 2 cm große Stücke geschnitten und auf den Pins der Ussing-Kammer fixiert (Abb. 10, S. 43). Die übrigen Kolon- und Jejunumsegmente wurden für weitere Messungen (Immunhistochemie, qPCR, Ca^{2+} -Imaging) verwendet.

Für alle weiteren Ussing-Kammer-Versuche wurde nur mit Mukosa-Submukosa-Präparaten des distalen Kolons gearbeitet. Dabei konnten aus jedem Tier zwei Kolonsegmente gewonnen werden, von denen eins als zeitabhängige Kontrolle und eins als Versuchsgewebe diente.

3.6.2 Herstellung eines sogenannten „Stufenpräparates“

Um Aufschluss über mögliche Mastzellinteraktionen nach Sensibilisierung mit und ohne Kolitis-Induktion zu erlangen, wurde ein sogenanntes „Stufenpräparat“ aus dem distalen Kolon der Versuchstiere hergestellt. Ziel war es, sowohl die submukösen Ganglien als auch die mukosalen Mastzellen, welche in der Lamina propria liegen, so zu präparieren, dass Ca^{2+} -Imaging-Messungen möglich waren. Dafür wurde die Mukosa-Submukosa-Präparation longitudinal eröffnet und mit der Mukosaseite nach oben auf einer schmalen Plexiglasplatte am oberen und unteren Ende mit zwei Klemmen fixiert. Um die Krypten zu entfernen, wurde das Gewebe in einer 37 °C warmen Kryptenisolationslösung, bestehend aus 372 mg EDTA (Ethylendiamintetraacetat), gelöst in 100 ml HBSS (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}), für ca. 6 min inkubiert. Das Epithel konnte dann vorsichtig mit einem gebogenen Kunststoffspatel abgestreift werden, sodass ein Lamina propria-Submukosa-Präparat entstand. Um nun die eigentliche „Stufe“ herzustellen, wurde in der Mitte des Gewebes mit der scharfkantigen Seite eines Objektträgers eine Inzision in die Lamina propria gesetzt, sodass diese vorsichtig entfernt werden konnte (vgl. Abb. 8). Nun konnte das Gewebe in 5 x 5 mm große Stücke geschnitten werden, welche alle eine „Stufe“ mittig

enthielten. Diese wurden dann auf Poly-L-Lysin ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) beschichtete Glasplättchen (Durchmesser 13 mm) verbracht und nach deren Anhaften mit Standardtyrode bis zur weiteren Messung bedeckt. Die Abstufung war notwendig, da man andernfalls in Ca^{2+} -Imaging-Versuchen aufgrund der zu hohen Schichtdicke keine Ganglien erkennen konnte.

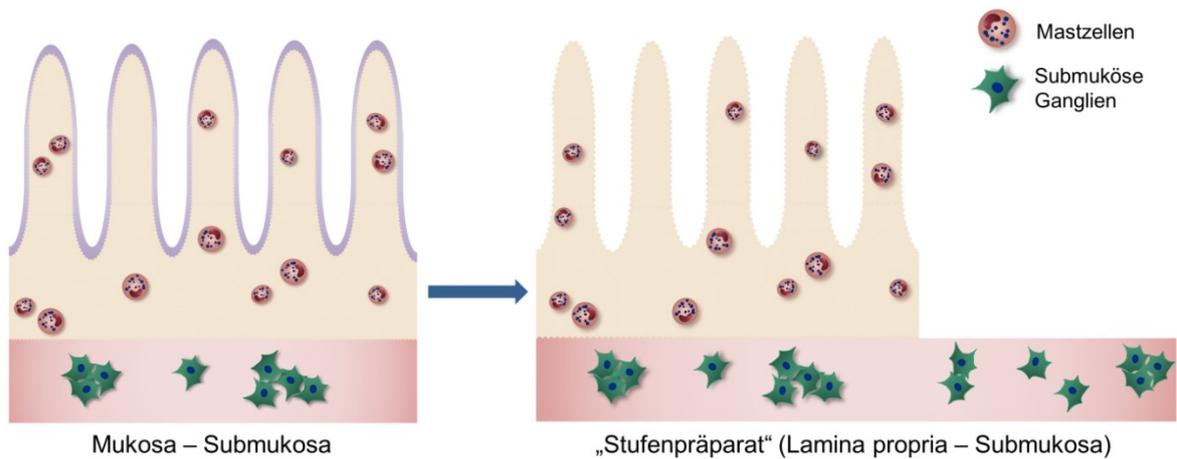


Abb. 8. Schematische Darstellung eines Stufenpräparates.

3.6.3 Präparation für das Ca^{2+} -Imaging

Für die Cokultur, bestehend aus intakter Submukosa und RBL-2H3, wurde das distale Kolon, wie oben beschrieben, präpariert und longitudinal eröffnet. Auf einer Glasplatte wurde das orale Ende des distalen Kolons fixiert, sodass das Gewebe mit einem Objektträger am distalen Ende leicht gespannt werden konnte. Nachdem mit einem zweiten Objektträger eine Inzision in die Mukosa gesetzt wurde, konnte diese nun vorsichtig in proximale Richtung abgestreift werden. Die Submukosa, erkennbar an ihrer milchig-transparenten, gefäßdurchzogenen Struktur, wurde in ca. 5 x 5 mm große Stücke geschnitten und auf Poly-L-Lysin ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) beschichtete Glasplättchen (Durchmesser: 13 mm) verbracht. Die Submukosapräparate wurden mit einer feinen Pinzette faltenfrei auf den Glasplättchen platziert und in eine Vier-Well-Schale gelegt. Nachdem sichergestellt wurde, dass die Submukosastücke sich an das Poly-L-Lysin angehaftet hatten, wurden diese bis zur weiteren Verwendung mit jeweils 500 μl Standard-Tyrode bedeckt.

3.7 Zellkultur

3.7.1 Primäre Kultivierung submuköser Neurone

Das distale Kolon wurde, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, präpariert, jedoch wurde die Submukosa in diesem Fall in ca. 2 x 2 mm große Stückchen geschnitten und in ein 2-ml-Tube mit kalter Parsons-Lösung verbracht. Nach kurzer Zentrifugation (10 s, 11.000 rpm) wurde die Lösung durch die enzymatische Digestionslösung ersetzt. Die Submukosastücke wurden für insgesamt 60 - 90 min im Thermomixer (37 °C, 200 Schüttelbewegungen/min) inkubiert bis eine trübe, homogene Lösung ohne sichtbare Partikel entstanden war. Zur manuellen Zerkleinerung wurde die Lösung währenddessen dreimal im Abstand von 20 - 30 min mit einer sterilen Spritze auf- und abpipettiert. Für jeden Schritt wurde die Kanülengröße so gewählt, dass deren Durchmesser im zeitlichen Verlauf abnahm (21G, 25G, 27G). Nach Zentrifugation (3 min, 1000 rpm) wurde die Kollagenaselösung entfernt, durch Neurobasal-A-Medium (NB-A, 3.3.3.1) ersetzt, durchmischt und erneut zentrifugiert (3 min, 1000 rpm). Die folgenden Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank statt (LaminAir LB-48-C; Heraeus, Hanau, Deutschland). Das zentrifugierte Zellpellet wurde mit der entsprechenden Menge an 37 °C warmem NB-A versetzt, sodass anschließend je 50 µl der Zellsuspension auf ein Poly-L-Lysin (0,02 mg·l⁻¹) beschichtetes Glasplättchen gegeben wurden. Nach einer ca. 15-minütigen Absinkzeit wurde jedes Well mit NB-A auf 500 µl aufgefüllt. Bis zur Durchführung weiterer Versuche wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert (Sanyo CO₂ Incubator; Sanyo, Wood Dale, IL, USA). Dabei wurde täglich das NB-A-Medium gewechselt. Die isolierten submukösen Neurone konnten bis zu 4 Tage kultiviert werden, ohne dass die Vitalität der Kultur abnahm oder diese mit stark proliferierenden Zellen (z. B. Fibroblasten) überwucherte.

3.7.2 Kultivierung der RBL-2H3

3.7.2.1 Zelllinie

Bei der verwendeten Zelllinie RBL-2H3 (rat basophilic leukemia cells) handelt es sich um eine Mastzell-äquivalente Zelllinie aus der Ratte, welche Mastzellmediatoren synthetisieren und freisetzen kann (Kulczycki und Metzger 1974; Barsumian et al. 1981). Diese wurde freundlicherweise von Prof. Adolfo Cavalié (Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) zur Verfügung gestellt.

3.7.2.2 Kulturbedingungen

RBL-2H3-Zellen wurden in Zellkulturschalen (Durchmesser: 6 cm) mit MEM α (3.3.3.2) bei 37 °C und 5 % CO₂ (v/v) im Brutschrank (TECO10: MS-L, Dielheim, Deutschland) kultiviert. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilbank (LaminAir LB-48-C) mit auf 37 °C temperierten Lösungen.

3.7.2.3 Auftauen der RBL-2H3

Bis zur Verwendung wurden die Zellen, eingebettet in einem Einfriermedium (s. 3.3.3.3), in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach Bedarf wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur aufgetaut und in 10 ml frisches MEM α überführt. Die Zellen wurden vorsichtig durchmischt und zentrifugiert (5 min, 1000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und erneut durch 4 ml frisches MEM α ersetzt. Nach kurzem Durchmischen wurde der Inhalt auf zwei Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm) verteilt, mit frischem MEM α auf jeweils 6 ml aufgefüllt und im Brutschrank (37 °C, 5 % (v/v) CO₂) gelagert. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurde das Medium in regelmäßigen Abständen erneuert bis eine entsprechende Dichte erreicht war, sodass die Zellen dann passagiert werden konnten.

3.7.2.4 Passagieren der RBL-2H3

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert mit dem Ziel jeweils 60.000 Zellen auf eine neue Zellkulturschale zu überführen. Dafür wurde das alte Medium mittels Pasteurpipette und Pumpe abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen dreimal

mit je 1 ml DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Thermo Fisher Scientific) gewaschen und für 5 min mit 1 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank (37 °C; 5 % (v/v) CO₂) inkubiert. Falls sich durch die Inkubation mit Trypsin noch nicht alle Zellkontakte gelöst hatten, wurde dies durch vorsichtiges Klopfen mit den Fingerspitzen gegen die Unterseite der Zellkulturschale unterstützt. Mittels Neubauer-Zählkammer wurde das benötigte Volumen für die gewünschte Zellzahl von 60.000 bestimmt. Anschließend wurde die in frische Zellkulturschalen überführte Zellsuspension mit MEM α auf 6 ml aufgefüllt und in den Brutschrank gestellt. Im Abstand von zwei Tagen wurde das Medium gewechselt bis zum erneuten Passagieren. Nach Passage 30 wurden die Zellen verworfen und neue Zellen aufgetaut.

Für die Ca²⁺-Imaging-Experimente der RBL-2H3-Monokultur wurden 5.000 Zellen pro Well ausgezählt und auf mit Poly-L-Lysin (0,02 mg·l⁻¹) beschichtete Glasplättchen (Ø 13 mm) in Vier-Well-Platten gegeben. Jedes Well wurde mit MEM α auf 500 μ l aufgefüllt und bis zum Versuch im Brutschrank bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ gelagert.

3.7.2.5 Einfrieren der RBL-2H3

Um den Bedarf an frischen Zellen zu decken, wurden RBL-2H3 zwischen Passage 5 und 10 eingefroren. Dafür wurden diese passagiert, je 120.000 Zellen in ein Kryoröhrchen überführt und mit frischem Einfriermedium auf 1 ml aufgefüllt. Um ein gleichmäßiges Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen in einem Einfriertopf (Kryo-Einfriergerät; Nunc, Wiesbaden, Deutschland) zunächst bei -80 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff verbracht. Der Einfriertopf ermöglichte hier ein gleichmäßiges Herunterkühlen um 1 °C pro Stunde.

3.7.3 Cokultur aus isolierten submukösen Neuronen und RBL-2H3

Für Ca²⁺-Imaging-Versuche wurde eine Cokultur aus primär isolierten submukösen Neuronen und RBL-2H3 angelegt. Dazu wurden zu den isolierten Neuronen (3.7.1) 10.000 RBL-2H3 pro Well hinzugefügt und mit je 500 μ l MEM α bedeckt. Bis zur

Durchführung der Ca^{2+} -Imaging-Messungen am nächsten Tag wurden die beiden Zellarten gemeinsam im Brutschrank (37 °C, 5 % (v/v) CO_2) inkubiert.

3.7.3.1 Inkubation der primär isolierten submukösen Neurone und RBL-2H3 mit proinflammatorischen Zytokinen

Um die Auswirkungen von Zytokinen auf Mastzell-Neuron-Interaktionen zu untersuchen, wurden primär isolierte submuköse Neurone und RBL-2H3 mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen – entweder einzeln oder kombiniert als Zytokinmix – vorbehandelt. Dabei wurde mit den Zellkulturen so verfahren wie zuvor beschrieben, nur dass parallel zu den unbehandelten Kontrollen die Zellen mit folgenden Zytokinen inkubiert wurden: $\text{TNF}\alpha$ (10 / 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), $\text{IFN-}\gamma$ (100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) oder $\text{IL-1}\beta$ (20 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) jeweils getrennt sowie kombiniert als Zytokinmix ($\text{TNF}\alpha$ 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $\text{IFN-}\gamma$ 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ und $\text{IL-1}\beta$ 20 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die Inkubationszeit betrug für alle Zytokine 1 Tag, lediglich für den Zytokinmix wurde diese zusätzlich auf 3 Tage verlängert. Dabei wurden die isolierten Neurone und die RBL-2H3 zunächst getrennt mit den jeweiligen Zytokinen über eine Dauer von zwei Tagen vorinkubiert, wobei das Medium (NB-A bzw. $\text{MEM}\alpha \pm$ Zytokine) täglich erneuert wurde. Die RBL-2H3 wurden passagiert (5.000 Zellen/Well) und anschließend wurden beide Zelltypen gemeinsam bis zum nächsten Tag kokultiviert ($\text{MEM}\alpha \pm$ Zytokine).

3.7.4 Kokultur aus intakter Submukosa und RBL-2H3

Die 5 x 5 mm großen Submukosastücke wurden auf mit Poly-L-Lysin (0,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) beschichteten Glasplättchen (\varnothing 13 mm) fixiert. Nach einem Waschschrift mit je 500 μl Standard-Tyrode wurde die Submukosa mit jeweils 500 μl NB-A bedeckt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % (v/v) CO_2 gelagert. Bevor mit den Ca^{2+} -Imaging-Experimenten begonnen wurde, wurde das NB-A entfernt, die RBL-2H3 passagiert und die entsprechende Menge an Mastzellsuspension (5.000 Zellen/Well) auf jedes Submukosapräparat gegeben. Nach einer kurzen Absinkzeit von ca. 15 min konnte jedes Well auf 500 μl $\text{MEM}\alpha$ aufgefüllt werden. Die Kokultur wurde für weitere 15 min gemeinsam im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % (v/v) CO_2).

3.8 Ussing-Kammer

3.8.1 Prinzip

Die Ussing-Kammer-Technik wurde Anfang der fünfziger Jahre entwickelt (Ussing und Zerahn 1951) und später modifiziert. Sie ermöglicht es an isolierten Epithelien verschiedener Gewebe elektrogene Transportvorgänge – verursacht durch Ionenbewegungen – zu messen.

Am Darmepithel finden kontinuierlich aktive und passive Resorptions- sowie Sekretionsvorgänge statt, an denen Ionen (v. a. Na^+ und Cl^-) maßgeblich beteiligt sind. Um passive Ionenströme auszuschalten, werden beide Kammerhälften mit identischem Puffer befüllt. Es bestehen demnach keine Konzentrationsgradienten, welche als Antriebskraft für die passiven Ionenströme dienen könnten. Gewebenah platzierte Spannungselektroden erfassen die transepitheliale Potentialdifferenz, die durch den aktiven elektrogenen Ionentransport entsteht („Open-circuit-Modus“). Frühere Studien konnten zeigen, dass am Kolon sowie am Dünndarm der Ratte spontan Anionen (v. a. Cl^- und HCO_3^-) sezerniert werden, wodurch die mukosale Seite eine negativere Ladung als die serosale Seite aufweist (Tai und Decker 1980; Strabel und Diener 1995). Um Änderungen des Ionentransportes feststellen zu können, wird der gemessenen Potentialdifferenz ein sogenannter Kurzschlussstrom (I_{sc} , short-circuit current; gemessen in $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) entgegengesetzt. Dafür wird vom „Open-circuit-Modus“ in den „Voltage-clamp-Modus“ umgeschaltet, wodurch die Potentialdifferenz auf 0 mV geklemmt wird. Dies passiert durch die gewebefernen, seitlich an der Kammer angebrachten Stromelektroden, welche mit einem Amperemeter verbunden sind (Abb. 9). Die gemessenen Daten werden kontinuierlich mittels spezieller Software erfasst („Winclamp“; Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland).

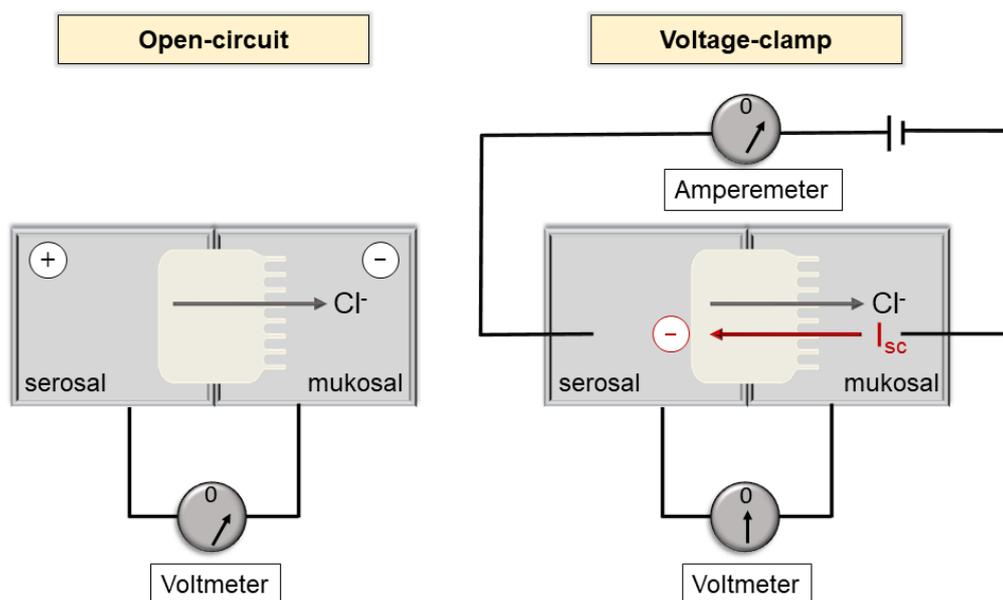


Abb. 9. Prinzip der Ussing-Kammer-Messung (mit freundlicher Genehmigung von L. Lottig).

Das bedeutet, dass der Wert des applizierten Kurzschlussstroms ($1 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ entspricht $26,9 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$) betragsmäßig der epithelialen Netto-Ionenbewegung entspricht, dieser jedoch entgegengesetzt ist. Steigt nun durch Zugabe von Sekretagoga die transepitheliale Potentialdifferenz an, so steigt folglich auch der Kurzschlussstrom. Im Gewebe kommt es zu einem Anstieg der Potentialdifferenz, wenn entweder mehr Kationen (v. a. Na^+) elektrogen resorbiert werden (und die serosale Seite positiver wird) oder wenn vermehrt Anionen (v. a. Cl^-) sezerniert werden (und die mukosale Seite des Gewebes negativer wird). Umgekehrt bedeutet dies, dass eine Abnahme der Potentialdifferenz zu einer Abnahme des I_{sc} am Gewebe führt (im Falle einer Anionenresorption bzw. Kationensekretion).

Parallel zum I_{sc} wird der Gewebewiderstand (R_t) sowie die Gewebeleitfähigkeit (G_t) bestimmt. Der Widerstand (R) eines Gewebes kann mittels Ohm'schen Gesetzes aus Potentialdifferenz (Spannung U) und Kurzschlussstrom (Stromstärke I) errechnet werden. Die G_t ergibt sich als reziproker Wert des Gewebewiderstands (R_t):

$$R = \frac{U}{I} \quad \text{daraus ergibt sich} \quad G_t = \frac{I}{U}$$

So kann man zusammenfassend sagen, dass der Kurzschlussstrom (I_{sc}) ein Maß für den aktiven Ionentransport am Epithel ist, welcher am Kolon überwiegend durch eine Anionensekretion bestimmt wird, und dass die Gewebeleitfähigkeit (G_t) Aussagen über die epitheliale Permeabilität liefert.

3.8.2 Aufbau

Wie in Abb. 10 zu erkennen, besteht die Ussing-Kammer aus zwei Plexiglaskammerhälften. Jede dieser Hälften besteht aus einer inneren Kammer, gefüllt mit Puffer, und einer äußeren Kammer, gefüllt mit temperiertem Wasser, welches eine konstante Temperatur von 37 °C gewährleistet. Die beiden inneren Kammerhälften sind durch eine 1 cm² große Öffnung in der Mitte miteinander verbunden. Umgeben wird diese Öffnung an einer Kammerhälfte von schmalen Metallpins, auf denen das Gewebe fixiert und dadurch die Öffnung komplett abdeckt wird.

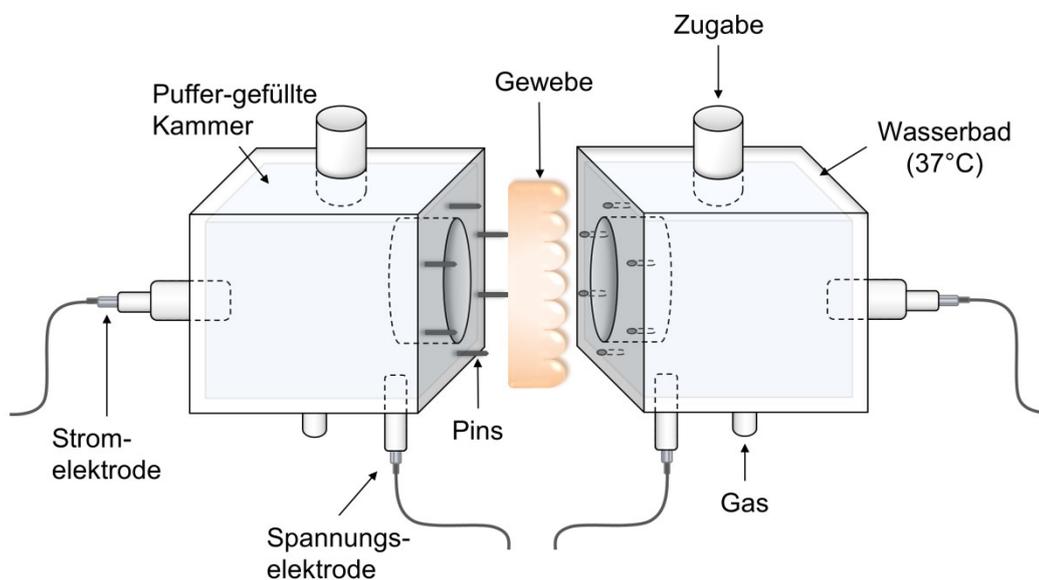


Abb. 10. Aufbau der Ussing-Kammer.

Die gegenüberliegende Kammerhälfte weist Einsenkungen für die Metallpins auf, sodass das Gewebe plan zwischen den beiden Hälften fixiert werden kann. Mit einem Silikonfilm, der auf die Innenseiten der Plexiglashälften aufgetragen wird, werden

beide Hälften gegeneinander abgedichtet und zusätzlich mit zwei Schrauben von außen fixiert. An der Oberseite der Kammern befindet sich jeweils eine Öffnung, durch die Puffer und Substanzen zugegeben werden. An der Unterseite der Kammern befinden sich Zuleitungen für Gas (hier: Carbogen, bestehend aus 95 % (v/v) O₂ und 5 % (v/v) CO₂), wodurch der Puffer durchmischt und das Gewebe kontinuierlich mit Sauerstoff versorgt wird. Um elektrophysiologische Messungen durchführen zu können, befinden sich an der Unterseite zwei Spannungselektroden, welche die transepitheliale Potentialdifferenz zwischen der mukosalen und serosalen Seite des Gewebes messen. Diese sind nah am Gewebe angeordnet um mögliche Messartefakte sowie den elektrischen Widerstand zu minimieren. Die Applikation des Kurzschlussstroms erfolgt durch zwei seitlich angebrachte Ag/AgCl-Elektroden. Alle Elektroden (gefüllt mit 3 mol·l⁻¹ KCl) sind über Agarbrücken (5 % (w/v) Agar) mit der Kammer verbunden.

3.8.3 Versuchsdurchführung

Die Gewebe wurden wie in 3.6.1 beschrieben präpariert, longitudinal eröffnet und mit der serosalen Seite nach unten auf den Metallpins fixiert. Die beiden Kammerhälften wurden zusammengefügt, mit Schrauben fixiert und mit jeweils 3,5 ml Parsons-Puffer befüllt. Nach einer Stabilisierungsphase von 30 - 60 min wurde mit dem jeweiligen Versuchsprotokoll begonnen (s. nachfolgenden Abschnitte). Am Ende eines jeden Experiments wurde eine Vitalitätskontrolle durchgeführt, entweder mit Carbachol (5·10⁻⁵ mol·l⁻¹, serosal) und/oder Forskolin (5·10⁻⁶ mol·l⁻¹, mukosal und serosal).

3.8.3.1 Versuchsprotokoll zum Tiermodell

Die entnommenen Gewebe der Versuchstiere (Jejunum, distales Kolon) wurden nach Stabilisierung des I_{sc} zunächst mit Ovalbumin stimuliert – das Antigen, gegen das die Tiere in vivo sensibilisiert wurden – um eine Mastzell-vermittelte Anionensekretion auszulösen. Als Vitalitätskontrolle wurde Carbachol verwendet, welches ein stabiles Acetylcholderivat darstellt und eine Ca²⁺-vermittelte Cl⁻-Sekretion auslöst.

Parallel zu dieser Versuchsreihe wurden Fluorescein-Flux-Messungen durchgeführt (detailliert in 3.8.4 beschrieben). Dafür wurde im Abstand von 30 min je 70 μl des Puffers von der serosalen Seite jeder Kammer entnommen (und wieder mit der gleichen Menge an Puffer aufgefüllt). Die ersten zwei Entnahmen vor der Ovalbumin-Zugabe dienten als Referenzwert; die folgenden drei Proben sollten Aufschluss über mögliche Änderungen der parazellulären Permeabilität nach Mastzellstimulation durch Ovalbumin liefern.

3.8.3.2 Versuchsprotokoll mit proinflammatorischen Zytokinen

Um *in vitro* die Auswirkungen von proinflammatorischen Zytokinen auf Mastzellvermittelte Cl^- -Sekretion zu untersuchen, wurden Segmente des distalen Kolons mit verschiedenen Zytokinen vorinkubiert. Dabei wurden die Gewebe zunächst für eine Stunde mit $\text{TNF}\alpha$ ($10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ / $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ / $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), $\text{IFN-}\gamma$ ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) oder $\text{IL-1}\beta$ ($20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) jeweils getrennt oder gemeinsam als Zytokinmix (für 1 h, 2 h oder 3 h) vorbehandelt. Dieser Zytokin-Cocktail setzte sich aus $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ sowie der hohen $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration zusammen. Im Anschluss an die Vorinkubation wurden die Mukosa-Submukosa-Präparate mit dem Mastzellaktivator Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal; Konzentrationsangabe auf der Basis des Molekulargewichts des Monomers) sowie dem Mastzellmediator Histamin ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal) stimuliert. Als Vitalitätskontrolle wurden sowohl Carbachol als auch Forskolin verwendet.

3.8.3.3 Versuchsprotokoll mit Agonisten

Um Aufschluss über die Wirkung verschiedener Agonisten auf die Mastzellvermittelte Anionensekretion zu erlangen, wurden solche Substanzen verwendet, deren Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen zu finden sind. Daher wurden die Mukosa-Submukosa-Präparationen des distalen Kolons jeweils mit den cholinergen Agonisten Nikotin und Pilocarpin sowie mit dem Neuropeptid Substanz P bzw. dem Katecholamin Noradrenalin vorbehandelt. Dabei wurde für alle Agonisten die Inkubationszeit auf 5 min festgesetzt, mit Ausnahme von Nikotin ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), welche auf 15 min verlängert wurde. Parallel dazu wurden bei jedem Versuch zeitabhängige

Kontrollen durchgeführt. Anschließend wurden alle Gewebe mit dem Mastzellaktivator Compound 48/80 stimuliert. Als Vitalitätskontrolle wurden die Ca^{2+} - und cAMP-abhängigen Sekretagoga Carbachol und Forskolin eingesetzt.

3.8.4 Messung der parazellulären Permeabilität mittels Fluorescein

Parallel zu den Ussing-Kammer-Messungen wurden Fluorescein-Fluxe an den Kolon- und Jejunumsegmenten gemessen. Dafür wurde der Farbstoff Fluorescein ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) – ein niedermolekularer Marker, welcher passiv über die Zwischenzellräume diffundiert – auf die mukosale Seite des Gewebes gegeben. Es wurden jeweils zwei Proben vor und drei Proben nach Ovalbuminzugabe von der serosalen Seite entnommen (70 μl pro Probe) und mit der gleichen Menge an Parsons-Puffer aufgefüllt. Die Probe zum ersten Entnahmezeitpunkt wurde als t_0 bezeichnet, die folgenden als t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{120} und t_{150} . Die Fluxe von zwei Kontrollperioden (von t_0 - t_{30} sowie t_{30} - t_{60}) wurden gemittelt und dienten als Referenzpunkt für die Änderung der parazellulären Permeabilität nach Ovalbuminzugabe (t_{90}). Alle Proben wurden für 5 min bei 11.000 rpm zentrifugiert, um Störungen durch mögliche Schwebstoffe zu vermeiden. Eine Änderung der Fluoresceinkonzentration konnte anschließend als Extinktion bei einer Wellenlänge von 488 nm mittels NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) photometrisch bestimmt werden, wobei als Grundlage das Lambert-Beer-Gesetz diente:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E steht dabei für die gemessene Extinktion, welche sich als Produkt aus dem Extinktionskoeffizienten ε ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), der Farbstoffkonzentration c ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) sowie der Schichtdicke d (cm) der Probe ergibt. Vor jeder Messung wird die Extinktion einer Leerprobe (hier Parsons-Puffer, der auch als Grundlage für die Fluorescein-Versuche galt) bestimmt, um dann Rückschlüsse auf die tatsächliche Farbstoffkonzentration zu ziehen.

Zur Bestimmung der einzelnen Transportraten (Fluxe) zwischen zwei Entnahmezeitpunkten wird die Differenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Farbstoffkonzentrationen ermittelt (z. B. Flux 1 = t_{30} minus t_0). Die berechnete Fluxrate wird in $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ angegeben. So konnten insgesamt fünf Fluxraten (zwei vor und drei nach Ovalbuminzugabe) bestimmt werden.

3.9 Ca^{2+} -Imaging

3.9.1 Theorie des Ca^{2+} -Imaging

Ziel des Ca^{2+} -Imaging ist es intrazelluläre Konzentrationsänderungen des Second messengers Ca^{2+} an lebenden Zellen mit möglichst hoher Raum- und Zeitauflösung zu registrieren. Verschiedene Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen durch ihre Bindung an freies Ca^{2+} eine optische Erfassung von Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Für diese Versuche wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 gewählt, welcher zu den wellenlängenändernden (wavelength shifting) Farbstoffen gehört und somit nach Anregung mit UV-Licht durch Bindung an Ca^{2+} seine optimale Anregungswellenlänge ändert. So liegt das Anregungsmaximum für an Ca^{2+} gebundenes Fura-2 bei 340 nm und für freies Fura-2 bei 362 nm. Aufgrund der Nähe zum isoemissiven Punkt bei 362 nm wird in der Praxis die Menge an freiem Fura-2 bei 380 nm gemessen. Am isoemissiven Punkt ist die Fluoreszenzintensität für gebundenes und freies Fura-2 identisch, es kann also keine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gemessen werden (Abb. 11). Die Emission des Farbstoffes wird, unabhängig von den beiden Anregungswellenlängen, bei > 440 nm gemessen.

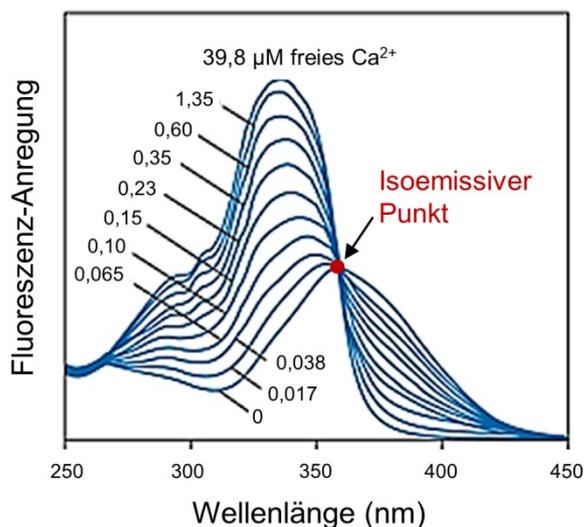


Abb. 11 Fura-2-Anregungsspektrum (modifiziert nach Thermo Fisher Scientific).

Durch die unterschiedlichen Anregungswellenlängen sind sogenannte Verhältnismessungen (Ratiomessungen) möglich, welche es erlauben Aussagen über die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle zu treffen. Als Ratio wird der Quotient der gemessenen Emission nach einer Anregung von 340 nm (für Ca^{2+} -gebundenes Fura-2) und 380 nm (für freies Fura-2) gebildet. So erhält man Aufschluss über die Änderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, jedoch nicht über den absoluten Gehalt an Ca^{2+} in der Zelle. Zudem bieten Ratiomessungen den Vorteil, dass sie unabhängig von der absoluten Farbstoffkonzentration, der Zellgröße sowie der Zelldicke sind und dass der Effekt des Ausbleichens während einer Messung auf ein Minimum reduziert werden kann (Grynkiewicz et al. 1985).

3.9.2 Fura-2

Der Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM (Fura-2-Acetoxy-methylester) liegt in seiner Grundform als Ester vor, welcher aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft die Zellmembran gut per Diffusion passieren kann. Jedoch fluoresziert der Farbstoff in dieser Form nicht, sodass er nach Aufnahme in die Zelle erst durch intrazelluläre Esterasen gespalten werden muss (Abb. 12).

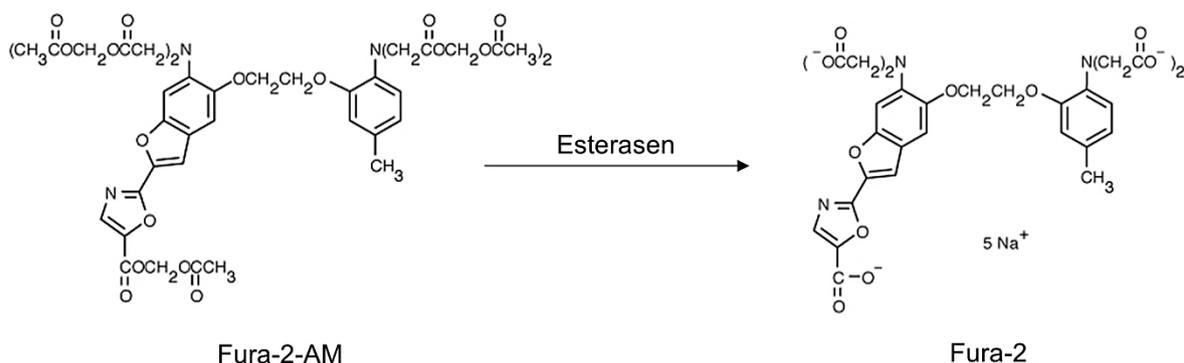


Abb. 12 Strukturformel von Fura-2-Acetoxy-methylester (Fura-2-AM) und Fura-2 (Natriumsalz; modifiziert nach Thermo Fisher Scientific).

Dadurch entstehen fünf Carboxylgruppen, von denen vier jeweils ein Ca^{2+} binden können. Die Bindungskurve von Fura-2 ist in Abb. 13 dargestellt. Unter Ruhebedingungen liegt die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol ungefähr bei $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und die Dissoziationskonstante K_d , bei der 50 % des Fura-2 an Ca^{2+} gebunden sind, bei $224 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dadurch ist es möglich Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen (Fluoreszenzänderungen) in einem großen Bereich messen zu können, bevor Fura-2 komplett mit Ca^{2+} abgesättigt ist.

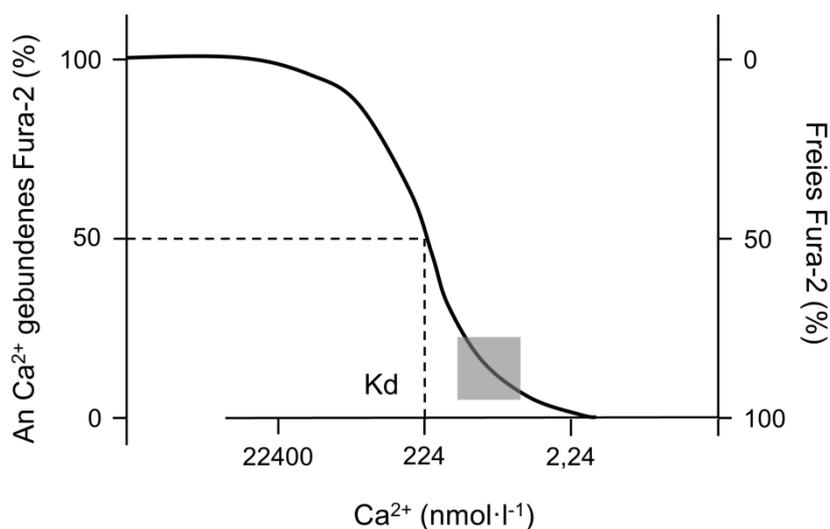


Abb. 13. Bindungskurve von Fura-2 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. Das graue Quadrat zeigt den Bereich der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unter Ruhebedingungen; K_d = Dissoziationskonstante.

3.9.3 Messstand

Der Messstand für das Ca^{2+} -Imaging (Abb. 14) bestand aus einem inversen Lichtmikroskop (IX 50; Olympus, Tokyo, Japan), welches mit einem Epifluoreszenz-Setup ausgestattet war (Abb. 14). Als Lichtquelle diente eine Xenonlampe, wodurch das Präparat entweder bei 340 nm oder 380 nm angeregt wurde. Die dabei entstandene Emission (> 440 nm) wurde über einen dichroitischen Spiegel an eine CCD-Kamera ($\text{CCD} = \text{charge coupled device}$; Till Photonics, Martinsried, Deutschland) weitergeleitet. Alle Präparate wurden mit einem Objektiv mit 20facher Vergrößerung betrachtet und die gemessenen Fluoreszenzänderungen wurden mit einer Image-Analyse-Software (Till Photonics) ausgewertet.

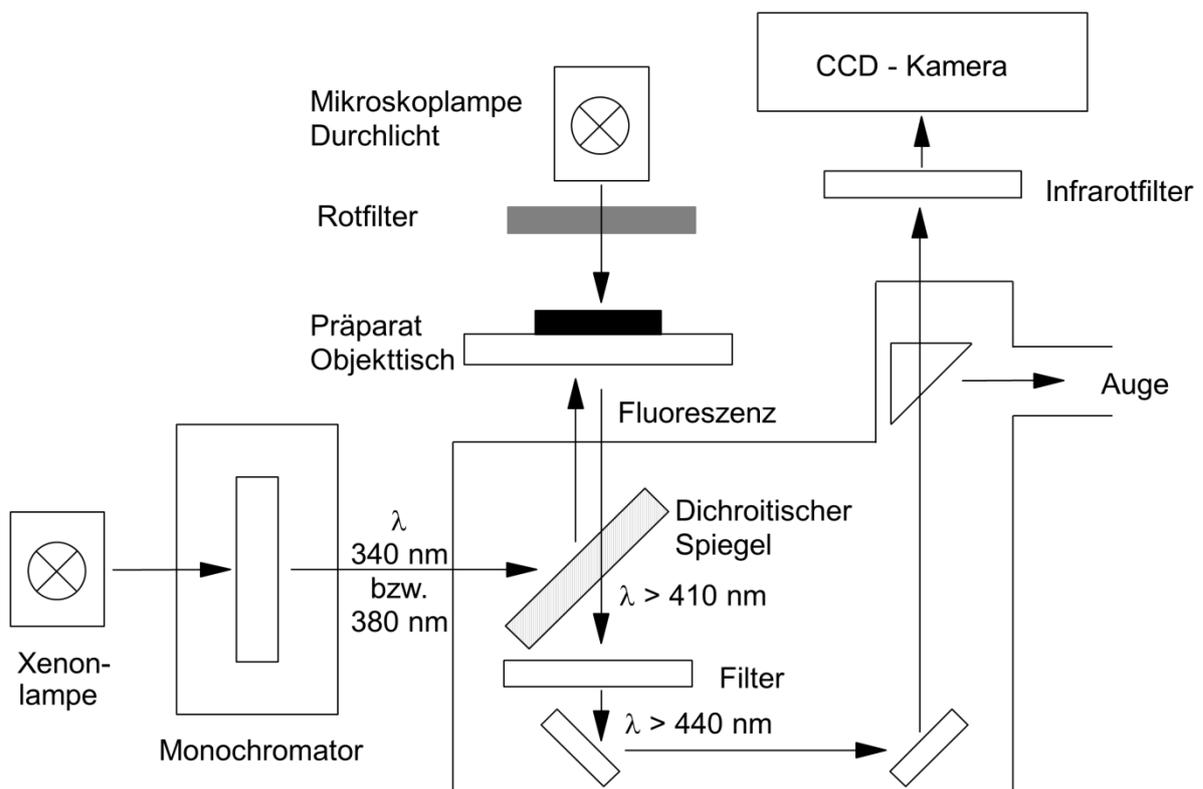


Abb. 14. Aufbau des Imaging-Messstandes (mit freundlicher Genehmigung von M. Diener).

3.9.4 Messkammer und Halterung für die elektrische Feldstimulation

Für alle Imaging-Experimente wurde eine Messkammer verwendet, welche aus einer Metallplatte mit zentraler Öffnung (\varnothing 10 mm) bestand (s. Abb. 15). Auf diese Öffnung wurde ein 13 mm großes, mit Poly-L-Lysin beschichtetes Glasplättchen gelegt, auf dem entweder Zellen oder Submukosapräparate fixiert waren. Darauf wurde eine Teflonscheibe mit zentraler Öffnung (\varnothing 10 mm) gelegt, welche sich schräg nach oben erweitert. Fixiert wurde alles mit vier Schrauben, sodass anschließend die Messkammer mit 1 ml Tyrode befüllt werden konnte.

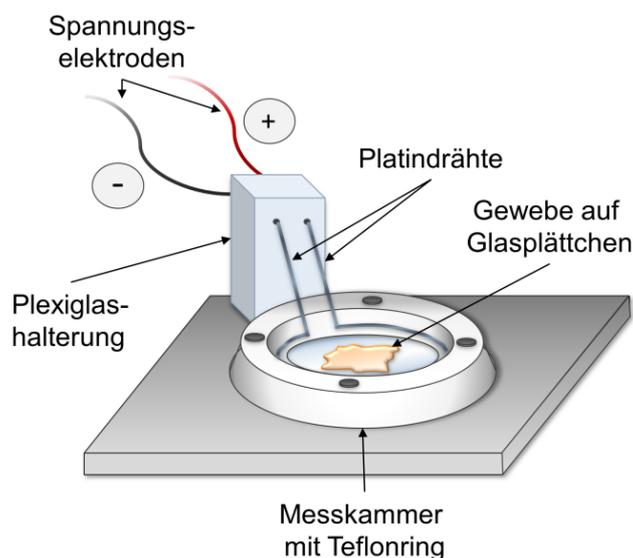


Abb. 15. Aufbau der Messkammer mit Halterung für die Elektrische Feldstimulation (EFS).

Als Vitalitätskontrolle für submuköse Ganglien wurde eine elektrische Feldstimulation (EFS) durchgeführt. Dafür wurde ein Plexiglashalter verwendet, an dem zwei Platindrähte fixiert waren. Die Enden der Drähte waren halbkreisförmig gebogen (\varnothing ca. 12 mm), sodass diese in der Messkammer möglichst auf einer Ebene mit dem Gewebe und am Rand des Glasplättchens zu liegen kamen, um die Messung nicht zu beeinträchtigen (s. Abb. 15). Die Platindrähte waren mit einem Grass S44 Pulsgenerator verbunden (Grass S44 Stimulator; Grass Warwick, RI, USA). Am Boden der Plexiglashalterung war ein Magnet mit angebracht, wodurch die Halterung sicher auf dem Messstand fixiert, aber auch bei Bedarf entfernt werden konnte.

3.9.5 Durchführung

Alle Imaging-Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zuerst wurde eine Lösung hergestellt, welche den Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM sowie Pluronic enthielt. Die Präparate, die sich in den Vier-Well-Platten befanden, wurden zunächst von dem Zellkulturmedium befreit, einmal mit je 500 μl Tyrodelösung pro Well gewaschen und anschließend mit je 250 μl der Fura-2-AM-Pluronic-Gemische entsprechend aufgeladen (s. 3.3.2.2). Je nach Aufladung der Zellen wurde die Inkubationszeit gegebenenfalls noch um einige Minuten verlängert. Anschließend wurde jedes Präparat zweimal mit je 500 μl Tyrode gespült, um überschüssige Farbstoffrückstände zu entfernen, und in die Messkammer verbracht.

Die zu messenden Zellen wurden als sogenannte ROIs (= region of interest) markiert, sodass jeder Zelle ein eigener Messbereich zugeordnet wurde. Dann wurde das Präparat alle 5 s bei 340 und 380 nm für die Dauer von 20 ms (bei geringer Aufladung für 50 ms) belichtet. Die Ratio aus den beiden Wellenlängen wurde mittels Imaging-Software berechnet. Nach einer Stabilisierungsphase von 3 - 5 min konnte mit dem jeweiligen Protokoll begonnen werden. Als Vitalitätskontrolle am Ende jeder Messung wurde entweder im Fall von Neuronen KCl ($3 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) oder im Fall von Mastzellen Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) zugesetzt. Eine weitere Kontrolle bestand in einer elektrischen Feldstimulation (EFS, s. 3.9.5.4), bei der die intakten submukösen Ganglien durch einen elektrischen Stimulus erregt werden, was in einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration resultiert.

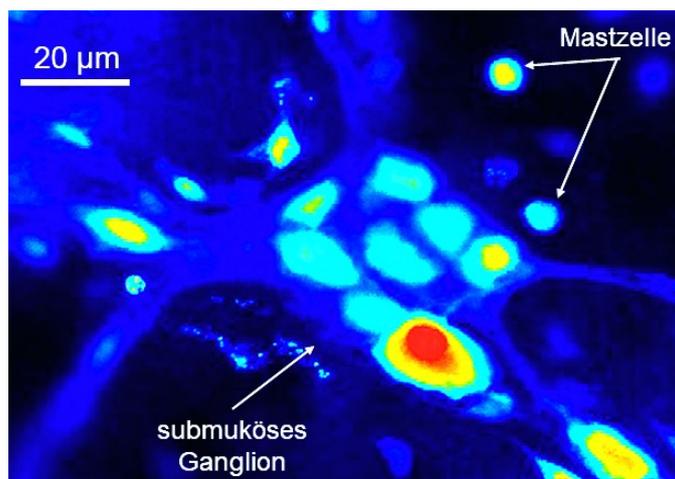


Abb. 16. Falschfarbendarstellung eines submukösen Ganglions aus dem distalen Kolon der Ratte, kokultiviert mit der Mastzelllinie RBL-2H3 (rot: hohe Fura-2-Ratio, blau: niedrige Fura-2-Ratio, schwarz: Hintergrund).

3.9.5.1 Versuchsprotokoll zur Wirkung von Ovalbumin auf das Kolon sensibilisierter Tiere

Aus dem distalen Kolon der Versuchstiere (OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis) wurde ein sogenanntes „Stufenpräparat“ hergestellt (s. 3.6.2) und mit Fura-2-AM-Lösung inkubiert. Die ROIs wurden in diesem Fall auf die Neurone der intakten submukösen Ganglien gesetzt. Nach einer 5-minütigen Stabilisierungsphase wurden die intestinalen Mastzellen mit Ovalbumin stimuliert. Anschließend wurde die Vitalität der intakten Ganglien mittels Zugabe von KCl überprüft.

3.9.5.2 Versuchsprotokoll zur Kokultur aus isolierten submukösen Neuronen und RBL-2H3 unter inflammatorischen Bedingungen

Für die Ca^{2+} -Imaging-Versuche wurde die Kokultur aus isolierten submukösen Neuronen und RBL-2H3-Zellen mit den entsprechenden Zytokinen bzw. dem Zytokinmix vorbehandelt und mit einer zeitabhängigen Kontrolle verglichen (s. 3.7.3.1). Die ROIs wurden auf die isolierten Neurone gesetzt. Nach einer Stabilisierungsphase von 5 min wurde zunächst der Mastzellaktivator Compound 48/80 zugegeben sowie nach weiteren 15 min KCl als Vitalitätskontrolle für die Neurone.

3.9.5.3 Versuchsprotokoll zur Wirkung von Agonisten auf die Monokultur RBL-2H3

Nach einer 3-minütigen Stabilisierungsphase wurden die RBL-2H3-Zellen mit Nikotin, Pilocarpin, Substanz P oder Noradrenalin für jeweils 15 min vorbehandelt. Anschließend wurden die Mastzellen mit Compound 48/80 ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) stimuliert sowie mit CPA deren Vitalität am Ende jeder Messung überprüft. Aufgrund einer extrem starken Reaktion der Mastzellen auf Compound 48/80 musste hier die Konzentration um den Faktor 10 erniedrigt werden im Vergleich zu den übrigen Ca^{2+} -Imaging-Experimenten.

3.9.5.4 Versuchsprotokoll zur Cokultur aus intakter Submukosa und RBL-2H3

Für die Ca^{2+} -Imaging-Experimente an den Cokulturen aus intakter Submukosa und RBL-2H3 (s. Abb. 16) wurden die ROIs sowohl auf die Neurone der submukösen Ganglien als auch auf die Mastzellen gelegt. Mittels elektrischer Feldstimulation (EFS) zu Beginn jeder Messung konnten die Ganglien sicher identifiziert und deren Vitalität überprüft werden.

3.9.6 Elektrische Feldstimulation (EFS)

Bei der elektrischen Feldstimulation (EFS) wird über zwei Elektroden ein Strom appliziert, um erregbares Gewebe zu stimulieren. Für die EFS wurde ein Halter (3.9.4) mit zwei drahtförmigen Platinelektroden auf die Messkammer gesetzt, sodass die halbkreisförmigen Enden der Drähte mit Puffer bedeckt waren. Über den Grass S44 Pulsgenerator wurde ein bipolarer Spannungspuls erzeugt, welcher die submukösen Ganglien erregte. Die EFS wurde am Anfang jeder Messung durchgeführt; so konnte neben der Vitalität der Ganglien auch gleichzeitig sichergestellt werden, dass es sich um erregbare Zellen handelte.

Die intakten submukösen Ganglien wurden mit einer Frequenz von 50 Hz, einer Pulsdauer von 0,8 ms und einer Spannung von 40 V für insgesamt 10 s stimuliert. Das dadurch entstandene elektrische Feld sollte sich möglichst homogen über das

Submukosapräparat ausbreiten, was durch die halbkreisförmige Anordnung der Platindrähte gewährleistet wurde. Durch den elektrischen Impuls werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der Membran von submukösen Neuronen geöffnet, wodurch es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration – und somit der Fluoreszenz – kommt. Dieser Effekt war sensitiv gegenüber Tetrodotoxin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; unveröffentlichte Daten).

3.10 Indirekte Immunfluoreszenz

3.10.1 Grundlagen

Als Grundlage für die Immunfluoreszenz dient die Eigenschaft von Antikörpern mit ihrer Fab-Region spezifisch an Antigene zu binden, wodurch ein stabiler Antigen-Antikörper-Komplex mit multiplen, nicht-kovalenten Bindungen entsteht (Reinard 2018). So können die zu untersuchenden antigenen Strukturen nachgewiesen werden. Um eine spezifische Bindung des Primärantikörpers an das zu untersuchende Antigen zu gewährleisten, müssen zunächst unspezifische Bindungsstellen abgesättigt werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird zusätzlich zu dem Primärantikörper, der spezifisch an das zu untersuchende Antigen bindet, ein Sekundärantikörper benötigt. Dieser bindet mit seiner Fab-Region an die Fc-Region des Primärantikörpers. An diese Sekundärantikörper ist zudem ein visuell detektierbarer Ligand gekoppelt, in diesem Fall ein Fluoreszenzfarbstoff (Abb. 17). Durch die Verwendung eines zusätzlichen Sekundärantikörpers kommt es zudem zu einer Signalverstärkung. Nach Anregung mit einer passenden Wellenlänge kann der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (Luttmann et al. 2014).

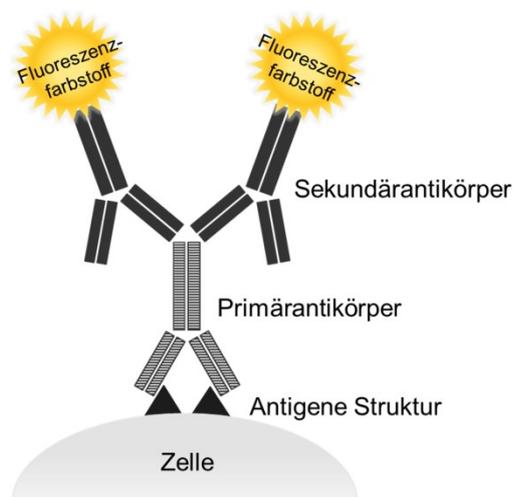


Abb. 17. Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.

3.10.2 Verwendete Antikörper

Zunächst wurden Kolon- und Jejunumsegmente von Kontrolltieren sowie von Tieren aus beiden Versuchsgruppen verwendet (OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis). Zum einen sollten die intestinalen Mastzellen in der Lamina propria sowie Submukosa angefärbt werden, zum anderen verschiedenen Claudine der Epithelbarriere. Dabei habe ich mich für vier verschiedene Claudine entschieden, die alle eine abdichtende Funktion an der Epithelbarriere erfüllen. Alle vier Primärantikörper, die gegen Claudin-1, -3, -4 und -8 gerichtet sind, wurden mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (Cy3 Donkey-anti-Rabbit IgG) kombiniert (Tabelle 1). Für die intestinalen Mastzellen wurde ein Primärantikörper verwendet, der gegen den SCF-Rezeptor gerichtet war (c-Kit/CD117), ebenfalls kombiniert mit dem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (Cy3 Donkey-anti-Rabbit IgG).

Aufgrund der Schwierigkeit Granula intestinaler Mastzellen immunhistochemisch anzufärben (s. auch 5.3 und 6.1.2), wurde Lungengewebe als Referenz genommen, um dort die Antikörper zu validieren. Dafür wurde ein Tryptase-Antikörper (Santa Cruz) mit Alexa 488 Donkey-anti-Mouse gekoppelt.

Material und Methoden

Ein weiterer Punkt bestand darin die durch Zytokine verursachte (mögliche) Apoptose in RBL-2H3-Zellen nachzuweisen. Als Apoptosemarker wurde ein Antikörper gegen die aktivierte Form der Caspase 3 (cleaved Caspase-3; cCas3) verwendet, welcher mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (Cy3 Donkey-anti-Rabbit IgG) kombiniert wurde (Tabelle 1).

Zielstruktur	Wirt	Hersteller	Verdünnung
<i>Primärantikörper</i>			
c-Kit	Kaninchen	Santa Cruz (sc-168)	1:250
Claudin-1	Kaninchen	Invitrogen (51-9000)	1:500
Claudin-3	Kaninchen	Invitrogen (34-1700)	1:1000
Claudin-4	Kaninchen	Invitrogen (36-4800)	1:500
Claudin-8	Kaninchen	Invitrogen (40-0700Z)	1:1000 (Kolon) 1:2000 (Jejunum)
Histamin	Kaninchen	Sigma (H7403)	bis 1:250
Mastzell-Tryptase	Maus	Abcam (ab2378)	bis 1:250
Mastzell-Tryptase	Maus	Santa Cruz (sc-59587)	bis 1:100
cCas3	Kaninchen	New England Biolab (Asp175)	1:2000
<i>Sekundärantikörper</i>			
Mouse IgG (Alexa 488-coupled)	Esel	Invitrogen (A121202)	bis 1:250
Mouse IgG (Cy3-coupled)	Ziege	Dianova (115-165-003)	bis 1:250
Rabbit IgG (Cy3-coupled)	Esel	Dianova (711-165-152)	1:1000

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

3.10.3 Herstellung der Geweblöckchen

Segmente des distalen Kolons sowie des Jejunums von Kontroll- und Versuchstieren (Tiermodell Sensibilisierung \pm Kolitis) wurden longitudinal eröffnet und in ca. 2 x 3 cm große Stücke geschnitten. Diese wurden auf ca. 2 x 4 cm große Plexiglasrahmen mit einer Öffnung in der Mitte geklebt, welche zuvor mit einem Cyanacrylatkleber beschichtet wurden (Abb. 18).

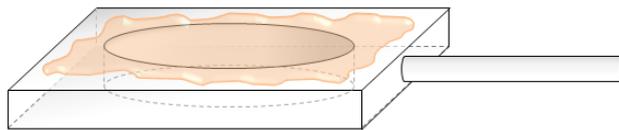


Abb. 18. Plexiglashalter für Gewebefixation.

Anschließend wurden die Gewebe über Nacht bei 4 °C in einer 4 % (w/v) PFA-Lösung fixiert (s. 3.3.4.3) und am nächsten Tag in Gelatine eingebettet (s. 3.3.4.4). Nach Verfestigung der Gelatine konnten die Gewebestückchen aus der Halterung herausgeschnitten werden. Diese wurden mit Tissue Freezing Medium[®] (Leica, Wetzlar, Deutschland) bedeckt und für 1 min in Isopentan, welches mit flüssigem Stickstoff auf ca. -160 °C heruntergekühlt wurde, eingefroren. Zur weiteren Lagerung wurden die Geweblöckchen erst mit Parafilm und dann mit Aluminiumfolie umhüllt und bei -80 °C bis zur Herstellung der Schnitte aufbewahrt.

Die als Referenzgewebe für die Mastzellmarkierung verwendeten Lungenlappen wurden zwerchfellnah von Kontrolltieren entnommen. Nach gründlichem Waschen mit Parsons-Puffer wurde ein Lungenlappen mit feinen Nadeln auf einem Korken befestigt und über Nacht bei 4 °C in 4 % (w/v) PFA-Lösung fixiert. Am nächsten Tag wurde mit dem Gewebe so verfahren wie im vorherigen Abschnitt erläutert.

3.10.4 Herstellung der Schnitte

Die eingefrorenen Gewebelöckchen wurden mit einem Kryostaten (Leica CM3050) in 4 µm dicke Scheiben geschnitten und anschließend auf gekühlten Objektträgern fixiert (Superfrost® Plus; Thermo Fisher Scientific).

3.10.5 Protokoll für die indirekte Immunfluoreszenz von Geweben

Nach Fixation der Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden diese dreimal für jeweils 5 min in Phosphatpuffer (PB) gewaschen und anschließend für 2 h bei Raumtemperatur in der frisch hergestellten Blockinglösung (3.3.4.5) inkubiert. Diese enthielt unter anderem Eseserum zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen sowie Triton-X, welches die Zellen permeabilisiert. Nun wurde die gewünschte Primärantikörperlösung in entsprechender Konzentration dem Gewebe zugesetzt (Tabelle 1). Dafür wurden die Objektträger mit dem Gewebe nach unten auf eine schmale Plexiglasplatte gelegt, welche an den Rändern eine leichte Erhöhung aufwies. Es wurden jeweils 200 µl der Primärantikörperlösung an den Rand des Objektträgers gegeben, sodass sich diese mittels Kapillareffekt zwischen Gewebe und Plexiglas ziehen konnte. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Objektträger erneut in PB gewaschen und mit der Sekundärantikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang mit PB wurden die Gewebe mit DAPI angefärbt. Die Schnitte wurden für 5 min in DAPI-Lösung (3.3.4.8) inkubiert, gewaschen und in Hydromount® (Biozym, Oldendorf, Deutschland) eingebettet. Bei den Versuchen zur Claudin-Markierung wurde ein gebrauchsfertiges Einbettmedium mit DAPI verwendet (RotiFluo with DAPI, Roth). Parallel zu jedem Versuch wurden Negativkontrollen mit angelegt, denen kein Primärantikörper zugesetzt wurde. Dies diente als interne Kontrolle, um mögliche unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen.

3.10.6 Protokoll für die indirekte Immunfluoreszenz von Zellen

Um eine Aktivierung von Caspase 3 – und somit eine Apoptose – durch Zytokine nachzuweisen, wurde die Mastzell-äquivalente Zelllinie RBL-2H3 über drei Tage mit und ohne Zytokinmix in Vier-Well-Platten inkubiert. Nachdem das Medium abgenommen wurde, wurden die Zellen dreimal mit PBS für je 5 min gewaschen und anschließend mit kalter PFA-Lösung (4 %, w/v) für mindestens 15 min im Kühlschrank fixiert. Alle weiteren Waschschrte fanden mit PBS-T-Lösung statt, welche 0,1 % (v/v) Triton-X enthielt. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 5 min wurden die Zellen mit Blockinglösung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die entsprechende Primärantikörperlösung (Tabelle 1) auf jedes Präparat gegeben und für 24 h bei 4 °C inkubiert. Parallel dazu wurden Negativkontrollen mit angefertigt, welche lediglich die Blockinglösung ohne Primärantikörper erhielten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für je 5 min wurden die Schnitte mit der Sekundärantikörperlösung für 2 h bei Raumtemperatur gelagert. Die Präparate wurden erneut gewaschen (dreimal für je 5 min), mit der DAPI-Lösung für weitere 5 min inkubiert und nach einem weiteren Waschschrte mit Hydromount (Biozym) eingebettet. Bis zum Mikroskopieren wurden die Objektträger bei 4 °C gelagert.

3.10.7 Mikroskopie

Alle mittels Immunfluoreszenz angefärbten Gewebeschnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Eclipse 80i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) begutachtet. Dabei wurden die verwendeten Sekundärantikörper mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen der verschiedenen Sekundärantikörper sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Sekundär-antikörper	Anregungs-wellenlänge	Emissions-wellenlänge	Farbliche Darstellung
Cy3	510 - 530 nm	630 - 660 nm	Rot
Alexa488	450 - 490 nm	510 - 530 nm	Grün
DAPI	358 nm	461 nm	Blau

Tabelle 2. Übersicht über die Anregungs- und Emissionswellenlänge der Sekundärantikörper.

Alle Bilder wurden mit einer Schwarz-Weiß-Kamera (s/w Camera Digital Slight DS 2 M Bwc; Nikon) aufgenommen. Anschließend wurde mit der Software NIS-Elements 2.30 (Nikon) jeder Emissionswellenlänge eine Farbe zugeordnet, um ein farbiges Bild zu erhalten. Für jedes Bild wurden die Farbkanäle jeweils einzeln und als Overlay dargestellt und abgespeichert. Um die Mastzellanzahl (c-Kit-positive Zellen) zu bestimmen, wurden die Gewebeschnitte von Jejunum und distalem Kolon als Serie aufgenommen, d. h. ein kompletter Gewebeschnitt bestand aus aufeinander folgenden Bildern (20fache Vergrößerung, s. Abb. 19). Um Aussagen über die Mastzellanzahl bezogen auf die Fläche des Gewebeschnittes zu treffen, wurden sowohl mukosale als auch submuköse c-Kit-positive Zellen ausgezählt, die Fläche des Gewebeschnittes vermessen und zuletzt die Mastzellanzahl pro mm² Fläche errechnet. Das Auszählen erfolgte durch einen unabhängigen Beobachter, der bezüglich der Zuordnung der Gewebeschnitte zu den einzelnen Versuchsgruppen verblindet war.

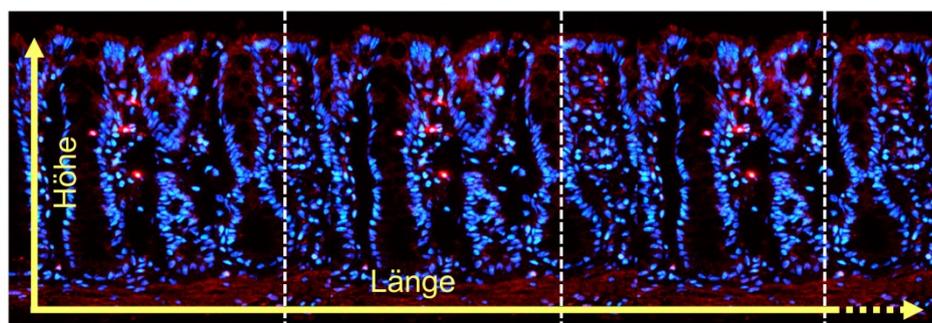


Abb. 19. Prinzip zur Bestimmung der Mastzellanzahl pro mm².

Um die Intensität mit Claudin-Antikörper zu quantifizieren, wurde die Signalstärke mittels ImageJ (Version 1.50i; <http://rsbweb.nih.gov/ij>) pro Epithelzelle geblindet morphometrisch bestimmt, d. h. jeder Graustufe wurde ein bestimmter Wert zugeordnet (Abb. 20). Dabei wurde während der Durchführung der Immunfluoreszenz darauf geachtet, dass Schnitte aus allen drei Gruppen (Kontrolle, OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis) parallel angefärbt wurden und dass für jeden Claudin-Antikörper dieselbe Belichtung und Verstärkung beim Erstellen der Bilder verwendet wurde.

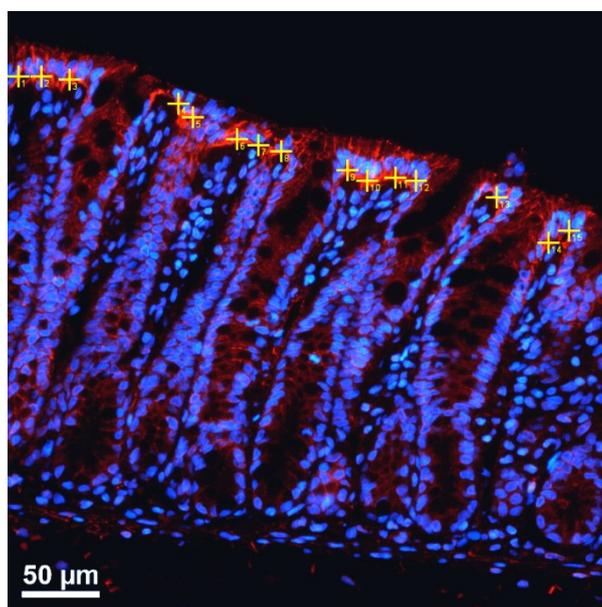


Abb. 20. Beispielbild einer morphometrischen Bestimmung der Intensität von Claudin-3-positiven Epithelzellen (rot dargestellt) im distalen Kolon von sensibilisierten Tieren. Jeder Epithelzelle wurde ein bestimmter Grauwert zugeordnet (dargestellt als gelbe Kreuze).

3.11 Toluidinblau-Färbung

3.11.1 Prinzip

Toluidinblau zählt zu den basischen Thiazinfarbstoffen mit der Eigenschaft bestimmte Gewebeteile metachromatisch anzufärben. Unter einer Metachromasie versteht man ein Abweichen des Farbtons des angefärbten Präparats von dem Farbton der verwendeten Färbelösung. So können z. B. Muzine, Granula und Kernchromatin eine rotviolette Färbung aufweisen nach Inkubation mit dem dunkelblauen Farbstoff Toluidinblau. Dies macht man sich unter anderem bei der Darstellung von Mastzellen zunutze, da diese Granula enthalten, welche sich im leicht sauren Milieu rotviolett anfärben (Mulisch und Welsch 2015).

3.11.2 Durchführung der Färbung

Parallel zur indirekten Immunfluoreszenz mit c-Kit wurden Gewebeschnitte mit Toluidinblau angefärbt. Dafür wurde eine gebrauchsfertige 1 % (w/v) Toluidinblaulösung verwendet, welche mit $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH auf einen pH von 4,5 eingestellt wurde. Die Schnitte (3.10.4) wurden auf Objektträgern fixiert (Superfrost® Plus, Thermo Fisher Scientific) und dreimal für je 5 min in Phosphatpuffer rehydriert. Anschließend wurden diese für 1 h in der Toluidinblaulösung inkubiert. Die Objektträger wurden für einige Sekunden in 96 % (v/v) Ethanol (angesäuert mit 2 - 3 Tropfen Eisessig auf 100 ml) geschwenkt bis sich keine Farbe mehr ablöste. Zuletzt wurden die Schnitte für einige Sekunden in 100 % Isopropanol geschwenkt, in Roti-Histol (Roth) eingebettet und mit einem Deckgläschen versehen.

Für die Darstellung der intestinalen Mastzellen im distalen Kolon und Jejunum wurden Serienschnitte angelegt, d. h. abwechselnd wurde je ein Schnitt für die Mastzellfärbung mit Toluidinblau oder mit dem c-Kit-Primärantikörper verwendet. Ziel dabei war es eine möglichst genaue Aussage über die Mastzellanzahl im distalen Kolon bzw. Jejunum sowie über den Granulagehalt der Mastzellen zu treffen.

3.12 Western Blot

3.12.1 Grundlagen

Um die verwendeten Antikörper der Immunhistochemie zu validieren, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dabei werden die zuvor extrahierten Proteine, die in denaturierter Form vorliegen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine spezielle Membran (hier: Nitrocellulose-Membran) übertragen. Mit einer anschließenden indirekten Immunfluoreszenz können diese dann detektiert werden (Luttmann et al. 2014). Zunächst werden die extrahierten Proteine mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Detergens SDS verhindert ein Zurückfallen der denaturierten Proteine in ihre Sekundär- und Tertiärstruktur und ermöglicht eine gleichmäßige Ladungsverteilung der Proteine (Reinard 2018). Diese können aufgrund ihrer negativen Ladung in bestimmten Acrylamidgelen so aufgetrennt werden, dass sie abhängig von ihrem Molekulargewicht unterschiedlich weit in den Gelen in Richtung Anode „wandern“. Dabei bestimmt der Grad der Vernetzung des Polyacrylamids im Gel (also die Acrylamidkonzentration) in welchem Molekulargewichtsbereich die Proteine aufgetrennt werden. Im nächsten Schritt, dem sogenannten „Blotting“, werden die aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine absorbierende Membran übertragen und somit immobilisiert; dies erfolgt durch das Anlegen eines elektrischen Feldes. Anschließend können die Proteinbanden mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert werden (Prinzip s. 3.10.1). Dabei ist jedoch der sekundäre Antikörper an ein Enzym gekoppelt (hier Meerrettichperoxidase; HRP = horseradish peroxidase). Dieses kann durch ein weiteres Substrat mit chemilumineszenten Eigenschaften detektiert werden. Im Anschluss sollte die Membran möglichst zeitnah fotografiert werden, um einen Signalverlust zu vermeiden (s. auch Reinard 2018).

3.12.2 Proteinextraktion

Zur Aufbereitung von Proteinen aus Gewebe wurde das NucleoSpin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Zunächst wurden Mukosa-Präparationen durch Ablation der übrigen Schichten aus dem distalen Kolon von unbehandelten Kontrolltieren hergestellt (s. auch 3.6.1). Dafür wurden ca. 30 mg Mukosa pro Tier in ein Tube mit Metallkugel (\varnothing 5 mm) abgewogen und kurzzeitig auf Trockeneis gelagert. Die Gewebe wurden mit je 700 μ l RP1 Puffer bedeckt, dem das Reduktionsmittel Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP; Macherey-Nagel) in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zugesetzt wurde. Zur mechanischen Zerkleinerung wurden die Proben für 1 min bei 30 Hz in eine Schwingmühle (MM301; Retsch, Haan, Deutschland) verbracht. Die folgenden Schritte wurden analog zum Protokoll des Herstellers durchgeführt (s. User manual, NucleoSpin RNA/Protein Kit, Macherey-Nagel), jedoch wurde abweichend vom Herstellerprotokoll mit jeweils 500 μ l Proteinlösung weitergearbeitet. Die extrahierten Proteine wurden in PSB-TCEP (Protein Solving Buffer mit TCEP versetzt; Macherey-Nagel) gelöst und bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Bevor mit dem Western Blot begonnen wurde, wurde die extrahierte Proteinmenge mittels Nanodrop (Version 2.0, Implen, München, Deutschland) photometrisch bestimmt.

3.12.3 Durchführung des Western Blots

Zur Durchführung des Western Blots wurde die Gelkammer entsprechend zusammengesetzt, in eine Gießvorrichtung eingebaut und das frisch angefertigte Trenngel gegossen. Isopropanol wurde zur Begradigung der Oberfläche auf das Trenngel gegeben. Nach dessen Polymerisation (Dauer ca. 1,5 - 2 h) wurde das Isopropanol mittels Filterpapier entfernt und das ebenfalls frisch angesetzte Sammelgel konnte in die Gelkammer gefüllt werden. Ein Gelkamm wurde eingesetzt und nach erfolgreicher Polymerisation (Dauer ca. 0,5 h) wurden die Gele in die entsprechende Vorrichtung für die Elektrophorese eingebaut und mit Laufpuffer befüllt. Die Gelslots wurden mit je 100 μ l Laufpuffer vorsichtig gespült um mögliche

Gelreste zu entfernen. Alle Proteinproben wurden mit PSB-TCEP so verdünnt, sodass eine einheitliche Menge von 20 µg pro Slot zugegeben werden konnte. Zusätzlich wurden 4 µl Precision Plus Protein Western C Standards in einen Slot pipettiert. Dieser Marker wurde als Leiter verwendet, um die Größe der Banden später zuzuordnen. Nun wurde die Gelelektrophorese gestartet, bei der die Proteinproben erst für 30 min bei 80 V und anschließend für 120 min bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt wurden (Biorad Power-Supply, Biorad).

Als nächster Schritt wurden die Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porengröße, Biorad) übertragen. Dafür wurden die Nitrocellulosemembran sowie das Blotting-Paper auf die entsprechende Gelgröße zugeschnitten und für 30 min – ebenso wie das Gel für 15 min – in Transfer-Puffer inkubiert. Anschließend wurden diese, wie Abb. 21 zu entnehmen, aufeinander geschichtet und die Proteine konnten auf die Nitrocellulosemembran bei 15 V für 60 min transferiert werden (Biorad Power-Supply; $3 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$, entspricht 135 mA pro Gel).

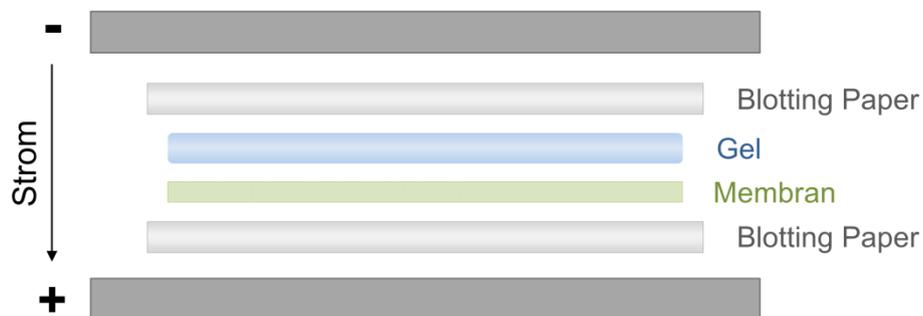


Abb. 21. Aufbau eines Blots.

Für die Immunodetektion wurde die geblottete Nitrocellulosemembran dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur mit Blockinglösung (TBS-T mit 10 % (w/v) Magermilchpulver) benetzt. Die Membran wurde mit der Primärantikörperlösung für ca. 72 h inkubiert. Dabei wurden alle Claudin-Antikörper (Cldn-1, -3, -4, -8) sowie der c-Kit-Antikörper mit TBS-T-Puffer verdünnt (Verdünnungsreihe bis 1:100), welchem 5 % (w/v) Magermilchpulver zugesetzt

wurde. Nach Inkubation mit der Primärantikörperlösung wurde die Nitrocellulosemembran dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper HRP-donkey-anti-rabbit IgG (1:2000) erfolgte für 2 h. Um den Marker später auf der Membran sichtbar zu machen, erfolgte zeitgleich die Inkubation mit StrepTactin-HRP (1:5000). Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBS-T wurde die Membran mit Clarity Western EBL Substrat-Kit (Biorad) für weitere 5 min inkubiert. Dabei mussten nach Herstellerangaben die beiden Bestandteile (Luminol Enhancer und Peroxid Puffer) zunächst im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt werden, um eine Chemilumineszenz der Proteinbanden zu gewährleisten.

3.12.4 Auswertung und Ergebnisse des Western Blots

Um die Chemilumineszenz der angefärbten Proteinbanden darzustellen, wurde der Molecular Imager Biorad Chemi-Doc XRS (Biorad) mit der dazugehörigen Software verwendet (Belichtungszeit 300 ms).

Alle verwendeten Claudin-Antikörper (Claudin-3, -4, -8) – mit Ausnahme von Claudin-1 – zeigten ein positives Ergebnis nach Durchführung des Western Blots. Für Claudin-3 und -4 wurde eine Bande entsprechend der bekannten Molekülgröße bei ~ 23 kDa beobachtet; für Claudin-8 bei ~ 27 kDa (Daten nicht gezeigt). Für Claudin-1 konnte – ebenso wie in der indirekten Immunfluoreszenz – kein positives Signal ermittelt werden. Ebenfalls zeigte sich nach Inkubation mit dem c-Kit-Antikörper keine positive Bande im Western Blot. Letzteres ist wahrscheinlich auf die geringe Mastzellanzahl unter physiologischen Bedingungen im Verhältnis zu den anderen Zellen im verwendeten Proteinisolat zurückzuführen.

3.13 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

3.13.1 Prinzip der qPCR

Das Grundprinzip der PCR beruht auf dem Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz, die nur in einem speziellen Gen vorkommt. Der Unterschied zwischen konventioneller und Echt-Zeit-PCR besteht darin, dass bei letzterer die Fluoreszenzintensität mittels einer sequenzspezifischen Sonde (hier: TaqMan) in Echtzeit die proportional dazu entstandene Menge der spezifischen DNA-Sequenz nachweist. Um eine spezifische DNA-Sequenz messen zu können, müssen zuvor 3 Schritte passieren: Denaturierung der DNA, Anlagerung (Annealing) der Primer und Verlängerung (Elongation) der spezifischen DNA-Sequenz (Ableitner 2014).

Der DNA-Doppelstrang kann durch Denaturierung voneinander getrennt werden, sodass zwei komplementäre Einzelstränge entstehen (5'-Ende → 3'-Ende sowie komplementär dazu 3'-Ende → 5'-Ende). Dies wird durch Erhitzen auf 95 °C bewirkt und stellt den ersten Schritt der PCR dar (Abb. 22). Im nächsten Schritt können sich die Primer, deren Basen komplementär zur spezifischen Zielsequenz sind, an die Einzelstränge anlagern. Falls die spezifische Zielsequenz nicht vorhanden ist, kommt es zu einem negativen PCR-Ergebnis. Ebenso lagert sich in diesem Schritt die sequenzspezifische TaqMan-Sonde an die Zielsequenz des 3' → 5' Strangs an, welche aus einem einzelsträngigen Oligonukleotid mit Reporter-Farbstoff am Anfang und Quencher-Molekül am Ende besteht. Dabei wird an der intakten TaqMan-Sonde das Fluoreszenzsignal des Reporters durch den Quencher unterdrückt. Wird nun der DNA-Einzelstrang (komplementär zur Zielsequenz) mittels Taq-Polymerase und Nukleotiden in Richtung 5' → 3' verlängert, so zerschneidet die Taq-Polymerase die TaqMan-Sonde, sodass der Reporter-Farbstoff getrennt wird und die erhöhte Fluoreszenz gemessen werden kann (Abb. 22).

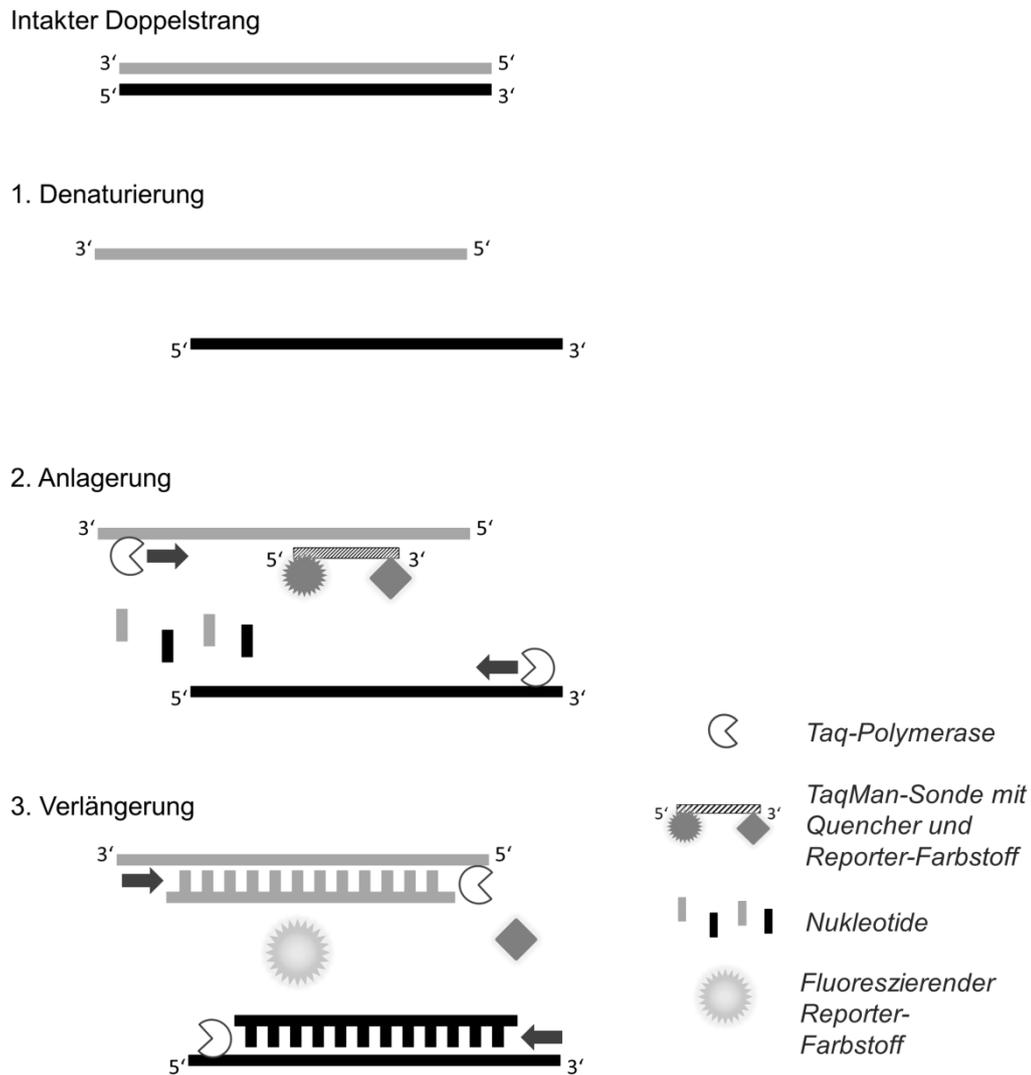


Abb. 22. Prinzip der qPCR mittels TaqMan-Sonde (modifiziert nach Ableitner 2014).

Diese Fluoreszenz wird einmal pro Zyklus gemessen und steigt bei erfolgreicher Vervielfältigung der PCR-Produkte an. Dies kann mittels StepOne Plus Software in Echtzeit anhand eines sigmoidalen Kurvenverlaufs für jede einzelne Probe beobachtet werden (Abb. 23). Zu Beginn wird nur die Hintergrundfluoreszenz gemessen, bis genügend Reporter-Farbstoffe freigesetzt werden und ein Schwellenwert überschritten wird. Dieser Schwellenwert wird „Cycle Threshold“ (C_T -Wert) genannt und dient zur späteren Auswertung der relativen Expression (s. 3.13.7). Der sigmoidale Anstieg der Kurve erreicht letztendlich ein Plateau, entweder durch den Verbrauch der Nukleotide oder durch nachlassende Enzymaktivität (Ableitner 2014).

Für die praktische Durchführung der qPCR, wie z. B. zur Validierung der Integrität des Ausgangsmaterials oder der Bestimmung der Referenzgene, bestehen sogenannte MIQE-Richtlinien (Bustin et al. 2009), die im Folgenden beachtet wurden.

3.13.2 Isolation der RNA

Für die RNA-Isolation wurden Kolon- und Jejunumsegmente von Kontrolltieren sowie Versuchstieren entnommen. Dabei wurden, wie in 3.6.1 beschrieben, die Tunica muscularis sowie die Serosa vom distalen Kolon entfernt. Zur Stabilisierung der DNA und RNA wurden alle Gewebe in RNAlater (Qiagen, Hilden, Deutschland) überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Um die DNA und RNA aufzuschließen, wurden jeweils 30 mg der Gewebe in ein 2-ml-Tube gegeben, welches eine Metallkugel (Ø 5 mm) sowie 350 µl Lysis Puffer (Macherey-Nagel) enthielt. Anschließend wurden die Proben mit einer Schwingmühle (MM301; Retsch) für 2 min bei 30 Hz zerkleinert bis ein trübes Homogenisat entstanden war. Nach 1-minütiger Zentrifugation wurden die Proben mittels Nucleo Spin RNA Plus kit (Machery-Nagel) aufbereitet, welches gleichzeitig eventuell vorhandene genomische DNA entfernt. Die Menge, Reinheit (OD260/280) sowie mögliche Kontaminationen der aufbereiteten RNA wurden mittels Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific) photometrisch bestimmt. Dabei wurden Proben, welche eine zu geringe Menge an RNA oder Verunreinigungen aufwiesen oder deren OD260/280-Werte außerhalb des Referenzbereichs (1,8 - 2,0) lagen, nicht für die weitere cDNA-Synthese verwendet. Um eine annähernd vergleichbare Menge an RNA (und später somit auch an cDNA) in jeder Probe zu gewährleisten, wurden alle RNA-Proben auf eine Konzentration von 250 ng/µl gebracht ("gelevelt"), indem diese mit der entsprechenden Menge an RNase-freiem Wasser versetzt wurden.

3.13.3 Bestimmung der RNA-Integrität mittels Gelelektrophorese

Da das Nanodrop One lediglich Aussagen über die Menge und Reinheit der RNA erlaubt, jedoch nicht über deren Qualität, wurde diese mittels Gelelektrophorese

zusätzlich bestimmt. Dafür wurde ein 1 % (w/v) Agarosegel hergestellt, indem 1 g Standardagarose in TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (1X) gelöst wurde. Die Lösung wurde so lange in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Um ein späteres Erkennen der Banden unter UV-Licht zu gewährleisten, wurde der Fluoreszenzfarbstoff GelRed (10.000X in water, Biotium) der Lösung zugegeben (2 µl GelRed auf 125 ml Agarosegel). Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer (1X) übergossen, welcher als Laufpuffer diente. Jeweils 10 µl jeder Probe (Zusammensetzung s. Tabelle 3) wurden nun in die Slots pipettiert.

Komponenten	Volumen
Loading Dye	1,6 µl
RNA	1 µl
RNAse-freies Wasser	8,4 µl
Gesamtvolumen	11 µl

Tabelle 3. Zusammensetzung einer Probe zur Bestimmung der RNA-Integrität.

Um die Banden später zuordnen zu können, wurde jeweils links und rechts eine 1-kbp-DNA-Leiter (Roth) in einen Slot gegeben. Es wurde eine Spannung angelegt (100 V, Stromfluss 150 mA, Dauer 1,5 h), sodass die RNA-Proben elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Zur Darstellung der Banden wurde das Gel aus der Halterung entnommen, unter UV-Licht gelegt und fotografiert. Proben, bei denen keine klaren Banden erkennbar waren, wurden verworfen. Die Proben, welche zwei deutlich abgrenzbare Banden (entsprechen den beiden unterschiedlich großen ribosomalen Untereinheiten) aufwiesen, wurden zur weiteren cDNA-Synthese verwendet (Daten nicht gezeigt).

3.13.4 cDNA-Synthese

Es wurde eine reverse Transkription durchgeführt, um aus der RNA einzelsträngige cDNA zu erhalten, welche komplementär zu dieser ist. Dafür wurde das High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Dieses enthält einen RT-Puffer (2X) sowie einen RT-Enzymmix (20X), zu denen die gelevelte RNA und RNase-freies Wasser zugesetzt wurden (Tabelle 4).

Komponenten	Volumen
2X RT-Puffer	10 µl
20X RT-Enzymmix	1 µl
Gelevelte RNA (250 ng/µl)	1 µl
RNase-freies Wasser	8 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 4. Zusammensetzung einer Probe für die reverse Transkription.

Durch kurzes Vortexen jeder Probe mit anschließender Zentrifugation konnte eine sorgfältige Durchmischung der Proben gewährleistet werden. Die cDNA jeder Probe wurde im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) mit folgenden Einstellungen synthetisiert (s. Tabelle 5). Dabei wurde darauf geachtet, dass auf jeder Platte zwei Negativkontrollen mit aufgebracht waren, welche keine RNA enthielten (das fehlende Volumen wurde durch die entsprechende Menge an RNase-freiem Wasser ersetzt).

	Temperatur	Dauer
Schritt 1	37 °C	60 min
Schritt 2	95 °C	5 min
Schritt 3	4 °C	∞

Tabelle 5. Programmbedingungen des Cyclers für die reverse Transkription.

Zur Bestimmung der passenden Referenzgene (s. 3.13.5) sowie für die gewünschten Primer (Tabelle 7) wurde die synthetisierte cDNA anschließend noch 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Diese zeigte nach Anlegen einer Verdünnungsreihe (1:5, 1:10, 1:20, 1:50) das beste Resultat (Daten nicht gezeigt).

3.13.5 Bestimmung der Referenzgene und Normalisierung

Um die relative Menge der entsprechenden mRNA zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen zu bestimmen, wurden für jedes Gewebe (distales Kolon, Jejunum) zwei Referenzgene ausgewählt, die in allen 3 Gruppen (Kontrolle, OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis) stabil exprimiert wurden. Dafür wurden sogenannte Custom Plates (TaqMan Array Fast Plates, Thermo Fisher Scientific) verwendet, welche mit 16 verschiedenen, rattenspezifischen Referenzgenen bestückt waren. Gemäß des Herstellerprotokolls wurden je 10 µl eines Gemisches aus TaqMan Gene Expression MasterMix, RNase-freiem Wasser und cDNA der verschiedenen Gruppen (n = 3 bzw. 6) auf die Platten gegeben und mittels Cycler StepOne Plus (Applied Biosystems) mit den Einstellungen aus Tabelle 6 und einer Wiederholung von 40 Zyklen amplifiziert.

	Temperatur	Dauer
Schritt 1	50 °C	2 min
Schritt 2	95 °C	10 min
Schritt 3	95 °C	15 s
Schritt 4	60 °C	1 min

Tabelle 6. Programmbedingungen des Cyclers für die qPCR.

Die Auswertung der passenden Referenzgene erfolgte mittels NormFinder (MOMA, Dänemark, Andersen et al. 2004), welches anhand von Algorithmen die am stabilsten exprimierten Referenzgene unter Einbezug der intra- und intergruppenspezifischen Varianzen bestimmt. Für das distale Kolon wurden so Gapdh und B2m und für das Jejunum Ppia und Rplp2 ausgewählt.

3.13.6 Durchführung der qPCR

Die relative Expression verschiedener Zielsequenzen sollte sowohl als Vergleich zwischen den Gruppen Kontrolle und OVA-sensibilisiert sowie Kontrolle und OVA+Kolitis bestimmt werden. Anhand der Immunfluoreszenzdaten wurden Primer für drei verschiedene Mastzellproteasen (zwei Trypsase-Untereinheiten, Chymase) sowie für zwei verschiedene Tight Junction Proteine (Claudin-3 und -4) ausgewählt (Tabelle 7).

Zielgen	Assay-ID	Gene accession number
rMCPT-2	Rn00756479_g1	NM_172044.1
Tpsb2 (= rMCPT-6)	Rn00569857_g1	NM_019180.2
Tpsab1 (= rMCPT-7)	Rn00570928_m1	NM_019322.2
Cldn3	Rn01499274_s1	NM_031700.2
Cldn4	Rn01196224_s1	NM_001012022.1
Gapdh	Rn99999916_s1	NM_017008.4
B2m	Rn00560865_m1	NM_012512.2
Ppia	Rn00690933_m1	NM_017101.1
Rplp2	Rn01479927_g1	NM_001030021.1

Tabelle 7. Übersicht der verwendeten Primer für die qPCR.

Für jede Probe wurde nun eine Lösung angesetzt – wie aus Tabelle 8 zu entnehmen – und als Dreifachansatz in die Reaktionsplatte pipettiert. Diese wurde mit einem Mikrofilm (Thermo Fisher Scientific) verschlossen und in den StepOne Plus Cycler gestellt. Um eine gleichmäßige Verteilung der Substanzen zu gewährleisten, wurden alle Proben mittels Vortexer kurz durchmischt und anschließend zentrifugiert (Tischzentrifuge). Ebenso wurde die versiegelte Reaktionsplatte mittels Plattenzentrifuge für 1 min zentrifugiert.

Komponenten	Volumen
TaqMan Gene Expression MasterMix	5 μ l
Primer	0,5 μ l
RNAse-freies Wasser	3,5 μ l
cDNA (1:10)	1 μ l
Gesamtvolumen	10 μl

Tabelle 8. Zusammensetzung jeder Probe zur Quantifizierung der jeweiligen Primer.

Für jede Reaktionsplatte wurden sowohl Kontrollproben als auch Proben beider Versuchsgruppen verwendet, um eventuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Platten zu minimieren. Zudem wurde für jeden verwendeten Primer eine interne Kontrollprobe mit angelegt, die keine cDNA enthielt. Hier wurde das entsprechende Volumen durch RNAse-freies Wasser ersetzt. Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit wurde jeder Versuch noch ein weiteres Mal wiederholt. Die Cycling-Einstellungen des StepOne Plus sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

3.13.7 Auswertung der qPCR-Ergebnisse

Nach erfolgreicher Vervielfältigung der spezifischen Zielsequenz entsteht ein sigmoidaler Kurvenverlauf, wie schematisch in Abb. 23 gezeigt.

Der C_T -Wert beschreibt dabei den Zeitpunkt, an dem der Schwellenwert überschritten und genügend Reporter-Farbstoff freigesetzt wird (was mit einer ansteigenden Fluoreszenz einhergeht). Die Steigung der Kurve bestimmt die Effizienz, mit der jede Probe pro Zyklus vervielfältigt wird, und sollte im Idealfall zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Das heißt mit einer Effizienz von 2,0 würde sich die DNA-Menge pro Zyklus theoretisch verdoppeln.

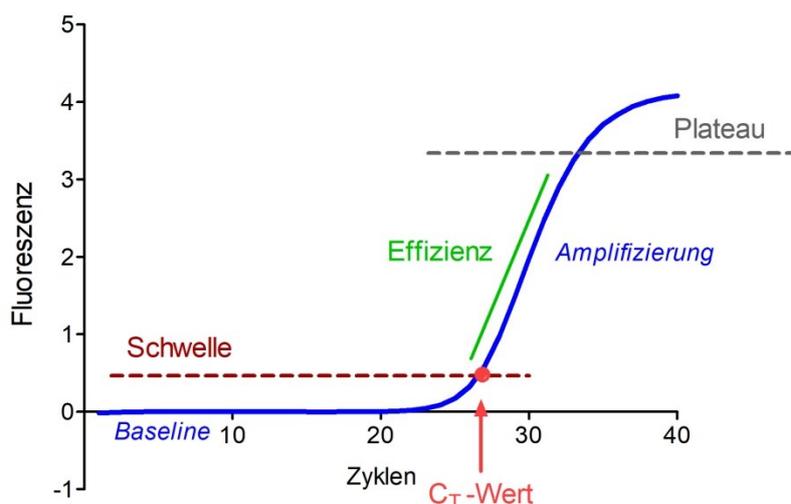


Abb. 23. Prinzip der Vervielfältigung bei der qPCR anhand einer Beispielkurve.

Zur Auswertung der qPCR-Daten wurde zunächst die Software LinRegPCR (<http://www.hartfaalcentrum.nl>, Karlen et al. 2007) eingesetzt, welche die exakte Effizienz jeder einzelnen Probe anhand einer linearer Regression berechnet. Dafür wurden die nicht-Baseline-korrigierten C_T -Werte importiert, welche einer individuellen Baseline-Korrektur unterzogen wurden (in Abhängigkeit vom verwendeten Cycler). Nach der Effizienzberechnung jeder einzelnen Probe konnten die Baseline-korrigierten C_T -Werte innerhalb einer Primer-Gruppe miteinander verglichen werden. Mögliche Ausreißer, die mehr als 5 % von der gemittelten Effizienz des jeweiligen Primers abwichen, wurden eliminiert. Ebenso wurden Proben, die nicht amplifiziert wurden sowie das Plateau nicht vor Beenden des 40. Zyklus erreichten, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zur weiteren Auswertung wurden die Baseline-korrigierten C_T -Werte jeder Probe aus einem Dreifachansatz sowie die Effizienzen jedes Primers pro Gruppe gemittelt. Für die anschließende Analyse inklusive Statistik wurde die Software REST (2009) verwendet. Diese vergleicht die relative Expression der verwendeten Zielgene zu den gewebespezifischen Referenzgenen zwischen zwei Gruppen (Kontrolle - OVA-sensibilisiert; Kontrolle - OVA+Kolitis) und wendet dabei ein statistisches Verfahren an, den sogenannten Pair-Wised fixed Reallocation Randomization Test (Pfaffl et al. 2002).

4. Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) mit der Anzahl der untersuchten Zellen oder Gewebe (n) angegeben. Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde entweder ein ungepaarter t-Test oder Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (Signifikanzen dargestellt mit *). Welche der beiden Methoden angewandt wurde, wurde mittels F-Test entschieden. Um Maximalwerte gegen eine Baseline statistisch auszuwerten, wurde ein gepaarter t-Test gewählt (Signifikanzen dargestellt mit #). Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) durchgeführt, gefolgt von einem Fisher's Least Significant Difference (LSD) Post-hoc-Test. Der Abfall des I_{sc} nach Carbachol wurde entweder auf eine mono- oder eine biexponentielle Funktion mittels GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) nicht-linear gefittet. Die Qualität der Regression wurde mittels quadriertem nicht-linearen Regressionskoeffizient (r^2) festgestellt. Die qPCR-Ergebnisse wurden mittels REST Software (als Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test) statistisch ausgewertet. Um Häufigkeiten von Ereignissen in verschiedenen Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde ein Chi-Quadrat-Test angewandt (χ^2). $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt (Signifikanzen dargestellt mit * oder #).

5. Ergebnisse

5.1 Induktion einer Sensibilisierung und Kolitis im Tiermodell

Um die Frage zu klären, wie eine Kolitis-Induktion die durch eine Sensibilisierung verursachte Mastzellaktivität beeinflusst, wurden die Versuchstiere in zwei Gruppen aufgeteilt (s. Abb. 7, S. 27): in der ersten Gruppe wurden alle Ratten gegen Ovalbumin sensibilisiert (OVA-sensibilisiert); in der zweiten Gruppe wurde zusätzlich zur Sensibilisierung noch eine milde Kolitis induziert (OVA+Kolitis). Eine erfolgreiche Sensibilisierung in 100 % aller Ratten aus beiden Gruppen zeigte sich an einem Anstieg des Kurzschlussstroms (I_{sc}) nach Antigenkontakt durch Ovalbumin in der Ussing-Kammer (Abb. 25).

Die Versuchstiere, bei denen eine Kolitis an Tag 8 ausgelöst wurde, zeigten am darauffolgenden Tag einen transienten Gewichtsverlust ($-3,3 \pm 2 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$, $n = 12$) im Vergleich zu den sensibilisierten Tieren ohne Kolitis-Induktion ($4,6 \pm 0,9 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$, $n = 16$). Dieser wurde jedoch innerhalb weniger Tage wieder ausgeglichen (Abb. 24). Nach Euthanasie der Tiere und dem Eröffnen der Bauchhöhle zeigte sich eine geringfügige Dilatation des Kolons, welches zudem mit weicherem Kot gefüllt war, im Vergleich zu den Tieren, die nur gegen Ovalbumin sensibilisiert worden waren. Im Jejunum konnten adspektorisch keine Veränderungen festgestellt werden. In Ussing-Kammer-Versuchen kam es zu einer signifikanten Erhöhung der basalen Gewebeleitfähigkeit (G_t ; ein Maß für die intestinale Permeabilität) der Mukosa-Submukosa-Präparationen bei allen OVA+Kolitis-Tieren (Abb. 25) – als Resultat einer erfolgreich induzierten Kolitis (Sanchez de Medina et al. 2002). Aufgrund der begrenzten Menge an Gewebe, die von jedem Tier entnommen werden konnte, wurde im Fall der Kolitis-Gruppe auf eine histologische Überprüfung sowie eine Untersuchung der Myeloperoxidaseaktivität verzichtet, da dies bereits in einer früheren Studie aus unserem Labor für dieses Tiermodell detailliert durchgeführt wurde (Steidle et al. 2013).

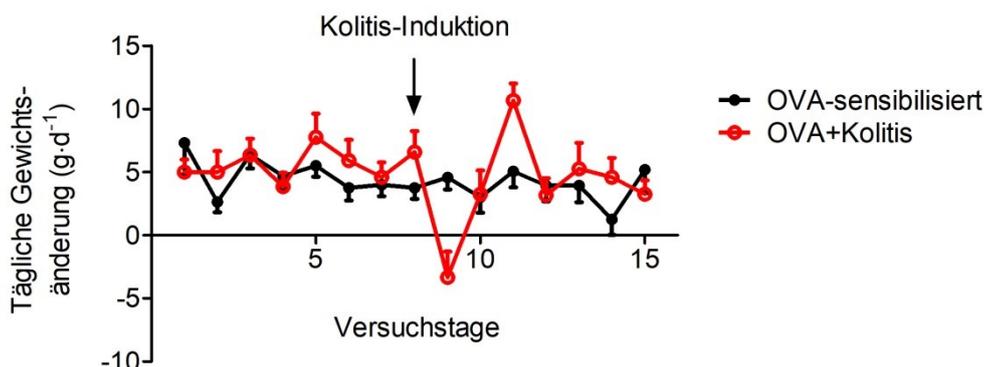


Abb. 24. Tägliche Körpergewichtsänderungen (in $\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$) der sensibilisierten Tiere (OVA-sensibilisiert, schwarze Linie; $n = 16$) sowie der sensibilisierten Tiere mit zusätzlicher Kolitis-Induktion (OVA+Kolitis, rote Linie; $n = 12$). Gegeben sind Mittelwerte + oder – SEM (zur besseren grafischen Darstellung).

5.2 Sensibilisierung und Kolitis beeinflussen die Anionensekretion und epitheliale Permeabilität

Wie sich eine vorherige Sensibilisierung \pm Kolitis auf die Sekretion und Permeabilität im distalen Kolon sowie Jejunum auswirkt, wurde in Ussing-Kammer-Versuchen untersucht. Die durch das Antigen Ovalbumin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mukosal und serosal) induzierte Mastzelldegranulation führte bei allen Versuchstieren zu einem signifikanten Anstieg der Anionensekretion (gemessen als Anstieg des I_{sc}). Dabei betrug das Maximum des I_{sc} im Jejunum $3,35 \pm 0,41 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($p < 0,05$ versus Baseline; $n = 8$) und im Kolon $5,71 \pm 1,02 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($p < 0,05$ versus Baseline; $n = 9$). Parallel dazu stieg auch die Gewebeleitfähigkeit (G_{t}) in beiden Geweben signifikant an (Abb. 25, Tabelle 9).

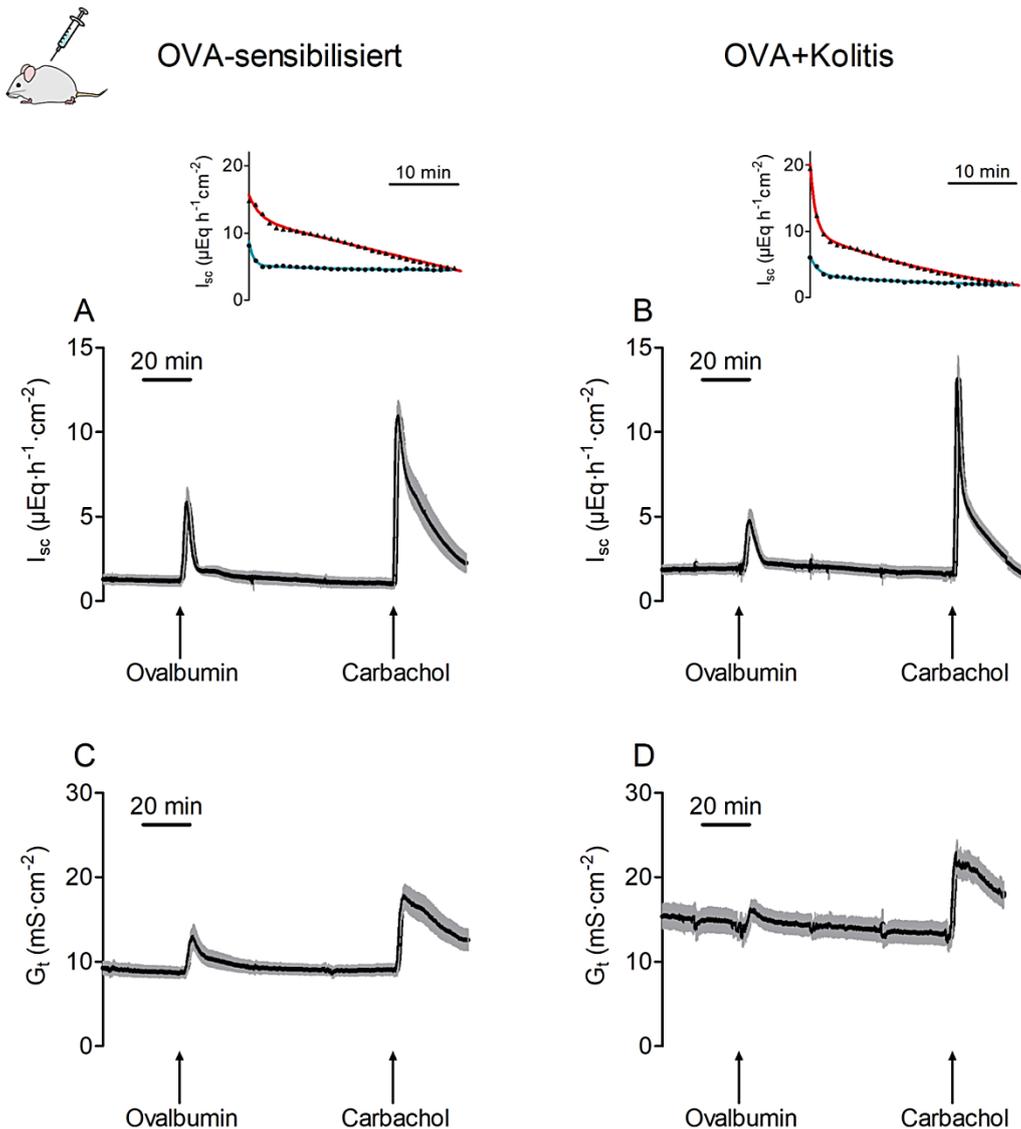


Abb. 25. Anstieg des I_{sc} (A, B) sowie der G_t (C, D) nach Zugabe von Ovalbumin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) auf der mukosalen und serosalen Seite des distalen Kolons von sensibilisierten Tieren ohne (OVA-sensibilisiert; A, C) und mit Induktion einer zusätzlichen Kolitis (OVA+Kolitis; B, D). Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, serosal) wurde als Vitalitätskontrolle am Ende jedes Versuchs verwendet. Die Daten sind als Mittelwerte (schwarze Linie) \pm SEM (grauer Bereich) dargestellt, $n = 8 - 11$. Der Inset zeigt den unterschiedlich schnellen Abfall der Carbachol-Antwort in den beiden Versuchsgruppen, dargestellt als Originalkurve im distalen Kolon (rote Linie) und Jejunum (blaue Linie). Die schwarzen Punkte der Insets spiegeln einen typischen Verlauf des I_{sc} wider (reduziert auf einen Datenpunkt pro Minute zur besseren grafischen Darstellung). Die farbigen Linien zeigen die Anpassung der Daten an eine exponentielle Funktion (für die Zeitkonstanten s. Tabelle 10).

Vergleicht man zunächst den basalen I_{sc} der beiden Gruppen, so zeigte sich eine leicht erhöhte Anionensekretion in der OVA+Kolitis-Gruppe im Vergleich zu den OVA-sensibilisierten Tieren (Tabelle 9). Parallel dazu stieg die basale G_t im distalen Kolon signifikant von $8,69 \pm 0,63 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 9$) in der OVA-Gruppe auf $14,13 \pm 1,25 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($p < 0,05$; $n = 11$) in der OVA+Kolitis-Gruppe (Tabelle 9). Im Jejunum blieben sowohl der basale I_{sc} als auch die basale G_t unverändert.

Durch die Zugabe des Antigens Ovalbumin und die dadurch hervorgerufene Mastzelldegranulation kam es zu einer Steigerung der Anionensekretion. So erreichte der I_{sc} ein Maximum von $5,71 \pm 1,02 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ in den Kolonsegmenten der OVA-sensibilisierten Tiere. Dieser Peak reduzierte sich um ca. 40 % nach zusätzlicher Induktion einer Kolitis, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 25, Tabelle 9).

Ähnliche Ergebnisse konnten im Jejunum beobachtet werden, wobei hier der Antigen-induzierte ΔI_{sc} in der OVA+Kolitis-Gruppe numerisch um ca. 30 % erniedrigt war. Diese Abnahme der Sekretion des Epithels unter Entzündungsbedingungen liegt jedoch nicht an einer generell verminderten Sekretionsleistung. Dies ist an den unveränderten (und sogar leicht erhöhten) I_{sc} -Werten in der OVA+Kolitis-Gruppe nach Zugabe des Ca^{2+} -abhängigen Sekretagogs Carbachol ($5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal) zu erkennen, welcher in allen Geweben zu einem signifikanten Anstieg des I_{sc} führte (Tabelle 9).

Ergebnisse

	OVA-Sensibilisierung	OVA+Kolitis
Distales Kolon	I_{sc} ($\mu Eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$)	
Baseline	1,20 ± 0,29	1,92 ± 0,32
ΔI_{sc} Ovalbumin	5,71 ± 1,02 [#]	3,44 ± 0,65 [#]
ΔI_{sc} Carbachol	11,11 ± 0,92 [#]	13,24 ± 1,20 [#]
	G_t ($mS \cdot cm^{-2}$)	
Baseline	8,69 ± 0,63	14,13 ± 1,25*
ΔI_{sc} Ovalbumin	4,10 ± 0,98 [#]	3,23 ± 0,49 [#]
ΔI_{sc} Carbachol	9,26 ± 0,85 [#]	10,94 ± 1,28 [#]
Jejunum	I_{sc} ($\mu Eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$)	
Baseline	1,64 ± 0,45	1,92 ± 0,51
ΔI_{sc} Ovalbumin	3,35 ± 0,41 [#]	2,28 ± 0,39 [#]
ΔI_{sc} Carbachol	1,51 ± 0,26 [#]	2,09 ± 0,31 [#]
	G_t ($mS \cdot cm^{-2}$)	
Baseline	32,20 ± 2,17	38,57 ± 3,45
ΔI_{sc} Ovalbumin	4,37 ± 0,91 [#]	6,26 ± 1,78 [#]
ΔI_{sc} Carbachol	8,39 ± 1,48 [#]	11,02 ± 3,32 [#]

Tabelle 9. I_{sc} und G_t des distalen Kolons (oberer Teil) und Jejunums (unterer Teil) nach Sensibilisierung (OVA-Sensibilisierung; mittlere Spalte) und zusätzlicher Induktion einer Kolitis (OVA+Kolitis; rechte Spalte). Dargestellt sind die Baselinewerte 5 min vor Zugabe von Ovalbumin sowie der maximale Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) oder der G_t (ΔG_t) induziert durch Ovalbumin ($100 \mu g \cdot ml^{-1}$, mukosal und serosal) oder Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} mol \cdot l^{-1}$, serosal). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, $n = 8 - 11$. * $p < 0,05$ (ungepaarter t-Test), [#] $p < 0,05$ (gepaarter t-Test).

Betrachtet man den Verlauf der Carbachol-Antwort genauer, so lässt sich feststellen, dass es in den beiden Versuchsgruppen zu einem unterschiedlich schnellen Abfall der Kurve auf Baseline-Niveau kommt (Inset in Abb. 25). Der Abfall des durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, serosal) induzierten I_{sc} gehorcht im distalen Kolon einer biexponentiellen Funktion mit einer schnellen (τ_{fast}) und einer langsamen (τ_{slow}) Zeitkonstante (s. auch Strabel und Diener 1995). Im Jejunum erfolgt dieser Abfall jedoch deutlich schneller und weist nur eine Zeitkomponente auf.

Bei genauerer Betrachtung des Kurvenabfalls fiel auf, dass die Carbachol-Antwort im Kolon bei den Kolitis-Tieren deutlich verkürzt war, was sich in einer signifikanten Verringerung von τ_{fast} äußerte. Im Jejunum hingegen war eine marginale Verlängerung der I_{sc} -Antwort, erkennbar als leichter Anstieg von τ_{fast} , zu sehen (Tabelle 10).

	Versuchsgruppe	τ_{fast} (min)	τ_{slow} (min)
Distales Kolon	OVA-sensibilisiert	$6,32 \pm 2,86$	$43,27 \pm 14,04$
	OVA+Kolitis	$0,93 \pm 0,08^*$	$35,69 \pm 12,34$
Jejunum	OVA-sensibilisiert	$0,82 \pm 0,09$	-
	OVA+Kolitis	$1,30 \pm 0,21^*$	-

Tabelle 10. Abfall des I_{sc} induziert durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, serosal), gefittet zu einer biexponentiellen Funktion mit schneller (τ_{fast}) und langsamer (τ_{slow}) Zeitkonstante im distalen Kolon und als monoexponentielle Funktion im Jejunum (s. Inset in Abb. 25). Der Regressionskoeffizient (r^2) für alle gefitteten Daten lag zwischen 0,70 und 0,99. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $n = 8 - 11$. * $p < 0,05$ versus den gleichen Parametern in der OVA-sensibilisierten Gruppe (ungepaarter t -Test).

Parallel zu den Ussing-Kammer-Versuchen wurden Fluxmessungen durchgeführt, bei denen Fluorescein (ein niedermolekularer Marker) verwendet wurde, um Aufschluss über den parazellulären Fluss zu erlangen. Die beiden ersten Perioden dienten als Kontrollwert, gegen den die übrigen Fluxraten nach Ovalbuminzugabe verglichen wurden. Nach Zugabe von Ovalbumin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, mukosal und serosal)

steigerte sich der Fluoresceinflux in der OVA+Kolitis-Gruppe im Jejunum von $1,67 \pm 0,87 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf ein Maximum von $2,90 \pm 0,73 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Abb. 26). Ähnlich verhielt es sich im Jejunum sensibilisierter Tiere, wobei hier ein maximaler Flux von $2,26 \pm 0,34 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ erreicht wurde. Im distalen Kolon blieb die Fluxrate in beiden Versuchsgruppen nach Ovalbuminzugabe ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mukosal und serosal) unverändert (Abb. 26). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den OVA-sensibilisierten Tieren und den OVA+Kolitis-Tieren festgestellt werden.

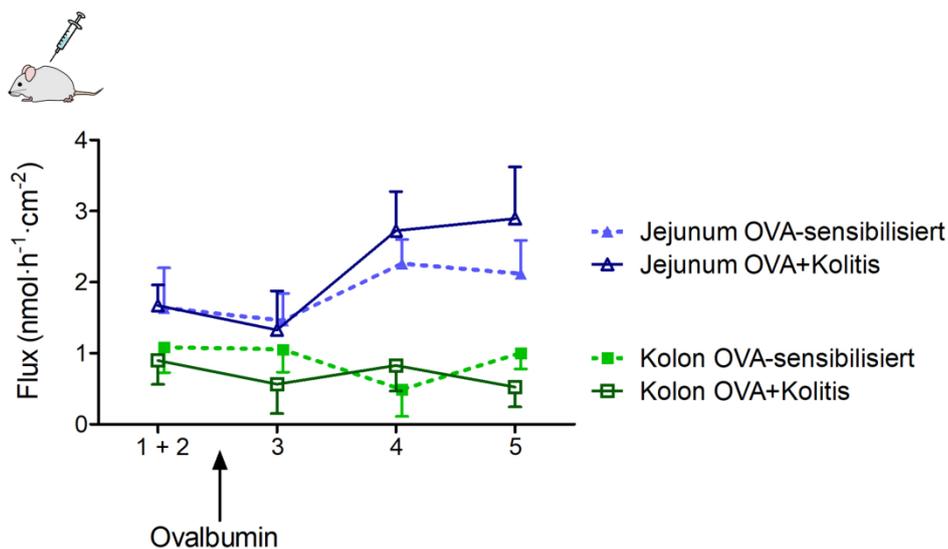


Abb. 26. Nach Stimulation des Gewebes mit Ovalbumin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mukosal und serosal) kommt es in beiden Versuchsgruppen zu einer gesteigerten Fluxrate (Fluoresceinflux von mukosal nach serosal) im Jejunum (blau), wohingegen die parazelluläre Permeabilität im Kolon (grün) unverändert bleibt. Die ersten zwei Fluxraten dienen als Kontrolle. Für eine bessere grafische Darstellung sind die Kurven leicht nach lateral versetzt und entweder nur + SEM oder – SEM angegeben. Die Daten werden dargestellt als Mittelwerte (Symbole) + oder – SEM, $n = 9 - 12$.

5.3 Detektion von Mastzellen

Inwieweit sich eine Sensibilisierung oder eine Sensibilisierung in Kombination mit Kolitis auf die intestinale Mastzellendichte im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren auswirkt, sollte als nächstes untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Färbetechniken angewendet, um Mastzellen in den Kolon- und Jejunumsegmenten darzustellen.

Zur Etablierung von geeigneten Antikörpern wurde Lungengewebe eingesetzt, in welchem mittels Tryptase-Antikörper pulmonale Mastzellen detektiert wurden. Jedoch gelang es nicht mit diesem Antikörper Mastzellen in der Wand des Dün- oder Dickdarms zu markieren. Das gleiche negative Resultat in intestinalen Gewebeproben wurde mit einem Histamin-Antikörper beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ein verlässliches Signal konnte erst erzielt werden, nachdem intestinale Mastzellen mit einem Antikörper markiert worden waren, welcher sich gegen den Oberflächenmarker c-Kit (auch CD117, SCF-Rezeptor) richtet (Walls und Amalinei 2014). Um eine mögliche Degranulation der intestinalen Mastzellen – verursacht durch die vorangegangene Sensibilisierung – auszuschließen bzw. zu bestätigen, wurden Serienschritte der fixierten Kolon- und Jejunumsegmente angelegt. Diese wurden abwechselnd entweder mit c-Kit oder Toluidinblau angefärbt. Dabei konnten jedoch nach Toluidinblau-Färbung nur vereinzelt mukosale und submuköse Mastzellen von Kontrolltieren metachromatisch dargestellt werden (Beispiel s. Abb. 27). Infolgedessen wurde für die Quantifizierung der intestinalen Mastzellen nur der c-Kit-Antikörper verwendet.

5.4 Segmentabhängige Unterschiede in der Mastzellanzahl

Zur quantitativen Auswertung wurden sowohl Kolon- als auch Jejunumsegmente von insgesamt drei verschiedenen Gruppen (Kontrolle, OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis)

mittels c-Kit-Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Dafür wurden alle c-Kit-positiven Zellen, welche außerhalb der Tunica muscularis lagen (um eine Verwechslung mit Cajal-Zellen zu vermeiden, die ebenfalls c-Kit an ihrer Oberfläche tragen), pro mm^2 quantifiziert. Die Mastzellendichte im Kolon betrug $10,2 \pm 1,0$ c-Kit-positiv Zellen pro mm^2 bei Kontrolltieren und verringerte sich um ca. 25 % in den beiden Versuchsgruppen, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 27). Ein anderes Bild konnte im Jejunum festgestellt werden: hier erhöhte sich die Mastzellanzahl signifikant um ca. 230 % nach OVA-Sensibilisierung ($12,73 \pm 1,51$ mm^{-2} ; $n = 9$ Schnitte) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($3,87 \pm 0,48$ mm^{-2} ; $n = 9$ Schnitte; $p < 0,05$). Nach zusätzlicher Kolitis-Induktion verringerte sich die Mastzellendichte geringfügig auf $11,86 \pm 0,98$ mm^{-2} ($n = 9$) im Vergleich zu den OVA-sensibilisierten Tieren (Abb. 27).

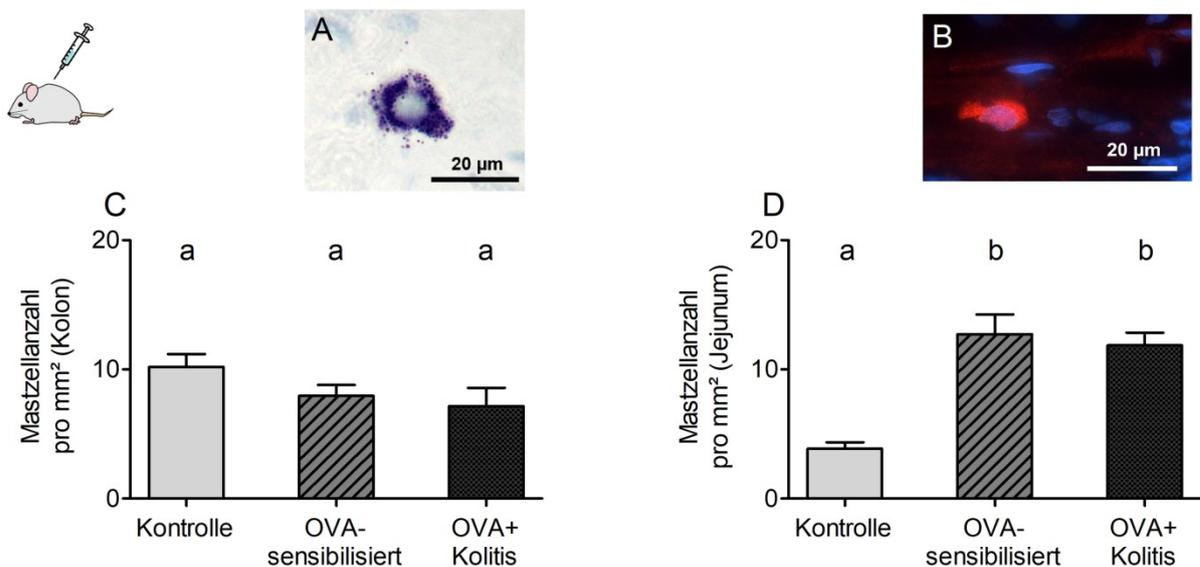


Abb. 27. Beispielbilder einer mit Toluidinblau gefärbten (A; Kontrolltier) und c-Kit gefärbten (B; OVA-sensibilisiert) intestinalen Mastzelle. Die Mastzellendichte, gemessen an c-Kit-positiven Zellen pro mm^2 , wird im Kolon (C) und Jejunum (D) als Mittelwert + SEM dargestellt ($n = 9$ Schnitte mit einer Gesamtzellzahl von 152 - 530). Statistisch unterschiedliche Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben markiert (a, b), $p < 0,05$ (ANOVA gefolgt von LSD Post-hoc-Test).

5.5 Geänderte epitheliale Barrierefunktion

Aufgrund der erhöhten G_t in der OVA+Kolitis-Gruppe im Vergleich zu den OVA-sensibilisierten Tieren in den Ussing-Kammer-Versuchen wurde als nächster Schritt die epitheliale Barrierefunktion überprüft, indem verschiedene Claudine immunhistochemisch angefärbt wurden. Bei den ausgewählten Claudinen (Claudin-1, -3, -4 und -8) handelt es sich um sogenannte barriereformende Claudine, welche die parazelluläre Permeabilität des Epithels für Kationen reduzieren (Günzel und Yu 2013). Zudem weisen sie eine deutliche Segmentabhängigkeit in ihrer Expression entlang des Darmrohrs mit seinen bekannten Gradienten im transepithelialen Widerstand (niedrig im Dünndarm, hoch im Dickdarm) auf (Markov et al. 2010).

Die immunhistochemischen Markierungen aller drei Gruppen (Kontrolle, OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis) wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Zudem wurden die gleichen Belichtungszeiten und -intensitäten bei der Betrachtung der Schnitte gewählt, sodass die Signalstärke zwischen den verschiedenen Gruppen vergleichbar war. In keiner der drei Gruppen konnte ein positives Ergebnis des Claudin-1-Antikörpers festgestellt werden. Für die übrigen Claudine zeigte sich jedoch ein positives Signal im Epithel der Kolon- und Jejunumsegmente (Abb. 28).

Ergebnisse

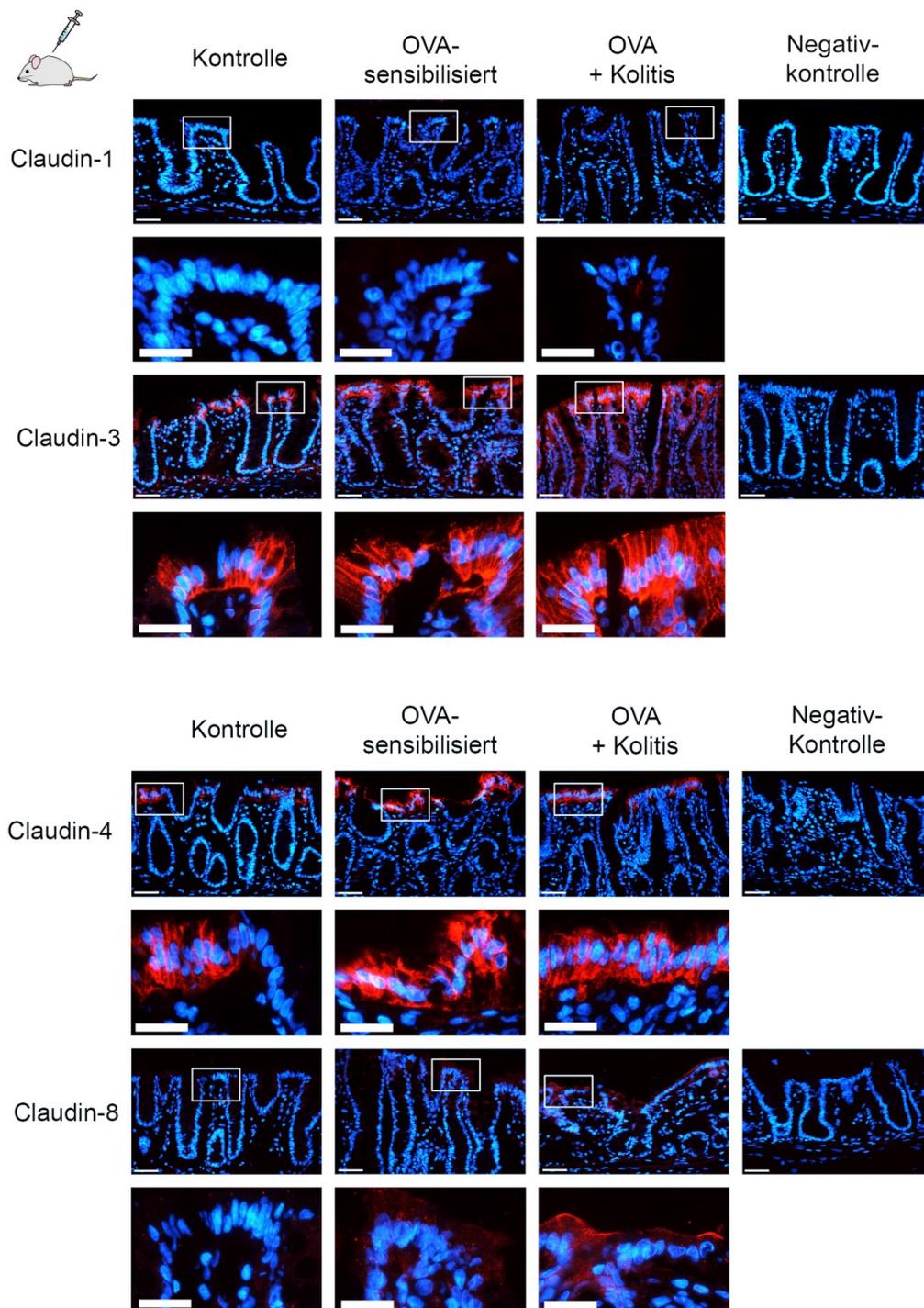


Abb. 28. Immunhistochemische Darstellung der verschiedenen Claudin-Antikörper im distalen Kolon der drei Gruppen (Kontrolle, OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis) sowie einer Negativkontrolle (rechte Spalte). Die untere Reihe des jeweiligen Antikörpers zeigt eine Vergrößerung des darüber stehenden Bildes. Der dünne Eichbalken entspricht 50 μm ; der dicke Eichbalken 25 μm . Repräsentative Darstellung von drei unabhängigen Experimenten für jeden Claudin-Antikörper.

Das Signal des Claudin-8-Antikörpers konnte nur qualitativ ausgewertet werden, da nur unter Entzündungsbedingungen eine diskontinuierliche Immunreaktivität in der apikalen Membran der Epithelzellen zu beobachten war (Abb. 28). Claudin-3 und -4 zeigten ein positives Signal sowohl im Kolon- als auch im Jejunumepithel aller drei Gruppen, welches apikal und basolateral der Epithelzellen lokalisiert war. Somit konnte deren Intensität morphometrisch quantifiziert werden, indem jeder gemessenen Graustufe ein Zahlenwert zugeordnet wurde (Abb. 20). Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nahm die Claudin-3-Immunreaktivität in beiden Darmsegmenten nach Sensibilisierung signifikant zu und reduzierte sich wieder nach zusätzlicher Kolitis-Induktion (im Vergleich zur OVA-Sensibilisierung; Abb. 29, Tabelle 11). Dabei kam es im Jejunum zu einer Zunahme der Claudin-3-Immunreaktivität um ca. 150 % nach Sensibilisierung, wohingegen diese im distalen Kolon nur um ca. 45 % stieg (Abb. 29, Tabelle 11). Nach zusätzlicher Induktion einer Kolitis reduzierte sich die Claudin-3-Immunreaktivität in beiden Darmsegmenten wieder um ca. 15 % im Vergleich zu den OVA-sensibilisierten Tieren (Abb. 29, Tabelle 11).

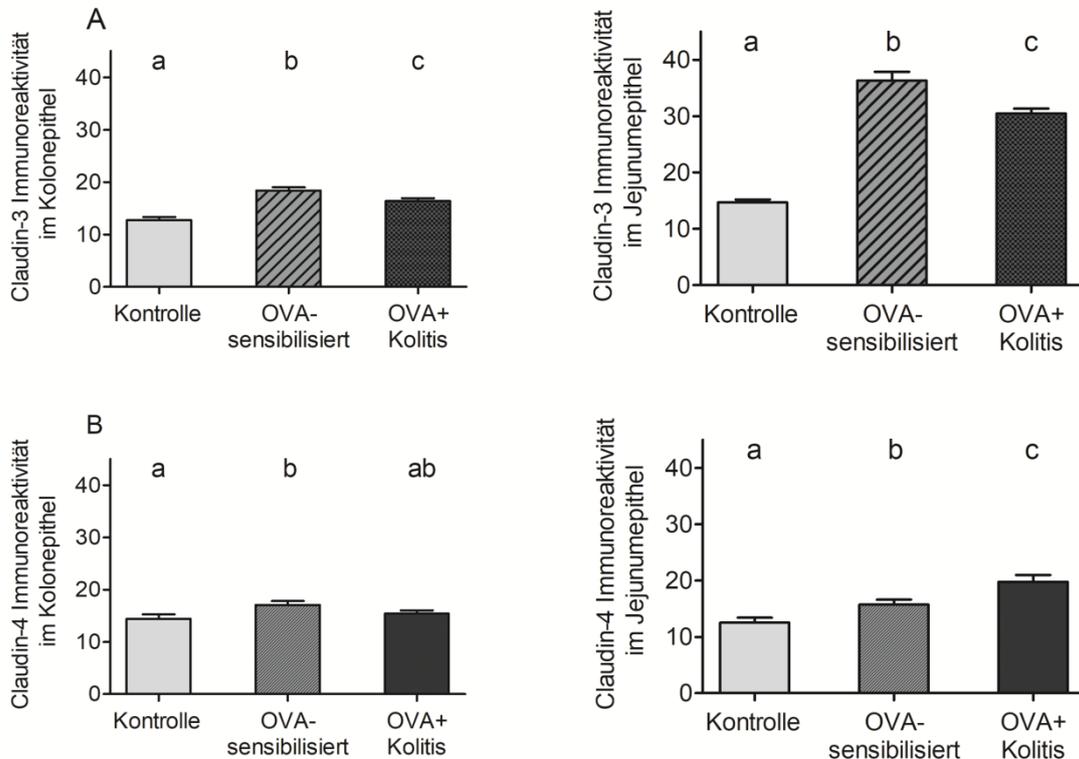


Abb. 29. Morphometrische Analyse der Claudin-3- (A) und Claudin-4-Immunoreaktivität (B) unter Kontrollbedingungen, nach OVA-Sensibilisierung sowie nach Sensibilisierung und Kolitis (OVA+Kolitis) im distalen Kolon (links) sowie im Jejunum (rechts). Dargestellt als Mittelwert + SEM dargestellt ($n = 163 - 401$ Zellen von jeweils drei unterschiedlichen und zufällig ausgewählten Tieren pro Gruppe). Statistisch unterschiedliche Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben markiert (a, b, c), $p < 0,05$ (ANOVA gefolgt von LSD Post-hoc-Test).

Betrachtet man die Claudin-4-Immunoreaktivität in beiden Darmsegmenten, so stieg auch diese nach OVA-Sensibilisierung im Vergleich zur Kontrolle an, blieb jedoch im distalen Kolon unverändert nach zusätzlicher Kolitis-Induktion (Abb. 29). Im Jejunum hingegen zeigte sich ein paradoxer Effekt unter Entzündungsbedingungen: hier erhöhte sich die Claudin-4-Immunoreaktivität signifikant auf $19,79 \pm 1,18$ ($n = 171$) in der OVA+Kolitis-Gruppe im Vergleich zu den OVA-sensibilisierten Tieren ($15,74 \pm 0,85$; $n = 192$; $p < 0,05$, Tabelle 11).

Ergebnisse

	Kontrolle	OVA- sensibilisiert	OVA+Kolitis
Claudin-3-Immunoreaktivität			
Distales Kolon	12,73 ± 0,58 ^a	18,41 ± 0,59 ^b	16,36 ± 0,57 ^c
Jejunum	14,69 ± 0,53 ^a	36,30 ± 1,57 ^b	28,84 ± 0,85 ^c
Claudin-4-Immunoreaktivität			
Distales Kolon	14,41 ± 0,86 ^a	17,03 ± 0,79 ^b	15,40 ± 0,65 ^{ab}
Jejunum	12,53 ± 0,86 ^a	15,74 ± 0,85 ^b	19,89 ± 1,18 ^c

Tabelle 11. Erhöhte Claudin-3- und Claudin-4-Immunoreaktivität der beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrolle. Die Färbeintensität (ausgedrückt in arbiträren Einheiten) wurde morphometrisch bestimmt (Bestimmung der Graustufen der mit der monochromatischen Kamera aufgenommen Bilder; s. 3.10.7). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n = 163 - 401 Zellen von drei unterschiedlichen Tieren pro Gruppe). Statistisch unterschiedliche Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben markiert (a, b, c), p < 0,05 (ANOVA gefolgt von LSD Post-hoc-Test).

5.6 Genexpressionslevel von Mastzellproteasen und Claudinen

Zusätzlich zur Bestimmung auf Proteinniveau mittels Immunhistochemie wurde auf Transkriptionsebene untersucht, ob sich die Expression von Mastzellmarkern oder Claudinen in der Darmwand der drei Gruppen (Kontrolle, OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis) unterscheidet. Gemessen wurde die relative Expression von drei verschiedenen Mastzellproteasen (rMcpt-2, rMcpt-6, rMcpt-7) sowie von zwei verschiedenen Claudinen (Cldn-3, Cldn-4). Dabei wurden die Claudine ausgewählt, die in der Immunhistochemie morphometrisch quantifiziert werden konnten. Als stabil exprimierte Referenzgene in allen drei Gruppen wurden Gapdh und B2m für das distale Kolon und Ppia und Rplp2 für das Jejunum gewählt (3.13.5).

Die Vervielfältigung der beiden Mastzelltryptase-Subtypen (rMcpt-6 und rMcpt-7) startete erst bei Zyklus 35 und erreichte kein Plateau innerhalb der durchgeführten 40 Amplifikationszyklen, weswegen diese Proben von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Eine erfolgreiche Vervielfältigung konnte für die Mastzellchymase (rMcpt-2) festgestellt werden, deren relative Expression in Bezug auf die Kontrollgruppe quantifiziert wurde. Dabei zeigte sich je nach Darmsegment eine unterschiedliche rMcpt-2-Expression nach Sensibilisierung der Tiere: im Jejunum war diese leicht erhöht, wohingegen im distalen Kolon eine Tendenz zu einer erniedrigten rMcpt-2-Expression zu erkennen war (Abb. 30). Unter Entzündungsbedingungen war diese Expression in beiden Darmsegmenten nur geringfügig erhöht; jedoch erreichten die Veränderungen keine statistische Signifikanz.

Zwischen den gemessenen Cldn-3- und Cldn-4-mRNA-Leveln im Jejunum und distalen Kolon nach Sensibilisierung der Tiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Wenn zusätzlich zur Sensibilisierung eine Kolitis induziert wurde, war ein Trend für eine Herunterregulation der Cldn-3- und -4-Expression erkennbar, welcher im Jejunum größer war als im distalen Kolon. Jedoch konnte auch hier keine statistische Signifikanz erreicht werden (Abb. 30).

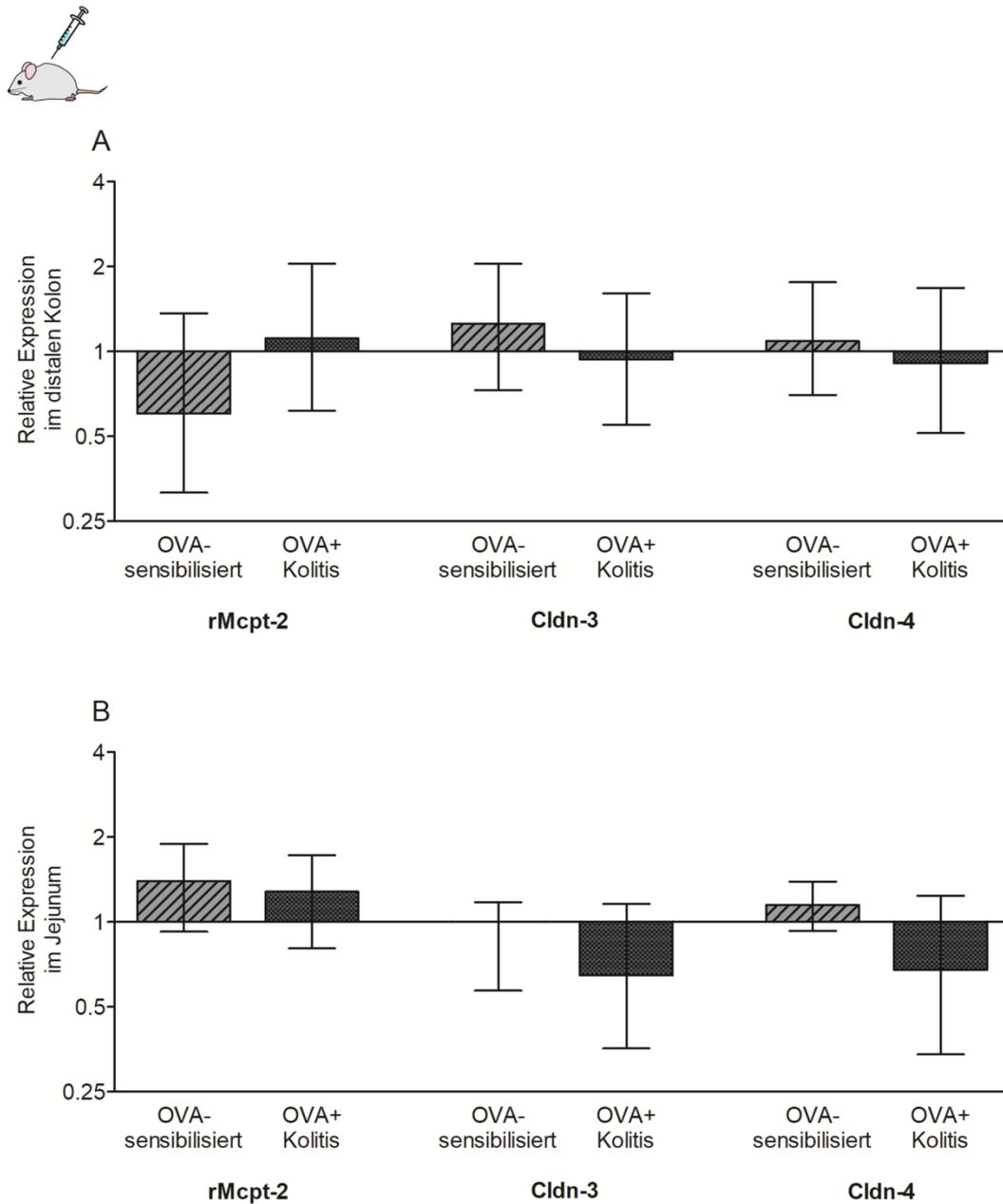


Abb. 30. Die relative Expression von Chymase (rMcp2), Claudin-3 (Cldn-3) und Claudin-4 (Cldn-4) im Vergleich zu Kontrolltieren im distalen Kolon (obere Grafik) oder Jejunum (untere Grafik) wird in einer log₂-Skala als Up- (Ratio > 1) oder Downregulation (Ratio < 1) dargestellt. Die Daten werden als Median ± SEM dargestellt, n = 3 - 6. In keiner der Gruppen wurde eine statistische Signifikanz erreicht nach Auswertung mittels REST Software (Pair-wised fixed reallocation randomization test).

5.7 Der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf Sekretion und Permeabilität im distalen Kolon

Um die Mastzell-Neuron-Interaktionen unter Entzündungsbedingungen *in vitro* zu untersuchen, wurde der Effekt von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen auf die basale und stimulierte Anionensekretion sowie Permeabilität im distalen Kolon der Ratte getestet. Dafür wurden die Zytokine TNF α , IL-1 β und IFN- γ ausgewählt, die erhöhte Konzentrationen in der Darmwand von Nagern nach Kolitis-Induktion sowie von Menschen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) aufweisen (Neurath et al. 1997; Neurath 2014; Singh et al. 2016). Für die Zytokine IL-1 β (20 ng·ml⁻¹) und IFN- γ (100 ng·ml⁻¹) wurden die Konzentrationen aus der Literatur gewählt, welche sich als effektiv erwiesen hatten (Barmeyer et al. 2004). Da TNF α in der Lage ist konzentrationsabhängig sowohl eine Apoptose in Zellen zu induzieren als auch deren Überleben zu steigern (Gupta 2002), wurden zunächst drei verschiedene Konzentrationen (10 ng·ml⁻¹, 50 ng·ml⁻¹, 100 ng·ml⁻¹) in der Ussing-Kammer getestet. Dabei führte die hohe Konzentration von TNF α (100 ng·ml⁻¹) zu einer signifikanten Steigerung des basalen Kurzschlussstroms im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wohingegen die niedrigeren Konzentrationen lediglich Tendenzen für eine erhöhte basale Anionensekretion aufwiesen (Tabelle 12, Abb. 31 A). Parallel dazu stieg die basale Gewebeleitfähigkeit (G_t) nach ≥ 50 ng·ml⁻¹ TNF α signifikant an (Tabelle 13). IL-1 β (20 ng·ml⁻¹) bewirkte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der G_t ; der basale I_{sc} blieb jedoch unbeeinflusst. Dahingegen veränderte IFN- γ (100 ng·ml⁻¹) weder die basale Sekretion noch die Gewebeleitfähigkeit (Abb. 31 A und Abb. 33 A).

Ergebnisse

	Baseline I_{sc}	ΔI_{sc} nach Compound 48/80	ΔI_{sc} nach Histamin	ΔI_{sc} nach Carbachol	ΔI_{sc} nach Forskolin
$\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$					
TNFα (10 ng·ml ⁻¹)	1,96 ± 0,40	1,73 ± 0,29 [#]	9,88 ± 0,38 [#]	9,88 ± 0,78 [#]	2,63 ± 0,76 [#]
Kontrolle	1,59 ± 0,47	1,31 ± 0,36 [#]	9,55 ± 0,76 [#]	9,51 ± 1,02 [#]	1,99 ± 0,27 [#]
TNFα (50 ng·ml ⁻¹)	1,99 ± 0,45	2,03 ± 0,45 [#]	11,07 ± 0,64 [#]	11,09 ± 0,99 [#]	2,22 ± 0,27 [#]
Kontrolle	1,21 ± 0,52	1,67 ± 0,43 [#]	9,51 ± 0,64 [#]	9,72 ± 0,45 [#]	2,37 ± 0,28 [#]
TNFα (100 ng·ml ⁻¹)	2,46 ± 0,31*	1,25 ± 0,21 [#]	9,02 ± 0,46 [#]	8,96 ± 0,79 [#]	1,85 ± 0,19 [#]
Kontrolle	1,30 ± 0,45	1,05 ± 0,22 [#]	9,55 ± 0,57 [#]	9,91 ± 1,04 [#]	2,33 ± 0,34 [#]

Tabelle 12. Konzentrationsabhängige Wirkung einer 1-stündigen Vorbehandlung mit TNF α (serosal) auf den basalen I_{sc} sowie auf ΔI_{sc} nach sekretorischer Stimulation durch Compound 48/80 (10^{-4} mol·l⁻¹, serosal), Histamin (10^{-4} mol·l⁻¹, serosal), Carbachol ($5\cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹, serosal) und Forskolin ($5\cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹, mukosal und serosal). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 9 - 11. * $p < 0,05$ versus zeitabhängige Kontrolle (ungepaarter t-Test), [#] $p < 0,05$ versus Baseline (gepaarter t-Test).

Um zu überprüfen, ob sich eine Vorbehandlung mit Zytokinen auf die Mastzellvermittelte Anionensekretion auswirkt, wurden die in den Mukosa-Submukosa-Präparaten lokalisierten intestinalen Mastzellen mittels Compound 48/80 (10^{-4} mol·l⁻¹, serosal), ein Mastzelldegranulator, stimuliert. Keines der einzeln eingesetzten Zytokine veränderte jedoch den durch Compound 48/80 induzierten Anstieg des I_{sc} oder der G_t (Tabelle 12 und Tabelle 13; Abb. 31 B und Abb. 33 B).

Histamin, einer der Hauptmediatoren von Mastzellen, bewirkt eine gesteigerte Sekretion am Darmepithel sowohl über eine direkte Aktivierung epithelialer Histaminrezeptoren (Schultheiss et al. 2006) als auch indirekt über eine Aktivierung neuronaler Histaminrezeptoren, welche auf submukösen Neuronen lokalisiert sind

Ergebnisse

(Bell et al. 2015). Eine Vorbehandlung mit IL-1 β (20 ng·ml⁻¹, serosal) führte zu einem signifikant reduzierten I_{sc} sowie zu einer signifikant erniedrigten G_t nach Stimulation des Gewebes mit Histamin (10⁻⁴ mol·l⁻¹, serosal) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abb. 31 C und Abb. 33 C). Weder TNF α noch IFN- γ hatten einen Einfluss auf die durch Histamin hervorgerufene Sekretion oder Leitfähigkeit (Tabelle 12 und Tabelle 13, Abb. 31 C und Abb. 33 C).

	Baseline G _t	ΔG_t nach Compound 48/80	ΔG_t nach Histamin	ΔG_t nach Carbachol	ΔG_t nach Forskolin
mS·cm ⁻²					
TNFα (10 ng·ml ⁻¹)	9,88 ± 0,67	0,72 ± 0,16 [#]	4,43 ± 0,26 [#]	6,42 ± 0,62 [#]	3,06 ± 0,43 [#]
Kontrolle	10,43 ± 0,67	0,68 ± 0,29 [#]	4,61 ± 0,45 [#]	6,12 ± 0,88 [#]	2,76 ± 0,48 [#]
TNFα (50 ng·ml ⁻¹)	13,21 ± 1,14*	1,01 ± 0,13 [#]	5,07 ± 0,35 [#]	7,15 ± 0,73 [#]	3,34 ± 0,50 [#]
Kontrolle	9,88 ± 0,83	0,57 ± 0,16 [#]	4,48 ± 0,45 [#]	5,73 ± 0,36 [#]	2,88 ± 0,27 [#]
TNFα (100 ng·ml ⁻¹)	14,50 ± 1,66*	0,68 ± 0,23 [#]	4,07 ± 0,34 [#]	5,69 ± 0,66 [#]	3,07 ± 0,34 [#]
Kontrolle	10,52 ± 0,46	0,50 ± 0,25 [#]	4,29 ± 0,38 [#]	5,97 ± 0,82 [#]	2,76 ± 0,42 [#]

*Tabelle 13. Konzentrationsabhängige Wirkung einer 1-stündigen Vorbehandlung mit TNF α (serosal) auf die basale Gewebeleitfähigkeit (G_t) sowie auf ΔG_t nach sekretorischer Stimulation durch Compound 48/80 (10⁻⁴ mol·l⁻¹, serosal), Histamin (10⁻⁴ mol·l⁻¹, serosal), Carbachol (5·10⁻⁵ mol·l⁻¹, serosal) und Forskolin (5·10⁻⁶ mol·l⁻¹, mukosal und serosal). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n = 9 - 11. * p < 0,05 versus zeitabhängige Kontrolle (ungepaarter t-Test), [#] p < 0,05 versus Baseline (gepaarter t-Test).*

Am Ende eines jeden Versuchs wurden die Ca²⁺- bzw. cAMP-abhängigen Sekretagoga Carbachol (5·10⁻⁵ mol·l⁻¹, serosal) und Forskolin (5·10⁻⁶ mol·l⁻¹, mukosal und serosal) dem Gewebe zugesetzt, um mögliche Auswirkungen der proinflammatorischen Zytokine auf die Sekretionsleistung des Darmepithels

festzustellen. Die Vorbehandlung mit IL-1 β (20 ng·ml⁻¹, serosal) führte dabei zu einer signifikanten Abnahme des ΔI_{sc} nach Stimulation mit Carbachol ($6,93 \pm 1,01 \mu\text{Eqh}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) im Vergleich zur zeitabhängigen Kontrolle ($11,06 \pm 1,52 \mu\text{Eqh}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, n = 7, p < 0,05, Abb. 31 D). Die Vorbehandlung mit TNF α und IFN- γ veränderte die Antwort des Ca²⁺-abhängigen Sekretagogs hingegen nicht (Tabelle 12, Abb. 31 D). Keines der einzeln eingesetzten proinflammatorischen Zytokine hatte Auswirkungen auf die cAMP-vermittelte Sekretion sowie auf die Gewebeleitfähigkeit nach Zugabe von Forskolin (Tabelle 13, Abb. 31 und Abb. 33, je E und F).

Ergebnisse

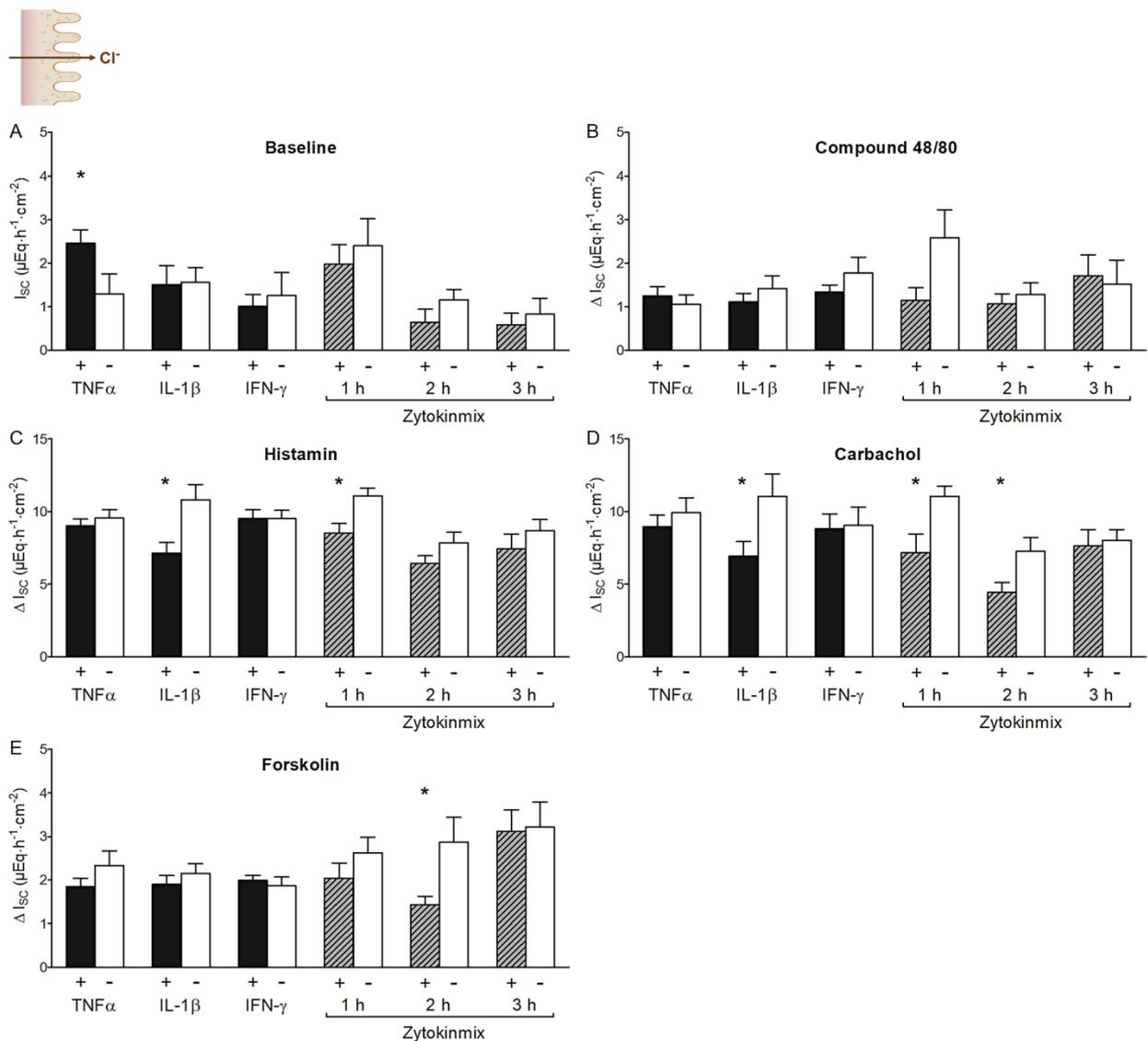


Abb. 31. Auswirkungen von einzelnen Zytokinen nach 1-stündiger Inkubation (schwarze Balken) oder eines Zytokinmix (graue Balken) auf die intestinale Sekretion (gemessen als I_{sc} in $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (weiße Balken) unter basalen Bedingungen (5 min vor Zugabe von Compound 48/80; A) oder als ΔI_{sc} nach Stimulation mit Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal; B), Histamin ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal; C), Carbachol ($5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal; D) und Forskolin ($5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mukosal und serosal; E). Die Konzentrationen der Zytokine (serosal; entweder einzeln oder als Mix) sind: TNF α ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), IFN- γ ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) und IL-1 β ($20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die Daten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt, $n = 5 - 10$. * $p < 0,05$ versus der jeweiligen Kontrolle (ungepaarter t-test).

5.8 Der Effekt des Zytokin-Cocktails auf die intestinale Sekretion und Permeabilität

Unter entzündlichen Bedingungen ist das intestinale Gewebe nicht nur einzelnen Zytokinen ausgesetzt, sondern einer Kombination aus mehreren, welche unter anderem die intestinale Sekretion und Permeabilität beeinflussen. Um herauszufinden inwieweit die Interaktionen zwischen Mastzellen, submukösen Neuronen und Enterozyten unter Entzündungsbedingungen verändert sind, wurden Segmente des distalen Kolons mit einem Zytokinmix für entweder eine, zwei oder drei Stunden vorinkubiert ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ $\text{TNF}\alpha$, $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ $\text{IL-1}\beta$ und $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ $\text{IFN-}\gamma$, serosal), bevor die jeweiligen Sekretagoga hinzugegeben wurden. Der Zytokinmix führte dabei innerhalb von 30 min zu einem transienten Anstieg der Anionensekretion. Wenn die Daten aus allen drei Versuchsreihen (1 h, 2 h, 3 h Vorinkubation) zusammengeführt werden, so bewirkte der Zytokinmix einen maximalen Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) um $1,08 \pm 0,19 \mu\text{Eqh}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 19$, $p < 0,05$, ungepaarter t-Test) im Vergleich zur zeitabhängigen Kontrolle ($n = 19$, Abb. 32). Parallel zum Kurzschlussstrom stieg auch die G_t signifikant um $0,76 \pm 0,23 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ an ($n = 19$, $p < 0,05$ versus Kontrolle, U-Test). Dieser transiente Anstieg war nach 1 h wieder komplett abgeklungen, sodass bei Zugabe des ersten Sekretagogs keine Unterschiede im basalen I_{sc} oder der basalen G_t im Vergleich zur Kontrolle bestanden (Abb. 31 A und Abb. 33 A).

Die sekretorische Kapazität des Epithels wurde durch Compound 48/80, Histamin, Carbachol und Forskolin nach Inkubation mit dem Zytokinmix untersucht. Weder der Anstieg des I_{sc} noch der G_t durch den Mastzell-Aktivator Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und der 1-, 2- oder 3-stündigen Vorbehandlung mit dem Zytokin-Cocktail (Abb. 31 B und Abb. 33 B). Jedoch konnte eine leichte – wenn auch nicht signifikante – Reduktion des ΔI_{sc} sowie der ΔG_t durch Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal) nach Präinkubation mit dem Zytokinmix für 1 h festgestellt werden (Abb. 31 B und Abb. 33 B). Der Sekretionsanstieg nach Zugabe von Histamin ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal) war signifikant erniedrigt nach 1-stündiger Vorbehandlung mit dem Zytokinmix ($8,51 \pm 0,66 \mu\text{Eqh}^{-1}$

$^1 \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 5$, $p < 0,05$, ungepaarter t-Test) im Vergleich zur zeitabhängigen Kontrolle ($11,08 \pm 0,52 \mu\text{Eqh}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 7$; Abb. 31 C).

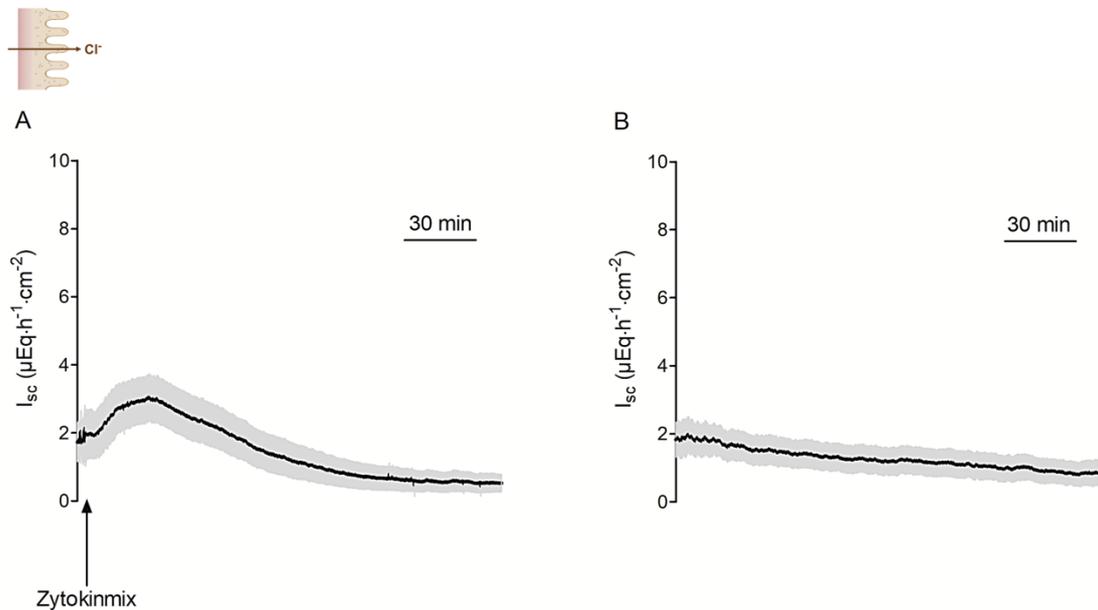


Abb. 32. Die serosale Zugabe eines Zytokinmix ($100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ TNF}\alpha$, $20 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ IL-1}\beta$ und $100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ IFN-}\gamma$) führte zu einem transienten Anstieg des I_{sc} im distalen Kolon (A) im Vergleich zur zeitabhängigen Kontrolle (B). Die Daten sind als Mittelwerte (schwarze Linie) \pm SEM (grauer Bereich) dargestellt, $n = 8 - 9$.

Die 1-stündige Vorbehandlung mit dem Zytokinmix beeinflusste zudem die Ca^{2+} -abhängige, jedoch nicht die cAMP-abhängige Sekretionsleistung und Permeabilität des Epithels. Dabei reduzierte sich der ΔI_{sc} nach Zugabe von Carbachol signifikant von $11,05 \pm 0,67 \mu\text{Eqh}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 7$) unter Kontrollbedingungen auf $7,17 \pm 1,25 \mu\text{Eqh}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 5$, $p < 0,05$, ungepaarter t-Test) nach Zytokinvorinkubation (Abb. 31 D). Auch der Carbachol-induzierte Anstieg der G_t fiel signifikant kleiner aus (Abb. 33 D). Wurde das Gewebe mit dem Zytokinmix für eine weitere Stunde inkubiert, so kam es zu einer signifikanten Hemmung sowohl der durch Carbachol als auch der durch Forskolin hervorgerufenen Sekretion (Abb. 31 D und E). Jedoch hatte die 2-stündige Vorbehandlung mit dem Zytokin-Cocktail keine Auswirkungen auf die Gewebeleitfähigkeit nach Stimulation mit den Ca^{2+} - bzw. cAMP-abhängigen Sekretagona (Abb. 33 D und E). Drei Stunden nach Zugabe des Zytokin-Cocktails

Ergebnisse

konnten keine Änderungen der gemessenen Parameter mehr im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen festgestellt werden (Abb. 31 und Abb. 33, A - E).

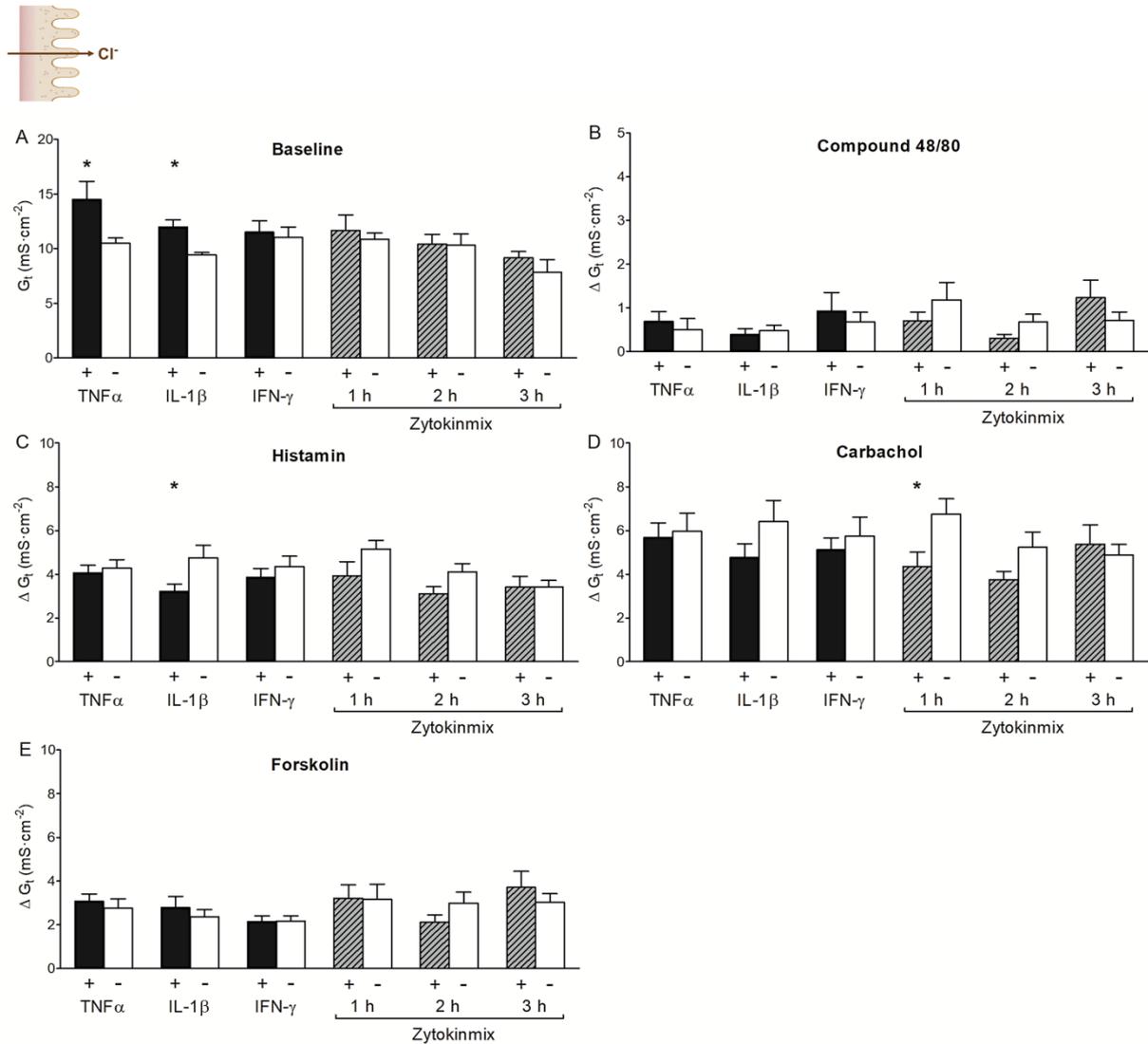


Abb. 33. Auswirkungen von einzelnen Zytokinen (nach 1-stündiger Inkubationszeit; schwarze Balken) oder eines Zytokinmix (graue Balken) auf die Gewebeleitfähigkeit (gemessen als G_t in $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (weiße Balken) unter basalen Bedingungen (5 min vor Zugabe von Compound 48/80; A) oder als ΔG_t nach Stimulation mit Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal; B), Histamin ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal; C), Carbachol ($5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal; D) und Forskolin ($5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mukosal und serosal; E). Die Konzentrationen der Zytokine (serosal; entweder einzeln oder als Mix) sind: TNF α ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), IFN- γ ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) und IL-1 β ($20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die Daten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt, $n = 5-10$. * $p < 0,05$ versus der jeweiligen Kontrolle (ungepaarter t-Test).

5.9 Die Antwort submuköser Neurone auf Mastzellmediatoren wird durch Zytokine moduliert

Die Verminderung der sekretorischen Antwort auf Compound 48/80 nach Präinkubation mit dem Zytokinmix könnte auf eine geringere Sekretionsleistung des Epithels hindeuten, wofür auch die reduzierte Carbachol- und Forskolin-Antwort spricht (Abb. 31). Allerdings sind auch sekretomotorische Neurone an der Mastzellvermittelten Sekretion beteiligt. Dies konnte in Experimenten gezeigt werden, in denen der I_{sc} im Gewebe sensibilisierter Tiere nach Antigenkontakt durch das Neurotoxin Tetrodotoxin stark reduziert wurde (Javed et al. 1992). So ist es durchaus denkbar, dass proinflammatorische Zytokine einen hemmenden Effekt auf die Mastzellvermittelte Stimulation sekretomotorischer Neurone haben.

Zur Untersuchung der Mastzell-Neuron-Interaktionen nach Sensibilisierung der Tiere wurden sogenannte Stufenpräparate für Ca^{2+} -Imaging-Versuche angefertigt (s. 3.6.2). Ein Stufenpräparat war deswegen erforderlich, da es aufgrund der zu hohen Gewebedicke der Mukosa-Submukosa-Präparationen nicht möglich war submuköse Ganglien zu erkennen. Ziel der Versuchsreihe war es die mukosalen und submukösen Mastzellen mit Ovalbumin zu stimulieren, sodass durch die Mediatorenfreisetzung die submukösen Ganglien aktiviert werden. Diese Aktivierung kann dann als Änderung der Fura-2-Ratio gemessen werden. Nach Zugabe von Ovalbumin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) kam es jedoch zu keinem Anstieg des Fura-2-Signals in den submukösen Neuronen (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls lieferte die Zugabe von KCl ($3\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) als Vitalitätskontrolle keine einheitliche Stimulation der Neurone, sodass abschließend gesagt werden kann, dass dieses Modell nicht geeignet ist Mastzell-Neuron-Interaktionen in vitro zu untersuchen. Daher wurde stattdessen ein Cokultur-Modell für die folgenden Experimente eingesetzt.

Um die Mastzell-Neuron-Interaktionen unter entzündlichen Bedingungen zu testen, wurde eine Kokultur aus primär isolierten submukösen Neuronen und der Mastzell-äquivalenten Zelllinie RBL-2H3 angelegt. Diese konnten über einen längeren Zeitraum, als es in der Ussing-Kammer möglich war, mit den proinflammatorischen Zytokinen inkubiert werden. In diesem Modell führt eine Aktivierung der RBL-2H3 durch Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und die darauffolgende Freisetzung der Mastzellmediatoren zu einem starken Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als Anstieg der Fura-2-Ratio) in submukösen Neuronen (Bell et al. 2015). Fasst man alle Daten aus allen Kontrollgruppen zusammen, so reagierten 368 von insgesamt 561 (= 69 %) Neuronen mit einem Anstieg des Fura-2-Signals auf die Mastzellaktivierung durch Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Diese Anzahl stimmt mit früheren Untersuchungen aus unserem Labor überein (Bell et al. 2015) und ist vermutlich durch die Unterschiede in der Expression von Rezeptoren sowie in der Erregbarkeit verschiedener Neuronentypen bedingt.

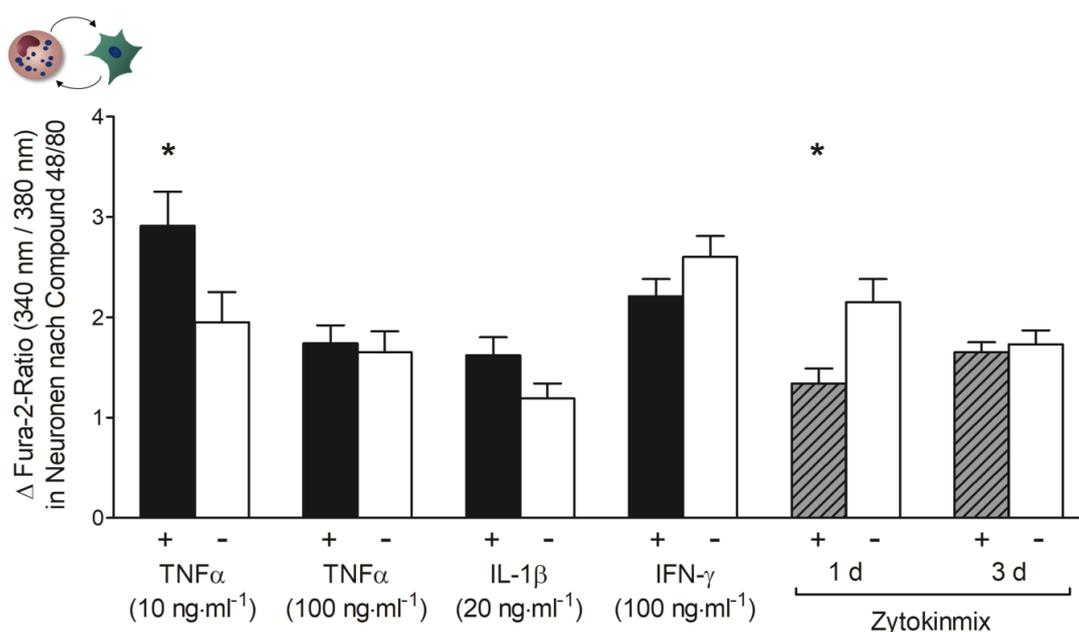


Abb. 34. Anstieg des Fura-2-Signals (als Δ Fura-2-Ratio) in isolierten submukösen Neuronen induziert durch den Mastzellaktivator Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nach Cokultivierung mit RBL-2H3. Die Cokultur wurde entweder mit einzelnen Zytokinen für einen Tag (schwarze Balken) oder mit einem Zytokinmix für einen oder drei Tage (graue Balken) parallel zu unbehandelten Kontrollen (weiße Balken) inkubiert. Der Zytokinmix setzte sich aus TNF α ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), IL-1 β ($20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) und IFN- γ ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) zusammen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM, $n = 32 - 166$ getestete Zellen von mindestens drei verschiedenen Tieren. * $p < 0,05$ (ungepaarter t-Test oder U-Test).

Nach Inkubation der Cokultur für die Dauer von einem Tag mit der niedrigen Konzentration TNF α ($10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) kam es zu einer signifikant höheren Amplitude des durch Compound 48/80 induzierten Fura-2-Signals im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, wohingegen die Anzahl neuronaler Responder unverändert blieb (Abb. 34 und Abb. 35). Wurde die Konzentration von TNF α auf $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ erhöht, so zeigte sich ein anderes Bild: die Anzahl der submukösen Neurone, die auf die Mastzelldegranulation antworteten, stieg signifikant auf 90 % an (46 von 51 getestete Neurone; $p < 0,05$, χ^2 -Test im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wo 42 von 80 Neurone (53 %) reagierten; Abb. 35). Die Amplitude des Fura-2-Signals blieb hingegen unverändert (Abb. 34). Weder eine Vorbehandlung der Cokultur mit IL-1 β

($20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) noch mit $\text{IFN-}\gamma$ ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) führte zu einer Änderung der Fura-2-Amplitude oder der Anzahl an reagierenden Neuronen nach Mastzelldegranulation durch Compound 48/80 (Abb. 34 und Abb. 35).

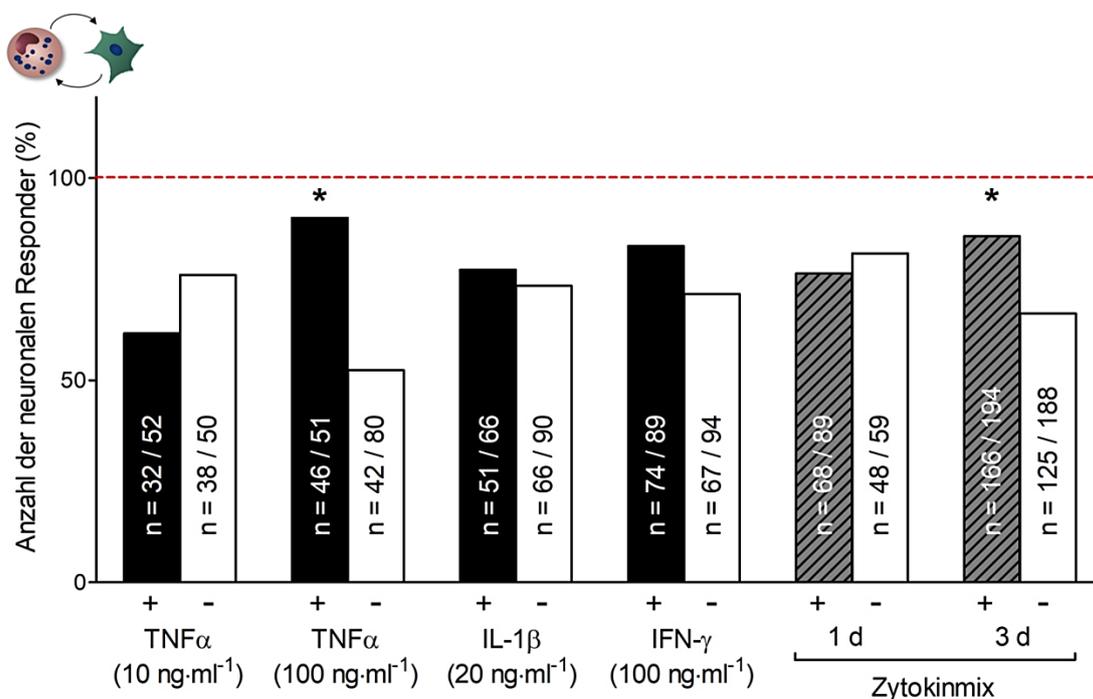


Abb. 35. Anzahl der submukösen Neurone, die auf eine Mastzellaktivierung durch Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) reagierten, nach Präinkubation der Cokultur (Neurone + RBL-2H3) mit einzelnen Zytokinen für einen Tag (schwarze Balken) oder mit einem Zytokinmix für einen oder drei Tage (graue Balken) parallel zu unbehandelten Kontrollen (weiße Balken). Der Zytokinmix setzte sich aus $\text{TNF}\alpha$ ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), $\text{IL-1}\beta$ ($20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) und $\text{IFN-}\gamma$ ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) zusammen. In jedem Balken ist die Anzahl der Responder im Vergleich zu allen Neuronen einer Versuchsgruppe angegeben, die auf KCl ($3\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) als Vitalitätskontrolle reagierten. * $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (χ^2 -Test).

Interessanterweise reduzierte sich die Amplitude der neuronalen Fura-2-Antwort um 40 %, nachdem die Cokultur mit einem Mix aus allen drei Zytokinen ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ $\text{TNF}\alpha$, $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ $\text{IL-1}\beta$ und $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ $\text{IFN-}\gamma$) für die Dauer von einem Tag vorbehandelt wurde. Compound 48/80 induzierte einen Anstieg der Fura-2-Ratio um $2,15 \pm 0,23$ ($n = 48$) unter Kontrollbedingungen; nach Vorinkubation mit dem

Zytokinmix betrug dieser Anstieg nur $1,34 \pm 0,15$ ($n = 68$; $p < 0,05$, ungepaarter t-Test; Abb. 34). Wurde die Inkubationszeit des Zytokinmix auf drei Tage verlängert, so war kein Unterschied mehr in dem Fura-2-Signal zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe zu erkennen (Abb. 34). Jedoch kam es zu einer signifikant höheren Anzahl an neuronalen Respondern nach der 3-Tage-Vorinkubation mit dem Zytokinmix (86 %, 166 von 194 Neuronen) im Vergleich zur Kontrolle (66 %, 125 von 188 Neuronen, $p < 0,05$, χ^2 -Test, Abb. 35).

5.10 Der Zytokinmix induziert Apoptose in RBL-2H3

Da die Mastzellichte im Tiermodell nach Sensibilisierung und zusätzlicher Kolitis-Induktion leicht abnahm (s. 5.4), sollte untersucht werden, ob dies aufgrund einer möglichen Apoptoseinduktion durch proinflammatorische Zytokine stattgefunden hat. Nach Inkubation der RBL-2H3 mit dem Zytokinmix über drei Tage konnte bereits eine rein optisch erkennbare Abnahme der Zellzahl festgestellt werden. Ob es sich dabei um eine mögliche Apoptose oder Nekrose handelt, sollte immunzytochemisch festgestellt werden, indem die aktive Form der Caspase 3 (Cas3) in RBL-2H3-Zellen markiert wurde. Parallel zur 3-tägigen Inkubation der RBL-2H3 mit dem Zytokinmix wurden unbehandelte Kontrollen mit angelegt. Die Caspase 3 stellt ein Schlüsselenzym im Vorgang der Apoptose dar, welches erst nach erfolgreicher Induktion einer Apoptose aktiviert wird (Gown und Willingham 2002). Wie in Abb. 36 zu erkennen war das Cas3-Signal in den RBL-2H3 verstärkt, nachdem diese mit dem Zytokinmix vorbehandelt worden waren. Dabei erhöhte sich die Anzahl der Cas3-positiven Zellen signifikant von 9 % unter Kontrollbedingungen ($n = 256$ Cas3-positiv von insgesamt 2902 gezählten Zellen) auf 47 % nach Inkubation mit dem Zytokinmix ($n = 1070$ Cas3-positiv von insgesamt 2461 gezählten Zellen; $p < 0,05$; χ^2 -Test).

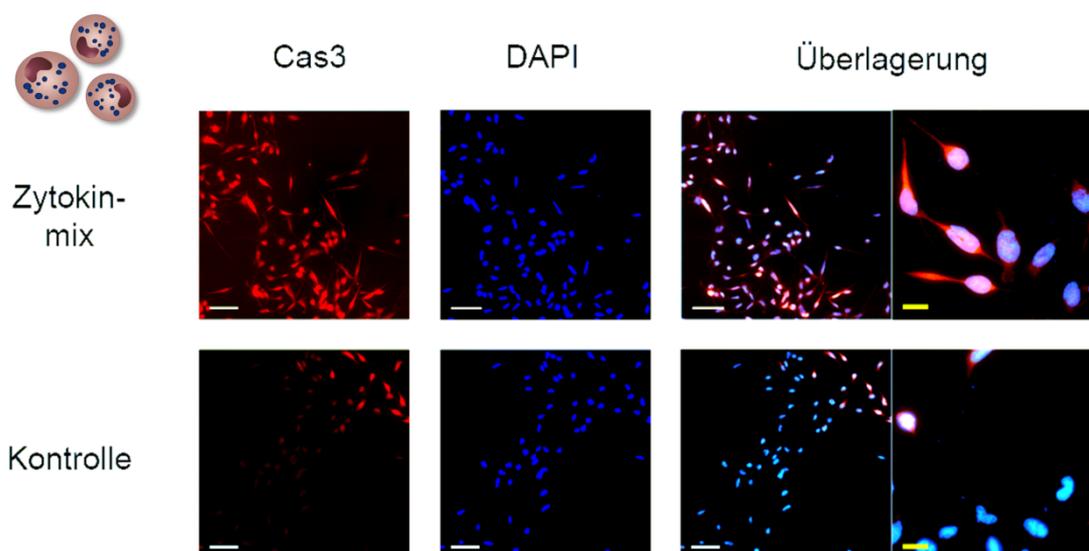


Abb. 36. Beispiel einer immunzytochemischen Färbung von RBL-2H3-Zellen mit einem Caspase-3-Antikörper unter Kontrollbedingungen sowie nach Inkubation mit einem Zytokinmix über 3 Tage. Der Zytokinmix setzte sich aus $\text{TNF}\alpha$ ($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), $\text{IL-1}\beta$ ($20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) und $\text{IFN-}\gamma$ ($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) zusammen. Cas3 gekoppelt mit einem Cy3-Sekundärantikörper ist in rot dargestellt, die Kernfärbung mittels DAPI in blau. Im rechten Bild sieht man eine beispielhafte Vergrößerung der Zellen. Die weißen Eichbalken entsprechen $20 \mu\text{m}$; die gelben Eichbalken $10 \mu\text{m}$. Repräsentative Darstellung von drei unabhängigen Experimenten.

5.11 Die Mastzell-vermittelte Anionensekretion wird durch Neurotransmitter verändert

Die Kommunikation zwischen Mastzellen und Neuronen funktioniert bidirektional: Mastzellmediatoren sind in der Lage enterische Neurone stimulieren (Schemann et al. 2005) und umgekehrt können Neurone durch die Freisetzung von Neurotransmittern zu einer Mastzelldegranulation führen, z. B. über das Neuropeptid Substanz P (Buhner und Schemann 2012). Weiterhin ist bekannt, dass eine Aktivierung muskarinerger (Bani-Sacchi et al. 1986) und adrenerger Rezeptoren (Butchers et al. 1991) die Mastzelldegranulation stimuliert, wohingegen nikotinerge Rezeptoren (Kageyama-

Yahara et al. 2008) hemmende Eigenschaften auf die Mastzellaktivierung aufweisen. Daher wurde in Ussing-Kammer-Versuchen getestet, ob eine Vorbehandlung des Gewebes mit Substanz P, Noradrenalin oder Agonisten cholinergischer Rezeptoren (Nikotin, Pilocarpin) Auswirkungen auf die Anionensekretion haben, nachdem Mastzellen mit Compound 48/80 stimuliert wurden.

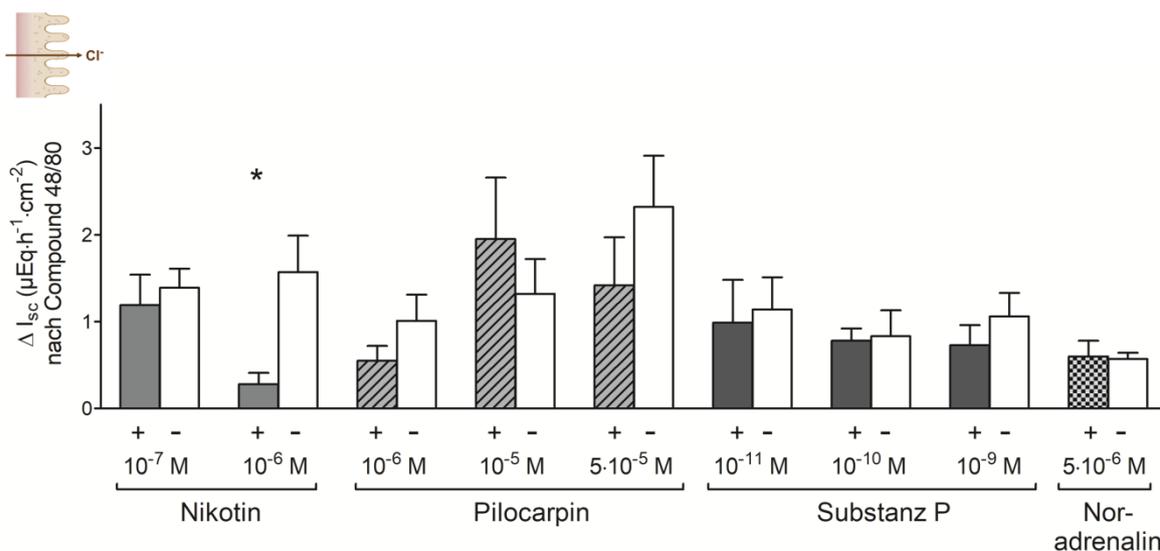


Abb. 37. Die Wirkung von Compound 48/80 ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) auf den I_{sc} in Anwesenheit (graue Balken) oder Abwesenheit (weiße Balken) von verschiedenen Agonisten. Die Agonisten Nikotin, Pilocarpin, Substanz P und Noradrenalin wurden der serosalen Seite hinzugefügt und für jeweils 5 min vorinkubiert; die Inkubationszeit für Nikotin ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) betrug 15 min. Die Daten sind dargestellt als Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) über die Baseline und sind Mittelwerte + SEM, $n = 4 - 9$. * $p < 0,05$ versus Kontrolle (ungepaarter t-Test).

Die 15-minütige Inkubation mit Nikotin ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) hatte keinen Effekt auf die basale Anionensekretion und führte zu keiner Änderung des durch Compound 48/80 induzierten ΔI_{sc} , (Tabelle 14, Abb. 37). Nach Verkürzung der Inkubationszeit auf 5 min sowie nach Erhöhung der Konzentration von Nikotin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, serosal) kam es im Gewebe zu einem kleinen Anstieg des I_{sc} auf $0,90 \pm 0,33 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$, $p < 0,05$, gepaarter t-Test, Tabelle 14) durch Nikotin. Der Mastzell-vermittelte Anstieg des I_{sc} durch Compound 48/80 war signifikant reduziert nach Vorbehandlung mit der höheren Konzentration ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) an Nikotin ($0,28 \pm 0,13 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 6$, $p <$

0,05, U-Test) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($1,57 \pm 0,42 \mu\text{Eqh}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 6$; Abb. 37). Im Gegensatz zu In-vivo-Versuchen, wo eine vagale Stimulation zu einer Histaminfreisetzung im Ileum der Ratte führte (Bani-Sacchi et al. 1986), konnte eine Vorbehandlung der Gewebe mit dem Muskarinagonist Pilocarpin ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ / $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ / $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) keine signifikante Änderung des durch Compound 48/80 induzierten I_{sc} bewirken, obwohl Pilocarpin selbst zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Anionensekretion führt (Abb. 37, Tabelle 14).

Ähnliches zeigte sich bei Ussing-Kammer-Versuchen zu Substanz P: der Agonist führte konzentrationsabhängig ($10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ - $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) zu einem Anstieg des I_{sc} , konnte jedoch nicht die durch Mastzelldegranulation hervorgerufene Sekretion modulieren (Tabelle 14, Abb. 37). Das Katecholamin Noradrenalin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) induzierte am distalen Kolon der Ratte einen negativen I_{sc} (Tabelle 14), verursacht durch eine K^{+} -Sekretion (Hörger et al. 1998). Jedoch blieb der ΔI_{sc} nach Stimulation mit Compound 48/80 unverändert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 37). Durch keinen der verwendeten Agonisten kam es zu einer verminderten Sekretionsleistung des Epithels, gemessen an dem Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Carbachol und Forskolin (Tabelle 14).

Ergebnisse

		ΔI_{sc} nach Agonist	ΔI_{sc} nach Carbachol	ΔI_{sc} nach Forskolin
$\mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$				
Nikotin	$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$0,12 \pm 0,07$	$10,32 \pm 1,10^{\#}$	$3,44 \pm 0,64^{\#}$
	Kontrolle	$0,16 \pm 0,07$	$11,75 \pm 1,04^{\#}$	$3,74 \pm 0,33^{\#}$
	$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$0,90 \pm 0,33^{*\#}$	$10,98 \pm 0,97^{\#}$	$3,33 \pm 0,55^{\#}$
	Kontrolle	$0,03 \pm 0,05$	$10,62 \pm 1,24^{\#}$	$3,18 \pm 0,42^{\#}$
Pilocarpin	$10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$0,22 \pm 0,06^{\#}$	$12,62 \pm 1,24^{\#}$	$3,00 \pm 0,40^{*\#}$
	Kontrolle	$0,08 \pm 0,02$	$10,20 \pm 1,09^{\#}$	$1,82 \pm 0,22^{\#}$
	$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$3,43 \pm 1,11^{*\#}$	$10,73 \pm 1,78^{\#}$	$3,61 \pm 0,69^{\#}$
	Kontrolle	$0,05 \pm 0,03$	$9,27 \pm 1,19^{\#}$	$2,83 \pm 0,43^{\#}$
	$5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$6,95 \pm 0,93^{*\#}$	$6,11 \pm 1,71^{\#}$	$2,58 \pm 0,21^{\#}$
	Kontrolle	$0,12 \pm 0,02$	$6,12 \pm 1,12^{\#}$	$2,78 \pm 0,48^{\#}$
Substanz P	$10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$0,20 \pm 0,06^{\#}$	$12,01 \pm 1,88^{\#}$	$4,38 \pm 0,80^{\#}$
	Kontrolle	$0,21 \pm 0,06$	$11,42 \pm 1,58^{\#}$	$3,79 \pm 0,42^{\#}$
	$10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$1,32 \pm 0,25^{*\#}$	$8,45 \pm 1,53^{\#}$	$3,43 \pm 0,25^{\#}$
	Kontrolle	$0,14 \pm 0,07$	$7,05 \pm 1,23^{\#}$	$2,90 \pm 0,51^{\#}$
	$10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$3,97 \pm 0,84^{*\#}$	$10,27 \pm 2,10^{\#}$	$2,93 \pm 0,58^{\#}$
	Kontrolle	$0,12 \pm 0,04$	$9,67 \pm 1,91^{\#}$	$2,64 \pm 0,55^{\#}$
Noradrenalin	$5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$-0,73 \pm 0,24^{*\#}$	$9,44 \pm 1,30^{\#}$	$2,72 \pm 0,49^{\#}$
	Kontrolle	$-0,12 \pm 0,03$	$10,14 \pm 1,43^{\#}$	$3,02 \pm 0,46^{\#}$

Tabelle 14. Die verschiedenen Agonisten führten innerhalb einer 5-minütigen Inkubationszeit konzentrationsabhängig zu einem Anstieg oder – im Fall von Noradrenalin – zu einem Abfall der intestinalen Sekretion (ΔI_{sc}), änderten aber nicht den durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, serosal) oder Forskolin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, mukosal und serosal) induzierten ΔI_{sc} . Die Inkubationszeit für Nikotin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) betrug 15 min. Die Daten werden als Mittelwerte \pm SEM angegeben, $n = 4 - 9$. * $p < 0,05$ verglichen zur zeitabhängigen Kontrolle (ungepaarter t -Test oder U -Test); $\# p < 0,05$ versus Baseline (gepaarter t -Test).

5.12 Die Wirkung von Agonisten auf die basale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in RBL-2H3

Mit Hilfe von Ca^{2+} -Imaging-Experimenten sollte untersucht werden, wie sich verschiedene Agonisten, für die Mastzellen entsprechende Rezeptoren exprimieren, auf die Mastzelldegranulation auswirken. Dafür wurde zunächst eine Kokultur angelegt, bestehend aus intakten Submukosastücken und der Mastzelllinie RBL-2H3, die mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2-AM aufgeladen wurde. Durch die elektrische Feldstimulation (EFS; 40 V, 0,8 ms, 50 Hz, 10 s) zu Beginn eines jeden Versuchs kam es zu einem direkten Anstieg des Fura-2-Signals in den submukösen Ganglien ($\Delta\text{Fura-2-Ratio } 0,47 \pm 0,03$, $n = 94$ Neurone aus $n = 11$ verschiedenen Tieren). Auch in einem Teil der benachbarten Mastzellen war nach neuronaler Reizung eine Ca^{2+} -Antwort erkennbar (Abb. 38). Diese antworteten zeitlich verzögert auf die EFS und mit einem geringeren Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ($\Delta\text{Fura-2-Ratio } 0,14 \pm 0,02$, $n = 33$; Abb. 38). Dabei reagierten nur 57 % aller gemessenen Mastzellen mit einem Anstieg der Fura-2-Ratio auf die neuronale Stimulation (33 von insgesamt 58 getesteten Mastzellen).

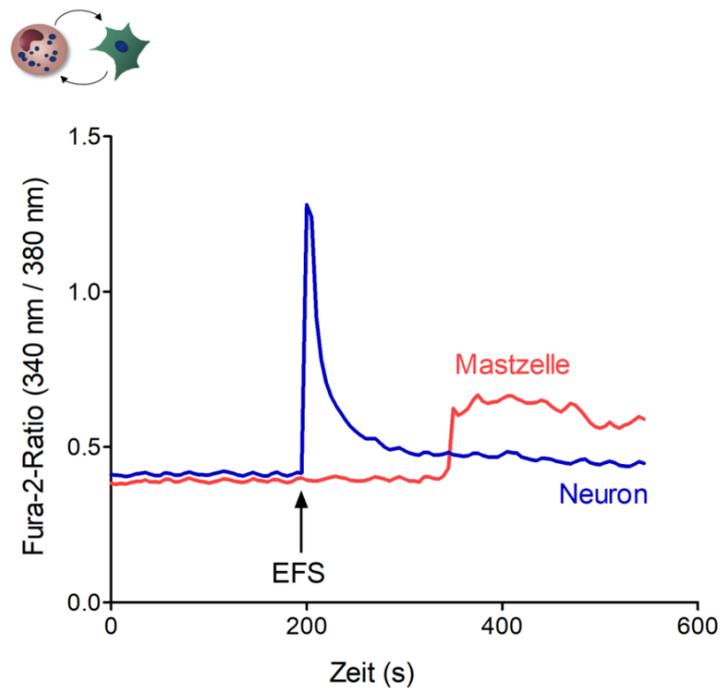


Abb. 38. Die elektrische Feldstimulation (EFS mit 40 V, 0,5 ms, 50 Hz über 10 s) führte zu einem direkten Anstieg des Fura-2-Signals im submukösen Neuron gefolgt von einer verzögerten Antwort der benachbarten Mastzelle (dargestellt als Originalkurve). Insgesamt zeigten 33 von 58 Mastzellen eine ähnliche Antwort auf die neuronale Stimulation, wohingegen in den gleichen Präparationen 94 von 94 getesteten Neuronen auf die EFS mit einem Anstieg der Fura-2-Ratio reagierten.

Um die neuronale Wirkung auf die Mastzellaktivierung detaillierter zu untersuchen, wurden die RBL-2H3 als Monokultur mit den gleichen Agonisten vorinkubiert, welche bereits in der Ussing-Kammer verwendet wurden. Alle getesteten Agonisten, also Nikotin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), Pilocarpin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), Substanz P ($10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und Noradrenalin ($5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), führten zu einem signifikanten Anstieg der Fura-2-Ratio in einem Teil der RBL-2H3 (Tabelle 15). Dabei bewirkten Noradrenalin und Substanz P die stärkste Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration; Substanz P konnte zudem mehr als die Hälfte aller Mastzellen aktivieren (53 %, 29 von 55 getesteten RBL-2H3; Tabelle 15). Die geringste Aktivierungsrate zeigte sich nach Zugabe von Nikotin (22 %), welches auch die niedrigste $\Delta\text{Fura-2-Ratio}$ von $0,67 \pm 0,12$ ($n = 15$) aufwies (Tabelle 15). Bei keinen der untersuchten Mastzellen, welche mit den Agonisten vorbehandelt

worden waren, wurde eine verminderte Vitalität festgestellt, gemessen am Anstieg des Δ Fura-2-Signals nach Stimulation mit Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Agonist	Δ Fura-2-Ratio	Responder	
		n	%
Nikotin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	$0,67 \pm 0,12^{\#}$	15 / 68	22
Pilocarpin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	$0,83 \pm 0,12^{\#}$	15 / 63	23
Substanz P ($10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	$1,18 \pm 0,14^{\#}$	29 / 55	53
Noradrenalin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	$1,28 \pm 0,27^{\#}$	23 / 64	36

Tabelle 15. Die verschiedenen Agonisten bewirkten einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (angegeben als Δ Fura-2-Ratio, 2. Spalte) in den RBL-2H3. Die Anzahl der reagierenden Mastzellen auf die Agonisten ist numerisch (3. Spalte) sowie prozentual (4. Spalte) in Bezug auf die Gesamtanzahl der RBL-2H3 angegeben, welche eine positive Vitalitätskontrolle aufwiesen. Cyclopiazonsäure (CPA, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), welche am Ende eines jeden Versuchs als Vitalitätskontrolle eingesetzt wurde, führte zu einem Anstieg der Δ Fura-2-Ratio um $2,71 \pm 0,13$ (gepoolte Daten, $n = 250$). Die Ratio-Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, $n = 55 - 68$, von drei unabhängigen Experimenten. $^{\#} p < 0,05$ versus Baseline (gepaarter t -Test).

5.13 Eine Aktivierung von Rezeptoren für Neurotransmitter modifiziert die RBL-2H3-Antwort auf Compound 48/80

Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Vorbehandlung der RBL-2H3 mit den Agonisten, für die sie offenkundig Rezeptoren exprimieren – wie an der Änderung der basalen Ca^{2+} -Konzentration erkennbar (Tabelle 15) – die Antwort auf den Mastzelledegranulator Compound 48/80 verändert. Dafür wurden die Mastzellen mit einer geringeren Konzentration von Compound 48/80 ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) stimuliert, da die zuvor verwendete Konzentration ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zu solch massiven Veränderungen im

Fura-2-Signal (Anstieg bei 340 nm, Abfall bei 380 nm) führte, dass das Emissionssignal bei 380 nm Baselinewerte erreichte und nicht mehr messbar war.

Die Vorbehandlung für jeweils 15 min mit dem jeweiligen Agonist führte in allen Versuchsreihen zu einer reduzierten Fura-2-Antwort auf Compound 48/80; zudem war in allen Fällen (mit Ausnahme von Pilocarpin) die Responderrate verringert (Abb. 39 und Abb. 40). Verglichen zur unbehandelten Kontrolle ($0,96 \pm 0,08$, $n = 49$), zeigte eine Vorinkubation mit Nikotin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) die größte Abnahme der $\Delta\text{Fura-2}$ -Ratio um mehr als 60 % ($0,37 \pm 0,04$, $n = 31$, $p < 0,05$, ungepaarter t-Test; Abb. 39) nach Zugabe von Compound 48/80. Zudem reagierten weniger als die Hälfte aller Mastzellen mit einem Anstieg des Fura-2-Signals auf Compound 48/80 nach Vorbehandlung mit Nikotin (Abb. 40). Dies ist wahrscheinlich auf die inhibitorischen Wirkungen der nikotinergeren Rezeptoren auf Mastzellen zurückzuführen (Kageyama-Yahara et al. 2008).

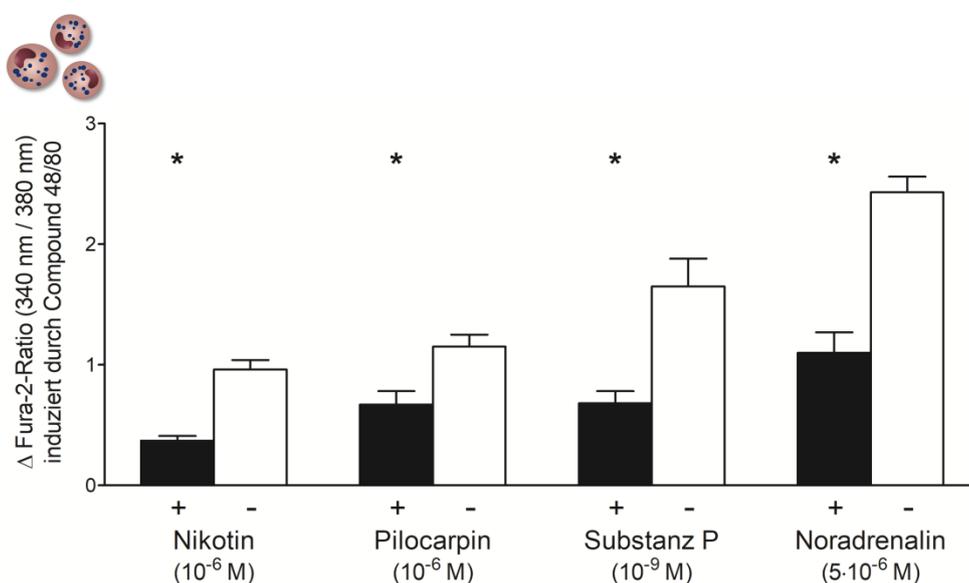


Abb. 39. Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als $\Delta\text{Fura-2}$ -Ratio) in RBL-2H3 durch eine Aktivierung mit Compound 48/80 ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in Anwesenheit (schwarze Balken) oder Abwesenheit (weiße Balken) der verschiedenen Agonisten. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM, $n = 55 - 68$ Zellen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ versus die Antwort auf Compound 48/80 der unbehandelten Kontrollen (ungepaarter t-Test oder U-Test).

Obwohl ein stimulierender Effekt von muskarinergen (Bani-Sacchi et al. 1986) und adrenergen (Butchers et al. 1991) Agonisten auf die Mastzellfunktion beschrieben ist, kam es hier paradoxerweise zu einer Abnahme der Compound-Antwort nach Vorbehandlung mit Pilocarpin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und Noradrenalin ($5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), wohingegen die Zahl der auf Compound 48/80 reagierenden Mastzellen nur geringfügig erniedrigt war (Abb. 39 und Abb. 40). So induzierte Pilocarpin einen um 42 % geringeren Anstieg der Fura-2-Ratio auf Compound 48/80 ($0,67 \pm 0,11$, $n = 58$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($1,15 \pm 0,10$, $n = 51$, $p < 0,05$, ungepaarter t-Test; Abb. 39).

Eine Abnahme der Amplitude des Fura-2-Signals nach Stimulation mit Compound 48/80 um mehr als 50 % zeigte sich nach Vorbehandlung mit Noradrenalin sowie nach Vorbehandlung mit Substanz P (Abb. 39). Das Neuropeptid Substanz P, für welches ebenfalls stimulierende Eigenschaften auf die Mastzellfunktion beschrieben sind (Buhner und Schemann 2012), verringerte die Δ Fura-2-Ratio nach Compound 48/80 auf $0,68 \pm 0,11$ ($n = 32$) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ($1,65 \pm 0,23$, $n = 47$, $p < 0,05$, ungepaarter t-Test). Auch hier antworteten nur 58 % aller untersuchten RBL-2H3 (32 von insgesamt 55 Zellen) mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Mastzelldegranulation durch Compound 48/80 (Abb. 40). Die Vorbehandlung mit den jeweiligen Agonisten führte zu keiner verminderten Vitalität der Mastzellen, gemessen an einer unverändert hohen Fura-2-Ratio nach Stimulation mit CPA ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Ergebnisse

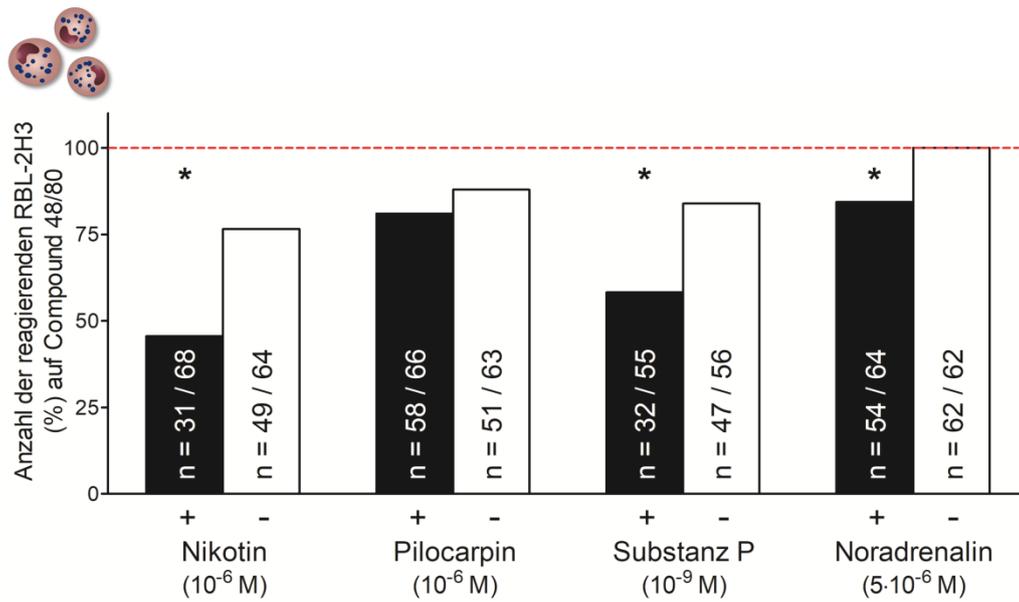


Abb. 40. Prozentzahl der RBL-2H3, die mit einem Anstieg des Fura-2-Signals auf Compound 48/80 antworteten, nach Vorbehandlung mit verschiedenen Agonisten für je 15 min (schwarze Balken) verglichen zu unbehandelten Kontrollen (weiße Balken). In jedem Balken ist die absolute Zahl an reagierenden RBL-2H3 angegeben in Bezug zur Gesamtanzahl, welche mit einem Anstieg des Fura-2-Signals auf CPA ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) als Vitalitätskontrolle reagierten. * $p < 0,05$ verglichen zur unbehandelten Kontrolle (χ^2 -Test).

6. Diskussion

6.1 Methodische Betrachtungen

6.1.1 Das Kolitismodell

Um die Pathomechanismen zu entschlüsseln, die an der Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (wie IBD) beteiligt sind, wurden bereits verschiedene Tiermodelle entwickelt, mit denen auf unterschiedlichem Weg eine akute oder chronische Darmentzündung experimentell hervorgerufen werden kann. Dabei unterscheidet man genetische, immunologische, chemische und spontane Modelle zur Induktion einer Enteritis/Kolitis (Pérez-Navarro et al. 2005b; Rijniere et al. 2007). Ich habe mich für eine chemische Variante entschieden, bei der TNBS (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) lokal im Kolon appliziert wurde. TNBS wirkt dabei als Hapten und löst in der Submukosa eine Th1-vermittelte Immunreaktion aus, gefolgt von einer transmuralen Entzündung des Kolons (Morris et al. 1989; Neurath et al. 2000). Als Lösungsvermittler wurde 50 % (v/v) Ethanol eingesetzt, welches zudem als „barrier breaker“ dient und lediglich das Eindringen von TNBS erleichtert. Dabei belegen verschiedene Studien, dass eine alleinige Applikation von Ethanol keine chronische Entzündung im Darm hervorruft (Morris et al. 1989; Antoniou et al. 2016).

Da die Konzentration an TNBS den Schweregrad der Entzündung bestimmt (Menozzi et al. 2006), wurde – auch um die Belastung der Versuchstiere so klein wie möglich zu halten – die Dosis (10 mg TNBS in 250 µl 50 % (v/v) Ethanol) so gering gewählt, dass es symptomatisch nur zu einer leichten Kolitis kam und keine Mortalität auftrat (s. 5.1 und Abb. 24 zur kurzfristigen Gewichtsabnahme nach TNBS-Applikation). Die lokale Applikation im Kolon hatte zudem den Vorteil, dass Kontrollgewebe des gleichen Tieres aus entfernteren, nicht entzündeten Darmabschnitten (hier: Jejunum) entnommen werden konnte. Da TNBS eine immunvermittelte (mit erhöhter Th1/Th17-Antwort), chronische Entzündung der

kompletten Darmwand auslöst, spiegelt dieses Modell annähernd das Erkrankungsbild von Morbus Crohn wider (Rijnierse et al. 2007; Padua et al. 2016). Eine Alternative zum TNBS-Modell wäre eine chemische Kolitis-Induktion mittels DSS (dextran sulfate sodium), welches oral über das Trinkwasser verabreicht wird und zu ähnlichen Symptomen wie bei Colitis Ulcerosa führt (z. B. mukosale Ulzeration, Diarrhö, Gewichtsverlust). Jedoch eignet sich das DSS-Modell eher zur Untersuchung von akuten entzündlichen Veränderungen der Mukosa, da diese Entzündung selbstlimitierend ist und weder B- noch T-Zellen in die Pathogenese involviert sind (Padua et al. 2016).

6.1.2 Heterogenität von Mastzellen

Da es infolge der Kolitis-Induktion mit TNBS zu einer immunvermittelten Entzündung der Darmwand kommt und Mastzellen vermutlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese von IBD einnehmen, wurde untersucht, inwieweit sich eine vorangegangene Sensibilisierung der Tiere auf eine Kolitis auswirkt und welche Folgen dies für die Darmfunktionen hat. Ein großes Problem bei Mastzellen besteht jedoch darin, dass diese sich stark an die gegebenen Bedingungen des lokalen Milieus, in dem sie sich befinden, anpassen und damit eine deutliche Heterogenität aufweisen (da Silva et al. 2014). Zudem existieren kontroverse Aussagen über die Mastzellanzahl im intestinalen Gewebe von IBD-Patienten, da sowohl Zunahmen als auch Abnahmen der Mastzellichte festgestellt wurden (Bischoff et al. 1996; Rijnierse et al. 2007). Diese Divergenzen könnten auch auf methodischen Problemen in der Detektion von Mastzellen beruhen. In der Literatur werden fast ausschließlich Toluidinblau-Färbungen, welche die Mastzellgranula metachromatisch darstellen, oder immunhistochemische Markierungen mit Antikörpern gegen Mastzellmediatoren angewandt. Die Verwendung spezifischer Antikörper ist dabei deutlich sensitiver als die klassische Färbung mit Toluidinblau (Walls und Amalinei 2014; Wouters et al. 2016). Jedoch muss bei beiden Methoden auf die physiologisch unterschiedliche Zusammensetzung und den Gehalt der Mastzellmediatoren in Abhängigkeit von Spezies und Lokalisation geachtet werden (Beil et al. 2000). Dies könnte die

unterschiedliche Detektion von Mastzellen aus Lunge und Darm in meinen Versuchen erklären: pulmonale Mastzellen unbehandelter Kontrolltiere waren immunopositiv nach Markierung mit einem Tryptase-Antikörper, wohingegen der gleiche Antikörper nicht in der Lage war Mastzellen in der Kolonwand anzufärben (s. 5.3). Ebenfalls konnte in qPCR-Experimenten auf cDNA-Ebene (mit mRNA als Ausgangsmaterial aus Kolon und Jejunum) keine Vervielfältigung von rMcpt-6 und rMcpt-7 erreicht werden (s. 5.6), welche die zwei Subtypen der Mastzelltryptase widerspiegeln. Mittels Toluidinblau war es nur möglich, vereinzelt mukosale bzw. submuköse Mastzellen in der Darmwand von Kontrolltieren anzufärben, jedoch nicht in den Segmenten der beiden Versuchsgruppen (OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis). Dies könnte auf eine geringfügige oder partielle Degranulation hindeuten, sodass die Sensitivität der Färbemethode nicht ausreichend ist, um Mastzellgranula im Sensibilisierungsmodell zu detektieren. Jedoch kann eine vollständige Degranulation der Mastzellen ausgeschlossen werden, da in den Ussing-Kammer-Experimenten eine Antigen-vermittelte Aktivierung der Mastzellen, gemessen als Ovalbumin-induzierter Anstieg der Anionensekretion, ausgelöst wurde (Abb. 25).

Als verlässlicher Marker in meinen Versuchen erwies sich hingegen der Nachweis der membranständige Tyrosinkinase c-Kit (CD117; Abb. 27), welche für Mastzellen spezifisch ist. Der immunhistochemische Nachweis von c-Kit erlaubt es Mastzellen unabhängig von einer erfolgten Degranulation zu markieren (Doyle et al. 2014; Wouters et al. 2016). Zwar tragen auch die interstitiellen Cajal-Zellen (ICC, interstitial cells of Cajal), welche als Schrittmacherzellen die gastrointestinale Motilität beeinflussen, c-Kit an ihrer Oberfläche, jedoch befinden sich diese Zellen innerhalb der Tunica muscularis (Komuro 1999), sodass aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation keine Verwechslungsgefahr mit Mastzellen in der Submukosa oder der Lamina propria besteht. Zudem zeichnen sich ICCs durch eine deutlich andere Form als Mastzellen aus: sie sind durch kleine Zellkörper und lange Fortsätze gekennzeichnet, welche untereinander ein feines Netzwerk bilden (Komuro 1999).

6.2 Die intestinale Epithelbarriere: Aufbau und Veränderungen unter Entzündungsbedingungen

Eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der Darmfunktionen und in der Regulation von Sekretion und Resorption spielt die Epithelbarriere, welche zum einen das Eindringen von pathogenen Keimen, Toxinen oder Antigenen aus dem Darmlumen verhindert und zum anderen die Durchlässigkeit für kleine, geladene Teilchen mit bestimmt. Die Enterozyten treten über Zellverbindungen mit Nachbarzellen in Kontakt. Diese Zellverbindungen teilt man in Tight Junctions, Adhäsionsjunctions, Desmosomen und Gap Junctions ein. Dabei spielen Tight Junctions eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Polarität, der Abdichtung gegen unerwünschte Noxen und der Regulation des parazellulären Transportes (Keita und Söderholm 2010). Wie bereits erwähnt (s. Kap. 2.2), zählen neben TAMPs auch Claudine zu den Tight Junction Proteinen. Die Expression mancher Claudine (v. a. Claudin-1, -3, -4, -5, -7 und -8) wirkt abdichtend auf epitheliale Barrieren, wohingegen andere Claudine (Claudin-2 und -15) eine porenbildende Funktion aufweisen (Günzel und Yu 2013).

Die Dichte und Expression der Claudine variiert je nach Spezies und Lokalisation im Darmrohr (Markov et al. 2010; Luettig et al. 2015, Garcia-Hernandez et al. 2017). So findet man z. B. eine höhere Dichte von Claudin-1, -3, -4, -5 und -8 im Dickdarm der Ratte (Markov et al. 2010). Ebenfalls zeichnet sich eine unterschiedliche Expression entlang der Krypten-Villus-Achse sowie an den unterschiedlichen Seitenflächen der einzelnen Enterozyten ab. An deren lateralen Seite wird verstärkt Claudin-1, -3, -4, -5 und -7 exprimiert, wohingegen Claudin-2, -8, -10, -12, -15, und -18 vermehrt apikal vorhanden sind (Günzel und Yu 2013; Garcia-Hernandez et al. 2017). Claudine sind integrale Membranproteine mit 4 Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen; N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Die extrazellulären Schleifen (ECL) sind wichtig für homophile bzw. heterophile Claudin-Claudin-Interaktionen zwischen benachbarten Epithelzellen (ECL2) sowie für die Ausbildung der ionenselektiven Poren (ECL1) (Abb. 41). Gerüstproteine, wie z. B.

Zonula occludens Protein 1 (ZO-1), stellen dabei die Verbindung des C-Terminus eines Claudins mit dessen PDZ-Domäne zum F-Aktin des Zytoskeletts her (Groschwitz und Hogan 2009). Da Myosin zum F-Aktin colokalisiert ist, stellt die Phosphorylierung der Myosinleichtkette (MLC) durch die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) über den klassischen Ca^{2+} /Calmodulin-Weg einen Hauptregulator der parazellulären Permeabilität dar (van Spaendonk et al. 2017). Daneben existieren auch weitere Kinasen – wie z. B. MAPK (mitogen-activated protein kinase), ERK 1/2 (extracellular signal-regulating kinase; gehört zur Familie der MAPK), PKC, PKA, oder Rho-Kinase – welche die Phosphorylierung der MLC und/oder Enzymaktivität der MLCK bzw. MLCP (Myosinleichtkettenphosphatase) beeinflussen (Abb. 41) und somit an der Regulation der Claudine sowie der Permeabilität beteiligt sind (Groschwitz und Hogan 2009; Günzel und Yu 2013; van Spaendonk et al. 2017). Damit bieten sich vielfältige Angriffspunkte zur Steuerung der parazellulären Permeabilität, z. B. unter Entzündungsbedingungen (s. nachfolgende Abschnitte).

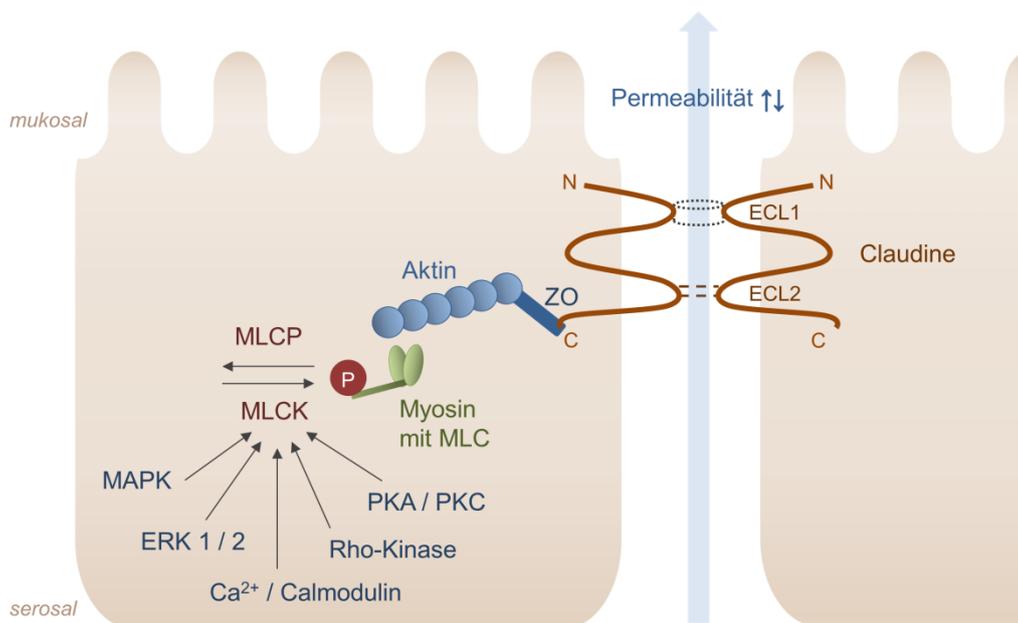


Abb. 41. Vereinfachte Darstellung der Claudin-Claudin-Interaktion (über ECL2) sowie deren Regulation über das Zytoskelett (über C-Terminus). Eine Aktivierung der MLCK führt zu einer Phosphorylierung der Myosinleichtkette (MLC). Durch eine Kontraktion der Aktinfilamente kommt es zu einem „Auseinanderziehen“ der Claudine. Diverse Enzyme können in diesen Wirkmechanismus eingreifen und so die parazelluläre Permeabilität ändern.

Das porenbildende Claudin-2 wird vor allem in durchlässigen Epithelien mit einem niedrigen transepithelialen Widerstand exprimiert (s. 3.8.1), wie dem proximalen Tubulus oder Dünndarm, und weist insbesondere eine Selektivität für Kationen auf. Unter physiologischen Bedingungen kann Claudin-2 nicht im humanen Kolon nachgewiesen werden, jedoch findet man eine erhöhte Expression in entzündeten Darmsegmenten von humanen IBD-Patienten (Zeissig et al. 2007; Luettig et al. 2015; Barmeyer et al. 2017). Dass eine erhöhte Claudin-2-Expression mit einem gesteigerten parazellulären Fluss von Kationen korreliert, konnte in einer Studie gezeigt werden, in der die Durchlässigkeit einer dichten Epithelzelllinie mit einem hohen transepithelialen Widerstand nach Transfektion mit Claudin-2-cDNA signifikant erhöht wurde (Amasheh et al. 2002). Neben einer verstärkten Expression von Claudin-2 wurde auch eine erniedrigte Expression von Claudin-3, -4, -5 und -8 sowie eine gesteigerte Apoptose des Darmepithels bei humanen IBD-Patienten beobachtet (Zeissig et al. 2007; Barmeyer et al. 2017; Garcia-Hernandez et al. 2017). Ebenfalls führte in meinen Versuchen an Ratten die Induktion einer TNBS-Kolitis zu einer gesteigerten Gewebeleitfähigkeit und zu einer erniedrigten Expression von Claudin-3 im distalen Kolon sowie im Jejunum (Abb. 29).

Obwohl lediglich lokal im Kolon eine Entzündung induziert wurde, wirkte sich diese auch auf die weiter oral gelegenen Jejunumsegmente aus (Tabelle 11), jedoch ohne den basalen I_{sc} sowie die basale G_t im Jejunum zu beeinflussen (Tabelle 9). Diese Segmentunterschiede bezüglich der basalen Eigenschaften des Epithels konnten ebenfalls in Geweben von humanen IBD-Patienten beobachtet werden: hier kam es nur im Dickdarm zu einer Erhöhung der basalen Anionensekretion und Permeabilität, jedoch nicht im Dünndarm (Crowe et al. 1997). Da eine gesteigerte Permeabilität mit dem Öffnen der Tight Junctions einhergeht und die Gefahr eines vermehrten Eindringens von Pathogenen birgt (was eine Immunreaktion auslöst und die Progression der Entzündung begünstigt), wird nach wie vor diskutiert, ob eine beschädigte Epithelbarriere der Auslöser oder die Folge einer chronischen Entzündung ist (König et al. 2016).

Neben chronischen Effekten zeigen proinflammatorische Zytokine auch kurzfristige Wirkungen am Darmepithel. So führte eine 1-stündige Vorinkubation ex vivo mit TNF α ($\geq 50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) oder IL-1 β zu einer gesteigerten parazellulären Permeabilität (gemessen als Anstieg der G_t) im distalen Kolon der Ratte (Abb. 33). Proinflammatorische Zytokine, wie TNF α , IL-1 β und IFN- γ , spielen eine Hauptrolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung einer chronischen Darmentzündung. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass TNF α und IFN- γ synergistisch wirken und die Integrität der Epithelbarriere über Wirkungen an den Tight Junctions oder am Zytoskelett verändern (Salim und Söderholm 2011; Wittkopf et al. 2014). Ein Öffnen der Epithelbarriere geht elektrophysiologisch mit einer Erhöhung der Gewebeleitfähigkeit (G_t) einher. Dies wurde bereits an einer humanen Kolonepithelzelllinie (HT29/B6) gezeigt, wo der Gewebewiderstand (also der Kehrwert der G_t), um 80 % herabgesetzt wurde, nachdem die Zellen mit TNF α ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) vorbehandelt wurden (Schmitz et al. 1999).

Diese Zytokin-abhängige Modulation der parazellulären Permeabilität beruht vermutlich auf einer Aktivierung der nicht-muskulären MLCK (nmMLCK) oder einer anderen Kinase, welche in die Kontrolle der Tight junctions involviert ist (Abb. 41). Eine Inkubation mit IL-1 β ließ den transepithelialen Widerstand der Caco2-Epithelzelllinie (humane Kolonkarzinomzelllinie) aufgrund einer verminderten Claudin-3-Expression absinken, was über β -Catenin¹ und die nmMLCK vermittelt wird (Haines et al. 2016). Ebenso kann TNF α über die nmMLCK das Öffnen der Tight Junctions induzieren; längerfristige Effekte hingegen beruhen vermutlich auf einer Änderung der Transkription von Tight Junction Proteinen (Edelblum und Turner 2009; Keita und Söderholm 2010; Wittkopf et al. 2014). Auch in meinen Experimenten wurde ein signifikanter Anstieg der Gewebeleitfähigkeit bereits nach 1-stündiger

¹ β -Catenin ist ein Protein mit dualer Funktion: zytoplasmatisch dient es als Gerüstprotein, im Zellkern als Modulator der Transkription.

Vorbehandlung mit $\geq 50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ TNF α oder $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IL-1 β gemessen (Tabelle 13, Abb. 33).

Aber nicht nur die Zytokine, sondern auch andere proinflammatorische Mediatoren bewirken eine Erhöhung der Permeabilität der Epithelbarriere. Eine durch Antigenkontakt induzierte Steigerung der parazellulären Durchlässigkeit ließ sich in meinen Versuchen anhand der Messung des transepithelialen Fluxes von Fluorescein nachweisen; ein Marker, der nur passiv das Darmepithel über den Zwischenzellraum passiert. So führte die Applikation von Ovalbumin im Jejunum sensibilisierter Tiere zu einem Anstieg der Fluorescein-Fluxrate; im distalen Kolon hingegen konnte keine Veränderung festgestellt werden (Abb. 26). Da kein Unterschied zwischen der OVA-sensibilisierten Gruppe und der OVA+Kolitis-Gruppe beobachtet wurde, wird der gesteigerte parazelluläre Fluss im Dünndarm sehr wahrscheinlich durch die vorangegangene Mastzellaktivierung verursacht.

Dass es nur im Jejunum zu einem Anstieg der parazellulären Permeabilität nach Antigenkontakt kam (Abb. 26), kann durch die segmentabhängige unterschiedlich hohe Mastzellanzahl begründet werden: im Jejunum stieg diese durch die Sensibilisierung um ca. 230 % an, wohingegen sie im Kolon leicht abfiel (Abb. 27). Nach Aktivierung intestinaler Mastzellen werden Mastzellmediatoren freigesetzt, welche permeabilitätssteigernd auf das Darmepithel wirken. Dabei scheinen Serinproteasen eine vorrangige Rolle zu spielen, deren Rezeptoren (PAR_{1,4}) sowohl auf Enterozyten als auch auf submukösen Neuronen und Mastzellen nachgewiesen wurden (Keita und Söderholm 2010). Nach einer Infektion von Ratten mit *Trichinella spiralis* wurde im Jejunum eine erhöhte Expression von diversen Mastzellchymasen, eine Downregulation von Claudin-3 sowie eine erhöhte Expression von Claudin-2 festgestellt, was mit einer gesteigerten Permeabilität einhergeht (Fernández-Blanco et al. 2015). Nicht nur Claudin-3, sondern auch die Expression von Claudin-5 sowie der transepitheliale Widerstand sind nach Stimulation von Epithelzellen mittels Chymase reduziert. Als Signalweg kommt hier eine Aktivierung des PAR₂ infrage sowie eine erhöhte MAPK- und Matrix-Metalloprotease-2-Aktivität (Groschwitz et al. 2013).

Ebenfalls scheinen ERK 1/2 sowie die MLCK an dem Öffnen der Tight Junctions nach Aktivierung von PAR₂ beteiligt zu sein, da die gesteigerte Permeabilität durch Applikation entsprechender Inhibitoren wieder verringert wurde (van Spaendonk et al. 2017).

Erstaunlicherweise war in meinen Versuchen an sensibilisierten Tieren die Expression der abdichtenden Claudine-3 und -4 im Kolon sowie im Jejunum im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (Abb. 29). Dies könnte auf einen kompensatorischen Mechanismus hindeuten, der das Ziel hat das Eindringen von Antigenen zu reduzieren. Jedoch bleibt die eigentliche Ursache hierfür spekulativ, da nur sehr wenige Studien über sogenannte Upregulationsmechanismen für diese Claudine existieren. Jedoch wird über eine mögliche Beteiligung von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie TGF- α und - β und EGF (epidermal growth factor), berichtet (McKay und Baird 1999; Lu et al. 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression der Claudine oder anderer Tight Junction Proteine durch verschiedene Stimuli moduliert werden kann, deren Signalwege nach wie vor nicht eindeutig geklärt sind. Dass diese jedoch eine zentrale Rolle bei IBD einnehmen – wenn auch nicht als alleiniger Auslöser der Erkrankung – ist unumstritten (Zeissig et al. 2007; Groschwitz und Hogan 2009; Hering und Schulzke 2009). Neben einer reduzierten Expression abdichtender Claudine sowie einer erhöhten Expression porenbildender Claudine, kann auch eine genetische Veranlagung für eine erhöhte intestinale Permeabilität als mögliche Ursache zur Entstehung von IBD infrage kommen: so wurde bei gesunden Verwandten ersten Grades von Morbus-Crohn-Patienten eine erhöhte parazelluläre Permeabilität nachgewiesen, die mit einer Mutation im CARD15/NOD2-Gen korreliert (Buhner et al. 2006). Da jedoch nicht alle IBD-Patienten diese Mutation besitzen, bleibt nach wie vor unklar, ob ein Öffnen der Tight Junctions die Ursache oder Folge der Entstehung von IBD ist.

6.3 Änderung der epithelialen Sekretion unter Entzündungsbedingungen

6.3.1 Einfluss auf die basale Sekretion

Eine chronische Darmentzündung, wie sie bei IBD vorliegt, wird durch ein gestörtes Wechselspiel zwischen Epithel, intestinalem Mikrobiom, Immunzellen und dem enterischen Nervensystem bestimmt. Sie geht nicht nur mit einer gestörten Epithelbarriere einher, sondern auch mit einem erhöhten Verlust von Wasser und Elektrolyten (Bernardazzi et al. 2016). Einer gesteigerten Nettosekretion von Ionen (v.a. Cl^- und Na^+) folgt Wasser aus osmotischen Gründen, was sich symptomatisch als Diarrhö manifestiert (s. auch Abb. 5). Intestinale Mastzellen spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung einer chronischen Darmentzündung, da sie neben prosekretorischen Mediatoren, wie Histamin, auch proinflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN-}\gamma$, freisetzen (Bischoff 2009).

Die zentrale Rolle der Zytokine zeigt sich auch an den erhöhten Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN-}\gamma$ im Serum und im Gewebe von IBD-Patienten in der Humanmedizin (Bauer et al. 2010; Strober und Fuss 2011; Singh et al. 2016). Sie üben einen prosekretorischen Effekt auf intestinale Epithelzellen aus. So führte in meinen Ex-vivo-Versuchen $\text{TNF}\alpha$ ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) zu einem Anstieg des basalen I_{sc} (Tabelle 12). Dies korreliert mit den Arbeiten von Schmitz et al. (1996) und Bode et al. (1998), wo $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ (jedoch nicht $\text{IFN-}\gamma$) die epitheliale Anionensekretion am distalen Kolon steigerten. Lange Zeit hatte man angenommen, dass Noxen bzw. proinflammatorische Zytokine direkt zu einer Erhöhung der Anionensekretion und demzufolge zu einer sekretorischen Diarrhö führen. Neuere Studien konnten jedoch einen anderen Wirkmechanismus aufzeigen: sowohl die aktive Ionensekretion als auch die aktive Ionenresorption ist bei IBD-Patienten vermindert. Da letztere aber deutlich stärker herunterreguliert wird, resultiert netto gesehen eine erhöhte Elektrolytsekretion

(Martínez-Augustin et al. 2009), die sich als Anstieg des I_{sc} bei Ex-vivo-Proben von humanen IBD-Patienten äußerte (Crowe et al. 1997).

Die Ursache für eine reduzierte Resorption von Ionen (v. a. Na^+ und Cl^-) liegt in einer Downregulation von apikalen Ionentransportern unter Entzündungsbedingungen. Davon betroffen sind beispielsweise Na^+/H^+ - oder Cl^-/HCO_3^- -Austauscher sowie epitheliale Na^+ -Kanäle (ENaCs) (Priyamvada et al. 2015; Camilleri et al. 2017; Anbazhagan et al. 2018). Interessanterweise sind epitheliale Cl^- -Transporter und -kanäle, welche maßgeblich an der aktiven Cl^- -Sekretion beteiligt sind (s. auch Abb. 2), unverändert: so konnten keine Unterschiede in der mRNA- oder Protein-Expression der CFTR- oder der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanäle sowie des NKCC1 unter Entzündungsbedingungen festgestellt werden (Sanchez de Medina et al. 2002; Hirota und McKay 2009). In meiner Arbeit stieg bei den Kolitis-Tieren der basale I_{sc} – als Maß für die spontane Anionensekretion – numerisch um 60 % im Kolon sowie interessanterweise auch geringfügig um 17 % im Jejunum an (keine statistische Signifikanz im Vergleich zu Darmsegmenten sensibilisierter Tiere; Tabelle 9), was mit der in der Literatur beschriebenen gesteigerten basalen Nettosekretion korreliert.

Interessanterweise kam es nach Zugabe des Zytokinmix (bestehend aus $TNF\alpha$, IL-1 β und IFN- γ) nicht zu einem langsamen, permanenten Anstieg des I_{sc} und der G_t (wie es bei $TNF\alpha$ der Fall war), sondern zu einer transienten Erhöhung, welche nach ca. 30 min ihr Maximum erreichte und innerhalb von 1 h wieder auf das alte Baseline-Niveau abklang (Abb. 32). Ein möglicher Grund für diesen Anstieg könnte eine Freisetzung von Prostaglandinen (v. a. PGE_2) sein, welche prosekretorisch am Darmepithel wirken, und zwar sowohl direkt über eine Aktivierung der Epithelzellen als auch indirekt über eine Stimulation des Plexus submucosus (Diener et al. 1988). Dies wird durch eine weitere Studie bestätigt, bei der der I_{sc} -Anstieg nach $TNF\alpha$ -Zugabe durch Indomethacin, ein Cyclooxygenase-Inhibitor, am humanen Kolon vollständig gehemmt wurde (Schmitz et al. 1996). Ein ähnlich transienter PGE_2 -vermittelter Anstieg des I_{sc} wurde auch an epithelialen T_{84} -Zellen in Ussing-Kammer-Versuchen

gemessen, nachdem diese mit dem Überstand einer weiteren bakteriell infizierten Epithelzelllinie (HT29) stimuliert wurden (Eckmann et al. 1997).

Neben der Beeinflussung der Epithelbarriere sowie dem basalen Elektrolyttransport kommt es unter Entzündungsbedingungen auch zu einer Änderung der stimulierten Sekretion am Epithel.

6.3.2 Interaktion mit Sekretagoga

Neben den Auswirkungen auf die basale Sekretion und die Wirkung auf Mastzell-vermittelte Sekretionsvorgänge (s. Kapitel 6.4) habe ich ex vivo untersucht, inwieweit sich die In-vivo-Induktion einer Kolitis mittels TNBS bzw. die Vorbehandlung mit proinflammatorischen Zytokinen auf die Wirkung typischer Sekretagoga auswirkt. Dazu wurde sowohl bei den Präparaten von den mit TNBS-vorbehandelten Tieren als auch bei den mit Zytokinen inkubierten Kolonsegmenten die Wirkung des Ca^{2+} -abhängigen Sekretagogs Carbachol gemessen. Bei den Zytokin-Versuchen wurde außerdem der Stromanstieg, der durch Forskolin induziert wurde, erfasst. Forskolin ist ein Aktivator von Adenylatzyklasen, welches ebenso wie VIP einen intrazellulären Anstieg von cAMP bewirkt und woraufhin CFTR-Kanäle geöffnet werden (Abb. 2) (Barrett und Keely 2000).

Carbachol ist ein stabiles Acetylcholinderivat und führt über eine Aktivierung von muskarinergen M_3 -Rezeptoren (sowie in geringerem Ausmaß auch über M_1 -Rezeptoren) zu einem Anstieg der Anionensekretion am Darmepithel (Haberberger et al. 2006). Vermittelt wird dies durch einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol, welcher zu einem Öffnen Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle und demzufolge zu einer Hyperpolarisation der Epithelzelle führt (Böhme et al. 1991; Hirota und McKay 2006). Dies dient als Antriebskraft für den Cl^- -Ausstrom über apikale Cl^- -Kanäle (s. auch Abb. 2). Die durch Carbachol induzierte Anionensekretion verläuft biphasisch (Strabel und Diener 1995) und kann in einen schnellen initialen Peak sowie in ein langsam abfallendes Plateau unterteilt werden, was für eine unterschiedliche Herkunft

von Ca^{2+} spricht. Der erste, schnelle Peak ist durch eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern gekennzeichnet (Lindqvist et al. 1998); der zweite, langsamere Abfall vermutlich durch ein Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen in der Membran der Enterozyten, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration aufrechterhalten wird (Frings et al. 1999). Dass TNBS-Kolitismodelle Ca^{2+} -abhängige Signalwege bei der Ratte negativ beeinflussen (gemessen als verminderte Sekretionsleistung durch Carbachol oder Histamin), konnte in verschiedenen Studien bereits gezeigt werden (Sanchez de Medina et al. 2002; Pérez-Navarro et al. 2005a; Pérez-Navarro et al. 2005b). Der reduzierte Carbachol-Peak kann auf eine reduzierte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und PKC sowie der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle unter Entzündungsbedingungen zurückgeführt werden (Hirota und McKay 2009). Interessanterweise konnte dieses Phänomen nach Ex-vivo-Präinkubation mit IL-1 β sowie mit dem Zytokinmix (für 1 und 2 h) festgestellt werden, jedoch nicht nach Kolitis-Induktion in vivo mittels TNBS (Abb. 31; Tabelle 9). Ursache dafür könnte die parallel zur TNBS-Kolitis induzierte Sensibilisierung sein, wodurch der inhibitorische Effekt der Kolitis maskiert sein könnte, da es durch den langfristigen Kontakt von Epithelzellen mit Mastzellmediatoren zu einer gesteigerten Cl^- -Sekretion nach Carbachol kommt (Barrett 1991). Hingegen zeigte sich nach Induktion der TNBS-Kolitis ein verändertes Bild im Zeitverlauf der Carbachol-Antwort im distalen Kolon: der erste, schnelle Abfall erreichte unter Entzündungsbedingungen früher wieder Baseline-Niveau im Vergleich zu den Kolonsegmenten sensibilisierter Tiere, wodurch die Carbachol-Antwort verkürzt wurde (Tabelle 10, s. Inset Abb. 25). Dies beruht möglicherweise auf einem schnelleren Entleeren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher unter Entzündungsbedingungen. Ursache dafür könnte eine Änderung von intrazellulären Enzymen oder Transportproteinen sein, wie z. B. eine Modulation des IP_3 -Signalwegs und der darauffolgenden Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, welche die erste Phase der Carbachol-Antwort repräsentiert (Lindqvist et al. 1998). Weiterhin wäre auch eine beschleunigte Ca^{2+} -abhängige Internalisierung des basolateralen NKCC1 denkbar, welche als negativer Feedbackmechanismus zur induzierten Cl^- -Sekretion stattfindet (Reynolds et al. 2007).

Ein weiterer Signalweg, über den eine Cl^- -Sekretion ausgelöst werden kann, besteht in der Erhöhung des cAMP-Spiegels und einer Aktivierung der PKA, woraufhin CFTR-Kanäle geöffnet werden und Cl^- aus der Zelle in das Darmlumen strömt. Zur Stimulation dieses Signalwegs wurde Forskolin verwendet, welches über eine Aktivierung von Adenylatzyklen zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Die individuell applizierten Zytokine hatten keine Auswirkung auf die cAMP-vermittelte Cl^- -Sekretion (Abb. 31). Lediglich nach der 2-stündigen Vorinkubation mit dem Zytokinmix war der Anstieg des I_{sc} auf Forskolin in den Mukosa-Submukosa-Präparationen des distalen Kolons vermindert (Abb. 31). Ähnliches wurde an Dickdarmsegmenten von Morbus-Crohn-Patienten beobachtet (Crowe et al. 1997) und könnte durch eine verminderte Aktivität der Adenylatzyklen erklärt werden (Sanchez de Medina et al. 2002).

Interessanterweise waren alle Änderungen bezüglich der Sekretion oder Gewebeleitfähigkeit nach 3-stündiger Inkubation mit dem Zytokinmix wieder verschwunden, wohingegen bei Kolitis-Induktion mittels TNBS in vivo auch noch 7 Tage nach Applikation von TNBS Änderungen der Epithelfunktionen feststellbar waren. So scheint es, dass eine kurzfristige Schädigung des Darmepithels wieder innerhalb weniger Stunden kompensiert werden kann und erst bei Bestehenbleiben einer chronischen Entzündung langfristige Folgen nach sich zieht.

6.4 Mastzellichte und Mastzell-vermittelte Sekretionsprozesse am Darmepithel unter Entzündungsbedingungen

Nach Antigenkontakt führt die Mastzelldegranulation über eine Freisetzung verschiedener Mediatoren (wie Histamin, Proteasen, Prostaglandine und Leukotriene) zu einer erhöhten Sekretion von Anionen (vor allem von Cl^-) am Darmepithel (Javed et al. 1992). Dies wird zum einen direkt durch die Aktivierung epithelialer Rezeptoren vermittelt, aber auch indirekt über eine Aktivierung submuköser Neurone, was

wiederum mit einer Freisetzung von prosekretorischen Neurotransmittern wie ACh und VIP einhergeht (s. auch Abb. 2). Experimentell lässt sich dies durch eine Sensibilisierung von Tieren gegen ein definiertes Antigen (hier: Ovalbumin) nachahmen. Nach Isolation von Dün- oder Dickdarmpräparaten eben solcher Tiere löste ein Antigenkontakt ex vivo in 100 % der untersuchten Gewebe eine Anionensekretion aus, erkennbar als Anstieg des I_{sc} (Abb. 25).

Immunhistochemisch konnte ein segmentabhängiger Unterschied in der Mastzellanzahl nach Sensibilisierung festgestellt werden: im distalen Kolon kam es zu einer leichten Abnahme, im Jejunum hingegen erhöhte sich die Mastzellanzahl um ca. 230 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abb. 27). Dies korreliert auch mit der unterschiedlich starken Antwort der Anionensekretion auf Ovalbumin und Carbachol in den Ussing-Kammer-Versuchen. Vergleicht man die Ovalbumin-Antwort im Kolon mit der von Carbachol, so betrug der Ovalbumin-induzierte I_{sc} (ΔI_{sc}) nur ca. 50 % des Carbachol-induzierten Kurzschlussstroms. Im Jejunum hingegen zeigte sich das Gegenteil: hier war die Ovalbumin-Antwort mehr als doppelt so hoch wie die Reaktion auf Carbachol (Tabelle 9). Dies könnte an der höheren Mastzellichte im Jejunum und der damit verbundenen, stärkeren Antigen-vermittelten Reaktion auf Ovalbumin liegen.

Obwohl verschiedene Berichte über eine erhöhte Mastzellanzahl bei IBD-Patienten in der humanmedizinischen Literatur vorliegen (z. B. Rijniere et al. 2007), existieren auch Aussagen über eine unveränderte oder sogar reduzierte Mastzellanzahl bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (z. B. Bischoff et al. 1996). Auch in dem von mir eingesetzten Rattenmodell (Sensibilisierung gegen Ovalbumin \pm Induktion einer Kolitis) reagierte das Darmepithel der OVA+Kolitis-Gruppe mit einem tendenziell reduzierten Anstieg der Anionensekretion (gemessen als I_{sc}) nach Stimulation mit Ovalbumin im Vergleich zu den OVA-sensibilisierten Tieren (Abb. 25). Dieser Effekt konnte nicht nur am Kolon, sondern auch im Jejunum (wenn auch in geringerem Ausmaß) beobachtet werden, welches entfernt von der lokal induzierten Entzündung lag. Die reduzierte I_{sc} -Antwort auf Ovalbumin kann jedoch nicht durch

eine generell verminderte Sekretionsleistung des Epithels erklärt werden, da die Antwort auf das ACh-Derivat Carbachol in der OVA+Kolitis-Gruppe unverändert war im Vergleich zur alleinigen Sensibilisierung. Die Ursache muss also in der Darmwand weiter „upstream“ zu suchen sein, z. B. auf Mastzellebene. Nach immunhistochemischer Markierung und quantitativer Analyse von Darmsegmenten der drei verschiedenen Versuchsgruppen (Kontrolle, OVA-sensibilisiert, OVA+Kolitis) wurde segmentabhängig eine unterschiedliche Mastzellanzahl festgestellt: die Mastzellanzahl im Jejunum (nicht aber im Kolon) stieg nach vorheriger Sensibilisierung um ca. 230 % an. Wie dieser Segmentunterschied zustande kommt, ist unklar. Allerdings macht es physiologisch durchaus Sinn die Dichte an Mastzellen im Dünndarm stärker hochzuregulieren, da diese aufgrund ihrer Befähigung zur Phagozytose und der Freisetzung von Mediatoren essentiell zur Abwehr beitragen. Da der Dünndarm bei oraler Aufnahme eines Antigens deutlich früher in Kontakt mit dem Antigen kommt, wird er aufgrund der „Verdünnungseffekte“ durch intestinale Sekrete in weiter aboral gelegenen Darmabschnitten höheren Antigenkonzentrationen ausgesetzt sein als der Dickdarm.

Die zusätzliche Induktion einer Kolitis verursachte sowohl im Kolon als auch im Jejunum einen leichten Abfall der Mastzellendichte (Abb. 27). Die leichte Abnahme in der OVA+Kolitis-Gruppe korreliert mit der reduzierten Sekretionsleistung des Epithels nach Antigenkontakt. Grund dafür könnte eine mögliche Apoptose sein, welche immunhistochemisch mit einer erhöhten Anzahl an Caspase3-positiven RBL-2H3 nach 3-tägiger Vorinkubation mit einem Mix aus proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen wurde (Abb. 36). Ebenfalls verringerte eine 1-stündige Vorinkubation der Kolonpräparate mit einem Zytokinmix (TNF α , IL-1 β und IFN- γ) die epitheliale Sekretion, die sich durch eine anschließende Mastzellstimulation auslösen ließ. Der Anstieg des I_{sc} , den der Mastzelldegranulator Compound 48/80 unter diesen Bedingungen verursachte, war numerisch um ca. 50 % vermindert, auch wenn diese Hemmung aufgrund der Streuung der Daten keine Signifikanz erreichte (Abb. 31).

Histamin, einer der Hauptmediatoren intestinaler Mastzellen, führt über eine Aktivierung von Histaminrezeptoren (v. a. H_1 und H_2) sowohl direkt an den Epithelzellen (Schultheiss et al. 2006) als auch indirekt über eine Stimulation von sekretomotorischen Neuronen im Plexus submucosus (Bell et al. 2015) zu einer gesteigerten Cl^- -Sekretion in das Darmlumen. In den Zellen wird dieser Signalweg über die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern vermittelt. Dass es unter Entzündungsbedingungen zu einer verminderten Cl^- -Sekretion durch Histamin kommt, konnte sowohl in Darmsegmenten von humanen IBD-Patienten (Crowe et al. 1997) als auch im TNBS-Kolitismodell bei verschiedenen Nagern festgestellt werden (Pérez-Navarro et al. 2005a). Auch meine Ergebnisse wiesen eine reduzierte Anionensekretion nach 1-stündiger Vorinkubation mit IL-1 β sowie mit dem Zytokinmix auf (Abb. 31). Ursache dafür kann zum einen eine Beeinflussung der Epithelzellen selbst oder aber auch der submukösen Neurone sein. Zu der Hypothese, dass der Ca^{2+} -Signalweg in den Enterozyten durch Zytokine beeinträchtigt wird, passt auch die Abschwächung der Carbachol-induzierten Sekretion nach Vorinkubation mit IL-1 β und dem Zytokinmix (Abb. 31). Da beide Sekretagoga – abgesehen von den unterschiedlichen Rezeptoren (M_1 oder M_3 versus H_1 oder H_2) – den gleichen Signalweg zur Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern nutzen, sprechen die Ergebnisse für eine direkte Beeinflussung der Zytokine auf die involvierten Signalmoleküle/Enzyme wie PLC, IP $_3$ oder DAG. Jedoch müsste dies in zukünftigen Untersuchungen noch genauer belegt werden, z. B. durch Messungen mit Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen (wie etwa Fura-2) an Krypten oder isolierten Epithelzellen, die mit proinflammatorischen Zytokinen vorbehandelt wurden.

Neben Änderungen in der Ansprechbarkeit des Epithels auf Histamin könnte die verminderte sekretorische Antwort (I_{sc} -Anstieg) in Gegenwart proinflammatorischer Zytokine aber auch auf Veränderungen an den sekretomotorischen Neuronen beruhen. Daher wurden Interaktionen zwischen Mastzellen und submukösen Neuronen unter Entzündungsbedingungen genauer untersucht.

6.5 Der Effekt von Neurotransmittern auf die Mastzellfunktion und die Mastzell-vermittelte Sekretion

In der Literatur belegen verschiedene Daten, dass Mastzellen und enterische Neurone in bidirektionaler Richtung miteinander kommunizieren und dass diese Interaktionen möglicherweise an der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt sind (van Nassauw et al. 2007; Rijniere et al. 2007; Buhner und Schemann 2012). Um ein In-vitro-Modell für die Untersuchung dieser Interaktion zu testen, wurde eine Kokultur aus einer Mastzell-äquivalenten Zelllinie der Ratte (RBL-2H3) und submukösen Ganglien eingesetzt. Dass Neurone Mastzellen direkt stimulieren können, zeigen die von mir erhobenen Imaging-Daten während einer elektrischen Feldstimulation (EFS): ein für 10 s angelegtes Feld aus bipolaren Spannungspulsen löste – wie zu erwarten – eine Stimulation der submukösen Neurone aus, die als Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (gemessen als Fura-2-Ratio) erfasst wurde und die durch das Neurotoxin Tetrodotoxin unterdrückbar war. Zeitverzögert reagierten 57 % der benachbarten Mastzellen mit einem (wenn auch geringeren) Anstieg des Fura-2-Signals (Abb. 38). Ähnliches wurde von Buhner et al. (2017) an humanem Kolonsegmenten nachgewiesen, wo in etwa ein Drittel der Mastzellen auf eine neuronale Stimulation reagierte. Erklären lässt sich dies durch eine zeitverzögerte Stimulation der Mastzellen aufgrund der freigesetzten Neurotransmitter, welche per Diffusion ihren Wirkort (die Mastzellen) erreichen. Dabei zählen Acetylcholin (ACh) und Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) zu den Haupttransmittern submuköser Neurone, wohingegen Substanz P, Neuropeptid Y oder Somatostatin in geringerem Ausmaß vorkommen (Furness 2000; Li et al. 2015). Ein weiterer wichtiger Neurotransmitter ist Noradrenalin, welches aus sympathischen Nervenendigungen freigesetzt wird und ebenfalls pulmonale Mastzellen beeinflussen kann (Butchers et al. 1991).

Um die Wirkung dieser Neurotransmitter auf Mastzellen zu untersuchen, wurde einer Monokultur aus RBL-2H3-Zellen, die mit Fura-2 aufgeladen waren, verschiedene Neurotransmitter (Substanz P, Noradrenalin) bzw. Agonisten cholinergischer Rezeptoren

(Nikotin, Pilocarpin) appliziert (Tabelle 15). Alle von mir getesteten Agonisten waren in der Lage die Mastzellen (RBL-2H3) zu stimulieren, was an einem Anstieg des Fura-2-Signals zu erkennen war. Die Amplitude dieser Antwort war am größten nach Zugabe von Noradrenalin und am geringsten nach Nikotin (Noradrenalin > Substanz P > Pilocarpin > Nikotin). Zudem reagierten unterschiedlich viele Mastzellen auf den jeweils applizierten Agonisten (Substanz P > Noradrenalin > Pilocarpin = Nikotin). Dies spricht für eine unterschiedliche Sensitivität der Mastzellen für bestimmte Neurotransmitter und eine unterschiedliche Rezeptordichte/-verteilung.

Neben der generellen Mastzellstimulation durch die getesteten Agonisten wurde auch ein unterschiedlicher und teils kontroverser Effekt auf die Mastzellaktivierung durch Compound 48/80 beobachtet. Alle verwendeten Agonisten verminderten den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Anstieg der Fura-2-Ratio), den dieser Mastzelldegranulator induziert, im Vergleich zu unbehandelten RBL-2H3-Zellen (Abb. 39). Dabei war jedoch der inhibitorische Effekt von Nikotin am größten (Nikotin > Substanz P = Noradrenalin > Pilocarpin). Neben dem direkten Effekt auf die Mastzellaktivierung zeigte sich ein divergentes Bild bezüglich der Anzahl an reagierenden Mastzellen auf Compound 48/80: mit Ausnahme von Pilocarpin kam es hier zu einer reduzierten Anzahl (Nikotin > Substanz P > Noradrenalin) (Abb. 40).

Dieser hemmende Effekt von Nikotin auf Mastzellen beruht vermutlich auf einer Aktivierung der inhibitorischen $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten des nikotineren Rezeptors, welche auf murinen Mastzellen nachgewiesen wurden (Kageyama-Yahara et al. 2008; Yamamoto et al. 2014). Bezüglich der konzentrations- und zeitabhängigen Wirkung von Nikotin auf die Mastzelldegranulation liegen jedoch unterschiedliche Aussagen in der Literatur vor: Nikotin (Konzentrationen im nanomolaren Bereich) führt in RBL-2H3 nach 8-stündiger Inkubation zwar nicht zu einer Degranulation von Histamin oder der β -Hexosaminidase (ein in den Mastzellgranula gespeichertes Enzym), jedoch hemmt es die Freisetzung bzw. Expression von Leukotrienen (LTC_4) und Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$) – vermutlich über eine Hemmung der zytosolischen PLA_2 -Aktivität und des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalwegs (Mishra et al. 2010). Hingegen wird die

Freisetzung der β -Hexosaminidase sowohl durch Nikotin in höheren Konzentrationen (im millimolaren Bereich) in mBMMC (murine bone marrow-derived mast cells) (Kageyama-Yahara et al. 2008) als auch durch die Applikation einer Zigarettenrauchlösung (CSS = cigarette smoking solution; beinhaltet Nikotin) in den RBL-2H3 innerhalb weniger Minuten gehemmt (Fowler et al. 2003). Dieser hemmende Effekt von Nikotin zeigte sich in meinen Untersuchungen nicht nur bei der Mastzellaktivierung in den Fura-2-Experimenten (Abb. 39, Abb. 40), sondern auch bei der durch Mastzellaktivierung ausgelösten Sekretion am Darmepithel: so war die I_{sc} -Antwort auf Compound 48/80 um 80 % in Gegenwart von Nikotin vermindert (Abb. 37). Dies kann jedoch nicht auf einen antisekretorischen Effekt von Nikotin am Epithel selbst zurückgeführt werden, da Nikotin am Kolon zu einer Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase über nikotinerge Rezeptoren führt und damit die Anionensekretion fördert (Lottig et al. 2019). Ebenfalls kann dieses Phänomen nicht durch eine verminderte Vitalität des Epithels erklärt werden, da die Reaktion auf Carbachol und Forskolin nach Nikotinvorbehandlung unverändert war (Abb. 37). Dieser inhibitorische Effekt über nikotinerge Rezeptoren auf Mastzellen und die damit verbundene verminderte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (wie z. B. $TNF\alpha$) könnte die Verbesserung der Symptome bei zigarettenrauchenden Colitis-Ulcerosa-Patienten erklären (Berkowitz et al. 2018). Physiologischerweise wird diese anti-inflammatorische Wirkung wahrscheinlich über den Vagusnerv und nikotinerge Rezeptoren sowie Makrophagen vermittelt, welche eine wichtige Rolle beim Abklingen einer Kolitis spielen (Ghia et al. 2006).

Ähnlich wie Nikotin lösten auch Noradrenalin, Substanz P und Pilocarpin eine Mastzellaktivierung aus bei gleichzeitiger Verminderung der Antwort auf Compound 48/80. Jedoch führte keiner dieser Agonisten zu einer verminderten Anionensekretion in den Ussing-Kammer-Versuchen nach Zugabe des Mastzelldegranulators (Abb. 37). Dieser „hemmende“ Effekt beruht vermutlich auf einer vorangegangenen, starken Aktivierung der Mastzellen durch die Agonisten selbst, die einer nachfolgenden weiteren Aktivierung durch Compound 48/80 entgegensteht. Die Vitalität der Mastzellen wurde jedoch nicht durch die verschiedenen Agonisten beeinflusst, da

keine verminderte Reaktion auf den SERCA-Blocker Cyclopiazonsäure festgestellt wurde (s. Kap. 5.13).

6.6 Wirkung proinflammatorischer Zytokine auf die Mastzell-Neuron-Interaktionen

Die Interaktionen zwischen Mastzellen und enterischen Neuronen spielen bei Entzündungsbedingungen eine wichtige Rolle, da vermutet wird, dass es unter anderem dadurch zu einer Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung bei IBD kommt (Rijnierse et al. 2007). Viele Mastzellmediatoren stimulieren sekretomotorische Neurone, z. B. daran erkennbar, dass sich die durch Antigenkontakt ausgelöste Cl^- -Sekretion in vitro bei verschiedenen Spezies durch das Neurotoxin Tetrodotoxin stark vermindern lässt (Javed et al. 1992; Hug et al. 1996).

Um zu untersuchen, ob sich die Interaktion zwischen Mastzellen und submukösen Neuronen unter Entzündungsbedingungen verändert, wurde die Neuron-Mastzell-Cokultur mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen bzw. einem Zytokinmix vorbehandelt. Danach wurde Compound 48/80 zugesetzt, um durch Freisetzung von Mastzellmediatoren (v. a. Histamin und Proteasen) benachbarte submukösen Neurone zu aktivieren, was an einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (und demzufolge einer Änderung des Fura-2-Signals) gemessen werden kann (Bell et al. 2015). Compound 48/80 ist dabei nicht in der Lage submuköse Neurone aus dem distalen Kolon der Ratte direkt zu stimulieren (Bell 2015; und eigene unveröffentlichte Beobachtungen). Die Vorinkubation mit $\text{TNF}\alpha$ führte dazu, dass die Antwort der Neurone auf die Mastzelldegranulation deutlich gesteigert war. Dies zeigte sich zum einen nach Vorinkubation mit einer niedrigen $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration ($10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) an dem signifikant höheren Ca^{2+} -Anstieg (Abb. 34). Zum anderen bewirkte eine Vorbehandlung mit der höheren $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) eine signifikante

Zunahme des Prozentsatzes an Neuronen (Respondern), die auf die Mastzelledegranulation mit einem Ca^{2+} -Anstieg reagierten (Abb. 35). Park et al. (2008) beobachteten ein ähnliches Phänomen: nach Inkubation von Neuronen aus der Großhirnrinde der Maus mit $\text{TNF}\alpha$ zeigten diese höhere Ca^{2+} -Antworten nach muskarinergem Stimulation, vermutlich aufgrund einer Hochregulierung von IP_3 -Rezeptoren.

Da unter Entzündungsbedingungen Mastzelleffekte tendenziell durch die numerische Verminderung der Mastzellichte herunterreguliert werden (zu sehen im Kolutismodell; Abb. 27) und gleichzeitig die Ansprechbarkeit des Epithels auf Mastzellmediatoren vermindert ist (Tabelle 9), stellt die Steigerung der neuronalen Ansprechbarkeit auf Mastzellmediatoren (Abb. 34, Abb. 35) möglicherweise eine Art sinnvolle Gegenregulation dar. So können auch unter Entzündungsbedingungen Abwehrvorgänge, wie z. B. Induktion einer epithelialen Sekretion zum „Ausspülen“ potenziell schädlicher Stoffe, aufrecht gehalten werden. Darüber, wie sich enterische Neurone unter Entzündungsbedingungen verhalten, existieren kontroverse Aussagen in der Literatur. Zahlreiche morphologische Abweichungen sind bei IBD-Patienten oder in Kolutismodellen an Nagern beschrieben (erhöhte/erniedrigte Neuronenanzahl oder -größe, Wachstum bzw. Verlust von Dendriten/Axonon) sowie teils kontroverse Aussage über die Transmitterdichte in enterischen Neuronen: neben einem erhöhten bis erniedrigten VIP-Gehalt bei IBD-Patienten (Lakhan und Kirchgessner 2010; Gougeon et al. 2013), konnte ein erhöhter Gehalt an Substanz P sowie eine erhöhte Rezeptorendichte nach einer *Trichinella spiralis*-Infektion festgestellt werden (Collins et al. 1992).

Daher scheint es dringend geboten, in zukünftigen Experimenten parallel zu den in meinen Versuchen erfassten Änderungen der elektrophysiologischen Parameter des Darmepithels (Abb. 25, Tabelle 9) auch systematische Änderungen der morphologischen Eigenschaften und der Expression von Neurotransmittern in den verschiedenen Abschnitten des enterischen Nervensystems und in den entsprechenden Kolutismodellen zu untersuchen.

In der folgenden Abbildung (Abb. 42) sind noch einmal die wichtigsten Ergebnisse der Dissertation mit Bezug auf die Literatur zusammengefasst.

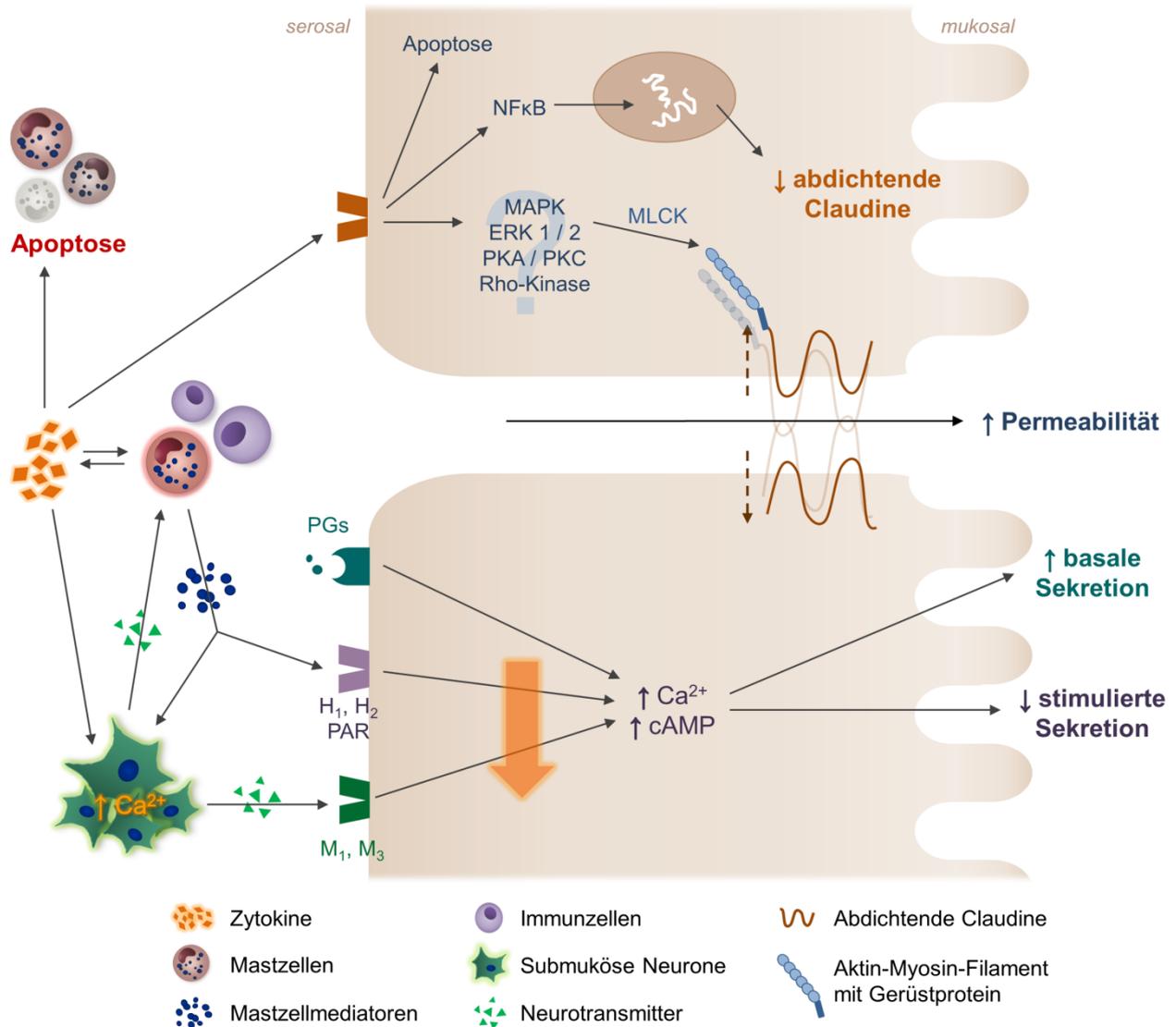


Abb. 42. Vereinfachte Darstellung der Wechselwirkung zwischen Mastzellen, submukösen Neuronen und dem Darmepithel unter Entzündungsbedingungen. Die Abbildung integriert die wichtigsten Ergebnisse dieser Dissertation in die aus der Literatur bekannten Signalwege zur Regulation epithelialer Funktionen. Proinflammatorische Zytokine führen (1) zu einer erhöhten Permeabilität, indem sie über intrazelluläre Signalwege das Zytoskelett bzw. Claudine modulieren, (2) zu einer erhöhten basalen Sekretion vermutlich über Prostaglandine sowie (3) zu einer verminderten Ca²⁺- und cAMP-abhängigen Sekretion nach Stimulation mit verschiedenen Sekretagoga. Daneben kommt es unter Zytokineinfluss zu einer erhöhten Erregbarkeit submuköser Neurone und zu einer Apoptose von Mastzellen.

7. Zusammenfassung

Die Rolle von Mastzellen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease, IBD) wird kontrovers diskutiert. Einige Studien berichten über eine erhöhte Mastzellichte bei IBD, wohingegen andere Studien eine Abnahme registrierten. Da Mastzellmediatoren dafür bekannt sind die intestinale Sekretion und Permeabilität zu erhöhen, stellte ich die Hypothese auf, dass eine Antigenantwort in sensibilisierten Tieren unter Entzündungsbedingungen ex vivo erhöht sein könnte, was zu der inadäquaten Immunantwort bei IBD beitragen würde.

Daher wurde eine Gruppe von Ratten gegen Ovalbumin sensibilisiert und in einer zweiten Gruppe eine zusätzliche Kolitis mittels TNBS (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) induziert. In Ussing-Kammer-Experimenten wurden der Kurzschlussstrom (I_{sc}), die Gewebeleitfähigkeit (G_t) sowie die parazelluläre Permeabilität von Segmenten des distalen Kolons (lokal entzündet) und Jejunums (nicht entzündet) gemessen. Parallel dazu wurden Mastzellmarker und Tight Junction Proteine mittels Immunfluoreszenz und qPCR bestimmt. Im Gegensatz zu der initialen Hypothese war der Antigen-induzierte I_{sc} in Ussing-Kammer-Experimenten nicht erhöht, sondern zeigte eine tendenziell erniedrigte Anionensekretion im distalen Kolon und (wenn auch in geringerem Ausmaß) im Jejunum nach Kolitis-Induktion. Die Mastzellichte war annähernd unverändert im distalen Kolon, wohingegen diese im Jejunum im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen um ca. 230 % nach Sensibilisierung anstieg. Nur im Jejunum führte der Antigenkontakt in der Ussing-Kammer zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität im Gewebe sensibilisierter Tiere. Dieser Effekt blieb unbeeinflusst durch die zusätzliche Kolitis-Induktion. Die Expression der abdichtenden Tight Junction Proteine Claudin-3 und Claudin-4 auf Proteinebene war nach vorheriger Sensibilisierung in beiden Darmsegmenten signifikant erhöht; die zusätzliche Kolitis-Induktion führte zu einer Downregulation von Claudin-3.

Aufgrund der erniedrigten Mastzell-vermittelten I_{sc} -Antwort unter Entzündungsbedingungen untersuchte ich weiterhin, ob proinflammatorische Zytokine *in vitro* die Antwort des Darmepithels und der submukösen Neurone auf eine Mastzelldegranulation modulieren. $TNF\alpha$ sowie ein Zytokinmix ($TNF\alpha + IL-1\beta + IFN-\gamma$) bewirkten einen Anstieg des I_{sc} und der G_t im distalen Kolon der Ratte. Die Mastzellaktivierung mittels Compound 48/80 blieb davon unberührt. Dahingegen war eine Stimulation der Ca^{2+} -abhängigen Anionensekretion (durch Histamin oder Carbachol) signifikant erniedrigt, nachdem das Gewebe mit $IL-1\beta$ oder dem Zytokinmix vorbehandelt wurde. Ca^{2+} -Imaging-Experimente zeigten eine erhöhte neuronale Aktivität nach 1-tägiger Inkubation einer Kokultur, bestehend aus submukösen Neuronen und einer Ratten-spezifischen Mastzelllinie (RBL-2H3), mit $TNF\alpha$. Eine 3-tägige Inkubation der Kokultur mit dem Zytokinmix induzierte eine Apoptose in den RBL-2H3, wohingegen sich die Anzahl der Neurone, welche auf eine Mastzelldegranulation hin stimuliert wurden, signifikant erhöhte. Demzufolge könnte die Downregulation der epithelialen Sekretion durch eine erhöhte Sensitivität sekretomotorischer Neurone kompensiert werden, was zu einer konstanten epithelialen Sekretion nach Mastzellaktivierung führt. Zudem kann die Mastzellfunktion durch enterische Neurone moduliert werden, da die Stimulation nikotinerger Rezeptoren sowohl den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als auch den I_{sc} -Anstieg nach Mastzellaktivierung durch Compound 48/80 hemmt.

Diese Studie ist ein weiterer Beweis für die Anpassungsfähigkeit von Mastzellen und für die segmentabhängigen Unterschiede in den Mastzell-Epithel-Interaktionen unter Entzündungsbedingungen sowie für den starken Einfluss der enterischen Neurone, welche Immun- und Epithelfunktionen koordinieren.

8. Summary

The role of mast cells in inflammatory bowel disease (IBD) is discussed controversially. While several studies report an increase of mast cell density during IBD, others found a decrease in it. As mast cell mediators are known to enhance intestinal secretion and permeability by affecting the epithelium directly and indirectly via activation of secretomotor neurons, I hypothesized that antigen exposure of sensitized animals might be elevated under inflammatory conditions *ex vivo*, which would contribute to the inadequate immune response during IBD.

In these experiments, one group of rats was sensitized against ovalbumin, whereas in a second group a TNBS-colitis was induced additionally. In Ussing chamber experiments short-circuit current (I_{sc}), tissue conductance (G_t) and paracellular permeability were measured in specimens of distal colon (inflamed) and jejunum (non-inflamed). In parallel, mast cell markers and tight junction proteins were determined with immunostaining and qPCR. In contrast to the initial hypothesis, the antigen evoked I_{sc} in Ussing chamber experiments was not enhanced, but tended to be reduced in distal colon and to lesser extent in jejunum after induction of colitis. Mast cell density was unaltered in distal colon, whereas in jejunum the mast cells number increased by approximately 230 % after sensitization compared to that of untreated controls. Only in jejunum the antigen exposure evoked an increase of the paracellular permeability in segments of sensitized animals; this effect was unaffected by additional induction of colitis. Expression of the sealing tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 on protein level was significantly elevated after sensitization in both intestinal segments; the additional induction of colitis evoked a downregulation of claudin-3.

Due to the reduced I_{sc} response induced by mast cell stimulation under inflammatory conditions, I investigated whether proinflammatory cytokines change the response of the epithelium and submucosal neurons to mast cell degranulation *in vitro*. $TNF\alpha$ and a mix of proinflammatory cytokines ($TNF\alpha + IL-1\beta + IFN-\gamma$) caused an increase of I_{sc}

and G_t in rat distal colon. Mast cell stimulation with compound 48/80 was unaffected, whereas stimulation of Ca^{2+} -dependent anion secretion (by histamine or carbachol) was diminished significantly after preincubation with IL-1 β and the cytokine mix. After 1 d TNF α exposure of a coculture consisting of submucosal neurons and a rat mast cell line (RBL-2H3), Ca^{2+} imaging experiments exhibited an enhanced neuronal activity. Prolonged exposure to the cytokine mix (3 d) induced apoptosis in RBL-2H3, whereas the number of neurons responding to mast cell degranulation increased significantly. Consequently, the downregulation of epithelial secretion might be compensated by an increased sensitivity of secretomotor neurons leading to a constant secretion after mast cell stimulation. Furthermore, mast cell function can be modified by enteric neurons as stimulation of nicotinic receptors inhibits the increase of cytosolic Ca^{2+} and the increase of the I_{sc} after mast cell stimulation with compound 48/80.

This study is a further evidence for the plasticity of mast cells and the segment-dependent differences in mast cell - epithelium interactions under inflammatory conditions. The study shows the strong impact of enteric neurons coordinating the immune and epithelial functions.

9. Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Schematische Darstellung der einzelnen Schichten der Darmwand.....	5 -
Abb. 2. Vereinfachte Darstellung der aktiven Chloridsekretion am Darm	11 -
Abb. 3. Schema der Mastzellaktivierung bei Überempfindlichkeitsreaktionen	15 -
Abb. 4. Mastzell-Neuron-Interaktion über Mediatoren bzw. Neurotransmitter	18 -
Abb. 5. Mastzell-Neuron-Interaktionen am Darmepithel.....	22 -
Abb. 6. Hypothetischer Circulus vitiosus von Mastzellen und Darmepithel	24 -
Abb. 7. Zeitlicher Verlauf des durchgeführten Tierversuchs	27 -
Abb. 8. Schematische Darstellung eines Stufenpräparates.....	36 -
Abb. 9. Prinzip der Ussing-Kammer-Messung.....	42 -
Abb. 10. Aufbau der Ussing-Kammer	43 -
Abb. 11 Fura-2-Anregungsspektrum	48 -
Abb. 12 Strukturformel von Fura-2-Acetoxymethylester und Fura-2.....	49 -
Abb. 13. Bindungskurve von Fura-2	49 -
Abb. 14. Aufbau des Imaging-Messtandes	50 -
Abb. 15. Aufbau der Messkammer für die Elektrische Feldstimulation (EFS).....	51 -
Abb. 16. Darstellung eines submukösen Ganglions aus dem distalen Kolon	53 -
Abb. 17. Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.....	56 -
Abb. 18. Plexiglashalter für Gewebefixation.....	58 -
Abb. 19. Prinzip zur Bestimmung der Mastzellanzahl pro mm ²	61 -
Abb. 20. Beispiel einer morphometrischen Bestimmung.....	62 -
Abb. 21. Aufbau eines Blots.....	66 -
Abb. 22. Prinzip der qPCR mittels TaqMan-Sonde.....	69 -
Abb. 23. Prinzip der Vervielfältigung bei der qPCR.....	76 -
Abb. 24. Tägliche Körpergewichtsänderungen im Tiermodell	79 -

Verzeichnisse

Abb. 25. Wirkung von Ovalbumin in der Ussing-Kammer.....	- 80 -
Abb. 26. Ovalbumin-induzierte Fluxrate im Jejunum und distalen Kolon.....	- 84 -
Abb. 27. Mastzellanzahl unter Kontroll- und Versuchsbedingungen.....	- 86 -
Abb. 28. Immunhistochemische Darstellung der Claudin-Antikörper	- 88 -
Abb. 29. Claudin-3- und -4-Immunoreaktivität im distalen Kolon und Jejunum ...	- 90 -
Abb. 30. Die relative Expression von Chymase, Claudin-3 und Claudin-4	- 93 -
Abb. 31. Auswirkung von Zytokinen auf die intestinale Sekretion	- 98 -
Abb. 32. Der transiente Anstieg des I_{sc} durch den Zytokinmix	- 100 -
Abb. 33. Auswirkung von Zytokinen auf die G_t	- 101 -
Abb. 34. Neuronale Stimulation nach Mastzellaktivierung.....	- 104 -
Abb. 35. Neuronale Responder nach Mastzellaktivierung	- 105 -
Abb. 36. Immunzytochemische Färbung der Caspase 3 in RBL-2H3	- 107 -
Abb. 37. Die Wirkung von Agonisten auf den I_{sc} nach Compound 48/80	- 108 -
Abb. 38. Aktivierung von Neuronen und Mastzellen durch die EFS	- 112 -
Abb. 39. Die Wirkung von Agonisten auf die Mastzellaktivität	- 114 -
Abb. 40. Die Wirkung von Agonisten auf die Mastzellresponder	- 116 -
Abb. 41. Darstellung der Regulation der Permeabilität durch Claudine	- 121 -
Abb. 42. Wechselwirkung zwischen Mastzellen, submukösen Neuronen und dem intestinalen Epithel unter Entzündungsbedingungen	- 139 -

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper	57 -
Tabelle 2. Anregungs- und Emissionswellenlänge der Sekundärantikörper	61 -
Tabelle 3. Zusammensetzung einer Probe zur Bestimmung der RNA-Integrität	71 -
Tabelle 4. Zusammensetzung einer Probe für die reverse Transkription	72 -
Tabelle 5. Programmbedingungen des Cyclers für die reverse Transkription	72 -
Tabelle 6. Programmbedingungen des Cyclers für die qPCR	73 -
Tabelle 7. Übersicht der verwendeten Primer für die qPCR	74 -
Tabelle 8. Zusammensetzung jeder Probe zur Quantifizierung der Primer	75 -
Tabelle 9. Ussing-Kammer-Daten des Tierversuchs (Sensibilisierung±Kolitis).. ...	82 -
Tabelle 10. Abfall des I_{sc} induziert durch Carbachol	83 -
Tabelle 11. Claudin-3- und Claudin-4-Immunoreaktivität	91 -
Tabelle 12. Konzentrationsabhängige Wirkung von $TNF\alpha$ auf den I_{sc}	95 -
Tabelle 13. Konzentrationsabhängige Wirkung von $TNF\alpha$ die G_t	96 -
Tabelle 14. Wirkung der verschiedenen Agonisten auf den I_{sc}	110 -
Tabelle 15. Wirkung der Agonisten auf die Mastzellaktivität	113 -

10. Literaturverzeichnis

- Ableitner, O. (2014): Einführung in die Molekularbiologie. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Aggarwal, B. B. (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. In: *Nat. Rev. Immunol.* 3 (9), S. 745-756. <https://doi.org/10.1038/nri1184>
- Amasheh, S.; Meiri, N.; Gitter, A. H.; Schöneberg, T.; Mankertz, J.; Schulzke, J. D.; Fromm, M. (2002): Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. In: *J. Cell Sci.* 115 (Pt 24), S. 4969-4976. <https://doi.org/10.1242/jcs.00165>
- Amstutz, I.; Diener, M. (1997). Inhibition of antigen-induced muscle contractions by inhibitors of thromboxane pathway in rat small intestine. *J. Vet. Med.* 44A, S. 349-359. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1997.tb01119.x>
- Anbazhagan, A. N.; Priyamvada, S.; Alrefai, W. A.; Dudeja, P. K. (2018): Pathophysiology of IBD associated diarrhea. In: *Tissue barriers* 6 (2), e1463897. <https://doi.org/10.1080/21688370.2018.1463897>
- Andersen, C. L.; Jensen, J. L.; Ørntoft, T. F. (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data. A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. In: *Cancer Res.* 64 (15), S. 5245-5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Andoh, A.; Deguchi, Y.; Inatomi, O.; Yagi, Y.; Bamba, S.; Tsujikawa, T.; Fujiyama, Y. (2006): Immunohistochemical study of chymase-positive mast cells in inflammatory bowel disease. In: *Oncol. Rep.* 16 (1), S. 103-107 <https://doi.org/10.3892/or.16.1.103>
- Antoniou, E.; Margonis, G. A.; Angelou, A.; Pikouli, A.; Argiri, P.; Karavokyros, I. et al. (2016): The TNBS-induced colitis animal model: An overview. In: *Ann. Med. Surg.* (2012) 11, S. 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2016.07.019>
- Avula, L. R.; Buckinx, R.; Favoreel, H.; Cox, E.; Adriaensen, D.; van Nassauw, L.; Timmermans, J.-P. (2013): Expression and distribution patterns of Mas-related gene receptor subtypes A-H in the mouse intestine: inflammation-induced changes. In: *Histochem. Cell Biol.* 139 (5), S. 639-658. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1086-9>

- Bani-Sacchi, T.; Barattini, M.; Bianchi, S.; Blandina, P.; Brunelleschi, S.; Fantozzi, R. et al. (1986): The release of histamine by parasympathetic stimulation in guinea-pig auricle and rat ileum. In: *J. Physiol.* 371 (1), S. 29-43.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp015960>
- Barmeyer, C.; Amasheh, S.; Tavalali, S.; Mankertz, J.; Zeitz, M.; Fromm, M.; Schulzke, J.-D. (2004): IL-1beta and TNFalpha regulate sodium absorption in rat distal colon. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317 (2), S. 500-507.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.072>
- Barmeyer, C.; Fromm, M.; Schulzke, J.-D. (2017): Active and passive involvement of claudins in the pathophysiology of intestinal inflammatory diseases. In: *Pflugers Arch.* 469 (1), S. 15-26. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1914-6>
- Barrett, K. E. (1991): Immune-related intestinal chloride secretion. III. Acute and chronic effects of mast cell mediators on chloride secretion by a human colonic epithelial cell line. In: *J. Immunol.* 147 (3), S. 959-964.
- Barrett, K. E.; Keely, S. J. (2000): Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. In: *Annu. Rev. Physiol.* 62, S. 535-572.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.535>
- Barsumian, E. L.; Isersky, C.; Petrino, M. G.; Siraganian, R. P. (1981): IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. In: *Eur. J. Immunol.* 11 (4), S. 317-323.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830110410>
- Bauer, C.; Duewell, P.; Mayer, C.; Lehr, H. A.; Fitzgerald, K. A.; Dauer, M. et al. (2010): Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. In: *Gut* 59 (9), S. 1192-1199.
<https://doi.org/10.1136/gut.2009.197822>
- Beil, W. J.; Schulz, M.; Wefelmeyer, U. (2000): Mast cell granule composition and tissue location-a close correlation. In: *Histol. Histopathol.* 15 (3), S. 937-946.
<https://doi.org/10.14670/HH-15.937>
- Bell, A.; Althaus, M.; Diener, M. (2015): Communication between mast cells and rat submucosal neurons. In: *Pflugers Arch.* 467 (8), S. 1809-1823.
<https://doi.org/10.1007/s00424-014-1609-9>
- Bell, A. (2015): Kommunikation zwischen Mastzellen und enterischen Neuronen - Ein Modell der Nahrungsmittelallergie bei der Ratte. Dissertationsschrift aus dem Fachbereich der Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Gießen. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2015/11840/>

- Berkowitz, L.; Schultz, B. M.; Salazar, G. A.; Pardo-Roa, C.; Sebastián, V. P.; Álvarez-Lobos, M. M.; Bueno, S. M. (2018): Impact of cigarette smoking on the gastrointestinal tract inflammation. Opposing effects in Crohn's disease and ulcerative colitis. In: *Front. Immunol.* 9, Art. 74.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00074>
- Bernardazzi, C.; Pego, B.; Souza, de Heitor S. P. (2016): Neuroimmunomodulation in the gut: Focus on Inflammatory Bowel Disease. In: *Mediators Inflamm.* 2016, Art. 1363818. <https://doi.org/10.1155/2016/1363818>
- Bischoff, S. C. (2007): Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses. Comparison of human and murine data. In: *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2), S. 93-104. <https://doi.org/10.1038/nri2018>
- Bischoff, S. C. (2009): Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. In: *Semin. Immunopathol.* 31 (2), S. 185-205.
<https://doi.org/10.1007/s00281-009-0165-4>
- Bischoff, S. C.; Wedemeyer, J.; Herrmann, A.; Meier, P. N.; Trautwein, C.; Cetin, Y. et al. (1996): Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. In: *Histopathology* 28 (1), S. 1-13.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1996.262309.x>
- Blandina, P.; Fantozzi, R.; Mannaioni, P. F.; Masini, E. (1980): Characteristics of histamine release evoked by acetylcholine in isolated rat mast cells. In: *J. Physiol.* 301, S. 281-293. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013205>
- Bode, H.; Schmitz, H.; Fromm, M.; Scholz, P.; Riecken, E.; Schulzke, J. (1998): IL-1 β and TNF- α , but not IFN- α , IFN- γ , IL-6 or IL-8, are secretory mediators in human distal colon. In: *Cytokine* 10 (6), S. 457-465.
<https://doi.org/10.1006/cyto.1997.0307>
- Böhme, M.; Diener, M.; Rummel, W. (1991): Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. In: *Pflügers Arch.* 419 (2), S. 144-151. <https://doi.org/10.1007/BF00373000>
- Bokhout, B. A.; Van Gaalen, C.; Van der Heijden, P. J. (1981). A selected water-in-oil emulsion: Composition and usefulness as an immunological adjuvant. In: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2: 491-500. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(81\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0165-2427(81)90009-X)
- Brandtzaeg, P. (2010): Food allergy: separating the science from the mythology. In: *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7 (7), S. 380-400.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.80>

- Buhner, S.; Buning, C.; Genschel, J.; Kling, K.; Herrmann, D.; Dignass, A. et al. (2006): Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? In: *Gut* 55 (3), S. 342-347. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.065557>
- Buhner, S.; Schemann, M. (2012): Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut. In: *Biochim. Biophys. Acta Mol. Bas. Dis.* 1822 (1), S. 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.06.004>
- Buhner, S.; Barki, N.; Greiter, W.; Giesbertz, P.; Demir, I. E.; Ceyhan, G. O. et al. (2017): Calcium imaging of nerve-mast cell signaling in the human intestine. In: *Front. Physiol.* 8, Art. 971. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00971>
- Bustin, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellems, J.; Huggett, J.; Kubista, M. et al. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. In: *Clin. Chem.* 55 (4), S. 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Butchers, P. R.; Vardey, C. J.; Johnson, M. (1991): Salmeterol: a potent and long-acting inhibitor of inflammatory mediator release from human lung. In: *Brit. J. Pharmacol.* 104 (3), S. 672-676. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12487.x>
- Camilleri, M.; Sellin, J. H.; Barrett, K. E. (2017): Pathophysiology, evaluation, and management of chronic watery diarrhea. In: *Gastroenterology* 152 (3), 515-532.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.014>
- Capaldo, C. T.; Powell, D. N.; Kalman, D. (2017): Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. In: *J. Mol. Med. (Berlin, Germany)* 95 (9), S. 927-934. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1557-x>
- Caulfield, M. P. (1993): Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. In: *Pharmacol. Ther.* 58 (3), S. 319-379.
- Ćirković Veličković, T.; Gavrović-Jankulović, M. (2014): Food Allergens. Ch. 1, New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0841-7>
- Collins, S. M.; Hurst, S. M.; Main, C.; Stanley, E.; Khan, I.; Blennerhassett, P.; Swain, M. (1992): Effect of inflammation of enteric nerves. Cytokine-induced changes in neurotransmitter content and release. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 664, S. 415-424. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb39780.x>

- Cooke, H. J. (1994): Neuroimmune signaling in regulation of intestinal ion transport. In: *Am. J. Physiol.* 266 (2 Pt 1), G167-78.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1994.266.2.G167>
- Coskun, M.; Vermeire, S.; Nielsen, O. H. (2017): Novel targeted therapies for inflammatory bowel disease. In: *Trends Pharmacol. Sci.* 38 (2), S. 127-142.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.014>
- Costa, M.; Brookes, S. J.; Hennig, G. W. (2000): Anatomy and physiology of the enteric nervous system. In: *Gut* 47 Suppl 4, iv15-9; discussion iv26.
https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv15
- Crowe, S. E.; Luthra, G. K.; Perdue, M. H. (1997): Mast cell mediated ion transport in intestine from patients with and without inflammatory bowel disease. In: *Gut* 41 (6), S. 785-792. <https://doi.org/10.1136/gut.41.6.785>
- Da Silva, E. Z. M.; Jamur, M. C.; Oliver, C. (2014): Mast cell function. A new vision of an old cell. In: *J. Histochem. Cytochem.* 62 (10), S. 698-738.
<https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
- De Winter, B. Y.; van den Wijngaard, R. M.; de Jonge, W. J. (2012): Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. In: *Biochim. Biophys. Acta Mol. Bas. Dis.* 1822 (1), S. 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.016>
- Diener, M.; Bridges, R. J.; Knobloch, S. F.; Rummel, W. (1988): Neuronally mediated and direct effects of prostaglandins on ion transport in rat colon descendens. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 337 (1), S. 74-78.
<https://doi.org/10.1007/BF00169480>
- Doyle, L. A.; Sepehr, G. J.; Hamilton, M. J.; Akin, C.; Castells, M. C.; Hornick, J. L. (2014): A clinicopathologic study of 24 cases of systemic mastocytosis involving the gastrointestinal tract and assessment of mucosal mast cell density in irritable bowel syndrome and asymptomatic patients. In: *Am. J. Surg. Pathol.* 38 (6), S. 832-843. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000190>
- Dvorak, A. M.; McLeod, R. S.; Onderdonk, A. B.; Monahan-Earley, R. A.; Cullen, J. B.; Antonioli, D. A. et al. (1992): Human gut mucosal mast cells: ultrastructural observations and anatomic variation in mast cell-nerve associations in vivo. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98 (2), S. 158-168. <https://doi.org/10.1159/000236180>

- Eckmann, L.; Stenson, W. F.; Savidge, T. C.; Lowe, D. C.; Barrett, K. E.; Fierer, J. et al. (1997): Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. In: *J. Clin. Invest.* 100 (2), S. 296-309. <https://doi.org/10.1172/JCI119535>
- Edelblum, K. L.; Turner, J. R. (2009): The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. In: *Curr. Opin. Pharmacol.* 9 (6), S. 715-720. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.022>
- Eliakim, R.; Karmeli, F.; Okon, E.; Rachmilewitz, D. (1992): Ketotifen effectively prevents mucosal damage in experimental colitis. In: *Gut* 33 (11), S. 1498-1503. <https://doi.org/10.1136/gut.33.11.1498>
- Fernández-Blanco, J. A.; Estévez, J.; Shea-Donohue, T.; Martínez, V.; Vergara, P. (2015): Changes in epithelial barrier function in response to parasitic infection. Implications for IBD pathogenesis. In: *J. Crohns Colitis* 9 (6), S. 463-476 <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv056>
- Fowler, C. J.; Sandberg, M.; Tiger, G. (2003): Effects of water-soluble cigarette smoke extracts upon the release of beta-hexosaminidase from RBL-2H3 basophilic leukaemia cells in response to substance P, compound 48/80, concanavalin A and antigen stimulation. In: *Inflamm. Res.* 52 (11), S. 461-469. <https://doi.org/10.1007/s00011-003-1202-8>
- Frings, M.; Schultheiss, G.; Diener, M. (1999): Electrogenic Ca²⁺ entry in the rat colonic epithelium. In: *Pflugers Arch.* 439 (1-2), S. 39-48. <https://doi.org/10.1007/s004249900159>
- Furness, J. B. (2000): Types of neurons in the enteric nervous system. In: *J. Auton. Nerv. Syst.* 81 (1-3), S. 87-96.
- Furness, J. B. (2006): *The enteric nervous system.* Oxford u. a.: Blackwell.
- Galli, S. J.; Borregaard, N.; Wynn, T. A. (2011): Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. In: *Nat. Immunol.* 12 (11), S. 1035-1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>
- Galli, S. J.; Grimaldeston, M.; Tsai, M. (2008): Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (6), S. 478-486. <https://doi.org/10.1038/nri2327>

- Gallwitz, M.; Enoksson, M.; Hellman, L. (2007): Expression profile of novel members of the rat mast cell protease (rMCP)-2 and (rMCP)-8 families, and functional analyses of mouse mast cell protease (mMCP)-8. In: *Immunogenetics* 59 (5), S. 391-405. <https://doi.org/10.1007/s00251-007-0202-1>
- Garcia-Hernandez, V.; Quiros, M.; Nusrat, A. (2017): Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1397 (1), S. 66-79. <https://doi.org/10.1111/nyas.13360>
- Gaudenzio, N.; Sibilano, R.; Marichal, T.; Starkl, P.; Reber, L. L.; Cenac, N. et al. (2016): Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. In: *J. Clin. Invest.* 126 (10), S. 3981-3998. <https://doi.org/10.1172/JCI85538>
- Ghia, J. E.; Blennerhassett, P.; Kumar-Ondiveeran, H.; Verdu, E. F.; Collins, S. M. (2006): The vagus nerve. A tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. In: *Gastroenterology* 131 (4), S. 1122-1130. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.016>
- Gilfillan, A. M.; Tkaczyk, C. (2006): Integrated signalling pathways for mast-cell activation. In: *Nat. Rev. Immunol.* 6 (3), S. 218-230. <https://doi.org/10.1038/nri1782>
- Gougeon, P.-Y.; Lourenssen, S.; Han, T. Y.; Nair, D. G.; Ropeleski, M. J.; Blennerhassett, M. G. (2013): The pro-inflammatory cytokines IL-1beta and TNFalpha are neurotrophic for enteric neurons. In: *J. Neurosci.* 33 (8), S. 3339-3351. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3564-12.2013>
- Gown, A. M.; Willingham, M. C. (2002): Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections. Immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. In: *J. Histochem. Cytochem.* 50 (4), S. 449-454. <https://doi.org/10.1177/002215540205000401>
- Goyal, R. K.; Hirano, I. (1996): The enteric nervous system. In: *N. Engl. J. Med.* 334 (17), S. 1106-1115. <https://doi.org/10.1056/NEJM199604253341707>
- Greger, R. (2000): Role of CFTR in the colon. In: *Annu. Rev. Physiol.* 62, S. 467-491. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.467>
- Groschwitz, K. R.; Hogan, S. P. (2009): Intestinal barrier function. Molecular regulation and disease pathogenesis. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (1), 3-20; quiz 21-2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>

- Groschwitz, K. R.; Wu, D.; Osterfeld, H.; Ahrens, R.; Hogan, S. P. (2013): Chymase-mediated intestinal epithelial permeability is regulated by a protease-activating receptor/matrix metalloproteinase-2-dependent mechanism. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304 (5), G479-89.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00186.2012>
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *J. Biol. Chem.* 260 (6), S. 3440-3450.
- Günzel, D.; Yu, A. S. L. (2013): Claudins and the modulation of tight junction permeability. In: *Physiol. Rev.* 93 (2), S. 525-569.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>
- Gupta, S. (2002): A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. In: *J. Clin. Immunol.* 22 (4), S. 185-194.
<https://doi.org/10.1023/A:1016089607548>
- Haberberger, R.; Schultheiss, G.; Diener, M. (2006): Epithelial muscarinic M1 receptors contribute to carbachol-induced ion secretion in mouse colon. In: *Eur. J. Pharmacol.* 530 (3), S. 229-233. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.11.055>
- Haines, R. J.; Beard, R. S.; Chen, L.; Eitnier, R. A.; Wu, M. H. (2016): Interleukin-1 β mediates β -catenin-driven downregulation of claudin-3 and barrier dysfunction in Caco2 cells. In: *Dig. Dis. Sci.* 61 (8), S. 2252-2261. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4145-y>
- He, S.-H. (2004): Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. In: *World J. Gastroenterol.* 10 (3), S. 309.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i3.309>
- Hering, N. A.; Schulzke, J.-D. (2009): Therapeutic options to modulate barrier defects in inflammatory bowel disease. In: *Dig. Dis. (Basel, Switzerland)* 27 (4), S. 450-454. <https://doi.org/10.1159/000233283>
- Hirota, C. L.; McKay, D. M. (2006): Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. In: *Br. J. Pharmacol.* 149 (5), S. 463-479.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706889>
- Hirota, C. L.; McKay, D. M. (2009): Loss of Ca^{2+} -mediated ion transport during colitis correlates with reduced ion transport responses to a Ca^{2+} -activated K^{+} channel opener. In: *Br. J. Pharmacol.* 156 (7), S. 1085-1097. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00122.x>

- Hörger, S.; Schultheiss, G.; Diener, M. (1998): Segment-specific effects of epinephrine on ion transport in the colon of the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 275, S. G1367-1376. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.6.G1367>
- Hug, F.; Diener, M.; Scharrer, E. (1996): Modulation by fish oil diet of eicosanoid-induced anion secretion in the rat distal colon. In: *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 35 (4), S. 323-331. <https://doi.org/10.1007/BF01610550>
- Javed, N. H.; Wang, Y. Z.; Cooke, H. J. (1992): Neuroimmune interactions. Role for cholinergic neurons in intestinal anaphylaxis. In: *Am. J. Physiol.* 263 (6 Pt 1), S. G847-52. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1992.263.6.G847>
- Jergens, A. E., and Simpson, K. W. (2012): Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 4, S. 1404–1419.
- Kageyama-Yahara, N.; Suehiro, Y.; Yamamoto, T.; Kadowaki, M. (2008): IgE-induced degranulation of mucosal mast cells is negatively regulated via nicotinic acetylcholine receptors. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 (1), S. 321-325. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.004>
- Karlen, Y.; McNair, A.; Perseguers, S.; Mazza, C.; Mermoud, N. (2007): Statistical significance of quantitative PCR. In: *BMC bioinformatics* 8, Art. 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-131>
- Keita, A. V.; Söderholm, J. D. (2010): The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. In: *Neurogastroenterol. Motil.* 22 (7), S. 718-733. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x>
- Komuro, T. (1999): Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: Ultrastructural characterization. In: *Microsc. Res. Tech.* 47 (4), S. 267-285. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19991115\)47:4<267::AID-JEMT5>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19991115)47:4<267::AID-JEMT5>3.0.CO;2-O)
- König, J.; Wells, J.; Cani, P. D.; Garcia-Rodenas, C. L.; MacDonald, T.; Mercenier, A. et al. (2016): Human intestinal barrier function in health and disease. In: *Clin. Transl. Gastroenterol.* 7 (10), e196. <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.54>
- Kulczycki, A.; Metzger, H. (1974): The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. II. Quantitative aspects of the binding reaction. In: *J. Exp. Med.* 140 (6), S. 1676-1695. <https://doi.org/10.1084/jem.140.6.1676>
- Kunzelmann, K.; Mall, M. (2002): Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. In: *Physiol. Rev.* 82 (1), S. 245-289. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2001>

- Lakhan, S. E.; Kirchgessner, A. (2010): Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. In: *J. Neuroinflammation* 7, 37. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-37>
- Li, J.-P.; Zhang, T.; Gao, C.-J.; Kou, Z.-Z.; Jiao, X.-W.; Zhang, L.-X. et al. (2015): Neurochemical features of endomorphin-2-containing neurons in the submucosal plexus of the rat colon. In: *World J. Gastroenterol.* 21 (34), S. 9936-9944. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i34.9936>
- Li, N.; Shi, R.-H. (2018): Updated review on immune factors in pathogenesis of Crohn's disease. In: *World J. Gastroenterol.* 24 (1), S. 15-22. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i1.15>
- Lindqvist, S.; Sharp, P.; Johnson, I.; Satoh, Y.; Williams, M. (1998): Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis. In: *Gastroenterology* 115 (5), S. 1131-1143. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70084-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70084-8)
- Lottig, L.; Bader, S.; Jimenez, M.; Diener, M. (2019): Evidence for metabotropic function of epithelial nicotinic cholinergic receptors in rat colon. In: *Br. J. Pharmacol.* 176 (9), S. 1328-1340. <https://doi.org/10.1111/bph.14638>
- Lu, Z.; Ding, L.; Lu, Q.; Chen, Y.-H. (2013): Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. In: *Tissue barriers* 1 (3), e24978. <https://doi.org/10.4161/tisb.24978>
- Luettig, J.; Rosenthal, R.; Barmeyer, C.; Schulzke, J. D. (2015): Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. In: *Tissue barriers* 3 (1-2), e977176. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.977176>
- Lüllmann-Rauch, R.; Asan, E. (2015): Taschenbuch Histologie. Kap.16; 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. (2014): Der Experimentator: Immunologie. Kap. 1, 5; 4., vollst. überarbeitete u. korrigierte Auflage. Berlin: Springer Spektrum (Experimentator). <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>
- Markov, A. G.; Veshnyakova, A.; Fromm, M.; Amasheh, M.; Amasheh, S. (2010): Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. In: *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 180 (4), S. 591-598. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0440-7>
- Martínez-Augustin, O.; Romero-Calvo, I.; Suárez, M. D.; Zarzuelo, A.; Sánchez de Medina, F. (2009): Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 15 (1), S. 114-127. <https://doi.org/10.1002/ibd.20579>

- McKay, D. M.; Baird, A. W. (1999): Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. In: *Gut* 44 (2), S. 283-289. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.44.2.283>
- Menozi, A.; Pozzoli, C.; Poli, E.; Lazzaretti, M.; Grandi, D.; Coruzzi, G. (2006): Long-term study of TNBS-induced colitis in rats: focus on mast cells. In: *Inflamm. Res.* 55 (10), S. 416-422. <https://doi.org/10.1007/s00011-006-6017-y>
- Mishra, N. C.; Rir-sima-ah, J.; Boyd, R. T.; Singh, S. P.; Gundavarapu, S.; Langley, R. J. et al. (2010): Nicotine inhibits Fc epsilon RI-induced cysteinyl leukotrienes and cytokine production without affecting mast cell degranulation through alpha 7/alpha 9/alpha 10-nicotinic receptors. In: *J. Immunol. (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (1), S. 588-596. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902227>
- Moon, T. C.; Befus, A. D.; Kulka, M. (2014): Mast cell mediators. Their differential release and the secretory pathways involved. In: *Front. Immunol.* 5 (569). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00569>
- Morris, G. P.; Beck, P. L.; Herridge, M. S.; Depew, W. T.; Szewczuk, M. R.; Wallace, J. L. (1989): Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. In: *Gastroenterology* 96 (3), S. 795-803.
- Mulisch, M.; Welsch, U. (Hg.) (2015): *Romeis Mikroskopische Technik*. Kap. 10; 19. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Nakanishi, M.; Furuno, T. (2008): Molecular basis of neuroimmune interaction in an in vitro coculture approach. In: *Cell. Mol. Immunol.* 5 (4), S. 249-259. <https://doi.org/10.1038/cmi.2008.31>
- Neurath, M.; Fuss, I.; Strober, W. (2000): TNBS-colitis. In: *Int. Rev. Immunol.* 19 (1), S. 51-62.
- Neurath, M. F.; Fuss, I.; Pasparakis, M.; Alexopoulou, L.; Haralambous, S.; zum Meyer Büschenfelde, K. H. et al. (1997): Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. In: *Eur. J. Immunol.* 27 (7), S. 1743-1750. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270722>
- Neurath, M. F. (2014): Cytokines in inflammatory bowel disease. In: *Nat. Rev. Immunol.* 14 (5), S. 329-342. <https://doi.org/10.1038/nri3661>
- O'Malley, K. E.; Farrell, C. B.; O'Boyle, K. M.; Baird, A. W. (1995): Cholinergic activation of Cl⁻ secretion in rat colonic epithelia. In: *Eur. J. Pharmacol.* 275 (1), S. 83-89. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)00758-Y](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)00758-Y)

- Onyiah, J. C.; Colgan, S. P. (2016): Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (22), S. 4203-4212.
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2289-8>
- Padua, D.; Vu, J. P.; Germano, P. M.; Piseigna, J. R. (2016): The role of neuropeptides in mouse models of colitis. In: *J. Mol. Neurosci.* 59 (2), S. 203-210.
<https://doi.org/10.1007/s12031-015-0688-1>
- Park, K. M.; Yule, D. I.; Bowers, W. J. (2008): Tumor necrosis factor-alpha potentiates intraneuronal Ca²⁺ signaling via regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. In: *J. Biol. Chem.* 283 (48), S. 33069-33079.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M802209200>
- Pérez-Navarro, R.; Martínez-Augustin, O.; Ballester, I.; Zarzuelo, A.; Sánchez de Medina, F. (2005a): Experimental inflammation of the rat distal colon inhibits ion secretion in the proximal colon by affecting the enteric nervous system. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 371 (2), S. 114-121.
<https://doi.org/10.1007/s00210-005-1023-0>
- Pérez-Navarro, R.; Ballester, I.; Zarzuelo, A.; Sánchez de Medina, F. (2005b): Disturbances in epithelial ionic secretion in different experimental models of colitis. In: *Life Sci.* 76 (13), S. 1489-1501. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.019>
- Perrier, C.; Corthésy, B. (2011): Gut permeability and food allergies. In: *Clin. Exp. Allergy* 41 (1), S. 20-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03639.x>
- Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W.; Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. In: *Nucleic Acids Res.* 30 (9), e36.
<https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Priyamvada, S.; Gomes, R.; Gill, R.K.; Saksena, Se.; Alrefai, W. A.; Dudeja, P. K. (2015): Mechanisms underlying dysregulation of electrolyte absorption in inflammatory bowel disease-associated diarrhea. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 21 (12), S. 2926-2935. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000504>
- Reinard, T. (2010): *Molekularbiologische Methoden*. Kap. 10, 11; 1. Auflage. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Reynolds, A.; Parris, A.; Evans, L. A.; Lindqvist, S.; Sharp, P.; Lewis, M. et al. (2007): Dynamic and differential regulation of NKCC1 by calcium and cAMP in the native human colonic epithelium. In: *The J. Physiol.* 582 (Pt 2), S. 507-524.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.129718>

- Rijnierse, A.; Nijkamp, F. P.; Kraneveld, A. D. (2007): Mast cells and nerves tickle in the tummy. In: *Pharmacol. Ther.* 116 (2), S. 207-235.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.06.008>
- Salim, S. Y.; Söderholm, J. D. (2011): Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 17 (1), S. 362-381.
<https://doi.org/10.1002/ibd.21403>
- Sanchez de Medina, F.; Perez, R.; Martinez-Augustin, O.; Gonzalez, R.; Lorente, M. D.; Galvez, J.; Zarzuelo, A. (2002): Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of the enteric nervous system and cAMP. In: *Pflugers Arch.* 444 (3), S. 378-388. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0807-z>
- Schemann, M.; Camilleri, M. (2013): Functions and imaging of mast cell and neural axis of the gut. In: *Gastroenterology* 144 (4), 698-704.e4.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.040>
- 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.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2004.00591.x>
- Schmitz, H.; Fromm, M.; Bentzel, C. J.; Scholz, P.; Detjen, K.; Mankertz, J. et al. (1999): Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. In: *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 1), S. 137-146.
- Schmitz, H.; Fromm, M.; Bode, H.; Scholz, P.; Riecken, E. O.; Schulzke, J. D. (1996): Tumor necrosis factor-alpha induces Cl⁻ and K⁺ secretion in human distal colon driven by prostaglandin E2. In: *Am. J. Physiol.* 271 (4 Pt 1), S. G669-74.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.271.4.G669>
- Schneider, S.; Wright, C. M.; Heuckeroth, R. O. (2019): Unexpected roles for the second brain: enteric nervous system as master regulator of bowel function. *Annu. Rev. Physiol.* 81, S. 235-259. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121515>
- Schultheiss, G.; Diener, M. (2000): Adrenoceptor-mediated secretion across the rat colonic epithelium. In: *Eur. J. Pharmacol.* 403 (3), S. 251-258.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00487-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00487-8)
- Schultheiss, G.; Hennig, B.; Schunack, W.; Prinz, G.; Diener, M. (2006): Histamine-induced ion secretion across rat distal colon: involvement of histamine H1 and H2 receptors. In: *Eur. J. Pharmacol.* 546 (1-3), S. 161-170.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.07.047>

- Scudamore, C. L.; Thornton, E. M.; McMillan, L.; Newlands, G. F.; Miller, H. R. (1995): Release of the mucosal mast cell granule chymase, rat mast cell protease-II, during anaphylaxis is associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. In: *J. Exp. Med.* 182 (6), S. 1871-1881. <https://doi.org/10.1084/jem.182.6.1871>
- Sharkey, K. A.; Kroese, A. B. (2001): Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. In: *Anat. Rec.* 262 (1), S. 79-90. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<79::AID-AR1013>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<79::AID-AR1013>3.0.CO;2-K)
- Shea-Donohue, T.; Urban, J. F., JR (2016): Neuroimmune modulation of gut function. In: Greenwood-Van Meerveld B. (eds) *Gastrointestinal Pharmacology. Handb. Exp. Pharmacol.*, Vol. 239. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/164_2016_109
- Silva, F. A. R.; Rodrigues, B. L.; Ayrizono, M. de Lourdes S.; Leal, R. F. (2016): The immunological basis of inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterol. Res. Pract.* 2016, Art. 2097274. <https://doi.org/10.1155/2016/2097274>
- Singh, U. P.; Singh, N. P.; Murphy, E. A.; Price, R. L.; Fayad, R.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. S. (2016): Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. In: *Cytokine* 77, S. 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.10.008>
- Skaper, S. D. (2001): Nerve growth factor. In: *Mol. Neurobiol.*, 24 (1-3), S. 183-199. <http://doi-org-443.webvpn.fjmu.edu.cn/10.1385/MN:24:1-3:183>
- Steidle, J.; Würner, L.; Diener, M. (2013): Altered response to hydrogen sulphide during experimental colitis in rats. In: *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 97 (5), S. 942-950. <https://doi.org/10.1111/jpn.12000>
- Stoyanova, I. I.; Gulubova, M. V. (2002): Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. In: *Acta Histochem.* 104 (2), S. 185-192. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00641>
- Strabel, D.; Diener, M. (1995): Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. In: *Eur. J. Pharmacol.* 274 (1-3), S. 181-191. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)00728-P](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)00728-P)
- Strober, W.; Fuss, I.; Mannon, P. (2007): The fundamental basis of inflammatory bowel disease. In: *J. Clin. Invest.* 117 (3), S. 514-521. <https://doi.org/10.1172/JCI30587>

- Strober, W., and Fuss, I. J. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, S. 1756-1767.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.016>
- Tai, Y. H.; Decker, R. A. (1980): Mechanisms of electrolyte transport in rat ileum. In: *Am. J. Physiol.* 238 (3), S. G208-12. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1980.238.3.G208>
- Thiagarajah, J. R.; Verkman, A. S. (2013): Chloride channel-targeted therapy for secretory diarrheas. In: *Curr. Opin. Pharmacol.* 13 (6), S. 888-894.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.005>
- Ussing, H. H.; Zerahn, K. (1951): Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. In: *Acta Physiol. Scand.* 23 (2-3), S. 110-127. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x>
- Van Nassauw, L.; Adriaensen, D.; Timmermans, J.-P. (2007): The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. In: *Auton. Neurosci.* 133 (1), S. 91-103. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.10.003>
- Van Spaendonk, H.; Ceuleers, H.; Witters, L.; Patteet, E.; Joossens, J.; Augustyns, K. et al. (2017): Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. In: *World J. Gastroenterol.* 23 (12), S. 2106-2123. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i12.2106>
- Walls, A. F.; Amalinei, C. (2014): Detection of mast cells and basophils by immunohistochemistry. In: *Methods Mol. Biol.* 1192, S. 117-134.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1173-8_9
- Wang, Y. Z.; Palmer, J. M.; Cooke, H. J. (1991): Neuroimmune regulation of colonic secretion in guinea pigs. In: *Am. J. Physiol.* 260 (2 Pt 1), S. G307-14.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1991.260.2.G307>
- Wittkopf, N.; Neurath, M. F.; Becker, C. (2014): Immune-epithelial crosstalk at the intestinal surface. In: *J. Gastroenterol.* 49 (3), S. 375-387.
<https://doi.org/10.1007/s00535-013-0929-4>
- Wood, J. D. (2004): Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. In: *Gastroenterology* 127 (2), S. 635-657. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.017>.
- Wouters, M. M.; Vicario, M.; Santos, J. (2016): The role of mast cells in functional GI disorders. In: *Gut* 65 (1), S. 155-168. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309151>
- Yadav, V.; Varum, F.; Bravo, R.; Furrer, E.; Bojic, D.; Basit, Abdul W. (2016): Inflammatory bowel disease. Exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets. In: *Transl. Res.* 176, S. 38-68. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.04.009>

- Yamamoto, T.; Kodama, T.; Lee, J.; Utsunomiya, N.; Hayashi, S.; Sakamoto, H. et al. (2014): Anti-allergic role of cholinergic neuronal pathway via $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors on mucosal mast cells in a murine food allergy model. In: PLoS ONE 9 (1), e85888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085888>
- Yoo, B. B.; Mazmanian, S. K. (2017): The enteric network: interactions between the immune and nervous systems of the gut. In: Immunity 46 (6), S. 910-926. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.011>
- Zeissig, S.; Bürgel, N.; Günzel, D.; Richter, J.; Mankertz, J.; Wahnschaffe, U. et al. (2007): Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. In: Gut 56 (1), S. 61-72. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>
- Zhang, Y.-Z.; Li, Y.-Y. (2014): Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. In: World J. Gastroenterol. 20 (1), S. 91-99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>

11. Eigene Publikationen

Becker J, Ott D, Diener M (2019). Impact of sensitization and inflammation on the interaction of mast cells with the intestinal epithelium in rats. *Front. Physiol.* 10: Art. 329. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00329>

Ballout J, Diener M (2019). Interactions between rat submucosal neurons and mast cells are modified by cytokines and neurotransmitters. *Eur. J. Pharmacol.* 864: Art. 172713. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172713>

12. Danksagung

Zu Beginn möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Diener für die exzellente Betreuung und das herausragende Engagement danken. Neben der enormen fachlichen Kompetenz und dem stets freundlichen Umgang, hast du dir jedes Mal Zeit genommen meine Fragen zu beantworten, sodass ich mein Wissen die letzten Jahre stets weiterentwickeln konnte. Deine Begeisterung für die Forschung (ja, man merkt, dass dir dein Beruf Spaß macht) hat mir die Freude an der Wissenschaft ein Stück näher gebracht. Vielen Dank dafür!

Weiterhin möchte ich unserem Laborteam – insbesondere Bärbel, Brigitta und Alice – für die tatkräftige Unterstützung danken: sowohl für eure Geduld mit mir beim Erlernen der vielen Methoden als auch für die morgendlichen Kaffeekränzchen, durch die jeder Arbeitstag mit einem Lächeln begonnen hat. Zudem danke ich auch allen anderen Institutsmitarbeitern, die das Arbeiten hier erst so angenehm gemacht haben. Besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern unserer Campuswerkstatt, die mir geholfen haben meine Ideen in sinnvolle (und funktionierende) Methoden umzusetzen. Nicht zu vergessen während meiner letzten Jahren am Institut sind natürlich die Doktoranden der Frühstücksrunde und die zahlreichen, lustigen Erlebnisse (wie das jährliche Oktoberfest und die vielen Grillabende), die mir den Arbeitsalltag versüßt haben und mir immer in Erinnerung bleiben werden. Vielen, vielen Dank an Niklas, Stephan, Mirko, Maanvee, Rebecca, Ervice, Franz, Fabian, Jessica, Alina, Julia und Daniela (und natürlich auch alle anderen, die ich vielleicht vergessen haben sollte).

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner langjährigen Freundin und Bürokollegin Lena bedanken. Ohne dich (und Dobby) hätte das Arbeiten hier nur halb so viel Spaß gemacht. Ich werde sowohl unsere (wenn auch nicht immer tiefgründigen) Gespräche als auch die vielen schönen Momente nie vergessen, die wir in den letzten Jahren gemeinsam erlebt haben. Danke für deine Hilfsbereitschaft, dein Zuhören und die gemeinsamen Lacher (und natürlich dafür, dass du unseren Nutella-Vorrat immer aufgefüllt hast).

Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Familie, die mir so viele tolle Eigenschaften mit auf den Weg gegeben hat und mich zu der Person gemacht hat, die ich heute bin. Dank euch und eurer ständigen Unterstützung konnte ich meine Ziele im Leben verwirklichen.

Und wie es so schön heißt: „das Beste kommt zum Schluss“. Ich weiß gar nicht wie sehr ich meinem Mann Peter für die vielen tollen Jahre danken soll. Bei all meinen Vorhaben und Plänen hast du mich immer unterstützt und mich immer wieder aufs Neue motiviert – auch wenn ein Versuch zum tausendsten Mal nicht funktioniert hat und ich wieder einmal total entnervt nach Hause kam. Danke für dein offenes Ohr (auch wenn du vermutlich nur so tust, als würdest du meine Arbeit verstehen), deine Geduld und dein Verständnis.

13. Erklärung

Ich erkläre hiermit die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Jasmin Ballout



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6835-6



9 783835 1968356