

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Arbeitsbereich Ernährungsmedizin / Klinische Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Epitheliale Barrierefunktion des Kolons beim Reizdarmsyndrom
des Mischtyps

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karem Awad
aus Wien

Datum der Promotion: 25.11.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	9
2. Einleitung.....	13
2.1. Transport- und Barrierefunktion im Kolon	13
2.1.1. Die elektroneutrale Resorption von Na ⁺ und Cl ⁻	14
2.1.2. Die elektrogene Na ⁺ -Resorption	15
2.1.3. Die Tight Junction und ihr molekularer Aufbau.....	16
2.2. Formen der Diarrhö	17
2.2.1. Osmotische Diarrhö	18
2.2.2. Motilitätsbedingte Diarrhö	18
2.2.3. Malabsorptive Diarrhö.....	18
2.2.4. Sekretorische Diarrhö	19
2.2.5. Leckflux-Diarrhö.....	19
2.3. Reizdarmsyndrom	20
2.3.1. Epidemiologie, Klinik und Diagnostik des Reizdarmsyndroms	20
2.3.2. Ätiopathogenese des Reizdarmsyndroms	22
2.2. Therapie des Reizdarmsyndroms	25
2.2. Zielstellung der Arbeit.....	28
3. Material und Methoden	30
3.1. Material.....	30
3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
3.1.2. Chemikalien	30
3.1.3. Puffer und Lösungen	32
3.1.4. Antikörper	36
3.1.5. Software.....	36
3.2. Methoden	36
3.2.1. Biopsieentnahme aus menschlichem Sigma	36
3.2.2. Transport, Präparation und Einspannen der Biopsien.....	37
3.2.3. Prinzip der elektrochemischen Transport- und Barriere-Messung	38
3.3. Ussing-Kammer.....	38

3.3.1.	Messkammer und Wärmetauscher	38
3.3.2.	Elektrische Messanordnung	40
3.4.	Impedanzspektroskopie	42
3.4.1.	Prinzip der Impedanzmessung	42
3.4.2.	Impedanz-Versuchsstand	44
3.5.	Versuchsablauf.....	45
3.5.1.	Badkorrektur und Elektrodenasymmetrie	45
3.5.2.	Messung des Kurzschlussstroms	45
3.5.3.	Messung der elektrischen Impedanz des Epithels	46
3.5.4.	Bestimmung des aktiven elektrogenen Natrium-Transports an humanen Sigmabiopsien	46
3.5.5.	Epitheliale Permeabilität für kleine Makromoleküle	48
3.5.6.	Überprüfung der Viabilität des Gewebes	50
3.6.	Molekularbiologische Methoden	50
3.6.1.	Protein-Extraktion aus humanen Colon sigmoideum-Biopsien.....	50
3.6.2.	Proteinquantifizierung nach Pierce	51
3.6.3.	Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	52
3.6.4.	Western Blot	53
3.7.	Färbemethoden	55
3.7.1.	Fixierung, Einbettung und Schnittverfahren.....	55
3.7.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	56
3.7.3.	Zellkernfärbung.....	56
3.7.4.	Apoptose-Färbung.....	56
3.8.	Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie	57
3.8.1.	Immunfluoreszenz	57
3.8.2.	Konfokale Mikroskopie.....	58
3.9.	Morphologische Veränderungen	59
3.10.	Sequenzierung.....	60
3.11.	Statistik.....	61
4.	Ergebnisse.....	61

4.1.	Epitheliale Barrierefunktion beim Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M) .	61
4.1.1.	Impedanzspektroskopische Analyse der epithelialen Barrierefunktion des Kolons.....	61
4.1.2.	Parazelluläre Permeabilität beim RDS-M	64
4.2.	Epitheliale Transportfunktion des Dickdarms beim Reizdarmsyndrom (RDS-M).....	65
4.2.1.	Natrium-Transport bei RDS-M und Kontrollen.....	65
4.2.2.	Elektrogene Chloridsekretion.....	67
4.3.	Molekulare Analyse der epithelialen Barriere.....	68
4.3.1.	Expressionsveränderungen der Tight Junction-Proteine beim RDS-M	68
4.3.2.	Subzelluläre Lokalisation der Tight Junction Proteine	70
4.3.3.	Epitheliale Apoptoserate beim RDS-M	73
4.3.4.	Morphologische Veränderungen.....	74
4.3.5.	RNA-Expressionsanalyse der Colonmucosa	74
5.	Diskussion.....	77
5.1.	Epitheliale Störung der Barrierefunktion beim Reizdarmsyndrom.....	78
5.2.	Natrium-Transport beim RDS-M.....	80
5.3.	Veränderungen in den epithelialen Tight Junctions beim RDS-M.....	82
5.4.	Epitheliale Apoptose.....	84
5.5.	Mukosale Darmoberfläche beim Reizdarmsyndrom	85
5.6.	Pathomechanismen beim RDS-M	85
6.	Literaturverzeichnis.....	88
7.	Anhang.....	99
7.1.	Erklärung der Selbstständigkeit.....	99
7.2.	Lebenslauf.....	101
7.3.	Verzeichnis der eigenen Publikationen	103
7.4.	Danksagung	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Ussing-Versuchsstand mit Wärmetauscher, integrierter Begasung und Umwälzung.....	40
Abbildung 2 Elektrische Messanordnung bei den Ussing-Experimenten	41
Abbildung 3 Nyquist-Diagramm einer Modellmessung.....	44
Abbildung 4 Aktiver elektrogener Natrium-Transport im Kolon.....	48
Abbildung 5 Epithelialer Widerstand im menschlichen Sigma.....	62
Abbildung 6 Originale Impedanz-Ortskurven (Nyquist-Diagramme).....	63
Abbildung 7 Permeabilität für parazelluläre Marker.....	64
Abbildung 8 Zeitverlauf des Kurzschlussstroms (I_{sc}) im Sigma beim Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M) nach Stimulation mit Aldosteron.....	66
Abbildung 9 Aktiver elektrogener Natrium-Transport (ΔI_{sc}) im Sigma bei Kontrollen und Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M).....	67
Abbildung 10 Aktiver elektrogener Chlorid-Transport (ΔI_{sc}) im Sigma bei Kontrollen und beim RDS-M.....	67
Abbildung 11 Darstellung der Expression von Occludin bei Kontrollen und RDS-M ...	68
Abbildung 12 Expressionsanalyse von Tight Junction-Proteinen bei Kontrollen und Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M).....	70
Abbildung 13 Immunfluoreszenz-Analyse von Occludin und ZO-1 im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop	72
Abbildung 14 Immunfluoreszenz-Analyse von Tricellulin und ZO-1 im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop.....	72
Abbildung 15 TUNEL- und DAPI-Färbung.....	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Pipettierschema zur Bestimmung des Proteingehalts mit dem Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer	52
Tabelle 2 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten.....	56
Tabelle 3 Elektrische Widerstände im menschlichen Sigma	62
Tabelle 4 Auszug einiger Gene aus dem RNA-Seq Datensatz mit Relevanz für RDS. 75	
Tabelle 5 Upstream – Regulator Analyse	76

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
A	Fläche
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Kapazität ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)
Cldn	Claudin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
EnaC	Epithelialer Natriumkanal
FKS	Fetales Kälberserum
G	Leitfähigkeit (Einheit: $\text{ms}\cdot\text{cm}^{-2}$)
$\times g$	mittlere Erdbeschleunigung
Hz	Hertz
I	Stromstärke (Einheit Ampère)
RDS	Reizdarmsyndrom
RDS-D	Reizdarmsyndrom vom Diarrhötyp
RDS-M	Reizdarmsyndrom vom Mischtyp
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
I_{sc}	Kurzschlussstrom (in $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ bzw. $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
J	Flux (hier verwendete Einheit: $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
kDa	Kilodalton
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol·l ⁻¹
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
o/n	Over night
P	Permeabilität (Einheit: cm/s^2)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
R	Widerstand (Einheit: $\Omega\cdot\text{cm}^2$)
RC	Resistor-Capacitor
rpm	Rounds per minute

R^{epi}	Epithelialer Widerstand (Einheit: $\Omega \cdot \text{cm}^2$)
R^{sub}	Subepithelialer Widerstand (Einheit: $\Omega \cdot \text{cm}^2$)
R^{t}	Transepithelialer Widerstand (Einheit: $\Omega \cdot \text{cm}^2$)
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard error of mean
t	Zeit in min oder h
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
TJ	Tight Junction
tTJ	trizelluläre Tight Junction
V	Volt
vgl.	vergleiche
Z	Impedanz (Einheit: $\Omega \cdot \text{cm}^2$)

1. Zusammenfassung

Einleitung Das Reizdarmsyndrom ist eine häufige Erkrankung, unter der fast jeder zweite Patient mit gastrointestinaler Symptomatik leidet. Die Patienten leiden unter Stuhlgangsveränderungen (Diarrhö und/oder Obstipation) und abdominellen Beschwerden (diffuse Schmerzen, Meteorismus). Bei Patienten mit Reizdarmsyndrom (RDS) scheint eine verstärkte motorische Darmaktivität und eine viszerale Hypersensitivität eine Rolle in der Pathogenese zu spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erforschung weiterer pathophysiologischer Mechanismen der Diarrhö bzw. Verstopfungsmechanismen beim Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M).

Methoden Es wurden Sigmabiopsien von Patienten mit Reizdarmsyndrom entnommen und in Ussing-Kammern elektrophysiologisch untersucht, um die Transport- und Barriereigenschaften des Kolons funktionell zu charakterisieren. Auch war die Erforschung der Aktivität des epithelialen Natriumkanals (EnaC) wichtig, da eine Störung des EnaC als Diarrhö-Mechanismus bei chronisch entzündlichen Erkrankungen beschrieben wurde. Zudem wurde die Permeabilität des Darmgewebes gegenüber kleinen Makromolekülen untersucht. Mittels Western Blotting erfolgte die Expressionsanalyse von Tight Junction-Proteinen sowie die Darstellung der subzellulären Lokalisation dieser Proteine mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie. Für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie wurde zuletzt mit Hilfe von Next Generation Sequencing die Analyse relevanter Genexpressionsmuster und Signalkaskaden durchgeführt.

Ergebnisse Bei RDS-M-Patienten zeigte sich eine Tendenz zur Abnahme des epithelialen Widerstands (allerdings nicht statistisch signifikant). Bei Patienten mit RDS-M war die parazelluläre Permeabilität für Fluorescein und FITC-Dextran 4000 im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Dies weist auf strukturelle Veränderungen der parazellulären Durchlässigkeit des Epithels hin, die durch eine veränderte Expression von Tight Junction Proteinen erklärt werden kann. Tatsächlich zeigte die Western-Blot-Analyse eine Abnahme der Proteinexpression von Occludin, während andere Tight Junction-Proteine wie Claudine in ihrem Expressionslevel nicht signifikant verändert waren. Bei reduzierter Occludin-Expression im Western Blot und erhöhtem Flux für 4 kDa-FITC-Dextran und Fluorescein bot sich auch eine andere Erklärung an, nämlich eine veränderte Lokalisation von Tricellulin im Darmepithel, die durch Occludin gesteuert wird. In der Tat zeigte sich dann auch in der Folge, dass in der RDS-M-Gruppe eine geringere Co-Lokalisierung des

Tricellulin-Signals mit ZO-1 in der trizellulären Tight Junction im Vergleich zu den Kontrollen vorlag und somit eine Heraussortierung von Tricellulin aus der trizellulären Tight Junction angenommen werden konnte.

Schlussfolgerungen Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass eine verminderte Expression von Occludin zu einer Umverteilung von Tricellulin aus der trizellulären Tight Junction heraus führt, die dann in einer erhöhten Makromolekülpermeabilität resultiert. Dies könnte einen wichtigen Pathomechanismus für das Reizdarmsyndrom vom gemischten Typ (RDS-M) darstellen, der zu einem Antigeneinstrom mit Entzündungsreaktionen in der Darmschleimhaut führen kann, die entlang des Leaky Gut-Konzepts pathophysiologisch zur Permission der Erkrankung beiträgt.

Summary

Introduction Irritable bowel syndrome is a very common disease, affecting almost every second patient with gastrointestinal symptoms. Patients mainly suffer from bowel changes (diarrhea and/or constipation) and abdominal discomfort (diffuse pain, meteorism). In patients with irritable bowel syndrome (IBS), increased intestinal activity and visceral hypersensitivity appear to play a role in the pathogenesis. The aim of the present work was to explore further pathophysiological mechanisms of diarrhea or constipation in mixed-type irritable bowel syndrome (IBS-M).

Methods To perform the study, sigmoid biopsies were obtained from patients with IBS and were electrophysiologically studied in Ussing chambers to functionally characterize the transport and barrier properties of the colon. Also, exploration of epithelial sodium channel (EnaC) activity was important, as disruption of EnaC has been described as a diarrhea mechanism in chronic inflammatory diseases. In addition, the permeability of intestinal tissue to small macromolecules was investigated. Western blot was used to analyze the expression of tight junction proteins and to visualize the subcellular localization of these proteins by confocal microscopy. Lastly, for a better understanding of the pathophysiology, analysis of relevant gene expression patterns and signaling cascades was performed using next generation sequencing.

Results In IBS-M patients, there was a tendency for the epithelial resistance to be decreased, which did not reach statistical significance. Subepithelial resistance was not altered, suggesting the absence of subepithelial changes such as inflammation. In patients with IBS-M, the permeability of fluorescein and FITC-dextran was increased compared with the control group.

Such an increased paracellular permeability indicates structural changes in the tight junction and may be explained by altered tight junction protein expression. Indeed, Western blot analysis showed a decrease in protein expression of occludin, whereas other claudins were not significantly altered. With reduced occludin expression in the Western blot and increased flux for 4 kDa FITC-dextran and fluorescein, we also considered an altered localization of tricellulin. In the IBS-M group, there was less co-localization of tricellulin with ZO-1 in the tricellular tight junction compared with controls indicating a redistribution of tricellulin off the tricellular tight junction.

Conclusions The present work shows that decreased expression of occludin in IBS-M leads to a redistribution of tricellulin, which then results in increased macromolecular permeability. This may represent an important pathomechanism for IBS-M that leads to antigen influx with inflammatory responses in the intestinal mucosa, which pathophysiologically contributes to the permission of the disease along the leaky gut concept.

2. Einleitung

2.1. Transport- und Barrierefunktion im Kolon

Das Kolon beginnt mit dem Blinddarm (*Caecum*) und geht distal in den Mastdarm (*Rectum*) über.

Man untergliedert das Kolon in vier Abschnitte:

- *Colon ascendens* (aufsteigendes Kolon)
- *Colon transversum* (Querdickdarm)
- *Colon descendens* (absteigendes Kolon)
- *Colon sigmoideum* (Sigma)

Das Kolon weist zwei Bewegungsmuster auf: Erstens, die Haustren resultieren aus Kontraktionen der Ringmuskelschicht (*Segmentation*). Hierdurch wird der Darminhalt durchmischt sowie zurückgehalten. Im Zuge dessen kommt es zum Teil zu einer Rückführung des Inhalts in das *Colon ascendens* und *Caecum*. Das zweite Bewegungsmuster umfasst die *Massenbewegungen*. Sie schieben den Inhalt des Darms zwei- bis dreimal am Tag um 20 bzw. 30 cm vor.

Der Darm enthält Bakterien u.a. andere Mikroorganismen, die in ihrer Summe die Mikrobiota (früher als Darmflora bezeichnet) ausmachen. Die Bakterien gehen dabei mit ihrem Wirt eine Symbiose ein, indem sie u.a. unverdauliche Nahrungsbestandteile dem Wirtorganismus zugänglich machen. Viele dieser Bakterien arbeiten anaerob, d. h. unter Ausschluss von Sauerstoff, und dieser Vorgang zählt zu den Vergärungsprozessen (Fermentation).

An dieser Stelle werden bei der Vergärung des Chymus mit ihrer Hilfe in erster Linie kurzkettige Fettsäuren produziert, die vom Epithel des Dickdarms resorbiert werden.

Das Kolon ist dafür zuständig, Elektrolyte und Wasser aus dem Darmlumen zu resorbieren wodurch der Chymus eingedickt und als Stuhl für die Ausscheidung vorbereitet wird. Das Kolon verarbeitet pro Tag etwa 1,5 bis 2 L Chymus, welcher aus dem Dünndarm zugeführt wird. Im Bereich zwischen dem Zökalpol und dem Rektum werden mit Hilfe der Dickdarmmukosa ca. 1,4 bis 1,9 L Wasser mit Elektrolyten resorbiert, sodass pro Tag etwa 100 ml Faeces ausgeschieden werden (Piper, 2012: 374). Hierbei kommt es mit Hilfe von Transportproteinen, die in der apikalen und basolateralen Membran der Epithelzellen lokalisiert sind, durch resorptive Transportprozesse zur Aufnahme von Elektrolyten und Flüssigkeit aus dem Darmlumen in den Organismus. Gleichzeitig spricht man bei

jenen Prozessen, die in die entgegengesetzte Richtung ablaufen, von sekretorischen Prozessen. Sofern physiologische Bedingungen vorherrschen, erfolgt innerhalb des Kolons eine Netto-Resorption von Elektrolyten und Wasser, was bedeutet, dass in der Summe mehr resorptive als sekretorische Transportvorgänge stattfinden. Dadurch kommt es zu einer höheren Aufnahme von elektrolytreicher Flüssigkeit in den Körper, während lediglich eine kleine Menge Flüssigkeit mit dem Stuhl ausgeschieden wird. Zu den resorbierten Elektrolyten gehören Natrium (Na^+), Chlorid (Cl^-) und Calcium (Ca^{2+}). Kalium (K^+) und Bicarbonat (HCO_3^-) werden hingegen sezerniert (Piper, 2012: 374). Zu den quantitativ wichtigsten resorptiven Transportprozessen im Kolon gehören die elektroneutrale Na^+ - und Cl^- -Resorption sowie die elektrogene Na^+ -Resorption. Hierbei ist zu beachten, dass aufgrund von pathologischen Vorgängen eine Störung der Homöostase auftreten kann, die einen Verlust von Elektrolyten und Wasser zur Folge hat.

Für die Aufrechterhaltung jener Homöostase ist insbesondere die Schutzfunktion der Epithelschicht mit ihren abdichtenden Eigenschaften relevant. Diese wird durch den speziellen Aufbau der Tight Junctions (TJ) bedingt. Der aus den Epithelzellen bestehenden Barriere obliegen hierbei zwei wesentliche Funktionen: Einerseits schützt sie den Organismus vor dem Eindringen von Antigenen und andererseits vor dem Verlust von Elektrolyten und Wasser ins Darmlumen. Kommt es auf Ebene der epithelialen Barriere zu pathologischen Veränderungen, kann dies zu einer Regulationsstörung des Elektrolyt- und Flüssigkeitstransports und zu einer Beeinträchtigung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes des Organismus führen (Kunzelmann and Mall, 2002).

2.1.1. Die elektroneutrale Resorption von Na^+ und Cl^-

Innerhalb aller Abschnitte des Kolons und dort vor allem im Oberflächenepithel findet die elektroneutrale Na^+/Cl^- Resorption statt. Die Expression der Na^+/Cl^- Transporter ist entlang des Kolons durch eine schrittweise abnehmende Aktivität von proximal nach distal gekennzeichnet (Farkas et al., 2011, Kunzelmann and Mall, 2002, Singh et al., 1995). Mit Hilfe dieser spezifischen Form der Stoffaufnahme, die aus einem kombinierten Na^+/H^+ und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch resultiert, kann im Kolon der Großteil der luminalen Resorption von Na^+ und Cl^- gewährleistet werden. In diesem Zusammenhang gelten die in der apikalen Membran befindlichen Na^+/H^+ -Austauscher Typ 2 sowie vor allem Typ 3 (NHE2/3) als die relevantesten Transportproteine, die für den Transfer von Na^+ und H^+ zuständig sind.

In Knockout-Maus-Modellen konnte belegt werden, dass eine verminderte Expression von NHE3 durch eine verminderte Resorption von Na^+ aus dem Lumen das Auftreten einer Diarrhö begünstigen kann. Dieser Effekt konnte nicht für das Transportprotein NHE2 belegt werden. (Ledoussal et al., 2001, Schultheis et al., 1998).

Daher kam es vorrangig zu Untersuchungen von NHE3 hinsichtlich der Regulation der elektroneutralen Na^+/Cl^- Resorption unter pathologischen Bedingungen, für deren Regulation eine Reihe von Aspekten von Bedeutung ist.

Neben Prozessen der Signaltransduktion wie z.B. Interaktionen mit dem Zytoskelett und Clathrin-vermittelte Endozytosen sind weitere Vorgänge von Relevanz. Hierzu gehören Protein-Protein Interaktionen wie solche mit Scaffoldern (z.B. NHERF1-4) oder über Phosphorylierungen, die z.B. durch die Proteinkinase A (PKA) oder Serum- und Glucocorticoid induzierbare Kinase 1 (SGK1) vermittelt werden. Des Weiteren spielt die Regulation der Transkription eine Rolle, die u.a. über Mineralo- und Glukokortikoide, enteropathogene Bakterienprodukte und Zytokine beeinflusst wird (He and Yun, 2010).

2.1.2. Die elektrogene Na^+ -Resorption

Hauptsächlich lokalisiert im distalen Kolon handelt es sich bei der elektrogenen Na^+ -Resorption um einen Prozess, der auf die oberen Abschnitte der Krypten und das Oberflächenepithel begrenzt ist (Kunzelmann and Mall, 2002). Der epitheliale Na^+ -Kanal (EnaC) vermittelt den elektrogenen Na^+ -Transport und besteht aus den α -Untereinheiten, die konstitutiv in Kolonozyten in der apikalen Membran vorkommen, und der β - und γ -Untereinheiten, deren Einbau in die apikale Membran und deren Expression durch Stimulation mit Glukokortikoiden oder Mineralokortikoiden (Aldosteron) ermöglicht wird (Firsov et al., 1998, Jasti et al., 2007).

Für die Regulation der elektrogenen Na^+ -Resorption, bedarf es inhibitorischer und aktivierender Elemente, die miteinander spezifisch kombiniert werden. Im Hinblick auf diese komplexe Interaktion sind der E3-Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 und der Raf-1-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg von Bedeutung. Kommt es zu keiner Stimulation (z.B. durch niedrigen Kortikoidspiegel), dann kann eine erhöhte Aktivität der inhibitorischen Proteine Raf-1 und Nedd4-2 gemessen werden. In dem EnaC regulierenden Komplex (ERC) (Kyriakis, 2007), einem Multi-Protein-Komplex, werden die einzelnen Elemente der MEK1/2-

ERK1/2-Signalkaskade organisiert sowie an dieser Stelle die Inhibition des EnaC mediert. Durch die Aktivierung der MEK1/2-ERK1/2-Signalkaskade wird Raf-1 aktiviert (Soundararajan et al., 2012). Die Hemmung der EnaC-Untereinheiten wird mit Hilfe von Nedd4-2 aufgehoben, das für diesen Prozess am C-terminalen Ende phosphoryliert wird. Darüber hinaus kommt es zwischen Nedd4-2 und ERC ebenfalls zur Interaktion. Der inhibierende Einfluss von Nedd4-2 und ERK1/2 kann jedoch aufgehoben werden, indem eine erhöhte Expression der EnaC stimulierenden Proteine GILZ1, CNK3 und SGK1 unter der Einwirkung von Aldosteron vorliegt.

2.1.3. Die Tight Junction und ihr molekularer Aufbau

Die Barrierefunktion im Kolonepithel wird durch eine intakte TJ-Verbindung zwischen den Epithelzellen gebildet. Die TJs bestehen aus retikulären Zell-Zell-Verbindungen, die zwischen den Epithelzellen in TJ-Strängen durch die Aneinanderreihung von unterschiedlichen TJ-Proteinen organisiert sind. TJs befinden sich an der apikalen Seite der lateralen Membran, wo sie in Ringform die Epithelzellen umschließen. Die Funktion der TJs besteht in der Verhinderung der freien Diffusion von Soluten und Wasser zwischen vaskulärem Kompartiment und Darmlumen sowie der Verhinderung des Eindringens von luminalen Antigenen in den Organismus. Durch den molekularen Aufbau der TJs wird die Dichtigkeit des Epithels maßgeblich beeinflusst. Grundsätzlich ist von folgendem Sachverhalt auszugehen: Je höher die Dichtigkeit des Epithels, desto größer sind auch die sich aufbauenden Konzentrationsunterschiede über dem Epithel, gegen die der Transport der Solute erfolgt. Im Bereich des Kolons handelt es sich um ein einschichtiges Epithel mit hochprismatischem Aufbau. Des Weiteren handelt es sich um ein semidichtes Epithel, das in seinem Aufbau von proximal nach distal in seiner Dichtigkeit zunimmt. Dadurch ist der aktive Transport von Soluten sogar gegen hohe Konzentrationsgefälle möglich.

TJs sind in Form von Strängen aus Transmembranproteinen aufgebaut. Im Jahr 1993 erfolgte die Identifikation des ersten TJ-Proteins Occludin (Furuse et al., 1993). Des Weiteren zeigten Studien eine Interaktion von Occludin in den TJs mit speziellen TJ-assoziierten Molekülen (Zonula occludens protein = ZO; ZO-1 und ZO-2), sowie dessen Verbindung mit dem Zytoskelett (Furuse et al., 1994). Daneben existiert eine weitere Gruppe von TJ-Proteinen, die gegenüber Occludin keine Sequenzhomologie aufweisen: die Claudine. Bei der Transmembranprotein-Superfamilie der Claudine handelt es sich um eine

multigene Molekülgruppe, die im Jahr 1998 durch eine Forschergruppe in Japan erstmals Erwähnung fand. Zum heutigen Zeitpunkt findet man bei Säugetieren 27 verschiedene Claudine – nicht alle davon jedoch im Darm (Furuse et al., 1998)

Die Claudine bilden das Gerüst der TJs und sind dabei für verschiedene Funktionen verantwortlich. Unterschieden wird hier zwischen sog. Barrierebildnern bzw. Kanalbildnern und den Nicht-Barriere bzw. Nicht-Kanalbildnern. Barrierebildner bzw. Kanalbildner führen hierbei eine Art Einlasskontrolle (engl. Gate function) durch. Nicht-Barrierebildner bzw. Nicht-Kanalbildner sind an verschiedenen Prozessen (z. B. Signaltransduktion, Proliferation, Differenzierung, Rezeptorfunktion und Motilität bzw. Migration) beteiligt. Daneben üben sie außerdem eine Zaun-Funktion (engl. Fence function) aus, deren Aufgabe darin besteht, einer Durchmischung der Proteine der apikalen und lateralen Membran der Epithelzelle entgegenzuwirken. Demnach haben die Claudine die Funktion, den parazellulären Transport der Solute und des Wassers zu kontrollieren und daneben den Organismus vor dem Eindringen von luminalen Antigenen zu schützen. Des Weiteren finden hier auch die selektive parazelluläre Permeation sowie kontrollierte resorptive und sekretorische Prozesse statt (Krug et al., 2014).

2.2. Formen der Diarrhö

Unter Diarrhö versteht man eine erhöhte Stuhlfrequenz, welche mit erhöhtem Wasseranteil und/oder erhöhten Gewicht des Stuhls einhergehen kann, dessen Auftreten durch pathophysiologische Prozesse des Darmes bedingt ist. Je nachdem, welcher pathophysiologische Prozess im Darm auftritt, werden verschiedene Typen von Diarrhö unterschieden. Zusammengefasst ist allerdings festzuhalten, dass alle Formen der Diarrhö – ausgenommen der motilitätsbedingten Diarrhö – durch osmotische Prozesse mediiert sind. Hierbei kommt es aufgrund eines vermehrten Auftretens von osmotisch wirksamen Soluten innerhalb des Darmlumens – was beispielsweise aufgrund von verminderter Resorption oder vermehrter Sekretion stattfinden kann – zu einem gesteigerten Austritt von Wasser ins Lumen sowie dessen Ausscheidung in den Faeces.

Die folgenden Unterkapitel beschäftigen sich mit den unterschiedlichen Formen der Diarrhö nach pathophysiologischer Klassifikation.

2.2.1. Osmotische Diarrhö

Zu einer osmotischen Diarrhö im engeren Sinne kommt es, wenn es im Darmlumen zu einer Anreicherung nicht resorbierbarer Stoffe kommt. Im klinischen Alltag zur Darmreinigung in Vorbereitung vor einer Koloskopie werden folgende Stoffe eingesetzt: Laktulose, Magnesiumsalze oder auch synthetische, hygroskopische Substanzen wie Polyethylenglykol (PEG, Macrogol) (Puckett and Soop, 2012). Charakteristisch für die osmotische Diarrhö ist außerdem, dass nach dem Einstellen der Zufuhr von nicht resorbierbaren Stoffen es zu einer Linderung der Symptome kommt.

2.2.2. Motilitätsbedingte Diarrhö

Zu motilitätsbedingten Diarrhöen kommt es, wenn entweder einer Hyper- oder eine Hypomotilität des Darmes vorliegt. Von einer hypermotilen Diarrhö spricht man, wenn es aufgrund von einer erhöhten Kontraktilität des Darmes zu einer verkürzten Transitzeit des Chymus und somit zu einem verminderten Kontakt des aus dem Dünndarm eingeschleusten Chymus mit der Kolonmukosa kommt. Hierbei kommt es aufgrund der Verkürzung der Kontaktzeit zu einer verminderten Resorption, sodass den Faeces durch die Mukosa lediglich eine geringe Menge an Soluten und Wasser entzogen werden kann und der Stuhl nicht ausreichend eingedickt wird (Spiller, 2006). Die motilitätsbedingte Diarrhö stellt häufig eine Begleitsymptomatik verschiedener Krankheitsbilder, wie etwa Hyperthyreose und Karzinoidsyndrom dar. Bei der hypomotilitätsbedingten Diarrhö liegt primär eine pathologisch verlängerte Transitzeit des Chymus vor. Hierdurch kommt es zu bakteriellen Gärungs- und Zersetzungsprozessen, die zu einer Verflüssigung des Stuhlgangs mit resultierender Diarrhö führen. Eine Hypomotilität des Darmes kann u.a. durch eine autonome Neuropathie hervorgerufen werden, wobei auch nach ätiologischen Gesichtspunkten der Diabetes mellitus eine tragende Rolle spielt. Die Diarrhö entsteht dann hier durch bakterielle Fehlbesiedlung des Dünndarms.

2.2.3. Malabsorptive Diarrhö

Malabsorptive Diarrhöen sind durch eine unvollständige Resorption potentiell resorbierbarer Substanzen bedingt, die auf den folgenden zwei Mechanismen basiert:

1. gestörte Transportmechanismen:

z. B. Glukose-Galaktose-Malabsorption – hierbei liegt innerhalb des Natrium-/Glukose-Cotransporters (SGLT1) ein Defekt vor (Xin and Wang, 2011).

2. verminderte Resorptionsfläche:

z. B. bei Zöliakie – hierdurch kommt es zu einer verminderten Resorption osmotisch wirksamer Substanzen.

Auch die maldigestive Diarrhö zählt zur Gruppe der malabsorptiven Diarrhöen. Hierbei wird der Nahrungsbrei nicht bzw. nicht ausreichend in resorbierbare Bestandteile aufgespalten – z. B. bei Laktasemangel oder bei exokriner Pankreasinsuffizienz (Breliau and Tenner, 2012).

2.2.4. Sekretorische Diarrhö

Sekretorische Diarrhöen treten auf, wenn es im Darmlumen zu einer aktiven transepithelialen Elektrolytsekretion – besonders von Anionen wie Cl^- und HCO_3^- kommt. Die Folge davon besteht in der Bindung von Wasser durch die Elektrolyte und einer anschließenden wässrigen Diarrhö, was z. B. durch Bakterientoxine wie bei der Cholera bedingt sein kann. Bei der Besiedlung mit *Vibrio cholerae* kommt es aufgrund der Cholera-Toxinwirkung zu einer starken Erhöhung der aktiven Cl^- -Sekretion, wodurch typische flüssige und weißlich-trüb verfärbte Stühle auftreten können (sog. Reiswasserstühle). Ohne entsprechenden substitutiven Ausgleich des so entstehenden Flüssigkeitsverlustes mittels oraler oder parenteraler Rehydrationslösung kann eine Infektion mit *Vibrio cholerae* tödlich enden (Harris et al., 2012).

2.2.5. Leckflux-Diarrhö

Von einer Leckflux-Diarrhö spricht man, wenn die Funktion der epithelialen Barriere gestört ist. Die TJ kann dabei die Abdichtung des Epithels nicht mehr gewährleisten und die parazelluläre Permeabilität für Solute und Wasser ist höher als normal. Dieser Zustand führt zum parazellulären Verlust von Elektrolyten und Wasser, und, wenn die Schädigung des Epithels stärker ist, können auch größere Moleküle durchtreten. Diese Veränderung kann in der Folge dann auch durch intakte transzelluläre Ionentransportprozesse nicht mehr ausgeglichen werden. Schließlich kommt es dadurch zu einer parazellulären Verschiebung von Flüssigkeiten und Soluten in das Darmlumen. Dies führt letztendlich zur

Diarrhö. Eine Form der Leckflux-Diarrhö ist zum Beispiel die Kolitis bedingt durch eine Infektion mit *Campylobacter jejuni* (Bucker et al., 2018).

2.3. Reizdarmsyndrom

Das Reizdarmsyndrom (RDS, englisch: irritable bowel syndrome, IBS) ist eine chronische Funktionsstörung des Magen-Darm-Trakts, die durch abdominelle Beschwerden sowie Veränderungen des Stuhlgangs (Diarrhö und/oder Obstipation) charakterisiert ist. Für die Diagnose ist u.a. der Ausschluss somatischer Erkrankungen durch laborchemische, bildgebende und mikrobiologische Befunde erforderlich (Ausschlussdiagnostik für das RDS).

Erkrankungen wie Angstzustände, schwere Depressionen und das chronische Fatigue-Syndrom sind bei Patienten mit einem RDS häufiger anzutreffen.

Der Aufbau einer Arzt-Patienten-Beziehung und die Kontinuität der Versorgung sind für die Behandlung aller Patienten mit RDS von entscheidender Bedeutung. Bei Patienten mit leichter Symptomatik können eine Anpassung des Lebensstils und eine Ernährungsumstellung genügen.

Bei Patienten mit leichten bis mittelschweren Symptomen, die nicht auf die anfängliche Behandlung ansprechen, und bei Patienten mit mittelschweren bis schweren Symptomen, die die Lebensqualität beeinträchtigen, wird eine pharmakologische Therapie als Zusatzbehandlung empfohlen (S3-Leitlinie, DGVS, 2011).

2.3.1. Epidemiologie, Klinik und Diagnostik des Reizdarmsyndroms

In westlichen Industriestaaten liegt die Prävalenz für RDS in der Bevölkerung bei 11 %. Die Prävalenz schwankt aber je nach Diagnosekriterien, Alter, Geschlecht und geographischer Region zwischen 1,1 % und 45 % (Hungin et al., 2003). Frauen sind häufiger als Männer betroffen.

Dieser relative Unterschied spiegelt einen absoluten Prävalenzunterschied von ungefähr 5 % zwischen den Geschlechtern wider. Die Prävalenz bei Frauen und Männern beträgt 14 bzw. 9 %. Bei Frauen ist die Wahrscheinlichkeit, dass Obstipation dominiert höher als bei Männern. Der Einfluss der Sexualhormone auf den Gastrointestinaltrakt wird als mögliche Ursache diskutiert (Lovell and Ford, 2012a). Die Prävalenz von RDS ist bei über 50-jährigen um 25 % niedriger als in der jüngeren Bevölkerungsgruppe (Lovell and Ford, 2012b).

RDS ist durch chronische Bauchschmerzen und Stuhlgangsveränderungen gekennzeichnet:

Chronische Bauchschmerzen:

Die abdominellen Schmerzen werden normalerweise als krampfend mit periodischen Exazerbationen beschrieben. Die Lokalisation und die Intensität können stark variieren ((Longstreth et al., 2006)). Der Schmerz steht oft in Verbindung mit der Defäkation. Während bei einigen Patienten die Bauchschmerzen durch Defäkation gelindert werden, berichten andere Patienten von einer Verschlechterung der Schmerzen. Emotionaler Stress und Mahlzeiten können den Schmerz exazerbieren (Simren et al., 2017). Patienten mit RDS berichten auch häufig von Blähungen oder Aufstoßen.

Stuhlgangsveränderungen:

Zusätzlich treten bei RDS-Patienten Stuhlgangsveränderungen im Sinne einer Diarrhö, Obstipation oder einer Mischung aus Diarrhö und Obstipation auf.

Die Diarrhö beim RDS ist in der Regel als hochfrequenter, breiiger oder wässriger Stuhl mit geringem bis mittlerem Volumen gekennzeichnet. Den meisten Stuhlgängen gehen Schmerzen, Dringlichkeit und das Gefühl einer unvollständigen Entleerung oder eines Tenesmus voraus. Etwa die Hälfte aller RDS-Patienten klagt über Schleimabsonderung mit dem Stuhl (Manning et al., 1978). Blutiger Stuhl, nächtlicher Durchfall und fettiger Stuhl sind nicht mit RDS assoziiert.

Bei Obstipation sind die Stühle oft hart und klumpig. Bei den Patienten kann es auch zu Tenesmen kommen, wenn das Rektum leer ist.

Wegen des Fehlens von biologischen Markern wurden mehrere symptom-basierte Fragebögen entwickelt, um die Diagnose von RDS zu standardisieren. Am weitesten verbreitet sind dabei die Kriterien nach Rom III (S3-Leitlinie, DGVS, 2011).

Gemäß diesen Kriterien wird RDS als wiederkehrender Bauchschmerz definiert, der in den vorhergehenden drei Monaten durchschnittlich an mindestens einem Tag pro Woche auftritt und mit zwei oder mehr der folgenden Kriterien in Verbindung gebracht wird (Mearin et al., 2016):

- Stuhlgang
- Änderung der Stuhlfrequenz

- Veränderung der Stuhlkonsistenz

Die Erkennung von RDS-Subtypen basiert auf der vom Patienten angegebenen vorherrschenden Stuhlkonsistenz an Tagen mit abnormalem Stuhlgang.

RDS-Subtypen werden für die klinische Praxis wie folgt definiert:

- RDS mit vorherrschender Verstopfung (RDS-O, RDS – Obstipation) – Der Patient berichtet, dass anormale Stuhlgänge normalerweise Verstopfungen sind.
- RDS mit vorherrschendem Durchfall (RDS-D, RDS – Diarrhö) – Der Patient berichtet, dass anormale Stuhlgänge normalerweise als Durchfall imponieren.
- RDS mit gemischten Darmgewohnheiten (RDS-M, RDS – Mischtyp) – Patienten berichten, dass anormale Stuhlgänge sowohl Verstopfung als auch Durchfall sein können.
- RDS nicht klassifiziert (RDS-U, RDS-unklassifiziert) – Patienten, die die diagnostischen Kriterien für RDS erfüllen, aber nicht genau in einen der drei anderen Subtypen eingeteilt werden können.

Neben der Erhebung des Fragebogens sind zur Diagnostik von RDS eine gründliche Anamnese und eine körperliche Untersuchung unerlässlich. Des Weiteren ist ein kleines Blutbild erforderlich, sowie eine Koloskopie mit Biopsieentnahme, um eine mikroskopische Kolitis auszuschließen.

Bei RDS-D Patienten wird oft das CRP bestimmt sowie eine serologische Diagnostik der Zöliakie durchgeführt.

2.3.2. Ätiopathogenese des Reizdarmsyndroms

Die zugrundeliegende Pathophysiologie des RDS bleibt bislang unvollständig geklärt. Es wird als Darmstörung angesehen, die aus einer Wechselwirkung zwischen einer Reihe von Faktoren resultiert.

Der bisherige Fokus von Erklärungsansätzen lag auf Veränderungen der gastrointestinalen Motilität und der viszeralen Hypersensitivität. Neuere Studien haben nun die Rolle von Entzündungen und Veränderungen der Darmflora untersucht. Ob eine genetische Veranlagung vorliegt, wird ebenfalls geprüft.

Veränderungen der gastrointestinalen Motilität:

Zu den beobachteten Veränderungen zählen eine erhöhte Häufigkeit und Unregelmäßigkeit von Darmkontraktionen, eine verlängerte Transitzeit bei vorwiegend obstipationsdominantem RDS und eine übertriebene motorische Reaktion auf Mahlzeiten bei vorwiegend Diarrhö-dominantem RDS (Agrawal et al., 2009, Chey et al., 2001, Kumar and Wingate, 1985, Schmidt et al., 1996, Simren et al., 2000). Die Relevanz dieser motorischen Funktionsveränderungen für die RDS-Symptomatik ist noch ungeklärt (Caldarella et al., 2002).

Viszerale Hypersensitivität:

Viszerale Hypersensitivität ist ein häufiger Befund bei Patienten mit Reizdarmsyndrom.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bei RDS-Patienten die Schmerzen, die durch Distension einer Darmschlinge verursacht werden, im Vergleich zu Kontrollen bei niedrigeren Dehnungsvolumina auftreten, was auf eine Überempfindlichkeit der Rezeptoren hindeutet (Bouin et al., 2002). Die Rektaldehnung bei Patienten mit RDS erhöhte auch die zerebrale kortikale Aktivität stärker als bei gesunden Probanden (Lawal et al., 2006).

Ungefähr die Hälfte der RDS-Patienten (hauptsächlich RDS-O) weist eine messbare Zunahme des Bauchumfangs auf, die mit Völlegefühl einhergeht, obwohl dies möglicherweise nicht mit dem Darmgasvolumen zusammenhängt (Houghton et al., 2006). Patienten, die über Völlegefühl und Gasüberschuss klagen, hatten tatsächlich Gasvolumina im Verdauungstrakt ähnlich wie bei asymptomatischen Patienten, zeigten jedoch eine Beeinträchtigung des Transits von Darmgas (Lasser et al., 1975).

Intestinale Inflammation:

Immunhistologische Untersuchungen ergaben, dass es zur Aktivierung des mukosalen Immunsystems bei einigen RDS-Patienten kommt. Bei diesen Patienten wurde über eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten im Dickdarm und Dünndarm berichtet. Eine Studie, in der bei zehn Patienten mit schwerem RDS Jejunalbiopsien durchgeführt wurden, ergab bei neun Patienten einen Anstieg der Lymphozyteninfiltration im *Plexus myentericus* und bei sechs Patienten eine Neuronendegeneration (Tornblom et al., 2002).

Stuhluntersuchungen bei Patienten mit RDS-D ergaben eine hohe Serin-Protease-Aktivität. Ein Stuhlextrakt aus diesen Patienten erhöhte bei intrakolonialer Infusion in Mäusen

die zelluläre Permeabilität des Dickdarms und die viszeralen Schmerzen in den Mäusen. Diese Effekte wurden durch Serin-Protease-Inhibitoren verhindert. Die Rolle von intestinalen Serinproteasen in der Pathophysiologie von RDS wird weiterhin untersucht (Gecse et al., 2008), (Ceuleers et al., 2018).

Mastzellen sind Effektorzellen des Immunsystems. Diese Zellen setzen Mediatoren (Histamin und Proteasen) frei, die das enterische Nervensystem stimulieren können und zu abnormaler motorischer Aktivität des Darms führen. Eine erhöhte Anzahl von Mastzellen wurde im terminalen Ileum, Jejunum und Dickdarm von RDS-Patienten nachgewiesen (Guilarte et al., 2007) (Barbara et al., 2006). Studien haben eine Korrelation zwischen Bauchschmerzen bei RDS und dem Vorhandensein aktivierter Mastzellen in der Nähe von Dickdarmnerven gezeigt (Barbara et al., 2006).

Bei Patienten mit RDS wurden zudem erhöhte Spiegel an proinflammatorischen Interleukinen im Plasma beobachtet (Liebregts et al., 2007) (Dinan et al., 2006). Darüber hinaus produzieren periphere mononukleäre Blutzellen von IBS-Patienten höhere Mengen an Tumornekrosefaktor als gesunde Kontrollen.

Postinfektiöses RDS:

Die Entwicklung eines RDS nach infektiöser Kolitis wurde klinisch vermutet, basierend auf der Vorgeschichte einer akuten Diarrhö, die bei einigen Patienten vor dem Auftreten von Reizdarmsymptomen auftrat. Zwei Metaanalysen zeigten ein erhöhtes Risiko für RDS bei Patienten, bei denen eine akute Gastroenteritis auftrat (Halvorson et al., 2006, Thabane et al., 2007).

Die Ursache der Symptomatik nach einer akuten Infektion ist nicht geklärt, obwohl verschiedene Theorien vorgeschlagen wurden:

- Malabsorption – Nach enterischen Infektionen wurde die Entwicklung einer Gallensäuremalabsorption beobachtet, die zu einer Durchfallerkrankung führen kann (Niaz et al., 1997, Sinha et al., 1998).
- Aktivierung enteroendokriner Zellen / Lymphozyten – Eine Zunahme von Serotonin-haltigen enteroendokrinen Zellen und T-Lymphozyten wurde nach akuter *Campylobacter*-Enteritis nachgewiesen (Spiller et al., 2000).

- Antibiotikabehandlung – Es wurde beobachtet, dass der Einsatz von Antibiotika bei Magen-Darm-Erkrankungen oder anderen Infektionen ein Risikofaktor für die Entwicklung funktioneller Darmsymptome ist (Maxwell et al., 2002).

Nahrungsmittelunverträglichkeit:

Die Rolle der Ernährung in der Pathophysiologie des RDS ist ebenfalls nicht klar. Einige Patienten mit RDS berichten postprandial über eine Verschlechterung der Symptome und nehmen eine Nahrungsmittelunverträglichkeit gegenüber bestimmten Nahrungsmitteln wahr (Monsbakken et al., 2006, Simren et al., 2001).

Mehrere Faktoren sollen zur Empfindlichkeit gegenüber Lebensmitteln bei RDS-Patienten beitragen. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf lebensmittelspezifische Antikörper, Kohlenhydrat-Malabsorption und Glutenempfindlichkeit.

Lebensmittelallergie:

Studien mit Schwerpunkt auf IgG-Antikörpern, die die normale Immunantwort auf Lebensmittel darstellen, haben jedoch gezeigt, dass die Eliminierung bestimmter Lebensmittel bei RDS-Patienten, bei denen die IgG-Titer in Verbindung mit diesen Lebensmitteln erhöht sind, die gastrointestinalen Symptome verringern kann (Atkinson et al., 2004).

Malabsorption von Kohlenhydraten:

Eine theoretische Ätiologie von RDS legt nahe, dass Symptome mit einer beeinträchtigten Absorption von Kohlenhydraten zusammenhängen können. Die Theorie besagt, dass Oligo-, Di- und Monosaccharide sowie Polyole (FODMAPs) bei RDS-Patienten in den distalen Dünndarm und Dickdarm gelangen, wo sie fermentiert werden, was zu Symptomen wie Bauchschmerzen und Stuhlgangsveränderungen, sowie zu erhöhter Darmpermeabilität und subklinischer bis klinischer Inflammation führt (Gibson and Shepherd, 2005).

2.2. Therapie des Reizdarmsyndroms

2.2.1. Ernährungsumstellung

Eine sorgfältige Anamnese kann Symptome aufzeigen, die sich auf bestimmte Lebensmittel beziehen. RDS-Patienten können vom Ausschluss gaserzeugender Lebensmittel (z.B. Bohnen, Zwiebeln, Sellerie, Karotten, Rosinen, Bananen, Aprikosen, Pflaumen und Rosenkohl), also einer Diät mit wenig FODMAPs sowie in ausgewählten Fällen von der Vermeidung von Gluten profitieren.

Eine Diät, die wenig FODMAPs enthält, ist bei RDS-Patienten, die trotz Meiden von gaserzeugenden Lebensmitteln noch Symptome haben, empfehlenswert. Diese kurzkettigen Kohlenhydrate werden schlecht resorbiert und sind im Darmlumen osmotisch aktiv, werden zudem fermentiert, was zu Blähungen und Schmerzen führt. Eine Low-FODMAP-Diät beinhaltet den Verzicht auf High-FODMAP-Lebensmittel, die fruktosehaltig sind, z. B. Honig, Äpfel, Birnen, Mangos, Kirschen oder Oligosaccharide einschließlich Weizen (Shepherd et al., 2013).

2.1.1.1. Medikamentöse Therapie

Wie oben erwähnt können Patienten mit mittelschweren bis schweren Symptomen des Reizdarmsyndroms (RDS), die die Lebensqualität beeinträchtigen, mit pharmakologischen Wirkstoffen behandelt werden. Da sich RDS im Allgemeinen als Symptomkomplex darstellt, sollte die Behandlung auf dem vorherrschenden Symptom und Subtyp basieren.

Obstipation:

- Osmotische Laxantien

Bei Patienten mit RDS-O, bei denen eine ballaststoffreiche Ernährung keine Besserung erzielt hat, wird eine Therapie mit Polyethylenglykol (PEG) empfohlen. Mit PEG behandelte Patienten haben signifikant mehr spontane Stuhlgänge sowie eine Verbesserung der Stuhlkonsistenz (Chapman et al., 2013).

- Lubiproston

Patienten mit anhaltender Verstopfung trotz Behandlung mit PEG können z.B. mit Lubiproston behandelt werden. Lubiproston ist ein lokal wirkender Chloridkanalaktivator (ClC-2 im oberen Teil des Jejunums), der die chloridreiche Sekretion von Darmflüssigkeit verbessert und dadurch eine Verflüssigung des Stuhls ermöglicht.

In zwei multizentrische, placebokontrollierte Studien wurden 1154 Erwachsene (92 % Frauen) mit RDS-O 12 Wochen lang mit Lubiproston oder Placebo behandelt. Patienten, die nach dem Zufallsprinzip zu Lubiproston randomisiert wurden, erreichten signifikant häufiger ein Gesamtansprechen (Drossman et al., 2009).

- 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) 4-Rezeptoragonisten

Agonisten des 5-Hydroxytryptamin-4 (5-DANN4) – Rezeptors stimulieren die Freisetzung von Neurotransmittern und erhöhen die Kolonmotilität. Tegaserod reduziert Bauchschmerzen bei RDS und verbessert Verstopfung (Scott and Perry, 1999).

- Natrium / Wasserstoff-Austauscher 3 (NHE3)-Hemmer

Tenapanor, ein Natrium / Wasserstoff-Austauscher 3, reduziert die Absorption von Natrium und Phosphat und verbessert das Volumen und den Transit der Darmflüssigkeit. Eine Behandlung mit Tenapanor führte in klinischen Studien zu einer Verbesserung sowohl des durchschnittlichen wöchentlichen vollständigen spontanen Stuhlgangs als auch der Bauchschmerzen im Vergleich zu Placebo (Chey et al., 2020)

Diarrhö:

Bei Patienten mit RDS-D ist der Stuhl charakteristisch weich bei erhöhter Stuhlfrequenz, weist jedoch ein normales tägliches Gesamtvolumen auf. Bei Patienten mit vorwiegend durchfallbedingten Symptomen wird eine Therapie mit Antidiarrhoika (z. B. Loperamid) als Erstbehandlung und Gallensäure-Sequestriermittel als Zweitlinientherapie empfohlen.

- Loperamid

Loperamid ist das einzige Mittel gegen Durchfall, das in randomisierten Studien bei Patienten mit RDS-D untersucht wurde. Eine systematische Überprüfung umfasste drei kontrollierte Studien zur Bewertung von Loperamid bei der Behandlung von RDS (Cann et al., 1984) (Hovdenak, 1987) (Efskind et al., 1996). Insgesamt deuteten die Studien darauf hin, dass Loperamid bei der Behandlung von Durchfall durch Verringerung der Stuhlfrequenz und -konsistenz wirksamer ist als Placebo, jedoch nicht bei Blähungen oder Bauchbeschwerden.

- Gallensäure-Sequestriermittel

Bei Patienten mit anhaltendem Durchfall trotz Antidiarrhoika werden u.a. Gallensäure-Sequestriermittel (z. B. Cholestyramin) eingesetzt.

Der Grund für die Verwendung von Gallensäure-Sequestriermitteln bei Patienten mit RDS-D ist, dass bis zu 50 Prozent der Patienten mit RDS-D eine Gallensäuremalabsorption aufweisen (Wedlake et al., 2009). Gallensäuren verursachen Diarrhö, indem sie die Darmsekretion und -motilität stimulieren.

- 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) 3 -Rezeptorantagonisten

Alosetron, ein 5-Hydroxytryptamin-3-Rezeptor (5HT-3)-Antagonist, ist für die Behandlung von schwerem, durch Diarrhö vorherrschendem RDS bei weiblichen Patienten zugelassen, deren Symptome sechs Monate andauerten. Alosetron moduliert die viszerale afferente Aktivität des Magen-Darm-Trakts, wodurch die Motilität und Sekretion des Dickdarms verringert wird (Prior and Read, 1993).

Spasmolytika:

Spasmolytika sollten nach Bedarf verabreicht werden. Spasmolytika lindern die Symptome von Bauchschmerzen bei Patienten mit RDS kurzfristig, ihre langfristige Wirksamkeit wurde jedoch nicht nachgewiesen.

Krampflosend sind solche, die die Entspannung der glatten Darmmuskulatur direkt beeinflussen (z. B. Mebeverin und Pinaverin), und solche, die über ihre anticholinergen oder antimuskarischen Eigenschaften wirken (z. B. Dicyclomin und Hyoscyamin) (Brandt et al., 2009)

Antidepressiva:

Trizyklische Antidepressiva (TCAs) verlangsamen über ihre anticholinergen Eigenschaften auch die Darmtransitzeit, was bei RDS-D von Vorteil sein kann (Gorard et al., 1995). Aufgrund ihrer Auswirkung auf den Darmtransit sollten TCAs bei Patienten mit Obstipation mit Vorsicht angewendet werden.

Antibiotika:

Während Antibiotika nicht routinemäßig bei allen Patienten mit RDS empfohlen werden sollten, können sie bei Patienten mit mittelschwerem bis schwerem RDS ohne Obstipation, insbesondere bei Patienten mit Blähungen, die nicht auf andere Therapien angesprochen haben z. B. eine Diät mit wenig FODMAPs, antispasmolytische Mittel und TCAs eingesetzt werden. In diesen Fällen kann eine zweiwöchige Therapie mit Rifaximin erfolgen (Menees et al., 2012).

2.2. Zielstellung der Arbeit

Die Prävalenz des RDS ist hoch und die Therapieoptionen und -erfolge begrenzt. Durch die unterschiedlichen Genesen der RDS-Subgruppen, die zum Teil überlappen, ist die Charakterisierung der Pathophysiologie des RDS, die zu Diarrhö und Obstipation führt,

von hohem Interesse. Um Pathomechanismen zu beschreiben ist die Analyse des Darmepithels hinsichtlich Barriere- und Transportfunktion maßgeblich, die beim RDS bislang nicht ausreichend untersucht wurden. Da die Epithelforschung am menschlichen Darm relevante Ergebnisse für das Krankheitsbild des RDS liefern könnte, stellte sich die Frage welche Diarrhö- und Obstipationsmechanismen beim RDS auftreten, die pathophysiologisch charakterisierbar sind, und welche weiteren pathologischen Veränderungen am Darmepithel von RDS-Patienten zu finden sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit, die pathophysiologischen Mechanismen der Diarrhö bzw. Verstopfungsmechanismen beim Reizdarmsyndrom vom Mischtyp zu erforschen. Zu diesem Zweck wurden während der Koloskopie von Patienten mit Reizdarmsyndrom Biopsien aus dem *Colon sigmoideum* entnommen. Diese Patienten erhielten noch keine Therapie. An diesen Proben wurden elektrophysiologische Messungen in Ussing-Kammern durchgeführt, um die Transport- und Barriereigenschaften des Kolons funktionell zu charakterisieren. Es wurde dabei auch die Aktivität des epithelialen Natriumkanals (EnaC) gemessen, da eine Störung des EnaC einen Diarrhö-Mechanismus erklären könnte.

Zur Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion wurde neben der Impedanzspektroskopie in Ussing-Kammern auch die Permeabilität des Darmgewebes gegenüber kleinen Makromolekülen wie Fluorescein und 4 kDa FITC-Dextran untersucht. Des Weiteren erfolgte die molekulare Untersuchung der Barrierefunktion mittels Expressionsanalyse von Tight Junction-Proteinen sowie die Darstellung der subzellulären Lokalisation dieser Proteine mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie.

Zudem interessierte uns die Erforschung relevanter Genexpressionsmuster und Signalkaskaden, die uns ein besseres Verständnis der Pathophysiologie ermöglichen könnte.

Auch wenn für das Gesamtverständnis der Erkrankung die Untersuchung aller RDS-Subtypen wünschenswert wäre, beschränkt sich diese Arbeit auf die Untersuchung des Reizdarmsyndroms des gemischten Typs (RDS-M).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agarosegel-Elektrophoresekammern	Biorad, München
DAKO Pen	DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Deckgläser	Menzel-Gläser, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Deutschland
Lösungsreservoir	Forschungswerkstatt der Charité
Magnetrührer	Ika-Combimag, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Merck, Deutschland
Mini Zentrifuge	Labnet International, USA
Objektträger	Menzel-Glaeser, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Silikonscheibe	Forschungswerkstatt der Charité Campus Benjamin Franklin
Skalpelle	Feather Safety Razor Co., Japan
Spitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Tecan Infinite 200	Tecan Group Ltd., Schweiz
Ussing-Kammern	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
Vortex-Gerät	Pharmacia, Freiburg
Wasserbad	Haake, Deutschland
Zeiss LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Deutschland

3.1.2. Chemikalien

50 x TAE-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe

Aldosteron	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Amilorid	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
BCA-Protein Assay Reagenz A + B	Pierce, USA
Bromphenolblau (Laemmli)	Amersham, München
BSA	AppliChem, Deutschland
Bumetanid	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Carbachol	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
DAPI	Boehringer-Mannheim, Deutschland
Dulbecco's PBS mit Mg/Ca PAA	Laboratories GmbH, Cölbe
Dulbecco's PBS ohne Mg/Ca PAA	Laboratories GmbH, Cölbe
Ethanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
FCS (fetal calf serum)	Biochrom, Berlin
FITC-gelabelte Dextrane (4 kDa)	Sigma, Taufkirchen
Formalin	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Fluorescein	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Serva, Deutschland
Lumilight Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
Methanol	Merck, Berlin
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Protein-Marker PageRuler	Fermentas, Leon-Rot
Pro Tags Mount Fluor	Biocyc GmbH & Co. KG, Deutschland
RNA-later	Qiagen, Deutschland
TAE 50 x	Serva, Heidelberg
TEMED	Life Technologies
Theophyllin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Tissue Tek	Sakura Finetek Europe, Niederlande
Triton X-100	Roche, Mannheim
TUNEL-Assay	Roche, Mannheim
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

3.1.3. Puffer und Lösungen

Badlösung für elektrophysiologische Experimente

140 mmol Na⁺

123,8 mmol Cl⁻

5,4 mmol K⁺

1,2 mmol Ca²⁺

1,2 mmol Mg²⁺

2,4 mmol HPO₄²⁻

0,6 mmol H₂PO₄⁻

21 mmol HCO₃⁻

ad 1 l Aqua bidest.

Blockierungslösung (Immunfluoreszenzfärbung der Biopsie)

10 % Goat serum

3 % Bovines Serumalbumin (BSA) in Phosphat-buffered saline (PBS)

BSA-Blockierungsreagenz (Western Blot)

25 g BSA

5 ml 2 % Natriumazid

ad 500 ml PBS/Tween

Elektrophoresepuffer

500 ml 10 x Puffer West

50 ml 10 % SDS

ad 5l Aqua bidest.

Gebrauchslösung (Proteinquantifizierung) je Probe

196 µl Pierce BCA Protein Assay Reagenz A

4 µl Pierce BCA Protein Assay Reagenz B

Gesamtlysepuffer

10 mM Tris-Cl pH 7,5

150 mM NaCl

0,5 % Triton X

0,1 % SDS

pro 10 ml Zugabe einer Tablette Complete (Roche)

PBS/Tween

2 Tabl. PBS

1 ml Tween 20

ad 1 l Aqua bidest.

Permeabilisierungslösung (Immunfluoreszenzfärbung Biopsie)

0,5 % Triton – X in PBS

Sammelgel

4,9 ml Sammelgel-Stammlösung

50 µl 10 % SDS

50 µl APS

5 µl TEMED

Sammelgel-Stammlösung

85 ml	30 % Acrylamid
125 ml	0,5 M Tris pH 6,8

ad 500 ml Aqua bidest.

Substrate für das Epithel

10 mmol	D(+)-Glukose
0,5 mmol	β -OH-Butyrat
2,5 mmol	Glutamin
10 mmol	D(+)-Mannose

ad 1 l Aqua bidest.

TBS/Tween

100 ml	10 x TBS
1 ml	Tween 20

ad 1 l Aqua bidest.

Transferpuffer

100 ml	10 x Puffer West
100 ml	Methanol abs.

ad 1 l Aqua bidest.

Trenngel (12,5 % - Claudine)

8,2 ml	Acrylamid
4,7 ml	Aqua bidest.
7 ml	1 M Tris pH 8,8

200 µl	10 % SDS
200 µl	APS
10 µl	TEMED

Trenngel (10 % - Occludin und Tricellulin)

6,66 ml	Acrylamid
7 ml	Aqua bidest.
7 ml	1 M Tris pH 8,8
200 µl	10 % SDS
200 µl	APS
10 µl	TEMED

10 x Puffer-West

144 g	Glycin
30,4 g	Tris HCl
	ad 1 l Aqua bidest.

10 x TBS

80 g	1,37 M NaCl
12,1 g	Tris Base
	ad 1 l Aqua bidest.

5 x Laemmli Puffer

0,32 M	Tris pH 6,8
44 %	Glyzerol
25 %	ss-Mercaptoethanol

12,5 % SDS (Sodium dodecyl sulfate)

0,001 % Bromphenolblau

3.1.4. Antikörper

Alexa Fluor 488 Goat-Anti-rabbit	Invitrogen, USA
Alexa Fluor 594 Goat-Anti-mouse	Invitrogen, USA
Rabbit-Anti-Claudin-1	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Claudin-2	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Claudin-3	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Claudin-4	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Claudin-5	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Claudin-8	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Occludin	Zymed, USA
Mouse-Anti-ZO-1	Zymed, USA
Mouse-Anti- β -Actin	Sigma-Aldrich Co., Deutschland

3.1.5. Software

Impedanzspektroskopie	Fiebig, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
LSM 510	Carl Zeiss, Deutschland
Image J 1.52d	Rasband, NIH, Bethesda, Maryland, USA freeware, http://rsb.info.nih.gov/ij/

3.2. Methoden

3.2.1. Biopsieentnahme aus menschlichem Sigma

In der vorliegenden Arbeit wurden RDS-Patienten des Mischtyps (RDS-M) untersucht. Als Einschlusskriterien des zu untersuchenden Patientenkollektivs zwischen 18 und 70 Jahren wurde die Diagnose eines Reizdarmsyndroms nach Rome III-Kriterien zugrunde

gelegt (Drossman, 2006). Dabei wurde sichergestellt, dass andere Ursachen der intestinalen Symptomatik, makroskopische Entzündung der Darmschleimhaut oder NSAID- oder Kortikosteroid-Therapien ausgeschlossen wurden. Bei der Kontrollgruppe handelte es sich um Patienten, die in der Regel im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung koloskopiert wurden und weder makroskopisch noch mikroskopisch pathologische Veränderungen an der Dickdarmschleimhaut aufwiesen.

Die Patienten mit Reizdarmsyndrom waren im Durchschnitt 35 Jahre und die Kontrollpatienten 49 Jahre alt. Das Verhältnis w:m betrug für das Reizdarmsyndrom 5:1 und für die Kontrollen 2:1.

Die untersuchten Personen wurden über das Studienziel, die Inhalte und Risiken mündlich und schriftlich informiert, und dass zu Forschungszwecken zusätzliche Biopsien entnommen werden. Sie stimmten dem schriftlich zu. Die Studie zur Entnahme für zusätzliche Biopsien für Forschungszwecke wurde durch die Ethikkommission der Charité unter der Antragsnummer des Ethikvotums EA4/015/13 bewilligt.

Die Forschungsbiopsien wurden am Ende der Routine-Untersuchung nach dem Zurückziehen des Koloskops bis 30 Zentimeter *ab ano* im *Colon sigmoideum* (Sigma) entnommen. Die entnommenen Biopsien wurden dann zur Messung der Transport- und Barrierefunktion direkt in Ussing-Kammern verbracht oder parallel für molekulare Untersuchungen wie Western Blot, RNA-Sequenzierung oder Mikroskopie fixiert.

3.2.2. Transport, Präparation und Einspannen der Biopsien

Die Biopsien wurden nach Entnahme unmittelbar in physiologische Kochsalz-Lösung überführt und umgehend ins Labor transportiert. Dort wurden die Biopsien präpariert und in die vorbereiteten Ussing-Kammern eingebracht.

Zur Präparation vor Einbau der Probe wurden die Biopsien mit der serosalen Seite nach oben liegend auf einer glatten Oberfläche ausgebreitet. Danach wurde ein mit Gewebekleber benetzter Kunststoffstring (lichter Innendurchmesser 2,5 mm) auf die serosale Oberfläche der Biopsie geklebt. Um die Fixierung des Epithels in der Ussing-Kammer mit einer suffizienten Abdichtung zu gewährleisten, wurde gemeinsam mit dem Kunststoffstring ein Silikondichtring in dem Epithelcontainer eingesetzt (Gitter et al., 1997). Der Container besteht aus zwei runden Plexiglasscheiben mit einer Öffnung von jeweils 2,5 mm Durchmesser im Zentrum. Diese Öffnung definiert die exponierte Fläche in der Messkammer

auf 0,049 cm². Zwischen der Entnahme der Biopsie und dem Einspannen in die Ussing-Kammer lagen in der Regel etwa 30 Minuten.

3.2.3. Prinzip der elektrochemischen Transport- und Barriere-Messung

Es wurde ein biologisch-physikalisches System zur Charakterisierung der intestinalen Transport- und Barriere-Funktion verwendet. Dieses beinhaltet in der vorliegenden Arbeit menschliche Darmpräparate, welche mit der von Ussing und Zerahn eingeführten Versuchsanordnung (Ussing and Zerahn, 1951) vermessen wurden. Das Prinzip und der Versuchsaufbau sind im Folgenden beschrieben. Zwischen zwei Flüssigkeitskompartimenten, die eine Lösung mit übereinstimmender Zusammensetzung enthalten (meist Ringerlösung), wird ein lebendes Darmepithel wie eine „trennende Membran“ eingefügt. Die Potenzialdifferenz, die über dem Epithel durch passive und aktive Transportprozesse entsteht, wird durch Anlegen eines externen Kurzschlussstromes (I_{sc}) kurzgeschlossen. Dies geschieht über eine externe Spannungsquelle und bewirkt, dass die Potenzialdifferenz über dem Epithel auf 0 mV gebracht wird. Dadurch werden alle treibenden Kräfte für passive Transportprozesse, also alle elektrochemischen Gradienten, nivelliert. Folglich sind alle nunmehr zwischen den Flüssigkeitskompartimenten beobachteten Netto-Teilchentransfers stets durch aktiven Transport hervorgerufen. Der so gemessene Kurzschlussstrom stellt demnach die Summe aller aktiven elektrogenen Ionenverschiebungen über das Epithel dar. Werden Wechselströme verschiedener Frequenz in diesem System angelegt, ermöglicht dies eine Differenzierung zwischen dem epithelialen und dem subepithelialen Anteil des Gesamtwiderstandes des eingebauten Gewebspräparates (Gitter et al., 1998). Das Prinzip der Unterscheidung beruht dabei auf den unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften von Epithel und Subepithel. Während die Epithelzellschicht, die den epithelialen Widerstand darstellt, elektrisch wie ein RC-Glied wirkt, gleicht das subepitheliale Gewebe einem rein ohm'schen Widerstand (vgl. Kapitel 3.4) (Fromm et al., 1985)

3.3. Ussing-Kammer

3.3.1. Messkammer und Wärmetauscher

Die Messkammern, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, waren in zwei symmetrischen Hälften aufgebaut, die durch das eingespannte Epithel voneinander getrennt

waren (Abb. 1). Dabei wurde das Epithel mit einer Badlösung umspült. Bei den Kammerhälften handelte es sich um zylindrische Acrylglaskonstruktionen. Die offene Basis war medial zum Epithel gerichtet. Das Volumen des Innenraums betrug 0,5 ml und umspülte das Epithel mit der auf 37°C erwärmten Badlösung. Es gab in der Arbeit 2 Kammertypen. Die hier beschriebene „Fluxkammer“ und die unter 3.3.2 weiter unten beschriebene „Impedanzkammer“, was jeweils die in den Kammern vorrangig erfassten Mess-Signale bezeichnet.

In der „Fluxkammer“ gab vier Kanäle, die jede Kammerhälfte durchzogen. Die zwei Kanäle, die sich oben befanden, dienten der Befestigung von elastischen Verbindungsschläuchen zwischen der Kammer und dem Badlösungsreservoir, das der Temperierung der Badlösung diente. Im dritten Kanal, der sich seitlich einer Kammerhälfte befand, befanden sich die Spannungselektroden und im vierten seitlich platzierten Kanal die epithel-fernen Stromelektroden.

Als Badlösereservoir fungierte eine doppelwandige Glaskonstruktion, bestehend aus zwei nebeneinander liegenden Hohlzylindern (ein sog. Gas-Lift). Zwei Öffnungen, die sich in den epithelnahen, dünnlumigen Kanälen befanden, dienten der Begasung der Badlösung mit 95 % O₂ und 5 % CO₂. Die Begasung löste einerseits die Umwälzung der Badlösung aus und andererseits stellte sie die Konstanz des pH-Werts sicher. Die Begasung ermöglichte somit eine dauerhafte Exposition mit Sauerstoff und in der Lösung enthaltenen Nährstoffen bei konstantem pH, wodurch einer frühzeitigen Beeinträchtigung der Viabilität des Epithels entgegengewirkt wurde. Durch diesen komplex aufgebauten Wärmetauscher erfolgte die konstante Temperierung der Badlösung auf 37 °C. In der doppelten Wandung des Geräts zirkulierte dafür Wasser, das über einen Schlauch mit dem Pumpensystem verbunden war.

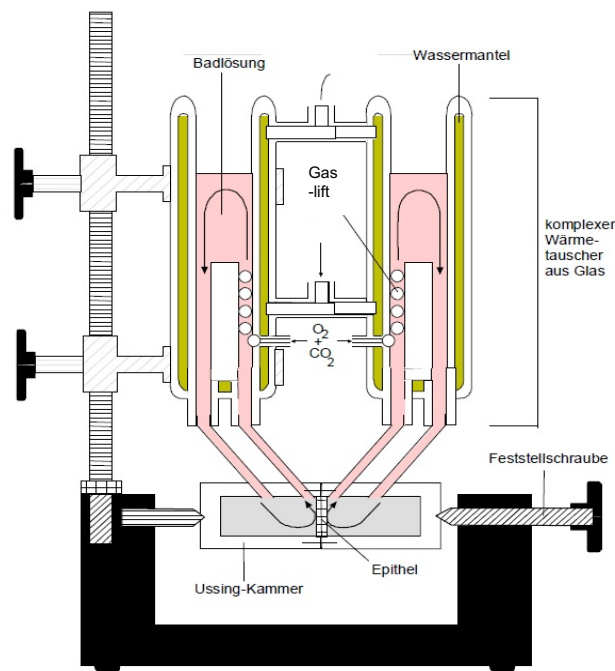


Abbildung 1 Ussing-Versuchsstand mit Wärmetauscher, integrierter Begasung und Umwälzung

Das Epithel ist in der Ussing-Kammer zwischen den zwei Kammerhälften, als „Trennmembran“ aufgespannt und von einer 37 °C warmen Badlösung umgeben. Die über den „Gas-Lift“ aufsteigenden Bläschen, bestehend aus 95 % O₂ und 5 % CO₂, halten die Zirkulation und die CO₂- und O₂-Partialdrücke in der Lösung aufrecht. Die Badlösung wird über einen Wärmetauscher erwärmt. In der doppelten Wandung des Wärmeaustauschers befindet sich Wasser, welches über ein temperiertes Wärmebad umgewälzt wird (Gitter et al., 1997).

3.3.2. Elektrische Messanordnung

Bei der elektrophysiologischen Messanordnung der Ussing-Kammer kann man zwischen „Strom-“ und „Spannungselektroden“ unterscheiden. Durch die Spannungselektroden wurde die transepitheliale Potenzialdifferenz gemessen. Um die Dicke der Flüssigkeitsschicht zwischen Epithel und Elektrodenspitze möglichst gering zu halten, waren diese so nahe wie möglich am Epithel angebracht (Abstand < 2 mm). Im Gegensatz dazu wurden die Stromelektroden so epithelfern integriert, wie es die Geometrie der Kammer möglich machte. Ihre Aufgabe war die Einspeisung des Kurzschlussstroms. Sie befanden sich

in einem Abstand von 20 mm zum Epithel. Bei dieser Entfernung war das elektrische Feld im Bereich des Epithels weitgehend homogen.

Jede der Spannungselektroden bestand aus einer Glaskapillare, die mit 3 g/dl Agar-Agar in 0,5 mol/l KCl gefüllt war. Durch einen Mikroelektrodenhalter, der ebenfalls mit 0,5 mol/l KCl gefüllt war und zentral die Spannungselektrode fasste, wurde der elektrische Kontakt sichergestellt. Zur Applikation des Kurzschlussstroms diente das zweite mit 3 g/dl Agar-Agar in 0,5 mol/l KCl gefüllte, epithelferne Elektrodenpaar.

Über eine computergesteuerte Spannungsklemmeinrichtung (Typ CVC6 und CVC8; Fiebig, Berlin) wurden die Stromimpulse aus der Kammer in vorgegebenen Zeitintervallen an einen Computer geleitet. Dort wurden die aufgezeichneten Messungen angezeigt und gespeichert. Gemessen wurden der Gesamtwiderstand des Epithels, die zum Kurzschließen des Epithels notwendige Stromstärke und die transepitheliale Spannung.

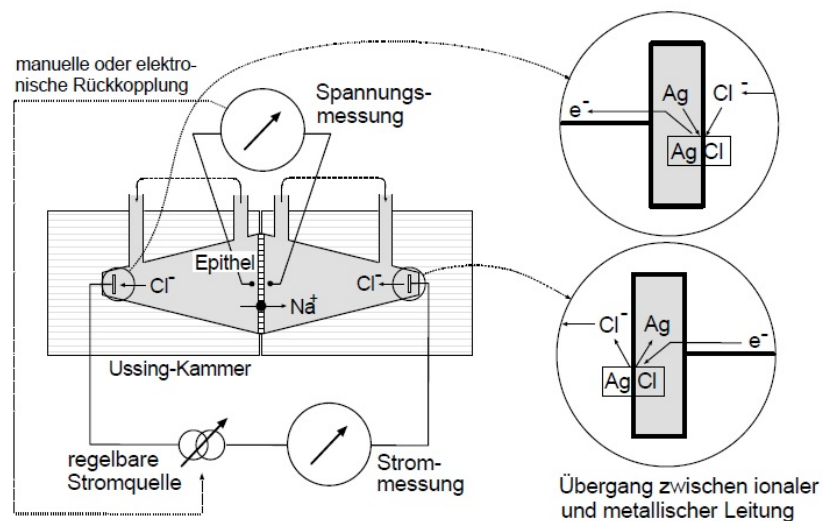


Abbildung 2 Elektrische Messanordnung bei den Ussing-Experimenten

Die transepitheliale Spannung wurde über die epithelnahen Spannungselektroden gemessen. Eine Applikation des Kurzschlussstroms erfolgte über die epithelfernen Elektroden. Mittels Ag/AgCl-Elektroden wurde der Übergang zwischen ionaler und elektrischer Leitung gewährleistet. (modifiziert nach Christian Barmeyer Diss. 2002)

3.4. Impedanzspektroskopie

3.4.1. Prinzip der Impedanzmessung

Durch die Impedanzspektroskopie ist die Diskriminierung zwischen dem epithelialen und dem subepithelialen Anteil am Gesamtwiderstand der Darmwand möglich. Der subepitheliale Widerstand und alle nicht-epithelialen Anteile der Biopsie entsprechen einander dabei.

Deshalb gilt:

$$R^t = R^{\text{epi}} + R^{\text{sub}}$$

R^t Gesamtwiderstand des Epithels

R^{epi} Widerstand des Epithels

R^{sub} Widerstand des Subepithels

Die Basis für die Wechselstrom-Impedanzanalyse bildet ein 3-Parameter-Modell, anhand dessen das elektrische Verhalten der Darmwand abgebildet werden kann ((Schifferdecker and Fromter, 1978). Das Modell beschreibt die Darmwand als einen elektrischen Ersatzschaltkreis. Der epitheliale Widerstand gleicht einem ohm'schen Widerstand, welcher parallel zu einem Kondensator (RC-Glied) und in Reihe zu einem den subepithelialen Widerstand repräsentierenden ohm'schen Widerstand geschaltet ist.

Hierbei werden die kapazitiven Charakteristiken der apikalen und der basolateralen Zellmembranen, als apparente Kapazität des Kondensator-Glieds dargestellt (Moore, 1975).

Auch subepitheliale Zellen wie Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen und andere sowie die extrazelluläre Matrix, verfügen über eine Kapazität. Da diese aber nicht über Zellverbindungen miteinander verknüpft sind, kann der Strom durch den subepithelialen Raum – entlang des geringsten Widerstandes – fließen. Das bewirkt die Kurzschließung der subepithelialen Kapazität, weshalb sie elektrisch auch nicht in Erscheinung tritt.

Wenn man bei einem eingespannten Darmstück Wechselströme unterschiedlicher Frequenzen appliziert, misst man ein Frequenzspektrum beginnend von 0 Herz, einen endlos großen kapazitiven Blindwiderstand. In diesem Zustand fließt der gesamte Strom über den R-Teil des RC-Gliedes, der dem epithelialen Widerstand entspricht und dann weiter über den seriell geschalteten Widerstand. Weist der eingespeiste Wechselstrom hingegen sehr große Frequenzen auf – quasi repräsentiert die Schnittstelle des Teilkreises im

Nyquist-Diagramm mit der x-Achse im hohen Frequenzbereich die Extrapolation gegen die Messfrequenz ∞ – geht der kapazitive Blindwiderstand Richtung 0. Unter diesen Umständen fließt der gesamte Strom über den Kondensator, vorbei am kurzgeschlossenen Parallelwiderstand, durch den nachfolgenden Serienwiderstand. Der Widerstand, der dann gemessen wird, gleicht dem subepithelialen Anteil des Gesamtwiderstandes.

Durch ein sogenanntes Nyquist-Diagramm kann die Impedanzanalyse des Epithels graphisch veranschaulicht werden ((Cole and Cole, 1941). Die x-Achse dieses Diagramms bildet den Realteil der komplexen Impedanz ab. Dieser gleicht dem ohm'schen Widerstand des Epithels. Auf der y-Achse befindet sich der Imaginärteil der Impedanz, welcher die kapazitiven Charakteristiken des Epithels wiedergibt, nämlich die Phasenverschiebung von Strom und Spannung. Die Messung der Wechselströme in der vorliegenden Arbeit, wurde zwischen den Frequenzen 0 bis 65 kHz ausgeführt.

Ein Teilkreis wurde nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate an die einzelnen Messpunkte angepasst. Dabei entspricht der Schnittpunkt dieses Teilkreises mit der x-Achse bei der Frequenz 0 Hz dem Gesamtwiderstand des Gewebes R^t . Der Schnittpunkt bei 65 kHz stellt den subepithelialen Widerstand R^{sub} dar.

Durch die Oberflächengeometrie wie Einfaltungen und Inhomogenitäten wie z.B. aufgrund verschiedener Zelltypen im Epithelzellverband des eingespannten Gewebestücks werden Verformungen, des im Nyquist-Diagramm abgebildeten Teilkreises, verursacht. Diese Verformungen sind für die Bestimmung von R^{epi} und R^{sub} nicht relevant. Hierfür sind lediglich die Schnittpunkte mit der x-Achse von Bedeutung.

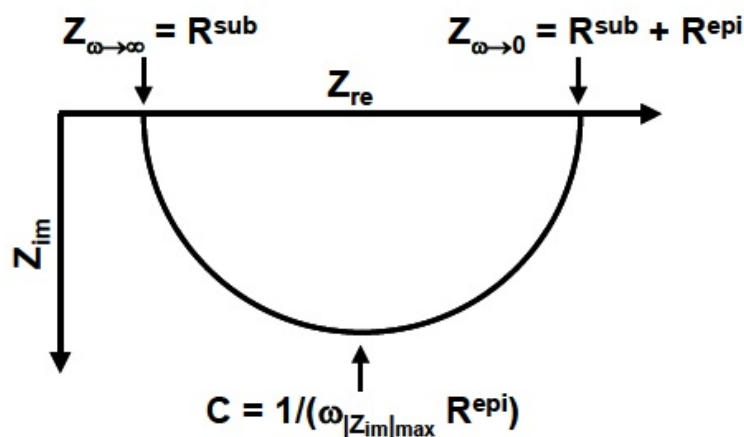


Abbildung 3 Nyquist-Diagramm einer Modellmessung

Messwerte aus der Impedanzspektrometrie, die aus verschiedenen Wechselstrom-Frequenzen resultieren, werden in der graphischen Darstellung als Teilkreis angezeigt. Der Realteil Z_{re} ergibt bei hohen Frequenzen ($\omega \rightarrow \infty$) den subepithelialen Widerstand R^{sub} . Bei niedrigen Frequenzen ($\omega \rightarrow 0$) hingegen erreicht er den transepithelialen Widerstand $R_t = R^{sub} + R^{epi}$. Die Kapazität C ist durch die Frequenz des Kreisbogenminimums berechenbar (mit freundlicher Genehmigung von Krug (2009)).

3.4.2. Impedanz-Versuchsstand

Der Unterschied der Messkammer des Impedanz-Versuchsstandes zu den konventionellen miniaturisierten Ussing-Kammern für Biopsien, lag lediglich in der Geometrie der oben beschriebenen Kammern und in der Abschirmung der Spannungselektroden durch einen äußeren Kupfermantel. Der elektrische Aufbau der Impedanz-Kammer glich ebenfalls der 4-Elektroden-Technik, angelehnt an (Ussing and Zerahn, 1951). Als Stromelektroden dienten bei der „Impedanzkammer“ zwei Silberdrahtringe und als Spannungselektroden zwei, mit 0,5 mol/l KCl gefüllte, Glaskapillaren. Die elektrische Signalerzeugung und Signalverarbeitung wird in den folgenden Unterkapiteln beschrieben.

3.5. Versuchsablauf

3.5.1. Badkorrektur und Elektrodenasymmetrie

Obwohl die Spannungselektroden möglichst nahe am Epithel angeordnet wurden, lag zwischen eingespanntem Epithel und den Elektroden, eine Flüssigkeitsschicht bestimmter Dicke als zusätzlicher Serienwiderstand zum Epithel. Diese verursachte einen zusätzlichen Spannungsabfall zwischen den Spannungselektroden. Dieser Spannungsabfall in der Messstrecke entstand demnach in Summe aus einem transepithelialen und einem unerwünschten Anteil, der durch die Flüssigkeitsschicht der Badlösung wirkte. Bevor das Epithel eingespannt wurde, wurde zur Korrektur des zu hohen Widerstandsabfall, der ohm'sche Widerstand der Badlösung in der leeren Kammer bestimmt und während der Untersuchung von den Messwerten subtrahiert. Auch die Asymmetrie der Elektroden, die durch die hervorgerufene Potentialdifferenz bedingt wurde, wurde zur Korrektur abgespeichert und im Versuchsverlauf von den gemessenen Spannungen abgezogen.

3.5.2. Messung des Kurzschlussstroms

Im Laufe der Experimente wurden minütlich die transepitheliale Spannung, der elektrische Widerstand und der Kurzschlussstrom aufgezeichnet. Damit der elektrische Gradient über dem Epithel ausgeschaltet wird, wurde externer Strom in passendem Ausmaß appliziert, um die Potentialdifferenz über dem Epithel auf 0 mV zu verringern (sog. Kurzschluss bzw. Klemme).

Alle elektrochemischen und hydrostatischen Gradienten, wurden durch identische Mischung der Badlösung und gleiche Füllhöhe der Kammern ausgeschaltet. Dadurch entsprach dieser Kurzschlussstrom der Summe aller aktiven elektrogenen Ionentransporte durch das Epithel. Er kann als Strom pro Fläche in $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, aber auch als Flux einwertiger Ionen pro Fläche in $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, angeführt werden.

$$\text{Strom} \quad \frac{I}{A} (\mu\text{A} * \text{cm}^{-2}) = \frac{96487}{3600} * \frac{M}{t * A} = 26,8 * \frac{M}{t * A}$$

$$\text{Flux} \quad \frac{M}{t * A} (\mu\text{mol} * \text{h}^{-1} * \text{cm}^{-2}) = \frac{3600}{96487} * \frac{I}{A} = 0,037 * \frac{I}{A}$$

I Stromstärke

A Fläche

M Menge transportierter Ionen

t Zeit

Faraday-Konstante $F=96487$ Coulomb/mol

Über die kurzzeitige Überlagerung des aktuellen Kurzschlussstroms mit rechteckigen Stromimpulsen, wurde der transepitheliale elektrische Widerstand registriert. Diese Impulse verursachten entsprechende Veränderungen in der Spannung. Der transepitheliale Widerstand wurde nach dem Ohm'schen Gesetz folgendermaßen berechnet: $R^t = \Delta V_{ms} / \Delta I_{sc}$

3.5.3. Messung der elektrischen Impedanz des Epithels

Zur Diskriminierung zwischen dem epithelialen und dem subepithelialen Widerstand, wurden wie bereits oben erwähnt, sinusförmige Wechselströme eingesetzt. Diese wurden bei 48 Frequenzen im Bereich von 1,3 Hz und 65 kHz über Stromelektroden in der Kammer appliziert. Mittels phasenempfindlichen Verstärkersystem (Electrochemical Interface, Typ 1286; Frequency Response Analyser, Typ 1250, Fa. Schlumberger, Gräfelfing) wurden die Spannungsantworten über dem Epithel registriert. Die Steuerung dieser Geräte sowie die Aufnahme, Berechnung und Speicherung der Daten, erfolgte mit einem Computer.

Aus den einzelnen 48 Spannungsantworten wurde die komplexe elektrische Impedanz berechnet. Dabei wurde sowohl die Phasenverschiebung von Strom und Spannung als auch die Korrektur des Badwiderstandes und der Elektrodenasymmetrie berücksichtigt. Die gemessenen Impedanzwerte wurden anschließend im Nyquist-Diagramm zu einem Teilkreis zusammengesetzt. Der transepitheliale und der subepitheliale Widerstand des Epithels, wurden aus den Schnittpunkten des Teilkreises mit der x-Achse bestimmt und daraus der epitheliale Widerstand errechnet (Gitter et al., 1998). Es wurden je Epithel vier Messungen im fünfzehnminütigen Abstand gemacht.

3.5.4. Bestimmung des aktiven elektrogenen Natrium-Transports an humanen Sigmabiopsien

Der elektrogene Natrium-Transport ist primär ein aktiver Ionentransport. Dieser bewirkt im distalen Kolon die Eindickung des Stuhls und wird hauptsächlich von dem Mineralokortikoid Aldosteron sowie von Glukokortikoiden stimuliert. Aldosteron wirkt aufgrund der dosisabhängigen Zunahme der Zahl an epithelialen Na^+ -Kanälen (EnaC). In der Zelle wird durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase ein Konzentrationsgradient für Natrium produziert. Über den in der apikalen Membran lokalisierten EnaC wird dann dem elektrochemischen Gradienten folgend Natrium in die Zelle aufgenommen.

Daraus folgt ein elektrogener transepithelialer Natrium-Transport. Das bedeutet, ein Transport von Teilchen, verbunden mit einer Verschiebung von Nettoladung. Die Latenzzeit des Anstiegs nach Stimulation mit Steroidhormonen beträgt für diesen Transport etwa eine Stunde. Nach sechs bis acht Stunden wird dann das Maximum erreicht ((Epple et al., 1995)). Der EnaC kann durch das K⁺-sparende Diuretikum Amilorid hochselektiv gehemmt werden (Benos, 1982). Durch eine Konzentration von 10⁻⁴ mol/l, wird der aktive Natrium-Transports beinahe gänzlich gestoppt.

Für die Bestimmung des elektrogenen Natrium-Transports hatte die elektrogene Chloridsekretion keine Relevanz. Aus diesem Grund wurde sie kurz nachdem das Epithel eingespannt wurde, auf der serosalen Seite gehemmt. Diese Hemmung wurde durch die Zugabe des Schleifendiuretikums Bumetanid, in einer Konzentration von 10⁻⁵ mol/l, erzeugt. Durch Untersuchungen am menschlichen Rektumepithel wurde bereits gezeigt, dass stabil-hohe Kurzschlussströme um ca. 50 % gesenkt werden konnten, wenn man Bumetanid hinzufügt. Schlussfolgernd entspricht dieser Anteil des Kurzschlussstroms im nicht-stimulierten Zustand, einer spontanen elektrogenen Chlorid-Sekretion des Dickdarmes in der in vitro Anordnung (Sandle, 1989). Die Substanz Bumetanid wird als Diuretikum eingesetzt und blockiert den Na⁺ 2Cl⁻ K⁺-Symporter selektiv. Dieser Kanal befindet sich nicht nur im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife der Niere, wo Bumetanid therapeutisch als Diuretikum angreift, sondern er ist auch im Dünndarm und im gesamten Dickdarm angesiedelt. Die basolaterale Aufnahme von Natrium-, Kalium- und Chlorid-Ionen in die Zelle, wird durch Blockieren des Na⁺2Cl⁻K⁺-Symporters gehemmt. Folglich sinkt die intrazelluläre Chloridkonzentration und somit auch die treibende Kraft für die aktive elektrogene Chlorid-Sekretion.

Etwa fünf bis zehn Minuten nachdem das Darmstück in der Kammer eingespannt wurde, wurde die elektrogene Natrium-Resorption stimuliert. Dies wurde durch das Zugeben von Aldosteron in einer Konzentration von 3·10⁻⁹ mol/l stimuliert, jeweils auf der mukosalen und der serosalen Seite. Nach acht Stunden Inkubationszeit wurde, ebenfalls beidseitig, der EnaC gehemmt. Die Hemmung wurde durch die Gabe von Amilorid in einer Konzentration von 10⁻⁴ mol/l erreicht. Der Kurzschlussstrom sank innerhalb von 5-10 Minuten ab. Der aktive elektrogene Natrium-Transport lässt sich quantitativ bestimmen, indem die Differenz des Kurzschlussstromes kurz vor und 20 Minuten nach der Zugabe von Amilorid berechnet wird.

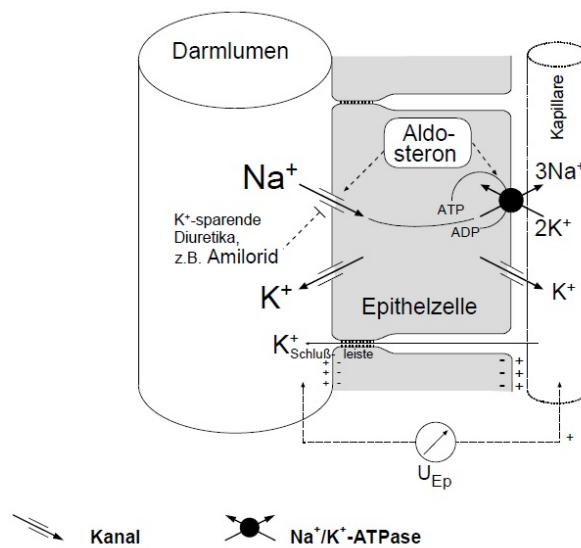


Abbildung 4 Aktiver elektrogener Natrium-Transport im KOLON

Durch Aldosteron nimmt die Zahl und Aktivität der epithelialen Natrium-Kanäle (ENaC) in der apikalen Membran zu. Das fördert den Einstrom von Natrium in die Zelle. Das Konzentrationsgefälle, das dafür benötigt wird, wird von der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase produziert. Diese ist ebenso durch Aldosteron stimulierbar. Durch Amilorid ist dieser transzelluläre Transport vollständig hemmbar. Aus dem Unterschied des I_{sc} zwischen maximaler Stimulation und Hemmung errechnet sich der ENaC-abhängige Na^+ Transport (modifiziert nach Fromm M (2004)).

3.5.5. Epitheliale Permeabilität für kleine Makromoleküle

Um die Permeabilität für Markermoleküle unterschiedlicher Größe zu bestimmen, die Epithelien über den parazellulären Weg passieren, wurden in Ussing-Kammern Fluxmessungen durchgeführt. Gleichzeitig konnte während des Versuchs der elektrische Widerstand gemessen werden.

3.5.5.1. Messung von Fluorescein-Fluxen

Nach dem Einspannen der Biopsien in Ussing-Kammern, wurden die beiden Kammerhälften mit je 10 ml Badlösung angefüllt. Nach der Äquilibrationsphase von etwa 15 min, nachdem konstante Widerstände erreicht wurden, wurde die Leerwert-Probe in der serosalen Lösung abgenommen (300 μl) und mit entsprechendem Volumen neuer Badlösung aufgefüllt. Es wurde ein Kurzschluss angelegt („closed circuit“-Betrieb; „Klemme“) und in der mukosalen Seite 10 μl 332 Da Fluorescein (aus 100 mM Fluorescein Stammlösung)

der Badlösung hinzugefügt. 15, 30, 45 und 60 Minuten nach Hinzufügen des Fluoresceins wurden jeweils 300 µl-Proben serosal abgenommen und wieder mit Badlösung ersetzt. Die Ermittlung der Fluorescein-Konzentration der Proben, erfolgte bei 520 nm photometrisch am Spektrometer (Tecan SpectroPhotometer, Tecan infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) und zur Berechnung der Fluxe wurde folgende Formel herangezogen:

$$J = \frac{(c_2 - c_1) * V_{Kammer}}{\Delta t * A_{Filter} * \frac{V_{Zugabe}}{V_{Kammer}}}$$

Über den Zusammenhang der Konzentration, ergibt der Flux die Permeabilität. Deshalb konnte anschließend die Permeabilität für Fluorescein bestimmt werden:

$$P = \frac{J}{\Delta c}$$

J	Flux
c1, c2	Konzentrationen zum Zeitpunkt 1, bzw. 2
Δt	Zeitdifferenz von t1 zu t2
V	Volumen der Kammer; Zugabevolumen
A	zugängliche Fläche (Fläche der Biopsie)
Δc	Konzentrationsdifferenz
P	Permeabilität

3.5.5.2. Messung von FITC-Dextran-Fluxen

Die Vorgehensweise zur Bestimmung der Permeabilität für größere Moleküle wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran ähnelte jener für Fluorescein. Es wurden 100 µl von 4 kDa FITC-Dextran (aus 20 mM Stammlösung) in 5 ml mukosaler Badlösung zugegeben und die serosalen Proben wurden zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten abgenommen. Das FITC-Dextran wurde bereits vor Versuchsbeginn dialysiert, um zu vermeiden, dass kleinere FITC-Dextranfragmente fälschlicherweise mit analysiert werden. Die FITC-Dextran-Konzentrationen wurden photometrisch am Spektrometer (Tecan

infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 520 nm gemessen. Anschließend wurden die Messwerte zur Berechnung der Fluxe und Permeabilitäten, analog zu 2.6.5.1., herangezogen.

3.5.6. Überprüfung der Viabilität des Gewebes

An den humanen Sigmabiopsien wurde parallel auch die Viabilität des untersuchten Epithels während der Ussing-Experimente überprüft. Zu diesem Zweck stimulierten wir die aktive elektrogene Chlorid-Sekretion und hemmten sie wieder, um eine adäquate Sekretionsleistung der Kolonozyten darzustellen.

Um die aktive Chlorid-Sekretion des Gewebes in der Ussing-Kammer zu stimulieren, wurde zunächst Prostaglandin E₂ (PGE₂, 10⁻⁶ mol/l) auf der serosalen Seite und Theophyllin (10⁻² mol/l) auf beiden Seiten der Kammer hinzugegeben. Beide Substanzen zusammen lösen durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes eine Chlorid-Sekretion aus.

Im Anschluss wurde durch das Hinzufügen von Carbachol (10⁻⁴ mol/l), einem direkten Parasympathomimetikum, das Epithel auf der serosalen Seite der Kammer fortsetzend stimuliert, wodurch die Ca²⁺-abhängige Chloridsekretion stimuliert wird und es, zusammen mit der Stimulation durch PGE₂ und Theophyllin, zu einer maximalen Sekretionsleistung kommt. Danach wurde serosal Bumetanid hinzugegeben. Das bewirkte schließlich die Hemmung des elektrogenen Chlorid-Transports. Die Viabilität des untersuchten Gewebes, wurde durch ein Ansteigen des Kurzschlussstroms nach Stimulation mit PGE₂, Theophyllin und Carbachol sowie ein Absinken des Kurzschlussstroms, nach Hemmung der Chlorid-Sekretion mit Bumetanid, dargestellt.

3.6. Molekularbiologische Methoden

3.6.1. Protein-Extraktion aus humanen Colon sigmoideum-Biopsien

Um die Expression von Occludin, Tricellulin sowie von Claudin-1 bis -5 und Claudin-8 zu untersuchen, wurde die Western Blot-Technik eingesetzt. Die Methode, die hier beschrieben wird, zielt insbesondere auf die Proteinextraktion aus endoskopisch entnommenen Kolon-Biopsien und die Darstellung der Proteinfractionen, die Tight Junction-Proteine enthalten, ab. Nach der endoskopischen Entnahme wurden die Biopsien zunächst in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Zur

Proteinpräparation wurden die Biopsien auf Eis aufgetaut. Jeweils eine Biopsie wurde in ein Homogenisator-Röhrchen gegeben und mit 300 µl, 4 °C kaltem und 0,5 % Triton X-100 enthaltenem Gesamtlysepuffer versetzt. Das Darmgewebe wurde mechanisch homogenisiert. Eine weiterer Homogenisierungsschritt der entstandenen Suspension, wurde durch jeweils zehnmaliges Pressen der Suspension durch eine 20 Gauge-Kanüle sowie einer 26 Gauge-Insulinkanüle durchgeführt. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation der Zelltrümmer bei 200 × g und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis wurde eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 15.000 × g und 4 °C, durchgeführt. Der daraus resultierende Überstand, das Gesamtlysat, wurde abgenommen und der Proteingehalt der Proben wurde bestimmt. Zum Schluss wurden diese bei -80 °C asserviert.

3.6.2. Proteinquantifizierung nach Pierce

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce, verwendet man die Reaktion von Proteinen mit Kupfer bei alkalischem pH-Wert. Dadurch entsteht ein farbiger Kupferkomplex, welcher durch Absorptionsmessung bei 562 nm zur Berechnung der enthaltenen Proteinkonzentration benutzt wird. Dabei wird mit einer Eichreihe bekannter Proteinkonzentrationen verglichen. Eine andere Bezeichnung für diese Methode ist BCA-Assay.

Die Bestimmung der Proteine erfolgte in Mikrotiterplatten. Der Proteingehalt der Proben wurde photometrisch, mittels einer Eichgeraden von Proteinen des Rinderserumalbumins (BSA) bestimmt. Deren Konzentrationen waren 0 mg BSA/ml, 0,2 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,2 mg/ml BSA. Pro Well wurden 10 µl Probe bzw. die Standardreihe pipettiert und 190 µl der BCA-Lösung hinzugefügt.

Zur Kontrolle wurden 10 µl Lysepuffer, ebenfalls mit 190 µl BCA-Lösung versetzt. Für die Kontrolle, die Proben und die Standardreihe wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde nach dem Pipettieren für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 562 nm im Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Der Extinktionswert des Lysepuffers wurde von den Mittelwerten der Proben abgezogen. Mit der Eichgeraden wurde der Proteingehalt der Proben quantifiziert.

Tabelle 1 Pipettierschema zur Bestimmung des Proteingehalts mit dem Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer

	1	2	3	4
A	0.0 mg/ml BSA	0.0 mg/ml BSA	Probe 1	Probe 1
B	0.2 mg/ml BSA	0.2 mg/ml BSA	Probe 2	Probe 2
C	0.8 mg/ml BSA	0.8 mg/ml BSA	Probe 3	Probe 3
D	1.2 mg/ml BSA	1.2 mg/ml BSA	Probe 4	Probe 4
E	Lysepuffer	Lysepuffer	Probe 5	Probe 5
F			Probe 6	Probe 6
G			Probe 7	Probe 7
H			Probe 8	Probe 8

3.6.3. Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Durch die SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese, kurz SDS-PAGE, wurden die Proteingemische getrennt und bestimmt. Proteine wandern, aufgrund ihres Ladungs- und Masseverhältnisses, in einer definierten Gelmatrix aus Acryl- und Bisacrylamid in einem elektrischen Feld. Für die Trenngele werden in einer Kettenreaktion durch Acrylamid lange Polymere gebildet, die Polymerisation wird durch freie Radikale (Radikalbildner: Ammoniumpersulfat, kurz APS) und einen Katalysator (N, N, N', N'-Tetramethylethylen-diamin, kurz TEMED) unterstützt.

Das Natriumdodecylsulfat (SDS) im Gel, bindet an Proteine, denaturiert diese und führt zu einer gleichmäßig negativen Ladung. Somit ist die Wanderung der Proteine im Gel unabhängig von der Gesamtladung oder Konformation der Proteine. Je kleiner die Molekülgröße, je größer die angelegte Spannung und je niedrigprozentiger das Polyacrylamidgel ist, desto schneller wandern die Proteine durch die Gelmatrix.

Um Occludin und Tricellulin (64 kDa) auftrennen zu können, braucht man ein zehnpromzentiges Gel, für die Claudine (~22 kDa) ein 12,5-prozentiges Trenngel. Das Gel wurde zwischen zwei Glasscheiben gegossen, die durch einen 1,5 mm dicken Abstandshalter voneinander getrennt in einer entsprechenden Halterung befestigt waren.

Zunächst wurde das Trenngel als erste Gelfraktion luftblasenfrei zwischen die Glasscheiben bis etwa 1,5 cm unterhalb der oberen Kante der Glasplatte pipettiert. Sie wurde außerdem mit 1 ml absolutem Alkohol überschichtet, um eine glatte Oberfläche entstehen zu lassen. Der Alkohol wurde nach dreißigminütiger Polymerisation abgegossen. Die Reste davon wurden mit Filterpapier entfernt. Das Sammelgel, also die zweite Fraktion, wurde schließlich auf das Trenngel aufgetragen. Zudem wurde ein Kamm mit 15 Zacken eingesteckt. Das ergab im weiteren Verlauf 15 Vertiefungen für die Probenzugabe.

Der Kamm wurde, nach erneuter Polymerisation von 30 Minuten entfernt. Das Gel wurde dann in einer Elektrodenhalterung fixiert und in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die präparierten Proben sowie 6 µl eines Protein Größen-Markers, wurden in die Probenaschen des Gels pipettiert.

Es wurde für jede Tasche ein Proteingemisch von 15 µl hergestellt. Dieses setzte sich zusammen aus 3 µl 5x Laemmli- Puffer, einem Volumenanteil der Probe sowie Lysepuffer zum Auffüllen auf 15 µl.

Pro Tasche betrug der Proteingehalt 10 µg. Zuvor wurden die Proteine bei 95 °C für 5 Minuten in einem Heizblock denaturiert. Unter konstanter Spannung von 100 V, fand nach dem Beladen der Proben auf das Gel für etwa 90 Minuten die Elektrophorese statt.

3.6.4. Western Blot

Bei einem Western Blot werden Proteine durch eine Bindung eines spezifischen Primärantikörpers gegen das Protein nachgewiesen. Ein zur Detektion benutzter Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper enthält eine Peroxidase, welche mit den Substraten eine detektierbare Lumineszenz verursacht. Zuvor müssen die Proteine aber aus dem Gel auf eine Membran transferiert werden.

Der Transfer der Proteine auf die Western Blot Membran wurde auf eine Nitrocellulosemembran durchgeführt. Zunächst erfolgte die Inkubation der Membran in absolutem Ethanol und anschließend die Äquilibration in Transferpuffer. Es wurden alle Komponenten in Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei zusammengestellt. Diese Sandwiches (siehe unten) wurden im Anschluss in einen Transfereinsatz für Elektrophoresekammern integriert (schwarzes Panel zu schwarzer Seite) und gemeinsam mit einem Kühlakku und einem Rührfisch, in der Kammer fixiert. Sie wurde zudem, unter Rühren mit einem Magnetrührer, für eine Stunde an eine Spannung von 100 Volt angeschlossen.

Hierbei wanderten die Proteine, ähnlich wie bei der Elektrophorese, zur Anode, in diesem Fall zur Membran.

Folgender Aufbau wurde bei der Sandwich-Technik angewandt:

klares Panel
Schwamm
Whatman-Filter
Membran
Gel
Whatman-Filter
Schwamm
schwarzes Panel

Nach dem Transfer fand der eigentliche Western Blot statt. Dabei wurde die Membran, nach kurzem Spülen in PBS/Tween, für zwei Stunden in einer BSA-Blockierungslösung bei Raumtemperatur (alternativ o/n 4 °C) geschwenkt. Da die BSA dabei freie Proteinbindungsstellen auf der Membran besetzte, reduzierte sie die unspezifische Bindung der Antikörper. Die Membran wurde nach diesem Blockierungsschritt mit dem Primärantikörper gegen das Protein, welches untersucht wurde, inkubiert.

Dieser Antikörper wurde meist in einer Verdünnung, im Verhältnis 1:2000, in BSA-Blockierungslösung angesetzt. Die Membran wurde, nachdem sie zwei Stunden bei Raumtemperatur (alternativ o/n 4 °C) inkubiert wurde, gewaschen. Zwei Mal für je zehn Minuten in PBS/Tween und dann ein Mal für ebenfalls zehn Minuten in TBS/Tween. Daraufhin wurde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war, vollzogen. Die Ansetzung dieses Antikörpers erfolgte in einer 1:1000-Verdünnung in einer Blockierungslösung aus 1 %-Blockingreagenz (Lumi-Light-PLUS Western Blotting Kit, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) in TBS/Tween. Die Membran wurde, nach einer etwa siebzigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur, abermals zwei Mal in PBS/Tween (je 10 min) und einmal in TBS/Tween (10 min) gereinigt.

Dann folgte die fünfminütige Inkubation der Membran in einer LumiLight-Lösung (1:1 Mischung von Lösung 1 und 2) im Dunkeln. Danach wurde sie zwischen zwei Transparentfolien platziert und die entstehende Lumineszenz im Western Blot Detektionssystem Fusion FX (Vilber, Eberhardzell, Deutschland) detektiert.

Die quantitative Analyse der vorhandenen Menge des zu untersuchenden Proteins wird durch die Intensitäten der Lumineszenz ermöglicht. Diese konnte mit Hilfe der Software (AIDA, Advanced Image Data Analyzer, Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ausgewertet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Patientenkollektiv mit unbehandeltem RDS, die Expression von Occludin, Tricellulin, Claudin-1, -2, -3, -4, -5 und -8 analysiert und mit Proben der Kontrollpatienten verglichen. Die Auswertung der Signale für Occludin, Tricellulin und für die jeweiligen Claudine wurde mit den Signalen für das β -Actin auf dem gleichen Blot verglichen. Zur Normierung der Tight Junction Proteine bezogen auf den Gesamtproteingehalt auf einem Blot diente β -Actin. Die Mittelwerte der mit β -Actin normierten und auf einem Blot detektierten Signale für Occludin, Tricellulin und für die jeweiligen Claudine des Kontrollkollektivs wurden für die Auswertung auf 100 % gesetzt und mit den Signalen der erkrankten Patienten prozentual in Bezug zum Mittelwert der Kontrollen berechnet.

3.7. Färbemethoden

3.7.1. Fixierung, Einbettung und Schnittverfahren

Nachdem die Biopsien in physiologischer NaCl-Lösung transportiert wurden, wurden sie spätestens nach 20 Minuten in Formalin fixiert. Nach 24-stündiger Fixierung wurde die Einbettung mit der Paraffintechnik umgesetzt. Dabei wurden die Biopsien mit Paraffin durchtränkt und danach in einem Paraffinblock eingesetzt. Mit einem Schlittenmikrotom wurden nach Aushärten der Blöcke, 3-5 μ m dünne Schnitte aus diesen geschnitten. Bei den folgenden Färbeverfahren kamen nur Präparate zum Einsatz, bei denen die Schnittführung parallel zu den Dickdarmkrypten verlief. Um die Schnittführung eines jeden Schnitts zu überprüfen, wurde mit der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gearbeitet.

3.7.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt eine Routinefärbung der konventionellen Histologie dar (Tabelle 2). Bei dieser Art der Färbung werden Gewebestrukturen durch den Kernfarbstoff Hämatoxylin (blau) und durch den Plasmafärbstoff Eosin (rot) angezeigt.

Tabelle 2 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten

Substanz	Wirkdauer
Xylol und absteigende Alkoholreihe	40 min
PBS	5 min
Methanol	10 min
PBS	5 min
Hämatoxylin	10 s
Leitungswasser 25 °C	30 s
Aqua bidest 30 s	
Aufsteigende Alkoholreihe (30 %, 70 %, 96 %)	30 s pro Lösung
Ethanol 1 %	3 s
Ethanol 96 %	10 s
Ethanol 100 %	30 s

3.7.3. Zellkernfärbung

Die Färbung der Zellkerne in einem Gewebsschnitt wurde mittels Inkubation mit dem Farbstoff DAPI (DAPI = 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) für 10 min (1:1000) bei 37 °C durchgeführt. Sie wird auch zur Bestimmung von Apoptosen genutzt. Es handelt sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der an DANN bindet. Er hat ein Absorptionsmaximum von $\lambda=340$ nm und ein Emissionsmaximum von $\lambda=405$ nm. Die Zellkerne lassen sich im Fluoreszenzmikroskop mit DAPI gut darstellen. Die DAPI-Kernfärbung wurde in dieser Arbeit nicht zur Bestimmung der Apoptoserate, sondern nur zur Darstellung der Epithelzellen im konfokalen Mikroskop eingesetzt.

3.7.4. Apoptose-Färbung

Apoptotische Zellen können durch den TUNEL-Assay (terminal transferase dUTP nick end labeling) spezifisch angefärbt. DANN-Fragmente, die bei der Apoptose durch En-

donucleasenaktivität entstehen, werden hierbei mit fluoreszenzmarkierten dUTP-Nucleotiden markiert, die durch eine Terminal-Transferase mit 3'-OH-Bruchenden verknüpft werden. Die Zellen können anschließend durch ein Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht und gezählt werden.

Die TUNEL-Färbung fand an Paraffinschnitten statt. Diese wurden zunächst mittels einer absteigenden Alkoholreihe und Xylol entparaffiniert. Die Permeabilisierung der Schnitte erfolgte nach zweimaligem Spülen mit PBS-Lösung für je fünf Minuten. Die Schnitte wurden mit der 0,1 %-igen Triton-Lösung (20 µg/ml Proteinase K in Tris-HCl) für 20 Minuten bei 37 °C in einer Feuchtkammer permeabilisiert. Dann folgten abermals zwei Spülungen der Schnitte mit PBS-Lösung. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend mit einer Lösung aus 5 % BSA und 20 % FKS in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Nachdem die Schnitte noch zwei weitere Male in PBS-Lösung gespült wurden, wurden sie mit etwa 50 µl TUNEL-Reagenz (Roche, Mannheim, Deutschland) (Puffer/TUNEL-Reagenz 1:10) bedeckt und in einer abgedunkelten Feuchtkammer für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten folgte für die Objektträger kurz das Schwenken in Aqua bidest. Und danach in absolutem Alkohol. Anschließend wurden sie mit Pro Tags Mount Fluor (Biocyc, Luckenwalde, Deutschland) eingedeckt.

Die apoptotischen Epithelzellen wurden in 200-facher Vergrößerung analysiert. Hochkondensierte, stark fluoreszierende und mehrfach segmentierte Kerne galten als Apoptosen. Die Apoptoserate ist gleich dem prozentualen Anteil apoptotischer Epithelzellen an allen Epithelzellen, die im Gesichtsfeld (~150 Epithelzellen/Gesichtsfeld) erkennbar sind. Die Apoptoserate wurde für jeden Patienten als Mittelwert aus mindestens fünf verschiedenen Gesichtsfeldern bestimmt.

3.8. Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

3.8.1. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzmikroskopie dient der genauen Darstellung von Strukturen in Geweben und Zellen mit Hilfe von Antikörpern. Zielproteine werden durch spezifische Primär-Antikörper gebunden. Damit die Bindung sichtbar wird, werden fluoreszenzmarkierte Sekundär-Antikörper eingesetzt, die spezifisch an die Fc-Teile der Primärantikörper andocken (indirekte Immunfluoreszenz). Alternativ können die strukturspezifischen Antikörper selbst auch an ein Fluorophor gebunden sein (direkte Immunfluoreszenz).

In dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation der Tight Junction-Proteine im *Colon sigmoideum* mittels der Immunfluoreszenz analysiert. Zunächst wurden die Sigmabiopsien für 60 Minuten bei RT in 1 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Danach wurden sie in PBS^{+Ca/Mg} gespült und für fünf Minuten in 25 mM Glycin inkubiert. Nachdem sie ein weiteres Mal in PBS^{+Ca/Mg} gewaschen wurden, folgte eine sukzessive Entwässerung der Biopsien durch eine ansteigende Sucrose-Reihe.

Das Gewebe wurde hierzu für jeweils 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuerst in 10 %-iger und dann in 20 %-iger Sucroslösung. Über Nacht folgte bei 4 °C eine weitere Inkubation in 30 %-iger Lösung. Zur Herstellung der Kryoblöcke, wurden die so präparierten Biopsien in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Methylbutan gefroren, dann in TissueTek eingelegt und anschließend bei -80 °C gelagert. Es wurden durch einen Kryostaten Gewebeschnitten in 5 µm Dicke erstellt. Diese wurden vor dem Färben auf beschichteten Objektträgern bei -20 °C für 12-24 Stunden eingefroren.

Nachdem die Schnitte aufgetaut worden waren, wurden sie mit dem DAKO-Fettstift (DAKO-Pen, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) umrandet und mit PBS^{+Ca/Mg} gespült. Danach erfolgte die zehnminütige Permeabilisierung des Gewebes mit der 0,5 %-iger Triton-X-Lösung bei Raumtemperatur. Anschließend wurden unspezifische Bindungen mit Blockierungslösung (10 % Goat serum, 3 % BSA, 0,05 % Triton X-100) blockiert. Dieser Vorgang dauerte 60 Minuten bei Raumtemperatur. Über Nacht fand schließlich die Inkubation zunächst mit dem primären Antikörper (1:100) bei 4 °C statt. Nach der 1. Inkubation folgten drei Waschschrte und dann wurde mit dem fluoreszierenden Sekundär-Antikörper (1:500) für 120 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde eine Spülung mit Blockierungslösung durchgeführt. Um die Zellkerne darzustellen, wurden alle Gewebeschnitte mit DAPI (1:1000) gefärbt und danach mit PBS^{+Ca/Mg} gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden nach der Zellkernfärbung mit Aqua bidest. Und Ethanol gewaschen. Dann wurden sie schließlich mit Pro Tags Mount Fluor auf dem Objektträger eingedeckt.

3.8.2. Konfokale Mikroskopie

Um die Tight Junction-Proteine zu lokalisieren, wurde die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie an fluoreszenzgefärbten Gewebeschnitten eingesetzt. Dabei wurde das Zeiss LSM 510 META Mikroskop verwendet (Zeiss, Jena, Deutschland).

Durch das Verwenden einer punktförmigen Lichtquelle, dem Laser, und durch den Einsatz von Lochblenden kann in einem konfokalen Lasermikroskop das Streulicht so weit unterdrückt werden, dass eine klare Abbildung einzelner Punkte in einer Objektebene möglich ist. Damit mit diesem Vorgang eine Darstellung eines größeren Ausschnitts einer Ebene umsetzbar ist, muss der Laser diese Punkt für Punkt entlang der XY-Koordinaten scannen. Die optischen Signale werden durch die Photomultiplier-Detektoren in elektrische umgewandelt, die dann an einen Computer weitergeleitet werden. Die erreichte Bildqualität kann, durch abermaliges Abtasten jedes Punktes und Mitteln der gewonnenen Information noch mehr verbessert werden.

Durch den Laser wird Licht einer bestimmten Wellenlänge auf das fluoreszenzgefärbte Präparat projiziert. Dadurch werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und geben ihrerseits Licht eines bestimmten Spektrums ab. Von den Photodetektoren wird das Signal registriert, das die maximale Emission durch passend gewählte Farbteiler passiert. Überlagerungen zwischen den einzelnen Laser-Kanälen können so weitestgehend verhindert werden.

Den Sekundärantikörpern entsprechend wurden die Wellenlängen 594 nm (rot) und 488 nm (grün) sowie 358 nm (blau für DAPI) benutzt. Die Aufnahmen entstanden mit 40× und 63× NA 1,4 Plan-Apochromat Plan-Neofluor-Objektiven. Um die Färbungen auszuwerten und aufzunehmen, wurde die LSM-Software (IM Version 3.2, Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Germany) benutzt.

3.9. Morphologische Veränderungen

Unter der Annahme, dass bei entzündlichen Darmerkrankungen häufig die Architektur der Mukosa verändert sein kann, war es wichtig die mukosale Oberfläche bei RDS-M im Vergleich zum Kontrollkollektiv zu berechnen. Denn die resorptiven und sekretorischen Eigenschaften des Darmepithels werden u.a. von einer veränderten mukosalen Oberfläche beeinflusst. In dieser Arbeit wurde die mukosale Oberfläche der Krypten beim RDS-M berechnet.

Hierfür wurden wie oben erwähnt HE-Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden lichtmikroskopisch mit einem 10×-Objektiv untersucht und pro Präparat wurden mindestens

drei repräsentative Areale ausgesucht. Die mit dem Mikroskop erstellten Bilder wurden weiter mit der Software *Image J* bearbeitet.

Mit Hilfe dieser Software konnte durch die Aktivierung der Funktion „Free Line selection“ die mukosale Oberfläche berechnet werden. Hierfür musste man mit dem Cursor entlang der apikalen Membran und der Muscularis mucosae fahren. Die errechneten Werte von apikaler und basaler Membran wurden in Relation gesetzt. Die Werte aus den untersuchten Arealen pro HE-Schnitt wurden zuletzt gemittelt.

3.10. Sequenzierung

Zur differentiellen Genexpressionsanalyse verwendeten wir die Technik der RNA-Sequenzierung mit anschließender bioinformatischen Signalwegs-Analyse. Gesamt-RNA wurde aus den Sigmabiopsien unter Verwendung des mirVana™ RNA-Isolierungskits gewonnen (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Die RNA-Sequenzierung wurde mit der TrueSeq Stranded-Total-RNA-Methode auf einem Illumina NovaSeq 6000 Sequenzierungssystem mit RNA-Qualitätswerten von ≥ 80 % durchgeführt.

Die aus RNA-Seq erhaltenen RNA-Sequenzen wurden gegen das Humangenom GRCh38 Release 97 gemappt und mit dem STAR-Aligner Version 2.7.1a in einem Zwei-Pass-Modus sortiert. Beim First-Pass Read Mapping wurden Koordinaten aus Ensembl Annotation Release 97 als Rahmen verwendet. Beim Second-Pass-Mapping wurden Spleißstellen hinzugefügt, die im ersten Durchlauf gefunden wurden. Die Gene-count-Tabellen mit den „gene-read coverages“ wurden unter Verwendung der Funktion „Counts Function“ des Bioconductor-Pakets Rsubread mit Koordinaten aus der oben erwähnten Ensembl-Annotation und Standardparametern erstellt.

Das Bioconductor-Paket DESeq2 wurde zur Quantifizierung der differentiellen Expression von Genen zwischen zwei Zuständen in Form von \log_2 -fachen Veränderungen mit ihren entsprechenden *P*-Werten verwendet.

Die Signalweg-Analyse und der Upstream Regulator Analyse wurde mit der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen Silicon Valley, Redwood, CA, USA) durchgeführt. Fastq-Dateien, die die unverarbeiteten Rohdaten aus der Sequenzierung und eine Rohdaten-Matrixtabelle enthalten, sind hinterlegt auf der Datenbank European Genome-Phenome Archive (EGA) unter der Datensatznummer EGAD00001006646. (<https://ega-archive.org/datasets/EGAD00001006646>)

3.11. Statistik

Die Erstellung der Dateitabellen, Abbildungen und die statistische Auswertung erfolgten mit folgenden Anwendungen: Microsoft Excel, Microsoft Word, Microsoft Powerpoint und GraphPad Prism 8.

Die Messwerte wurden als arithmetische Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Um Signifikanzen zu berechnen, kam Student's t-Test zum Einsatz. Die Anzahl der Versuche (Patienten) wurde durch n ausgedrückt. Als statistisch signifikant wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit $P < 0,05$ gewertet (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

4. Ergebnisse

Um den pathophysiologischen Mechanismen der Störungen am Epithel des Dickdarms, die zu Diarrhö oder Verstopfung führen können, auf den Grund zu gehen, wurden die Barriere- und Transporteigenschaften im *Colon sigmoideum* von Reizdarmsyndrom-Patienten mit Hilfe von funktionellen Messungen in der Ussingkammer sowie durch molekulare Analysen untersucht.

4.1. Epitheliale Barrierefunktion beim Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M)

4.1.1. Impedanzspektroskopische Analyse der epithelialen Barrierefunktion des Kolons

Zur Beurteilung der epithelialen Barrierefunktion des Kolons bei RDS-M wurden an humanen Sigmaproben mit Hilfe der Impedanzspektroskopie der epitheliale und der subepitheliale Widerstand ermittelt.

Es konnten Sigmaproben von 18 Studienteilnehmern erfolgreich in der Ussingkammer vermessen werden (7 RDS-M, 11 gesunde Kontrollen). Bei den RDS-M-Patienten zeigte sich eine Tendenz zur Abnahme des epithelialen Widerstands (R^{epi}), die jedoch die statistische Signifikanz verfehlte (Abbildung 5, $P=0,077$). Der subepitheliale Widerstand war nicht verändert, was darauf hindeutet, dass keine subepithelialen Veränderungen wie Entzündungsgeschehen vorliegen (Tabelle 3).

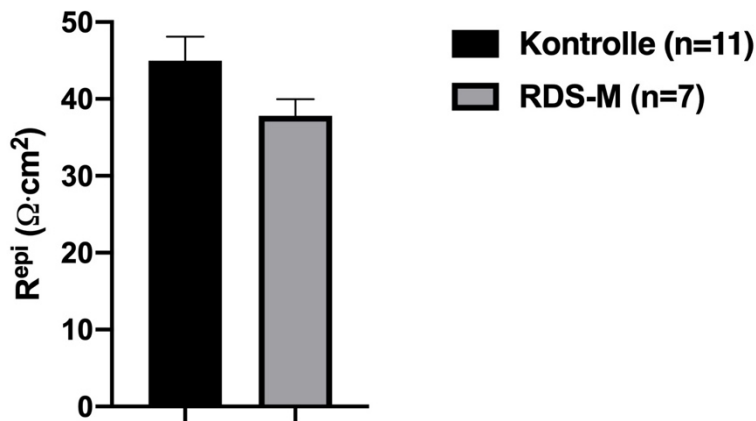


Abbildung 5 Epithelialer Widerstand im menschlichen Sigma

Impedanzspektroskopie-Messung des epithelialen Widerstands R^{epi} bei Kontrollen und RDS-M in $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Keine statistische Signifikanz im Student's t-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM

In Tabelle 3 sind die einzelnen Ergebnisse der Impedanzspektroskopie dargestellt. Der Gesamtwiderstand des Gewebes, der sich aus der Summe von Epithelwiderstand und Subepithelwiderstand ergibt, dient zur Berechnung des Korrekturfaktors R^t/R^{epi} , der die Unterschätzung des tatsächlichen aktiven Transports durch die gemessene Transportrate (wie Isc-Werte) in der Ussingkammer bezeichnet. Da sich dieser Faktor aber beim RDS-M nicht von den Kontrollen unterschied, konnten wir auf die Anwendung dieses Korrektur-Algorithmus in der vorliegenden Arbeit verzichten.

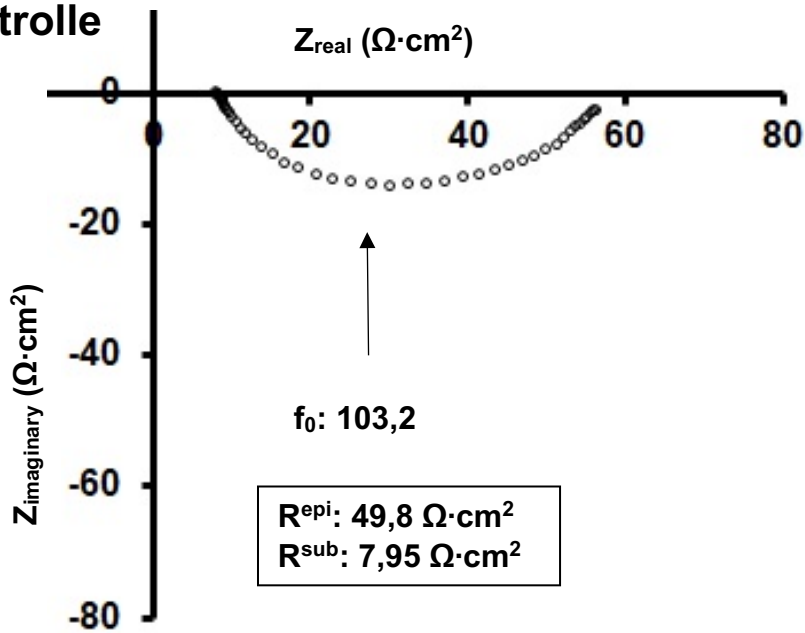
Tabelle 3 Elektrische Widerstände im menschlichen Sigma

	R^{epi} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	R^{sub} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	R^t/R^{epi}	n
Kontrolle	45 \pm 3	14 \pm 3	1,3 \pm 0,1	11
RDS-M	38 \pm 2	11 \pm 1	1,3 \pm 0,1	7

Epithelialer Widerstand R^{epi} und subepithelialer Widerstand R^{sub} bei Kontrollen und RDS-M in $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Keine statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen im Student's t-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Die Abbildung 6 zeigt exemplarisch zwei originale Impedanz-Ortskurven (Nyquist-Diagramme) und zwar jeweils eines Präparates von einer Kontrolle und eines vom Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M).

A=Kontrolle



B= RDS-M

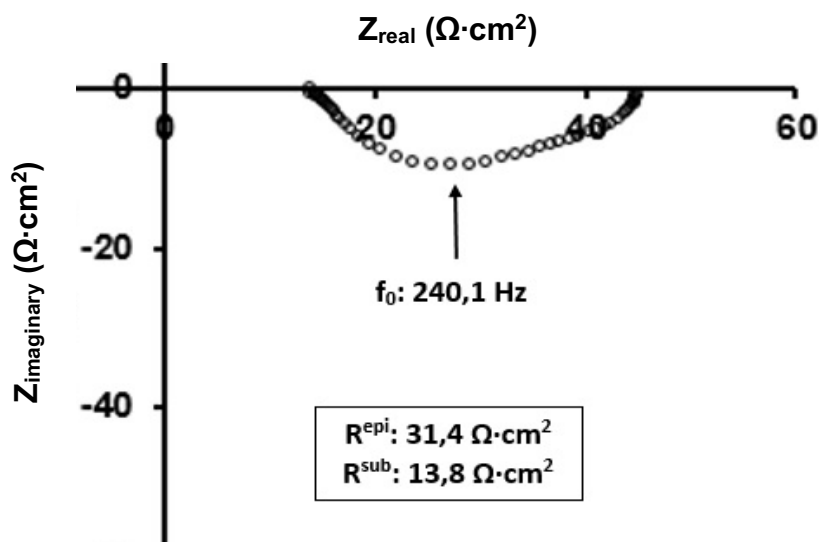


Abbildung 6 Originale Impedanz-Ortskurven (Nyquist-Diagramme)

Z_{real} stellt die ohm'sche, $Z_{\text{imaginary}}$ die reaktive Komponente der elektrischen Impedanz dar. Die Schnittpunkte des Kreissegmentes mit der x-Achse bei niedrigen und hohen Frequenzen ergaben R^t und R^{sub} . R^{epi} errechnet sich durch $R^t - R^{\text{sub}}$. A: Kontrolle, B: RDS-M.

4.1.2. Parazelluläre Permeabilität beim RDS-M

Für die Ermittlung der Molekül-Permeabilität des Darmes beim Reizdarmsyndrom wurden Fluxe parazellulärer Marker verschiedener Größe gemessen und zwar mit einem Molekulargewicht von 332 Da oder 4 kDa.

Für das Kontrollkollektiv ($n = 10$) zeigte sich für Fluorescein (332 Da) eine Permeabilität von $0,5 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Bei der Gruppe der RDS-M-Patienten ergab sich im Vergleich dazu eine erhöhte Permeabilität für Fluorescein ($n = 6$, $*P < 0,05$) (Abbildung 7 A).

Die Makromolekül-Permeabilität für 4 kDa-Dextran (FITC-Dextran 4000 im Kontrollkollektiv ($n = 8$)) lag bei $0,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Die Permeabilität war bei Patienten mit Reizdarmsyndrom des Mischtyps, verglichen mit der Kontrollgruppe, auf $1,1 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$ cm/s erhöht ($n = 8$, $**P < 0,01$) (Abbildung 7 B). Es liegt also bei dem RDS-M-Kollektiv eine Störung der Barrierefunktion im Sigma für kleine Makromoleküle vor.

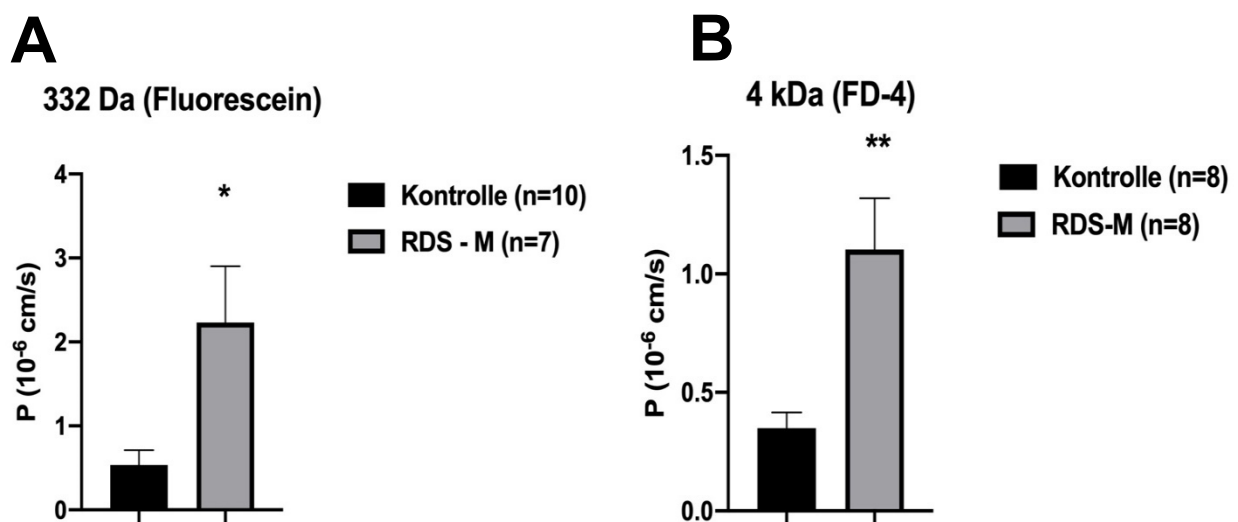


Abbildung 7 Permeabilität für parazelluläre Marker

(A) Beim RDS-M ($n = 7$; $*P < 0,05$) zeigt sich für 332 Da-Fluorescein eine erhöhte Permeabilität gegenüber der Kontrolle ($n=10$) (B) Für FITC-Dextran 4000 (4 kDa) ergab sich beim RDS-M ($n = 8$; $**P < 0,01$) eine in Bezug auf die Kontrollgruppe gestiegene Permeabilität gegenüber der Kontrolle ($n=8$). Alle Werte repräsentieren Mittelwerte und SEM. Der statistische Vergleich erfolgte mit dem Student's t-Test für unpaarige Stichproben.

4.2. Epitheliale Transportfunktion des Dickdarms beim Reizdarmsyndrom (RDS-M)

4.2.1. Natrium-Transport bei RDS-M und Kontrollen

Die Ussing-Experimente an Biopsien aus dem Sigma dienten parallel auch dazu, die aktive elektrogene Natrium-Resorption bei Reizdarmsyndrom-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten zu bestimmen. Da eine Störung des EnaC mit einer resultierenden fehlenden Na^+ -Resorption eine Diarrhö begünstigen kann, war eine Untersuchung der EnaC-Funktion im Hinblick der Erforschung von Diarrhömechanismen bei Patienten mit RDS-M wichtig.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Kurzschlussstromwerte (I_{sc}) einer Kontrollperson und eines Patienten mit Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M) im Zeitverlauf. Die Einzelversuche wurden der statistischen Analyse zugeführt und die Daten des aktiven elektrogenen Transports von Natrium sind in Abbildung 9 dargestellt.

Die Darmproben der Patienten in den Ussingkammern wurden mit Aldosteron stimuliert und nach 8 Stunden mit 10^{-4} mol/l Amilorid behandelt, um den Kurzschlussstrom zu hemmen. Auf diese Weise wurde der aktive elektrogene Natriumtransport ermittelt, welcher der Differenz ΔI_{sc} zwischen dem maximal stimulierbaren Kurzschlussstromwert direkt vor und 20 Minuten nach der Gabe von Amilorid entspricht. Die Messung in der Kontrollgruppe ergab keinen Unterschied zur Gruppe mit RDS-M (Abbildung 9). Es ist also davon auszugehen, dass die EnaC-abhängige Aufnahme von Na^+ im distalen Kolon dieses Patientenkollektivs mit RDS-M nicht beeinträchtigt ist und dies somit als ein Pathomechanismus nicht relevant zu sein scheint.

Der basale Kurzschlussstrom von $76 \pm 19 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, der sich nach der Gabe von Amilorid bei Patienten mit RDS-M zeigt (Kontrollkollektiv: $94 \pm 19 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), ist nicht signifikant unterschiedlich und hat in der Analyse wenig Bedeutung, da die maximal stimulierten Werte für die Bestimmung der Aktivität des EnaC herangezogen werden müssen.

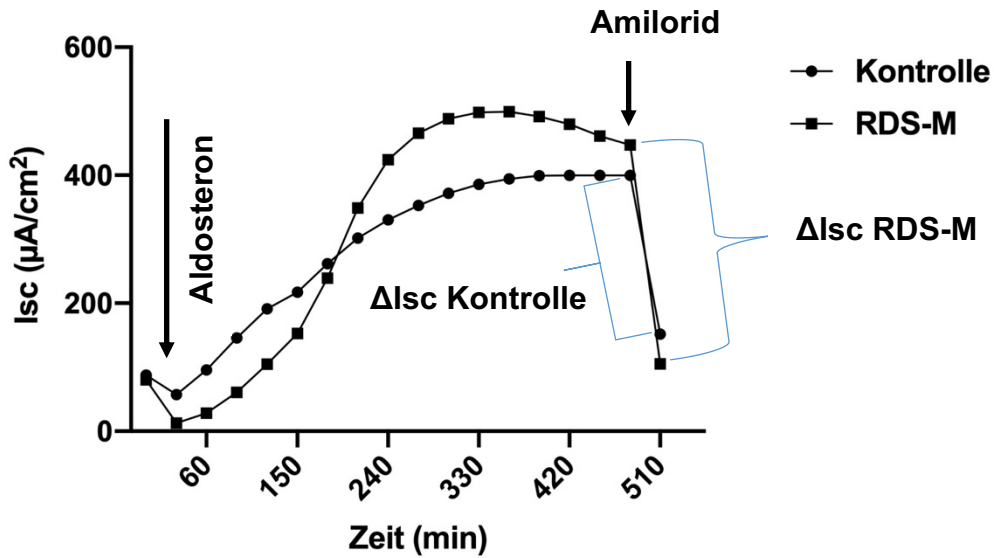


Abbildung 8 Zeitverlauf des Kurzschlussstroms (Isc) im Sigma beim Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M) nach Stimulation mit Aldosteron

Eine Messung des aktiven elektrogenen Natriumtransports erfolgte acht Stunden nach Stimulation mit $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l Aldosteron, durch Messung des Kurzschlussstroms, vor und nach Hemmung des epithelialen Natriumkanals (EnaC) mit 10^{-4} mol/l Amilorid. Der Wert auf der Ordinate (ΔIsc) stellt die Differenz zwischen dem Kurzschlussstromwert unmittelbar vor und 20 Minuten nach Gabe von Amilorid dar. Die Darstellung umfasst Einzelversuche, die exemplarisch jeweils einen Patienten mit Reizdarmsyndrom und eine Kontrollperson repräsentieren.

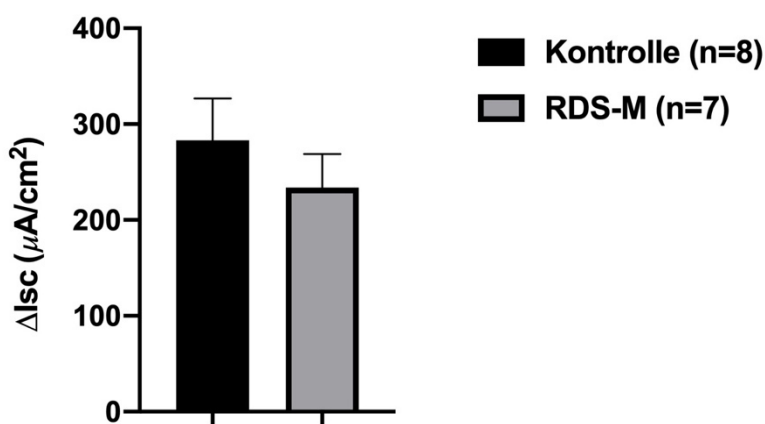


Abbildung 9 Aktiver elektrogener Natrium-Transport (ΔI_{sc}) im Sigma bei Kontrollen und Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M)

Die *EnaC*-Aktivität im Dickdarm, also den aktiven elektrogenen Natrium-Transport, misst man durch den Kurzschlussstromwert 20 Minuten nach der Gabe von Amilorid, abgezogen von dem Wert unmittelbar vor der Gabe von Amilorid. Die Darstellung gibt die Mittelwerte \pm SEM wieder. Keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen im Student's *t*-Test.

4.2.2. Elektrogene Chloridsekretion

Die Darmbiopsien der Patienten in den Ussingkammern erhielten ca. 6 bis 8 Minuten nach Beginn des Ussing-Versuchs 10^{-2} mol/l Bumetanid, um die aktive Chloridsekretion durch Inhibition des $Na^+-2Cl^-K^+$ -Cotransporters zu hemmen. Der elektrogene Chloridtransport wurde auf diese Weise ermittelt, welcher der Differenz zwischen den Kurzschlussstromwerten (ΔI_{sc}) direkt vor und 10 Minuten nach der Gabe von Bumetanid entspricht.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich jedoch nicht nur keine Stimulation, sondern sogar eine Verringerung der Chloridsekretion bei den RDS-M-Patienten (Abbildung 10).

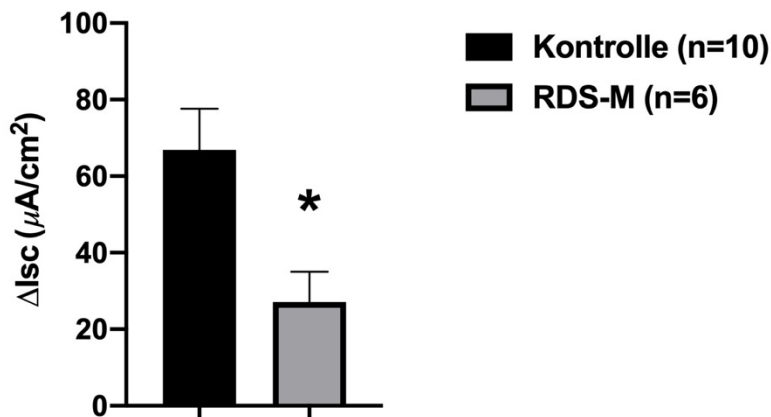


Abbildung 10 Aktiver elektrogener Chlorid-Transport (ΔI_{sc}) im Sigma bei Kontrollen und beim RDS-M

Der aktive elektrogene Chlorid-Transport wurde ermittelt, indem der Kurzschlussstromwert 10 Minuten nach der Gabe von Bumetanid von dem unmittelbar vor der Gabe abgezogen wurde. Student's *t*-Test. * $P < 0,05$ beim Vergleich der Kontrollen vs. RDS-M. Die Darstellung umfasst die Mittelwerte \pm SEM.

4.3. Molekulare Analyse der epithelialen Barriere

4.3.1. Expressionsveränderungen der Tight Junction-Proteine beim RDS-M

In elektrophysiologischen Versuchen ließ sich durch die Fluxmessungen eine beeinträchtigte Barriereeigenschaft des Kolonepithels beim RDS-M feststellen. Daraufhin wurde die Expression von Strang-bildenden Tight Junction-Proteinen wie Occludin, Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5, Claudin-8, Tricellulin und ZO-1 im Western Blot untersucht. Hiermit sollte ermittelt werden, ob Veränderungen der Expression der Tight Junction-Proteine einen Beitrag zum erhöhten Flux insbesondere des Makromoleküls FITC-Dextran beim RDS-M leisten.

In Abbildung 11 ist die Protein-Expression von Occludin bei RDS-M-Patienten im Vergleich zu Kontrollen dargestellt. Die auf dem Blot ermittelten Signale wurden mit β -Aktin normalisiert. Bei der Auswertung wurden die Mittelwerte der Kontrollen auf 100 % gesetzt. Dann wurden die Signale der Tight Junction-Proteine aus der RDS-M Gruppe dazu in Relation gesetzt.

In Abbildung 12 ist die Expression von Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -8 und Tricellulin von RDS-M-Patienten im Vergleich zu Kontrollen beispielhaft dargestellt.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung und der statistischen Analyse der Expressionsmuster finden sich in Abbildung 12. Occludin zeigte eine erniedrigte Proteinexpression bei den Patienten mit RDS-M, aber keines der anderen hier analysierten Tight Junction-Proteine zeigte in der Densitometrie der Western Blots eine Expressionsänderung (Abbildung 12).

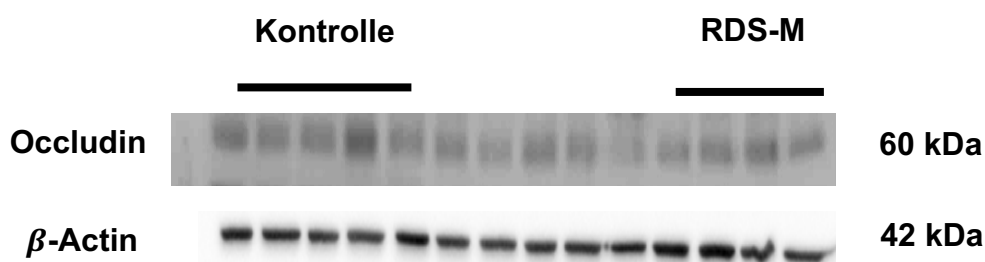
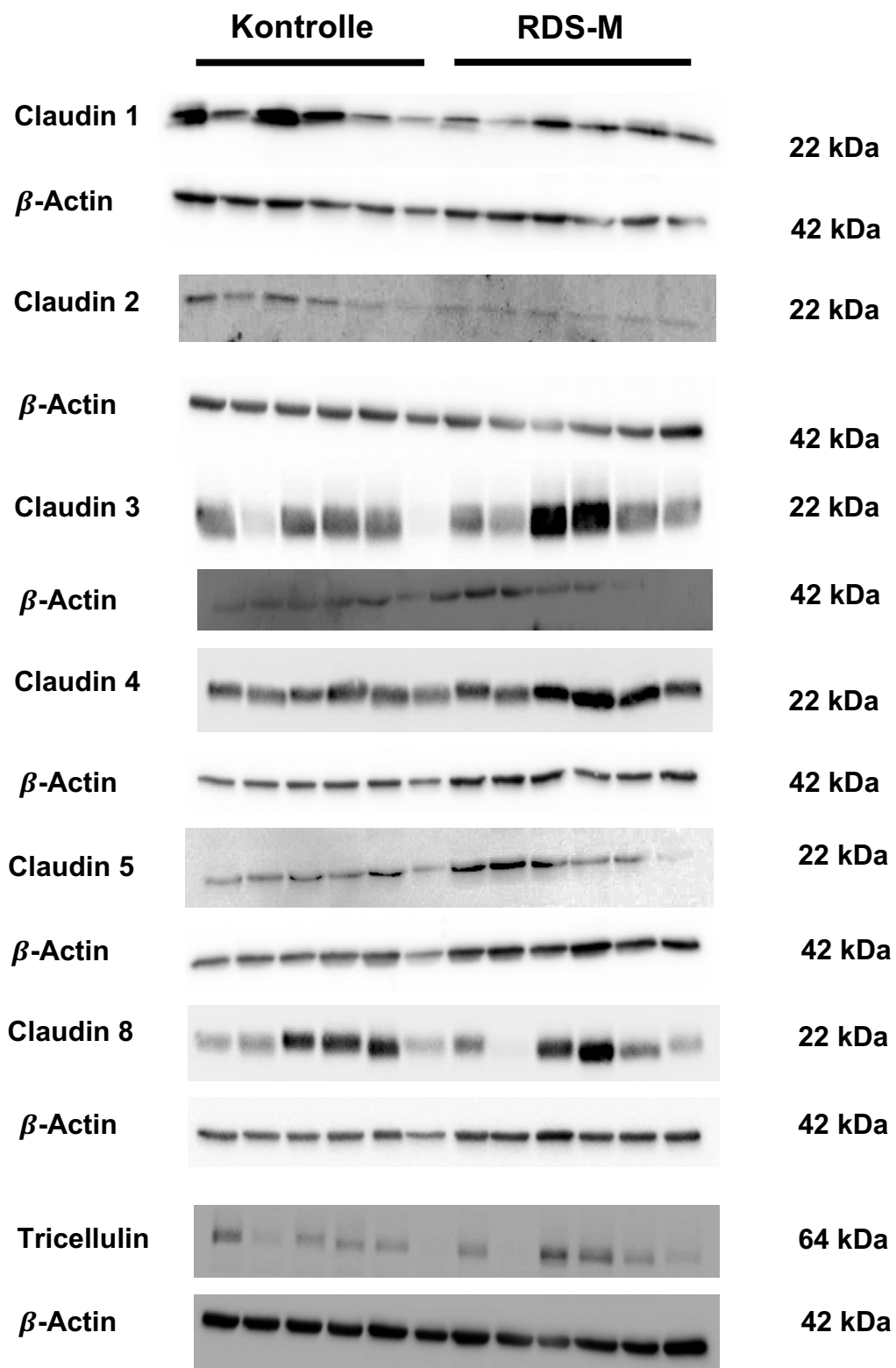


Abbildung 11 Darstellung der Expression von Occludin bei Kontrollen und RDS-M

Gezeigt ist ein Western Blot für Occludin. Dieser stammt von fünf Kontrollen und vier RDS-M-Patienten.



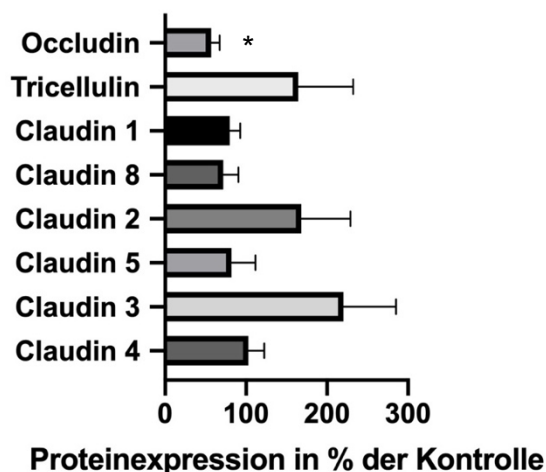


Abbildung 12 Expressionsanalyse von Tight Junction-Proteinen bei Kontrollen und Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M)

(A) Gezeigt sind Western blots für die Claudine 1,2,3,4,5 und 8 sowie Tricellulin bei Kontrollen und RDS-M. Diese stammen von sechs Kontrollen und sechs RDS-M-Patienten.

(B) Ergebnisse der densitometrischen Analyse der Western Blots. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM der spezifischen Proteinexpressionssignale von Kontrollpersonen ($n = 5-6$) und Erkrankten mit RDS-M ($n = 4-6$). Dabei wurde die Expression der Proteine von Kontrollpersonen auf 100 % gesetzt.

Anhand der densitometrischen Analyse konnte beim RDS-M bei Occludin eine reduzierte Expression von 57 ± 10 % ($*P < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Keine signifikante Modifikation zeigte sich dagegen bei den Tight Junction-Proteinen Claudin-1 (80 ± 13 %), Claudin-2 (168 ± 61 %; ns), Claudin-3 (220 ± 65 %; ns), Claudin-4 (103 ± 19 %; ns), Claudin-5 (82 ± 30 %; ns), Claudin-8 (72 ± 19 %; ns) und Tricellulin (165 ± 77 %; ns). $*P < 0,05$ beim Vergleich zwischen Kontrolle und RDS-M in Student's *t*-test.

4.3.2. Subzelluläre Lokalisation der Tight Junction Proteine

Neben der quantitativen Bestimmung von Tight Junction-Proteinen im Western Blot ist es notwendig, die subzelluläre Lokalisation der Tight Junction-Proteine zu bestimmen. Unter der Prämisse, dass lediglich die Proteine, die in der Zellmembran verankert sind, ihre Funktion als Barrierebildner ausüben können, ist es bei dem Leck-Flux-Pathomechanismus der Diarrhö relevant, wenn eine intakte Lokalisation der Tight Junction-Proteine nicht

gegeben ist. Denn Proteine, die nicht membrangebunden und in der Tight Junction-Domäne organisiert sind, tragen auch nicht zur Barrierefunktion bei.

Zur Ermittlung der Lokalisation der Tight Junction Proteine dienten fluoreszenzgefärbte Gewebeschnitte von vier Kontrollen und vier RDS-M-Patienten, die mit der Methode der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie untersucht wurden.

Angesichts der Resultate der Western Blot-Analyse mit verminderter Expression von Occludin wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation von Occludin im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop untersucht. In Abbildung 13 ist die Lokalisation von Occludin mit dem zytoplasmatischen Tight Junction Protein ZO-1 und ihrer Co-Lokalisation dargestellt. Hierbei zeigte sich beim RDS-M eine leichte Verringerung des Signals von Occludin in Co-Lokalisation mit ZO-1 im Vergleich zu den Kontrollen, entsprechend dem verringerten Signal von Occludin im Western Blot.

Bei einer verminderten Expression von Occludin im Western Blot und einem erhöhten Flux für 4 kDa-FITC-Dextran beim RDS-M, hielten wir auch eine veränderte Lokalisation von Tricellulin für möglich, das eine Abdichtung gegenüber kleinen Makromolekülen vermittelt. Deshalb erfolgte als nächstes die Immunfluoreszenz-Untersuchung von Tricellulin und ZO-1. Hier zeigte sich beim RDS-M insgesamt weniger Co-Lokalisation des Tricellulin-Signals mit ZO-1 im Vergleich zu Kontrollen und zusätzlich insbesondere eine Herausortierung von Tricellulin aus der trizellulären Tight Junction heraus (Abbildung 14).

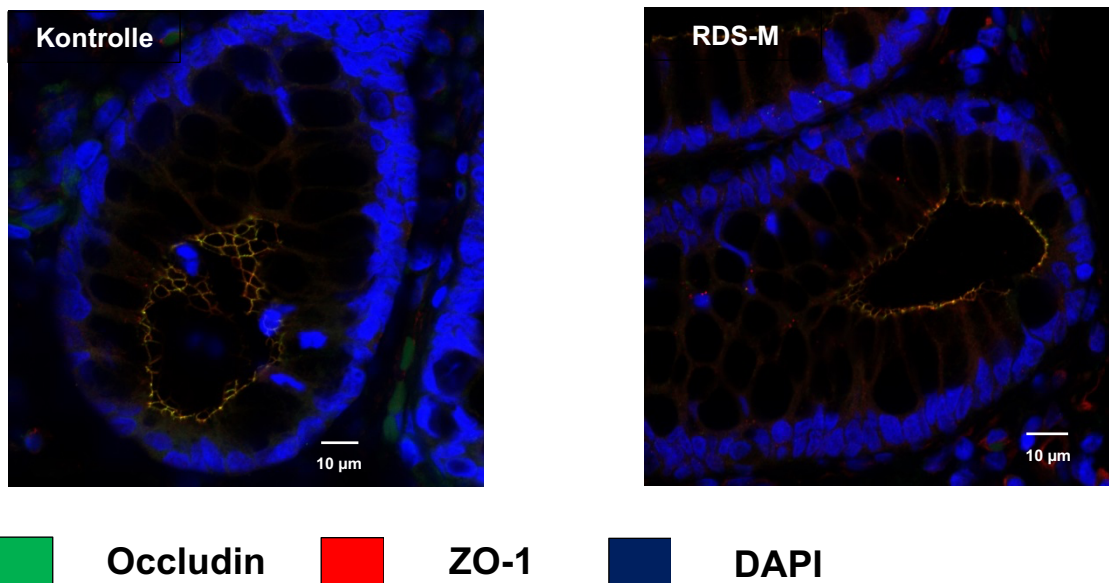


Abbildung 13 Immunfluoreszenz-Analyse von Occludin und ZO-1 im konfokalen Laser- Scanning Mikroskop

Abgebildet sind Krypten von je einer Kontroll-Biopsie (A) und einer RDS-M-Biopsie (B). Occludin ist grün gefärbt, ZO-1 ist rot gefärbt, die Zellkerne sind blau gefärbt und die Co-Lokalisation des Occludins und ZO-1 erscheint gelb (sog. merge). Insgesamt erscheint die Occludinfärbung in der Tight Junction beim RDS-M im Vergleich zur Kontrolle abgeschwächt zu sein (das rote Signal überwiegt).

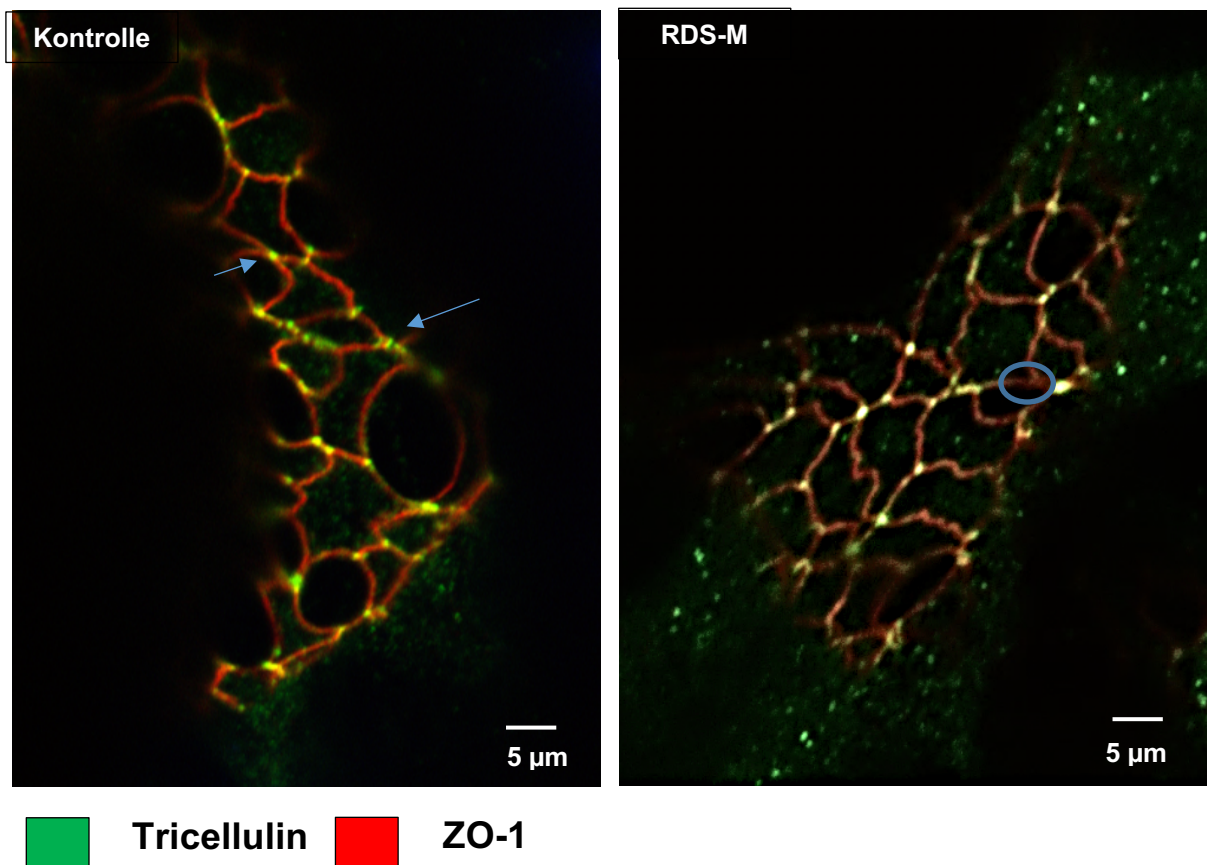


Abbildung 14 Immunfluoreszenz-Analyse von Tricellulin und ZO-1 im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop

Abgebildet sind Oberflächen-nahe Zellen im Kryptenhals der Colonbiopsien von je einer Kontrolle (A) und einem RDS-M Patienten (B). Tricellulin ist grün gefärbt und ZO-1 ist rot gefärbt. Die Co-Lokalisation von Tricellulin und ZO-1 erscheint gelb (merge). Die Pfeile (links) deuten auf Co-Lokalisationen und der Kreis (rechts) exemplarisch auf eine Heraussortierung aus der tricellulären Tight Junction.

4.3.3. Epitheliale Apoptoserate beim RDS-M

Im Darmepithel sind vermehrte Apoptose-Events ganz allgemein Barriere-relevant. Apoptosen wurden analysiert, da bereits Einzel-Zell-Apoptosen im Epithel zu einer lokal erhöhten Leitfähigkeit führen können und sogar die Permeabilität für kleine Makromoleküle erhöhen können.

Epitheliale Apoptosen bei Probanden der Kontrollgruppe und Patienten mit RDS-M sind in Abbildung 15 in der Fluoreszenz-Mikroskopie gezeigt.

Die Untersuchung der Apoptosenanzahl im Epithel ergab für das Kontrollkollektiv eine durchschnittliche Apoptoserate von $1,0 \pm 0,7 \%$ ($n=5$) und für das RDS-M-Kollektiv eine Rate von $1,1 \pm 0,6 \%$ ($n=5$, n.s.). Das bedeutet, dass sich zwischen gesunden Patienten und Patienten mit Reizdarmsyndrom bezüglich der epithelialen Apoptoserate keine Unterschiede zeigten. Angegeben ist der mittlere Prozentsatz \pm SEM der apoptotischen Epithelzellen unter den im Gesichtsfeld insgesamt zu erkennenden Epithelzellen (≈ 150 Epithelzellen/Gesichtsfeld).

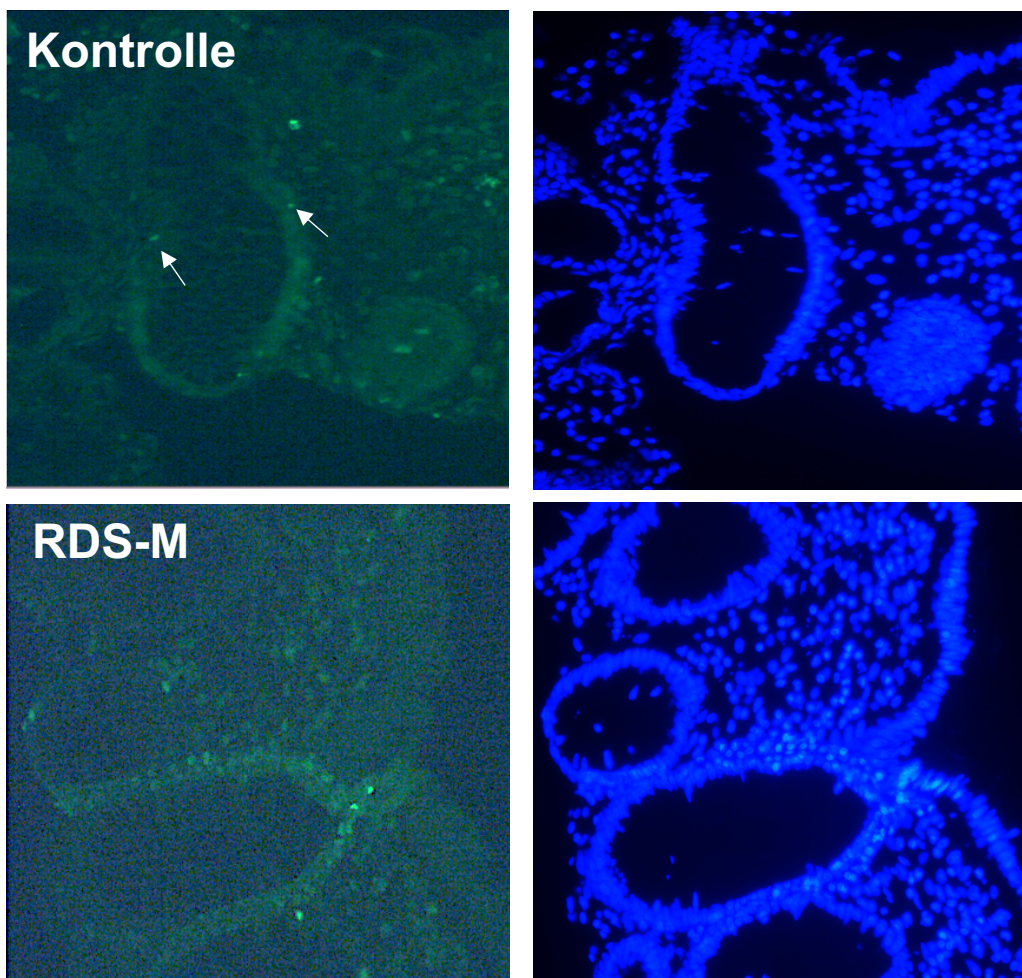


Abbildung 15 TUNEL- und DAPI-Färbung

TUNEL-Färbung zur Darstellung von Apoptosen in Biopsien aus dem Colon sigmoideum von (a) gesunden Probanden und (b) RDS-M-Patienten. Die Apoptosen sind als kondensierte Chromatinfragmente und segmentierte Kerne zu erkennen (Pfeil). Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt.

4.3.4. Morphologische Veränderungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die resorptive Oberfläche bei RDS-M Patienten im Vergleich zu Kontrollen bestimmt. Mikroskopisch analysiert wurden die Länge der mukosalen Oberfläche des Epithels inklusive Krypten in μm und die Länge der Basalmembran in H&E-Färbungen der Kolonproben. Der Quotient aus beiden Werten (Längen apikal / basal) zeigt einen korrigierten Wert für die epitheliale Oberflächen. Dies dient dazu eventuell Veränderungen im Subepithel mit einzubeziehen.

Nach Analyse der mukosalen Oberfläche zeigten sich keine Unterschiede in den korrigierten epithelialen Oberflächen zwischen Kontrollpatienten ($4,57 \pm 0,58$; $n=5$) und Patienten mit RDS-M ($4,97 \pm 0,70$; $n=5$, ns).

4.3.5. RNA-Expressionsanalyse der Colonmucosa

Um Veränderungen zu verfolgen, die für Transport und Barriere des Kolons auch auf RNA-Expressionsebene eine Rolle spielen könnten, wurde an Sigma-Proben von drei RDS-M Patienten und vier Kontrollen eine RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) durchgeführt. Die Sequenzdaten sind bei der Datenbank *European Genome-Phenome Archive (EGA)* unter der Nummer EGAD00001006646 hinterlegt. Hierbei konnten wir die zuvor gezeigte unveränderte Expression der Tight Junction-Proteine auch in der unveränderten Expression auf RNA-Ebene nachvollziehen. Die mRNA-Expression zeigte keine Veränderungen bei Claudin-1 (p-Wert: 0,83), Claudin-3 (p-Wert: 0,58), Claudin-4 (p-Wert: 0,05), Claudin-5 (p-Wert: 0,80), Claudin-7 (p-Wert: 0,29), Claudin-8 (p-Wert: 0,91). Auch für Tricellulin (p-Wert: 0,83) sowie Occludin (p-Wert 0,40) wurde keine unterschiedliche RNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Claudin-2 konnte in der Analyse nicht detektiert werden. Interessanterweise konnte die Abnahme des Occludins im Western Blot (Abbildung 11 & 12) nicht auf RNA-Ebene gezeigt werden, was also auf ein post-

transkriptionelles Geschehen in Richtung Protein-Spaltung oder Protein-Umverteilung hindeutet.

Zudem zeigte sich für die Messung der Transportfunktion auf mRNA-Ebene keine transkriptionellen Veränderung der Untereinheit des EnaC (α , β , γ) im Vergleich zu Kontrollen (SCNN1A p-Wert: 0,91; SCNN1B p-Wert: 0,90; SCNN1G p-Wert: 0,95), was auch den funktionellen Ergebnissen aus Abbildung 9 entspricht.

Nach unserer Analyse scheinen einige Gene, die für intestinale Transportproteine codieren in ihrer Expression gemindert zu sein. Die unten aufgeführten mRNA für Transporter sind in der RNA-Seq Analyse bei RDS-M verringert exprimiert (Tabelle 4).

Tabelle 4 Auszug einiger Gene aus dem RNA-Seq Datensatz mit Relevanz für RDS

Genname	Expressionsänderung (log2 fold change)	p-value
SLC12A2 (NKCC1, Basolateral Na-K-Cl Symporter)	-1.8	0,0005
CLCA1 (calcium-activated chloride channel regulator 1)	-1.9	0,002
CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	-1.4	0,003

Der Datensatz aus der RNA-Seq wurde einer bioinformatischen Signalwegs-Analyse zugeführt, der Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software. Hiermit können Vorhersagen über aktivierte oder inhibierte Signalwege aufgrund des RNA-Expressionsmusters von Genen getroffen werden. Auch kann berechnet werden, welche Mediatoren in der Probe eine vorherrschende Rolle gespielt haben, was mit der Upstream Regulator Analyse dargestellt wird. Die Upstream Regulator Analyse zeigte, dass Zytokine und Lipopolysaccharid (LPS) die Effektoren mit den meisten aktivierten Signalwegen ihrer downstream Zielgene sind (Tabelle 5).

Tabelle 5 Upstream – Regulator Analyse

Upstream regulator	p-value	Target molecules
TNF- α	4,95E ⁻⁰⁷	ABTB2,ADM,ASS1,BCL10,BCL2L1,BIRC5,BMP2,BUB1B,CCL20,CDKN1A
LPS	5,42E ⁻⁰⁶	ABCC4,ABCG1,ADM,ASS1,BCL10,BCL2L1,BMP2,CCL20,CDKN1A,DDIT3
IL-5	5,79E ⁻⁰⁵	ASS1,BCL2L1,CDKN1A,DUSP5,DUSP6,GK,LMNB1,LMO7,METRNL,PIM1
IL-1 β	8,82E ⁻⁰⁵	ACHE,ADM,ASS1,BCL2L1,BMP2,CCL20,CDKN1A,DDIT3,DUSP5,ERRFI1
IL-6	2,86E ⁻⁰⁴	ADM,BCL2L1,BIRC5,BMP2,BUB1B,CCL20,CCNA2,CDKN1A,DUSP6,ERRFI1
IFN- ϵ	3,09E ⁻⁰⁴	CDKN1A,HSD11B1,ISG15,PLAAT4,SLC2A1
IFN- γ	5,15E ⁻⁰⁴	ADM,ASS1,BCL2L1,BUB1B,CCL20,CCL23,CCNA2,CCNO,CDKN1A,CLIC5

Top Upstream-Regulatoren, Lipopolysaccharid (LPS) und proinflammatorische Zytokine mit Aktivierung ihrer Downstream-Targets in Kolonproben von Patienten mit IBS-M (3 Patienten vs. 4 Kontrollen). Spalte 1: Gen-Name des vorgeschalteten Regulators. Spalte 2: P-Wert der Überlappung des Downstream-Zielgen-Datensatz und des Signalweg-Datensatz. Spalte 3: Zielmoleküle. Die Sequenzdaten sind bei der Datenbank European Genome-Phenome Archive (EGA) unter der Nummer EGAD00001006646 hinterlegt. Die RNA-seq Daten wurden mit Ingenuity Pathway Analysis ausgewertet. Der Überlappungs-P-Wert zeigt, ob es eine statistisch signifikante Überlappung zwischen den Genen des Datensatzes und den Genen gibt, die von einem vorgeschalteten Transkriptionsregulator reguliert werden.

Abkürzungen: TNF α , Tumor-Nekrose-Faktor-alpha. LPS, Lipopolysaccharid; IL-5, Interleukin 5; IL-1 β , Interleukin – 1 beta; IL-6; Interleukin 6; IFN ϵ , Interferon-epsilon; IFN γ , Interferon-gamma.

Zudem scheint in der IPA auch die Calcitriol (aktives Vitamin D)-abhängige Regulation aktiviert zu sein (z-score = 2,769, p-value of overlap = $1,76 \cdot e^{-6}$). Calcitriol als Upstream Regulator zeigte demnach einen vergleichbaren Aktivierungsgrad mit LPS.

Auch Prostaglandin E2 ist in unserem Datensatz als Upstream Regulator aktiviert (z-score = 2,01, p-value of overlap = $1,29 \cdot e^{-2}$) und auch Glutamin zeigt in der Analyse eine Veränderung allerdings zeigte sich hier eine Inhibition der downstream Signalwege (z-score = -0,468, p-value of overlap = $3,44 \cdot e^{-03}$).

Weitere Signalwege in Abhängigkeit von Medikamenten oder funktionellen Nahrungsbestandteilen wie etwa Curcumin und Quercetin scheinen ebenfalls verändert zu sein (Curcumin: z-score = 1,48, p-value of overlap $1,24 \cdot e^{-02}$; Quercetin: z-score = -0,254, p-value of overlap = $4,67 \cdot e^{-02}$). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die Zugabe der entsprechenden Substanzen eine regulatorische Wirkung in den Patienten erzielen könnte, die sich möglicherweise positiv auf das Krankheitsbild auswirkt. Diese bioinformatischen Vorhersagen bieten aber nur erste Hinweise auf mögliche Substanzen zur Behandlung und bedürfen der weiteren Konfirmation.

5. Diskussion

Das Reizdarmsyndrom ist eine eigenständige Erkrankung, die von anderen entzündlichen Darmerkrankungen gut zu unterscheiden ist. Ihre Ätiopathogenese ist bisher weitgehend ungeklärt. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Erforschung der pathophysiologischen Mechanismen der Diarrhö beim RDS. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten mit einem RDS-M wurden dazu an endoskopisch entnommenen Biopsien aus dem *Colon sigmoideum* die Transport- und Barriereigenschaften des Darmgewebes untersucht. Vordergründig wurde hierbei der aktive elektrogene Natrium-Transport untersucht, aber aus den Messungen des basalen Kurzschlussstromes am Beginn des Ussing-Experiments konnten auch Rückschlüsse auf die aktive Anionensekretion gezogen werden. Anhand der Wechselstrom-Impedanzspektroskopie und mit dem Einsatz von Fluorescein und FITC-Dextran 4000 wurden außerdem als Schwerpunkt dieser Studie die Eigenschaften der epithelialen Barriere analysiert. Hier zeigte sich eine Barriestörung für die von uns untersuchten kleinen Makromoleküle, aber keine Erhöhung der ionalen Leitfähigkeit. Eine Analyse der Tight Junction-Protein-Expression wurde ebenso wie die immunhistochemische Charakterisierung der subzellulären Verteilung der

Tight Junction-Proteine zur Ergänzung durchgeführt und zeigte die Umverteilung von Tricellulin aufgrund einer verminderten Präsenz von Occludin als das molekulare Korrelat zur funktionellen Barrierestörung.

5.1. Epitheliale Störung der Barrierefunktion beim Reizdarmsyndrom

Eine äußerst wirksame Barriere zwischen dem intestinalen Lumen und dem hochpermeablen Endothel der Blutkapillaren wird durch eine intakte einschichtige Epithelzellschicht des Darms dargestellt. Diese Schicht übt abhängig von der Lokalisation verschiedene Eigenschaften aus. Sie ist im Dünndarm beim Massentransport der Nährstoffabsorption stark durchlässig. Hier vermittelt sie auch eine osmotische Teilchen- und Wasseraufnahme über den parazellulären Weg (*solute and solvent drag*). Im Dickdarm sorgt sie als mitteldichtes Epithel eher für die Aufrechterhaltung von Teilchengradienten, die zur Resorption von Wasser und Ionen genutzt werden.

Tight Junctions verhindern den unkontrollierten Austausch von Wasser, Elektrolyten und sonstigen Substanzen. Des Weiteren wird von ihnen prinzipiell auch der Einstrom von luminalen Antigenen begrenzt. Durch strukturelle oder quantitative Veränderungen bei den Tight Junction-Proteinen kann es zu einer Reduktion des transmuralen Widerstands und damit zu einer Störung der epithelialen Barrierefunktion kommen.

Für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde bereits eine epitheliale Barrierestörung beschrieben. Beispielsweise wurde für die Colitis ulcerosa mittels konventioneller Ussing-Messverfahren unter Gleichstrom-Bedingungen eine Verminderung des Gesamtwiderstands um circa 50 % gezeigt (Sandle et al., 1990).

Spätere Untersuchungen mit der Wechselstrom-Impedanzspektroskopie ergaben bei der Colitis ulcerosa sogar eine Reduktion des epithelialen Widerstands um 79 % (Schmitz et al., 1999). Dies kam dadurch zustande, dass der starke Epithelwiderstandsabfall bei der konventionellen Messung mit Gleichstrom zum Teil durch den entzündlich bedingten Anstieg des subepithelialen Widerstands maskiert wird (Schmitz et al., 1999). Weniger stark beeinträchtigt war die Barrierefunktion für den Morbus Crohn. Der Epithelwiderstand in der Impedanzspektroskopie war um 40 % reduziert (Zeissig et al., 2007).

Bei entzündlichen Darmerkrankungen kann, wie oben erwähnt, durch eine entzündliche Verdickung des Gewebes der subepitheliale Widerstand (R_{sub}) erhöht sein, sodass der Gesamtwiderstand nicht verändert erscheint, wenn man bedenkt, dass der erhöhte R_{sub}

den eventuell erniedrigten epithelialen Widerstand (R_{epi}) maskiert. Nur mit der Technik der Impedanzspektroskopie können solche Veränderungen aufgelöst und identifiziert werden, die mit einfachen Messungen des transmuralen Gesamtwiderstands nicht möglich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Schlussleistendichtheit mittels Wechselstrom-Impedanzspektroskopie untersucht. Beim Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M) wurde bislang die Diskriminierung des epithelialen und des subepithelialen Widerstandsanteils am Gesamtanteil des Darmgewebes mit dieser Ussing-Kammer-Technik zuvor nie untersucht. Hier fand sie nun Anwendung, um eventuell maskierte Änderungen in den transmuralen Widerständen beim RDS genauer analysieren zu können.

R_{epi} war bei unseren Untersuchungen bei Patienten mit RDS-M nicht reduziert, auch zeigte sich keine Änderung im R_{sub} . Zwar zeigte sich eine Tendenz zur Verringerung des epithelialen Widerstands, die jedoch die statistische Signifikanz verfehlte. Es liegen also für den R_{epi} keine funktionell relevanten Unterschiede zu Darmgesunden vor. Mögliche systematische Gründe, die zudem dafür verantwortlich sein könnten, dass nur eine Tendenz ohne eine Signifikanz gemessen wurde, sind z.B. die Heterogenität des Patientenkollektivs bei Patienten mit Reizdarmsyndrom, was insbesondere die Unterschiede der dominierenden Symptomatik zum Zeitpunkt der Untersuchung betrifft (wie Obstipation oder Diarrhö).

So wurden mehrere Patienten mit RDS-M in der Diarrhö-freien Phase der Erkrankung untersucht, was eventuell dazu geführt hat, dass sich keine Veränderung des R_{epi} zeigte. Insofern könnte die Fallzahl der untersuchten RDS-M Patienten aufgrund der Heterogenität der Erkrankung zu niedrig gewesen sein, während bei anderen chronischen Darmerkrankungen wie z.B. der Colitis ulcerosa diese Fallzahl für Signifikanzen in den Ergebnissen der Impedanzanalyse ausreichte.

Neben den elektrophysiologischen Messungen wurde die parazelluläre Permeabilität des Epithels als Korrelat der Barrierestörung mittels FITC-Dextran 4000- und Fluorescein-Fluxmessungen untersucht. Dabei konnte beim RDS-M eine gesteigerte parazelluläre Permeabilität für Fluorescein festgestellt werden, die um 4-fach höher war als bei den Kontrollen. Zudem zeigte sich auch eine um den Faktor 3 gesteigerte Permeabilität für FITC-Dextran 4000 im Vergleich zu den Kontrollen.

Mit diesen Untersuchungsergebnissen konnte erstmals für das Patientenkollektiv RDS-M am Kolon gezeigt werden, dass eine erhöhte parazelluläre Permeabilität für Makromoleküle ein entscheidender Aspekt in der Pathogenese der Erkrankung ist. Eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle kann eine chronische mukosale Inflammation, wie sie ja auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bekannt ist, begünstigen (Ahmad et al., 2017).

5.2. Natrium-Transport beim RDS-M

Für die elektrogene Natrium-Resorption in zahlreichen Geweben ist der epitheliale Natrium-Kanal (EnaC) ein zentraler Bestandteil des aktiven Transportsystems. An der Niere und am Darm regulieren Mineralokortikoide, insbesondere Aldosteron und Glukokortikoide, die EnaC-Aktivität. Die dosisabhängige Zunahme der Anzahl der epithelialen Natrium-Kanäle in der apikalen Enterozytenmembran wird bestimmt durch die Wirkung des Aldosterons. Dies geschieht unter anderem durch eine gesteigerte mRNA-Synthese (transkriptionelle Regulation), aus der eine vermehrte Proteinsynthese und damit konsekutiv auch ein vermehrter Proteineinbau in die apikale Membran resultieren. Es sind jedoch auch weitere Schritte der Regulation an Einbau, Aktivierung und Hemmung der Ubiquitinierung beteiligt. Im Besonderen ist die Wirkung von Aldosteron eine erhöhte mRNA-Expression der β - und γ -EnaC-Untereinheit im Kolon; die α -Untereinheit wird unverändert exprimiert (Epple et al., 2000, Amasheh et al., 2004). Durch den vermehrten Einbau des EnaCs wird die Leitfähigkeit von Natrium an der apikalen Membran erhöht und so die luminalen Natrium-Aufnahme des aktiven elektrogenen Natrium-Transports initiiert. Der Transport steigt jedoch nicht direkt an, sondern mit einer Latenzzeit von circa einer Stunde. Dies spiegelt die Zeitschiene der Prozesse wider, die daran beteiligt sind. Dazu gehören Transkription, Translation und Einbau in die Plasmamembran der Zelle. Nach sechs bis acht Stunden ist das Maximum erreicht (Epple et al., 1995).

Der epitheliale Natrium-Kanal kann durch das K^+ -sparende Amilorid hochselektiv gehemmt werden (Benos, 1982) Eine Konzentration von 10^{-4} mol/l bewirkt ein schnelles und annähernd vollständiges Sistieren des aktiven Natrium-Transports. Dies äußert sich in einem reduzierten Kurzschlussstrom.

Ein gestörter elektrogener Natrium-Transport – beispielsweise infolge einer gestörten Proteinsynthese und -insertion des EnaCs in die apikale Membran – führt zu einem vermehrten Verlust von Natrium-Ionen für den Organismus und durch Solvent Drag auch zu Wasserverlust ins Darmlumen. Für die Colitis ulcerosa und den Morbus Crohn wurde dieser malabsorptive Diarrhömechanismus bereits gezeigt (Amasheh et al., 2004, Zeissig et al., 2008). Wie Amasheh et al. Zeigten entsteht der verminderte elektrogene Natrium-Transport bei der Colitis ulcerosa durch eine reduzierte Transkription der γ -Untereinheit des EnaCs. Dieser Effekt wird durch das proinflammatorische Zytokin TNF α ausgelöst. Zeissig und Mitarbeiter führten an einem Rattenmodell Experimente mit TNF α sowie mit den Inhibitoren der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2 durch, um beim Morbus Crohn den Signaltransduktionsweg des Entzündungsgeschehens zu bestimmen. Sie zeigten, dass durch die Inhibition der MEK1/2, die die ERK1/2 durch Phosphorylierung aktivieren kann, eine Disinhibition der verminderten Natrium-Resorption bewirkt wird, die durch TNF α verursacht wurde.

Bisher wurden keine Untersuchungen des elektrogenen Natrium-Transports für das Reizdarmsyndrom durchgeführt. Für uns war die Funktion des EnaCs beim RDS-M vor allem wegen der Störung des Natrium-Transports bei kollagener Kolitis, die Bürgel et al. Beschreiben, von besonderem Interesse (Bürgel et al., 2002).

In unseren Experimenten konnte beim RDS-M, verglichen mit dem Kontrollkollektiv, keine Veränderung des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms gezeigt werden. Wir schlussfolgerten, dass das EnaC-abhängige aktive elektrogene Natrium-Transportsystem beim RDS-M nicht gestört ist.

Es fand sich also kein Beleg dafür, dass eine Malabsorption von Na⁺ im Kolon als ein möglicher Diarrhömechanismus im Zusammenhang mit dem Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M) steht. Dies ist aber auch nicht überraschend, wenn man sich vor Augen hält, dass diese Patienten lange Phasen von Obstipation aufweisen, die nur von Zeit zu Zeit durch lösende Episoden einer Stuhlverflüssigung unterbrochen werden.

Es ist weiter festzuhalten, dass in unseren Experimenten eine Hemmung der elektrogenen Chloridsekretion durch Bumetanid erfolgte. Dieser Bumetanid-hemmbarer Kurzschlussstrom stellt eine aktive Anion-Sekretion wie die von Chlorid oder Bikarbonat dar. Dass dieser Transport im RDS-M kleiner war als bei den Kontrollen ein weiterer Baustein in der Erklärung der Obstipationsphase dieser Patienten.

Im Zusammenhang mit der verminderten intestinalen Sekretion bei RDS-M, funktionell gemessen in der Ussing-Kammer, wurde auf molekularer Ebene in der RNA-Sequenzierung von einer verringerten Expression von CLCA1, NKCC1 und CFTR begleitet, was diese Interpretation untermauert.

Der cAMP/cGMP-regulierte CFTR-Kanal (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) ist der primäre Chloridkanal an der apikalen Membran von Darmepithelzellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Sekretion und Homöostase von Darmflüssigkeit.

Medikamente oder Toxine, die den intrazellulären cAMP- und/oder cGMP-Spiegel hochregulieren, können den CFTR-Kanal hyperaktivieren und so eine übermäßige Flüssigkeitssekretion und sekretorische Diarrhöe verursachen (Moon et al., 2015)

Eine verminderte Aktivierung des CFTR-Kanals, sowie sie in unseren Daten bei Patienten mit RDS-M gezeigt wurde, könnte die Sekretion von Flüssigkeit ins Darmlumen beeinträchtigen, sodass eine Obstipation begünstigt wird.

Die Funktion des EnaC scheint also nicht verändert zu sein und somit könnte man davon ausgehen, dass auch der Signalweg nicht affektiert ist. In der Datenanalyse von IPA taucht der Signalweg nicht auf. Mögliche Gründe dafür könnten sein, dass die Information im Datensatz für eine Vorhersage zu gering ist oder dass der Signalweg nicht reguliert war, weil EnaC eben nicht betroffen ist.

Vorherrschend bei unseren untersuchten RDS-M-Patienten war eine chronische Obstipation, mediiert durch weniger aktive Anionen-Sekretion und eine unbeeinträchtigte aktive elektrogene Natrium-Resorption. Unsere Hypothese aus den Untersuchungen dieser Arbeit ist deshalb, dass diese Obstipation hin und wieder sporadisch durch Episoden einer Diarrhö als Ausdruck sekretorischer Phänomene kurzzeitig durchbrochen wird und dann die Obstipation zurückkehrt. Welche Mechanismen diese sekretorischen Phasen bedingen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. In Frage dafür kommen aber z.B. eine durch Dehnung der Darmwand bei der Obstipation initiierte neuronale Aktivierung VIPerger Sekretomotorneurone oder eine Eindickung (Aufkonzentration) von Gallensäuren.

5.3. Veränderungen in den epithelialen Tight Junctions beim RDS-M

Es wurde vermutet, dass das morphologische Korrelat der erhöhten Epitheldurchlässigkeit beim RDS-M mit einer Veränderung in der Zusammensetzung der epithelialen Tight

Junction-Proteine einhergeht. Nicht in jedem Fall jedoch ist die Funktion dieser Proteine exakt bekannt. Einige der Claudine gelten als abdichtend (Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5 und Claudin-8), anderen wird eine porenbildende Funktion (Claudin-2, Claudin-15) zugesprochen (Sonoda et al., 1999, Van Itallie et al., 2001, Amasheh et al., 2002, Furuse et al., 2002, Wen et al., 2004). Auch das TJ-Protein Occludin wirkt eher abdichtend, jedoch ist seine Funktion nicht essenziell für die ionale Permeabilität, da Occludindefiziente Tiere keine messbare Epithelwiderstandsveränderung aufwiesen, sondern ist eher für die Permeabilität für Makromoleküle von Bedeutung (Matter and Balda, 1999).

In den vergangenen Jahren nahm das Verständnis der Bedeutung von Veränderungen der Tight Junctions für die epitheliale Barrierefunktion und der Pathogenese von Barriestörungen zu. Es wurden vermehrt Expressionsanalysen der Tight Junction-Proteine im Kontext chronisch entzündlicher Darmerkrankungen durchgeführt. Diese ergaben eine verminderte Expression von Occludin und Claudin-4 bei der kollagenen Kolitis (Burgel et al., 2002). Beim Morbus Crohn sind hingegen Claudin-5 und Claudin-8 vermindert, während Claudin-2 hochreguliert ist (Burgel et al., 2002, Zeissig et al., 2007). Diese unterschiedlichen Expressionsmuster haben bei beiden Erkrankungen eine gestörte Barrierefunktion zur Folge, die ursächlich an der Diarrhö bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Sinne einer Leckflux-Diarrhö beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine quantitative Analyse der Membranproteine Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5, Claudin-8, Occludin, Tricellulin sowie ZO-1 durchgeführt. Die Proteine Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5, Claudin-8 und Tricellulin fanden sich dabei unverändert exprimiert. Beim abdichtenden Tight Junction-Protein Occludin konnte hingegen, verglichen mit dem Kontrollkollektiv, eine verminderte Expression festgestellt werden, was die erhöhte Permeabilität für kleine Makromoleküle erklären könnte.

Diese Ergebnisse für das Reizdarmsyndrom stimmen nicht mit den von Bürgel et al. überein, die diese für die kollagene Kolitis erhoben haben. Bei dieser Erkrankungsform hat die Veränderung der Tight Junction-Zusammensetzung aber auch einen funktionell anderen Effekt. Es kommt zu einem Anstieg der ionalen Permeabilität, was einen passiven Verlust von Teilchen und Wasser, also eine Leckflux-Diarrhökomponente, nach sich zieht, weshalb die kollagene Kolitis anders als das RDS-M durch eine kontinuierliche Diarrhö charakterisiert ist.

Wir führten als Ergänzung zur Tight Junction-Expressionsanalyse beim RDS-M eine immunhistochemische Untersuchung der Veränderungen der subzellulären Lokalisation von den Tight Junction-Proteinen Occludin und Tricellulin durch. Dabei zeigte sich, dass bei Patienten mit RDS-M eine Heraussortierung von Tricellulin aus der trizellulären Tight Junction (tTJ) vorliegt. Eine verringerte Expression von Tricellulin und Aussortierung aus der tTJ ist verantwortlich für eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle (Krug et al., 2009) (Krug et al., 2018). Zudem wird angenommen, dass eine Herunterregulation der Expression von Occludin zu einer Umverteilung von Tricellulin aus der trizellulären in die bizelluläre Tight Junction beitragen kann (Buschmann et al., 2013).

Somit konnte in dieser Arbeit Anhaltspunkte dafür erhoben werden, dass eine verminderte Expression von Occludin zu einer Umverteilung von Tricellulin führt, die dann in einer erhöhten Makromolekülpermeabilität an den trizellulären Tight Junctions (tTJs) resultiert.

5.4. Epitheliale Apoptose

Eine weitere Ursache für eine strukturelle Barrierestörung des Epithels kann eine erhöhte Apoptoserate sein. Makroskopisch sichtbare Läsionen wie Erosionen und Ulzerationen sind beim Reizdarmsyndrom per definitionem nicht vorhanden. Daneben kann eine erhöhte Leitfähigkeit des Epithels bereits durch Einzelzellverluste aufgrund des Zelltodmechanismus, der Apoptose, der durch pro-inflammatorischen Zytokine aktiviert werden kann, verursacht werden (Gitter et al., 2000). Insgesamt wird aber weiterhin kontrovers diskutiert, inwieweit eine geringe Anzahl von Apoptose-Ereignissen barriererelevant ist. Es herrschte lange die Ansicht vor, Apoptosen hätten keine Auswirkungen auf die epitheliale Integrität, denn bis zu ihrer Extrusion aus dem Zellverband mit den Tight Junctions bleiben die apoptotischen Zellen mit ihren benachbarten Zellen in Kontakt und die umliegenden Zellen schließen die entstehende Einzellläsion innerhalb von Minuten (Gunzel et al., 2006). Letztendlich können die Zellfragmente sogar geregelt von den benachbarten Zellen aufgenommen werden (Autophagie).

Durch die Conductance Scanning-Methode haben Gitter et al. An einem Zellkulturmodell gezeigt, dass es auch aufgrund von mehreren apoptotischen Einzelzellverlusten zu einer passageren lokalen Permeabilitätserhöhung im Sinne von fokalen Läsionen (*focal leaks*) kommen kann (Gitter et al., 1997). Ebenfalls zeigten sie, dass dieser Effekt bei einer Stimulation mit TNF α weiter ansteigt, weil durch dieses Zytokin wahrscheinlich die Tight

Junction-Expression, die für die Abdichtung essentiell ist, reduziert wird. Aufgrund dessen war der Blick auf den Einfluss der epithelialen Apoptosen auf die erhöhte Permeabilität des Epithels beim Reizdarmsyndrom interessant, um zu überprüfen, ob die erhöhte Makromolekülpermeabilität apoptosebedingt ist oder nicht.

Unterschiede in der Apoptoserate zwischen den Kontrollen und dem Reizdarmsyndrom vom Mischtyp (RDS-M) konnten aber in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Sie unterschieden sich nicht von den darmgesunden Kontrollen. Unsere erhobenen Ergebnisse sind damit vergleichbar mit der unveränderten Apoptoseraten bei der kollagenen Kolitis (Burgel et al., 2002). Von der Colitis ulcerosa und vom Morbus Crohn unterscheiden sie sich diesbezüglich insofern erheblich. Hier wurde eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen (Strater et al., 1997, Burgel et al., 2002, Zeissig et al., 2007). Deshalb scheint eine Heraussortierung von Tricellulin aus der tTJ als Folge einer verminderten Expression von Occludin die plausibelste Erklärung für die erhöhte Makromolekülpermeabilität bei Patienten mit RDS-M zu sein.

5.5. Mukosale Darmoberfläche beim Reizdarmsyndrom

Oftmals ist bei entzündlichen Erkrankungen des Darmes die Schleimhautarchitektur verändert. Dies ist bedingt durch Zytokine, zum einen erklärbar durch Änderungen in der Struktur des subepithelialen Bindegewebes und zum anderen durch veränderte Apoptose- und Zellproliferationsraten. Eine Rarefizierung der Krypten der Dickdarmschleimhaut, wie beispielsweise bei der Colitis ulcerosa, kann vorhanden sein. Eine verminderte oder vergrößerte mukosale Oberfläche wirkt sich selbstverständlich auf die resorptiven sowie sekretorischen Eigenschaften der Darmwand und auf deren Widerstand aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde, verglichen mit Kontrollen, die mukosale Oberfläche der Krypten beim RDS-M bestimmt. Im Vergleich zum Kontrollkollektiv war keine Veränderung der mukosalen Oberfläche auszumachen.

5.6. Pathomechanismen beim RDS-M

Die Diarrhö entsteht beim RDS-M wie auch bei anderen Durchfallerkrankungen – beispielsweise Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder kollagener Kolitis – im Zusammenwirken verschiedener Pathomechanismen. Vordergründig ist der Leck-Flux-Mechanismus, der

die parazelluläre Strömung von Wasser und Soluten ins Lumen möglich macht. Als funktionelles Korrelat wäre ein erniedrigter Epithelwiderstand und als molekulares Korrelat ist eine verminderte Expression von Tight Junction-Proteinen der Claudin-Familie zu erwarten gewesen, was nicht der Fall war. Die von uns untersuchten Patienten gehören aber eben auch wie oben ausgeführt der RDS-M Gruppe an, weisen also während längerer Phasen keine Diarrhö auf.

Beim RDS-M wurden keine vermehrten Apoptosen als zusätzliche Ursache für die erhöhte Makromolekül-Permeabilität des Epithels ausgemacht. Auch eine Störung der aktiven elektrogenen Natrium-Resorption im Sinne einer Na⁺-Malabsorption wurde als Diarrhö-Mechanismus (ggf. mitverantwortlich für Diarrhö-Episoden der RDS-M Patienten) ausgeschlossen.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei lymphozytärer Kolitis eine Störung des EnaC-vermittelten elektrogenen Na⁺-Transports im menschlichen Sigma. Die Zunahme der γ -EnaC-mRNA-Expression als Reaktion auf Aldosteron war bei Patienten mit lymphozytärer Kolitis MEK1/2-abhängig reduziert, da sie durch MEK1/2-Hemmung durch U0126 wieder normalisiert werden konnte. Parallele Experimente zur Identifizierung der Signalgebung im distalen Dickdarm von Ratten ergaben, dass MEK1/2 durch einen Zytokincocktail aus TNF α , IFN γ und IL-15 aktiviert wird, die als die wichtigsten Regulatoren in der Upstream-Regulatoranalyse bei lymphozytärer Kolitis identifiziert wurden (Barmeyer et al., 2017).

Dieses Zytokinprofil und v.a. IL-15 scheint bei RDS-M keine dominierende Rolle in der Pathogenese zu spielen. Das könnte ein Grund dafür sein, warum der EnaC bei RDS-M nicht gestört ist.

Zusätzlich zu der hier untersuchten Transport- und Barrierefunktion können weitere Pathologien zur RDS-Symptomatik beitragen. Wie oben in der IPA erwähnt scheint Prostaglandin E2 aktiviert zu sein. Dies könnte z.B. ein Mechanismus für die Entstehung von Diarrhö-Episoden bei RDS-M Patienten darstellen, nämlich in Folge einer dehnungsbedingten Prostaglandin-Freisetzung in der Darmmucosa. Möglicherweise spielt Prostaglandin E2 auch eine Rolle bei der viszeralen Hypersensitivität beim RDS-M (Grabauskas et al., 2020).

Da der Curcumin-abhängige Signalweg in der IPA Pathway-Analyse affektiert ist, könnte Curcumin als supportives Therapeutikum bei Patienten mit RDS-M effektiv sein, da es zudem barrierestabilisierende und immunmodulatorische Funktionen besitzt (Lobo de Sa

et al., 2019). Auch Glutamin-abhängige Signalwege scheinen affektiert zu sein. Möglicherweise könnte also auch Glutamin beim RDS-M eingesetzt werden.

Auch der Signalweg von Quercetin als Upstream Regulator ist verändert. Möglicherweise könnte Quercetin also zur Gegenregulation der subklinischen Inflammation beim RDS-M Anwendung finden, da es eine antiinflammatorische Wirkung besitzt. Zudem soll Quercetin barrierefördernd über eine Interaktion mit Claudin 4 wirken. Dies wurde zumindest in Caco-2-Zellen gezeigt (Amasheh et al., 2008).

5.7. Perspektiven

Parallel zum Projekt RDS-M wurden Biopsien aus dem Sigma von Patienten mit RDS-D gesammelt. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf das RDS-M-Kollektiv gelegt. In einer weiteren Arbeit können nun die Pathomechanismen von RDS-D erforscht werden, zu dem schon erste Daten vorliegen.

Bei einem heterogenen Krankheitsbild wie RDS mit multifaktorieller Genese ist die Erforschung verschiedenster Pathomechanismen, sowie die Sequenzierung von mRNA-Signalen in Darmbiopsien von einzelnen Patienten nicht hoch genug einzuschätzen, um eine zielgerichtete Analyse einerseits, aber auch eine individualisierte Therapie andererseits, in der Zukunft anbieten zu können.

Unter der Annahme, dass bei RDS-Patienten eine chronische subklinische Infektion oder Dysbiose vorliegen könnte, bei der eine Erregersuche mit herkömmlichen mikrobiologischen Untersuchungen, wie z.B. durch Stuhlkulturen, oft nicht zielführend ist, ist aber auch die Erforschung der gesamten Darmmikrobiota durch Mikrobiom-Sequenzierung denkbar, um die Erkrankung besser zu verstehen und möglicherweise Mikrobiom-basiert eine individualisierte Therapie zu ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

- AGRAWAL, A., HOUGHTON, L. A., REILLY, B., MORRIS, J. & WHORWELL, P. J. 2009. Bloating and distension in irritable bowel syndrome: the role of gastrointestinal transit. *Am J Gastroenterol*, 104, 1998-2004.
- AHMAD, R., SORRELL, M. F., BATRA, S. K., DHAWAN, P. & SINGH, A. B. 2017. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol*, 10, 307-317.
- AMASHEH, M., SCHLICHTER, S., AMASHEH, S., MANKERTZ, J., ZEITZ, M., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2008. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J Nutr*, 138, 1067-73.
- AMASHEH, S., BARMMEYER, C., KOCH, C. S., TAVALALI, S., MANKERTZ, J., EPPLER, H. J., GEHRING, M. M., FLORIAN, P., KROESEN, A. J., ZEITZ, M., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2004. Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of epithelial sodium channel in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 126, 1711-20.
- AMASHEH, S., MEIRI, N., GITTER, A. H., SCHONEBERG, T., MANKERTZ, J., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci*, 115, 4969-76.
- ATKINSON, W., SHELDON, T. A., SHAATH, N. & WHORWELL, P. J. 2004. Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *Gut*, 53, 1459-64.
- BARBARA, G., STANGHELLINI, V., DE GIORGIO, R. & CORINALDESI, R. 2006. Functional gastrointestinal disorders and mast cells: implications for therapy. *Neurogastroenterol Motil*, 18, 6-17.
- BARMMEYER, C., ERKO, I., AWAD, K., FROMM, A., BOJARSKI, C., MEISSNER, S., LODDENKEMPER, C., KERICK, M., SIEGMUND, B., FROMM, M., SCHWEIGER, M. R. & SCHULZKE, J. D. 2017. Epithelial barrier dysfunction in lymphocytic colitis through cytokine-dependent internalization of claudin-5 and -8. *J Gastroenterol*, 52, 1090-1100.
- BENOS, D. J. 1982. Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol*, 242, C131-45.

BOUIN, M., PLOURDE, V., BOIVIN, M., RIBERDY, M., LUPIEN, F., LAGANIERE, M., VERRIER, P. & POITRAS, P. 2002. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology*, 122, 1771-7.

BRANDT, L. J., CHEY, W. D., FOXX-ORENSTEIN, A. E., SCHILLER, L. R., SCHOENFELD, P. S., SPIEGEL, B. M., TALLEY, N. J. & QUIGLEY, E. M. 2009. An evidence-based position statement on the management of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*, 104 Suppl 1, S1-35.

BRELIAN, D. & TENNER, S. 2012. Diarrhoea due to pancreatic diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 26, 623-31.

BUCKER, R., KRUG, S. M., MOOS, V., BOJARSKI, C., SCHWEIGER, M. R., KERICK, M., FROMM, A., JANSSEN, S., FROMM, M., HERING, N. A., SIEGMUND, B., SCHNEIDER, T., BARMAYER, C. & SCHULZKE, J. D. 2018. *Campylobacter jejuni* impairs sodium transport and epithelial barrier function via cytokine release in human colon. *Mucosal Immunol*, 11, 474-485.

BURGEL, N., BOJARSKI, C., MANKERTZ, J., ZEITZ, M., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2002. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology*, 123, 433-43.

BUSCHMANN, M. M., SHEN, L., RAJAPAKSE, H., RALEIGH, D. R., WANG, Y., WANG, Y., LINGARAJU, A., ZHA, J., ABBOTT, E., MCAULEY, E. M., BRESKIN, L. A., WU, L., ANDERSON, K., TURNER, J. R. & WEBER, C. R. 2013. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell*, 24, 3056-68.

CALDARELLA, M. P., SERRA, J., AZPIROZ, F. & MALAGELADA, J. R. 2002. Prokinetic effects in patients with intestinal gas retention. *Gastroenterology*, 122, 1748-55.

CANN, P. A., READ, N. W., HOLDSWORTH, C. D. & BARENDS, D. 1984. Role of loperamide and placebo in management of irritable bowel syndrome (IBS). *Dig Dis Sci*, 29, 239-47.

CEULEERS, H., HANNING, N., HEIRBAUT, J., VAN REMOORTEL, S., JOOSSENS, J., VAN DER VEKEN, P., FRANQUE, S. M., DE BRUYN, M., LAMBEIR, A. M., DE MAN, J. G., TIMMERMANS, J. P., AUGUSTYNS, K., DE MEESTER, I. & DE WINTER, B. Y. 2018. Newly developed serine protease inhibitors decrease visceral hypersensitivity in a

post-inflammatory rat model for irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol*, 175, 3516-3533.

CHAPMAN, R. W., STANGHELLINI, V., GERAINT, M. & HALPHEN, M. 2013. Randomized clinical trial: macrogol/PEG 3350 plus electrolytes for treatment of patients with constipation associated with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*, 108, 1508-15.

CHEY, W. D., LEMBO, A. J. & ROSENBAUM, D. P. 2020. Efficacy of Tenapanor in Treating Patients With Irritable Bowel Syndrome With Constipation: A 12-Week, Placebo-Controlled Phase 3 Trial (T3MPO-1). *Am J Gastroenterol*, 115, 281-293.

CHEY, W. Y., JIN, H. O., LEE, M. H., SUN, S. W. & LEE, K. Y. 2001. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am J Gastroenterol*, 96, 1499-506.

COLE, K. S. & COLE, R. H. 1941. Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics. *The Journal of Chemical Physics*, 9, 341-351.

DINAN, T. G., QUIGLEY, E. M., AHMED, S. M., SCULLY, P., O'BRIEN, S., O'MAHONY, L., O'MAHONY, S., SHANAHAN, F. & KEELING, P. W. 2006. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology*, 130, 304-11.

DROSSMAN, D. A. 2006. Rome III: the new criteria. *Chin J Dig Dis*, 7, 181-5.

DROSSMAN, D. A., CHEY, W. D., JOHANSON, J. F., FASS, R., SCOTT, C., PANAS, R. & UENO, R. 2009. Clinical trial: lubiprostone in patients with constipation-associated irritable bowel syndrome--results of two randomized, placebo-controlled studies. *Aliment Pharmacol Ther*, 29, 329-41.

EFSKIND, P. S., BERNKLEV, T. & VATN, M. H. 1996. A double-blind placebo-controlled trial with loperamide in irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol*, 31, 463-8.

EPPLER, H. J., AMASHEH, S., MANKERTZ, J., GOLTZ, M., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2000. Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278, G718-24.

EPPLE, H. J., SCHULZKE, J. D., SCHMITZ, H. & FROMM, M. 1995. Enzyme- and mineralocorticoid receptor-controlled electrogenic Na⁺ absorption in human rectum in vitro. *Am J Physiol*, 269, G42-8.

FARKAS, K., YERUVA, S., RAKONCZAY, Z., JR., LUDOLPH, L., MOLNAR, T., NAGY, F., SZEPE, Z., SCHNUR, A., WITTMANN, T., HUBRICHT, J., RIEDERER, B., VENGLOVECZ, V., LAZAR, G., KIRALY, M., ZSEMBERY, A., VARGA, G., SEIDLER, U. & HEGYI, P. 2011. New therapeutic targets in ulcerative colitis: the importance of ion transporters in the human colon. *Inflamm Bowel Dis*, 17, 884-98.

FIRSOV, D., GAUTSCHI, I., MERILLAT, A. M., ROSSIER, B. C. & SCHILD, L. 1998. The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J*, 17, 344-52.

FROMM M, M. M., GÜNZEL D. 2004. Praktikum experimentelle Physiologie für Mediziner und Zahnmediziner – Skript zum Praktikum Epithelien/GI-Trakt.

FROMM, M., SCHULZKE, J. D. & HEGEL, U. 1985. Epithelial and subepithelial contributions to transmural electrical resistance of intact rat jejunum, in vitro. *Pflugers Arch*, 405, 400-2.

FURUSE, M., FUJITA, K., HIIRAGI, T., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141, 1539-50.

FURUSE, M., HATA, M., FURUSE, K., YOSHIDA, Y., HARATAKE, A., SUGITANI, Y., NODA, T., KUBO, A. & TSUKITA, S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 156, 1099-111.

FURUSE, M., HIRASE, T., ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S., TSUKITA, S. & TSUKITA, S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123, 1777-88.

FURUSE, M., ITOH, M., HIRASE, T., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S., TSUKITA, S. & TSUKITA, S. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*, 127, 1617-26.

GECSE, K., ROKA, R., FERRIER, L., LEVEQUE, M., EUTAMENE, H., CARTIER, C., AIT-BELGNAOUI, A., ROSZTOCZY, A., IZBEKI, F., FIORAMONTI, J., WITTMANN, T. & BUENO, L. 2008. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut*, 57, 591-9.

GIBSON, P. R. & SHEPHERD, S. J. 2005. Personal view: food for thought--western lifestyle and susceptibility to Crohn's disease. The FODMAP hypothesis. *Aliment Pharmacol Ther*, 21, 1399-409.

GITTER, A. H., BENDELDT, K., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2000. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J*, 14, 1749-53.

GITTER, A. H., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 1998. Impedance analysis for the determination of epithelial and subepithelial resistance in intestinal tissues. *J Biochem Biophys Methods*, 37, 35-46.

GITTER, A. H., SCHULZKE, J. D., SORGENFREI, D. & FROMM, M. 1997. Ussing chamber for high-frequency transmural impedance analysis of epithelial tissues. *J Biochem Biophys Methods*, 35, 81-8.

GORARD, D. A., LIBBY, G. W. & FARTHING, M. J. 1995. Effect of a tricyclic antidepressant on small intestinal motility in health and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci*, 40, 86-95.

GRABAUSKAS, G., WU, X., GAO, J., LI, J. Y., TURGEON, D. K. & OWYANG, C. 2020. Prostaglandin E2, Produced by Mast Cells in Colon Tissues From Patients With Irritable Bowel Syndrome, Contributes to Visceral Hypersensitivity in Mice. *Gastroenterology*, 158, 2195-2207 e6.

GUILARTE, M., SANTOS, J., DE TORRES, I., ALONSO, C., VICARIO, M., RAMOS, L., MARTINEZ, C., CASELLAS, F., SAPERAS, E. & MALAGELADA, J. R. 2007. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut*, 56, 203-9.

GUNZEL, D., FLORIAN, P., RICHTER, J. F., TROEGER, H., SCHULZKE, J. D., FROMM, M. & GITTER, A. H. 2006. Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R1496-507.

- HALVORSON, H. A., SCHLETT, C. D. & RIDDLE, M. S. 2006. Postinfectious irritable bowel syndrome--a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 101, 1894-9; quiz 1942.
- HARRIS, J. B., LAROCQUE, R. C., QADRI, F., RYAN, E. T. & CALDERWOOD, S. B. 2012. Cholera. *Lancet*, 379, 2466-2476.
- HE, P. & YUN, C. C. 2010. Mechanisms of the regulation of the intestinal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 238080.
- HOUGHTON, L. A., LEA, R., AGRAWAL, A., REILLY, B. & WHORWELL, P. J. 2006. Relationship of abdominal bloating to distention in irritable bowel syndrome and effect of bowel habit. *Gastroenterology*, 131, 1003-10.
- HOVDENAK, N. 1987. Loperamide treatment of the irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 130, 81-4.
- HUNGIN, A. P., WHORWELL, P. J., TACK, J. & MEARIN, F. 2003. The prevalence, patterns and impact of irritable bowel syndrome: an international survey of 40,000 subjects. *Aliment Pharmacol Ther*, 17, 643-50.
- JASTI, J., FURUKAWA, H., GONZALES, E. B. & GOUAUX, E. 2007. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*, 449, 316-23.
- KRUG, S. 2009. Tricellulin und seine Funktion in der trizellulären Tight Junction von Epithelzellen. *Dissertation*.
- KRUG, S. M., AMASHEH, S., RICHTER, J. F., MILATZ, S., GUNZEL, D., WESTPHAL, J. K., HUBER, O., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2009. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell*, 20, 3713-24.
- KRUG, S. M., BOJARSKI, C., FROMM, A., LEE, I. M., DAMES, P., RICHTER, J. F., TURNER, J. R., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2018. Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor alpha2, affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis. *Mucosal Immunol*, 11, 345-356.
- KRUG, S. M., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2014. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 36, 166-76.

- KUMAR, D. & WINGATE, D. L. 1985. The irritable bowel syndrome: a paroxysmal motor disorder. *Lancet*, 2, 973-7.
- KUNZELMANN, K. & MALL, M. 2002. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*, 82, 245-89.
- KYRIAKIS, J. M. 2007. The integration of signaling by multiprotein complexes containing Raf kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1238-47.
- LASSER, R. B., BOND, J. H. & LEVITT, M. D. 1975. The role of intestinal gas in functional abdominal pain. *N Engl J Med*, 293, 524-6.
- LAWAL, A., KERN, M., SIDHU, H., HOFMANN, C. & SHAKER, R. 2006. Novel evidence for hypersensitivity of visceral sensory neural circuitry in irritable bowel syndrome patients. *Gastroenterology*, 130, 26-33.
- LEDOUSSAL, C., WOO, A. L., MILLER, M. L. & SHULL, G. E. 2001. Loss of the NHE2 Na(+)/H(+) exchanger has no apparent effect on diarrheal state of NHE3-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G1385-96.
- LIEBREGTS, T., ADAM, B., BREDACK, C., ROTH, A., HEINZEL, S., LESTER, S., DOWNIE-DOYLE, S., SMITH, E., DREW, P., TALLEY, N. J. & HOLTMANN, G. 2007. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 132, 913-20.
- LOBO DE SA, F. D., BUTKEVYCH, E., NATTRAMILARASU, P. K., FROMM, A., MOUSAVI, S., MOOS, V., GOLZ, J. C., STINGL, K., KITTLER, S., SEINIGE, D., KEHRENBURG, C., HEIMESAAT, M. M., BERESWILL, S., SCHULZKE, J. D. & BUCKER, R. 2019. Curcumin Mitigates Immune-Induced Epithelial Barrier Dysfunction by *Campylobacter jejuni*. *Int J Mol Sci*, 20.
- LONGSTRETH, G. F., THOMPSON, W. G., CHEY, W. D., HOUGHTON, L. A., MEARIN, F. & SPILLER, R. C. 2006. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*, 130, 1480-91.
- LOVELL, R. M. & FORD, A. C. 2012a. Effect of gender on prevalence of irritable bowel syndrome in the community: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 107, 991-1000.
- LOVELL, R. M. & FORD, A. C. 2012b. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10, 712-721 e4.

- MANNING, A. P., THOMPSON, W. G., HEATON, K. W. & MORRIS, A. F. 1978. Towards positive diagnosis of the irritable bowel. *Br Med J*, 2, 653-4.
- MATTER, K. & BALDA, M. S. 1999. Occludin and the functions of tight junctions. *Int Rev Cytol*, 186, 117-46.
- MAXWELL, P. R., RINK, E., KUMAR, D. & MENDALL, M. A. 2002. Antibiotics increase functional abdominal symptoms. *Am J Gastroenterol*, 97, 104-8.
- MEARIN, F., LACY, B. E., CHANG, L., CHEY, W. D., LEMBO, A. J., SIMREN, M. & SPILLER, R. 2016. Bowel Disorders. *Gastroenterology*.
- MENEES, S. B., MANEERATTANNAPORN, M., KIM, H. M. & CHEY, W. D. 2012. The efficacy and safety of rifaximin for the irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 107, 28-35; quiz 36.
- MONSBAKKEN, K. W., VANDVIK, P. O. & FARUP, P. G. 2006. Perceived food intolerance in subjects with irritable bowel syndrome-- etiology, prevalence and consequences. *Eur J Clin Nutr*, 60, 667-72.
- MOON, C., ZHANG, W., SUNDARAM, N., YARLAGADDA, S., REDDY, V. S., ARORA, K., HELMRATH, M. A. & NAREN, A. P. 2015. Drug-induced secretory diarrhea: A role for CFTR. *Pharmacol Res*, 102, 107-112.
- MOORE, J. W. 1975. Membranes, ions, and impulses. Dedication to Kacy Cole. *Fed Proc*, 34, 1317.
- NIAZ, S. K., SANDRASEGARAN, K., RENNY, F. H. & JONES, B. J. 1997. Postinfective diarrhoea and bile acid malabsorption. *J R Coll Physicians Lond*, 31, 53-6.
- PIPER, W. 2012. *Innere Medizin*, Springer Berlin Heidelberg.
- PRIOR, A. & READ, N. W. 1993. Reduction of rectal sensitivity and post-prandial motility by granisetron, a 5 HT₃-receptor antagonist, in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, 7, 175-80.
- PUCKETT, J. & SOOP, M. 2012. Optimizing colonoscopy preparation: the role of dosage, timing and diet. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 15, 499-504.
- SANDLE, G. I. 1989. Segmental heterogeneity of basal and aldosterone-induced electrogenic Na transport in human colon. *Pflugers Arch*, 414, 706-12.

- SANDLE, G. I., HIGGS, N., CROWE, P., MARSH, M. N., VENKATESAN, S. & PETERS, T. J. 1990. Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology*, 99, 97-105.
- SCHIFFERDECKER, E. & FROMTER, E. 1978. The AC impedance of Necturus gallbladder epithelium. *Pflugers Arch*, 377, 125-33.
- SCHMIDT, T., HACKELSBERGER, N., WIDMER, R., MEISEL, C., PFEIFFER, A. & KAEISS, H. 1996. Ambulatory 24-hour jejunal motility in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol*, 31, 581-9.
- SCHMITZ, H., BARMEYER, C., FROMM, M., RUNKEL, N., FOSS, H. D., BENTZEL, C. J., RIECKEN, E. O. & SCHULZKE, J. D. 1999. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 116, 301-9.
- SCHULTHEIS, P. J., CLARKE, L. L., MENETON, P., MILLER, M. L., SOLEIMANI, M., GAWENIS, L. R., RIDDLE, T. M., DUFFY, J. J., DOETSCHMAN, T., WANG, T., GIEBISCH, G., ARONSON, P. S., LORENZ, J. N. & SHULL, G. E. 1998. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet*, 19, 282-5.
- SCOTT, L. J. & PERRY, C. M. 1999. Tegaserod. *Drugs*, 58, 491-6; discussion 497-8.
- SHEPHERD, S. J., LOMER, M. C. & GIBSON, P. R. 2013. Short-chain carbohydrates and functional gastrointestinal disorders. *Am J Gastroenterol*, 108, 707-17.
- SIMREN, M., CASTEDAL, M., SVEDLUND, J., ABRAHAMSSON, H. & BJORNSSON, E. 2000. Abnormal propagation pattern of duodenal pressure waves in the irritable bowel syndrome (IBS) [correction of (IBD)]. *Dig Dis Sci*, 45, 2151-61.
- SIMREN, M., MANSSON, A., LANGKILDE, A. M., SVEDLUND, J., ABRAHAMSSON, H., BENGTTSSON, U. & BJORNSSON, E. S. 2001. Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome. *Digestion*, 63, 108-15.
- SIMREN, M., PALSSON, O. S. & WHITEHEAD, W. E. 2017. Update on Rome IV Criteria for Colorectal Disorders: Implications for Clinical Practice. *Curr Gastroenterol Rep*, 19, 15.

- SINGH, S. K., BINDER, H. J., BORON, W. F. & GEIBEL, J. P. 1995. Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. *J Clin Invest*, 96, 2373-9.
- SINHA, L., LISTON, R., TESTA, H. J. & MORIARTY, K. J. 1998. Idiopathic bile acid malabsorption: qualitative and quantitative clinical features and response to cholestyramine. *Aliment Pharmacol Ther*, 12, 839-44.
- SONODA, N., FURUSE, M., SASAKI, H., YONEMURA, S., KATAHIRA, J., HORIGUCHI, Y. & TSUKITA, S. 1999. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*, 147, 195-204.
- SOUNDARARAJAN, R., PEARCE, D. & ZIERA, T. 2012. The role of the ENaC-regulatory complex in aldosterone-mediated sodium transport. *Mol Cell Endocrinol*, 350, 242-7.
- SPILLER, R. 2006. Role of motility in chronic diarrhoea. *Neurogastroenterol Motil*, 18, 1045-55.
- SPILLER, R. C., JENKINS, D., THORNLEY, J. P., HEBDEN, J. M., WRIGHT, T., SKINNER, M. & NEAL, K. R. 2000. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut*, 47, 804-11.
- STRATER, J., WELLISCH, I., RIEDL, S., WALCZAK, H., KORETZ, K., TANDARA, A., KRAMMER, P. H. & MOLLER, P. 1997. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 113, 160-7.
- THABANE, M., KOTTACHCHI, D. T. & MARSHALL, J. K. 2007. Systematic review and meta-analysis: The incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, 26, 535-44.
- TORNBLOM, H., LINDBERG, G., NYBERG, B. & VERESS, B. 2002. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 123, 1972-9.
- USSING, H. H. & ZERAHN, K. 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*, 23, 110-27.

VAN ITALLIE, C., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 107, 1319-27.

WEDLAKE, L., A'HERN, R., RUSSELL, D., THOMAS, K., WALTERS, J. R. & ANDREYEV, H. J. 2009. Systematic review: the prevalence of idiopathic bile acid malabsorption as diagnosed by SeHCAT scanning in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, 30, 707-17.

WEN, H., WATRY, D. D., MARCONDES, M. C. & FOX, H. S. 2004. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol*, 24, 8408-17.

XIN, B. & WANG, H. 2011. Multiple sequence variations in SLC5A1 gene are associated with glucose-galactose malabsorption in a large cohort of Old Order Amish. *Clin Genet*, 79, 86-91.

ZEISSIG, S., BERGANN, T., FROMM, A., BOJARSKI, C., HELLER, F., GUENTHER, U., ZEITZ, M., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2008. Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 134, 1436-47.

ZEISSIG, S., BURGEL, N., GUNZEL, D., RICHTER, J., MANKERTZ, J., WAHNSCHAFFE, U., KROESEN, A. J., ZEITZ, M., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 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. *Gut*, 56, 61-72.

Leitlinie:

Layer et al.: S3-Leitlinie Reizdarmsyndrom: Definition, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Stand: 2010.

7. Anhang

7.1. Erklärung der Selbstständigkeit

„Ich, Karem Awad, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Epitheliale Barrierefunktion des Kolons beim Reizdarmsyndrom des Mischtyps“; „Epithelial barrier function of the colon in mixed type-irritable bowel syndrome“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7.2. Lebenslauf

Karem Awad

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.3. Verzeichnis der eigenen Publikationen

- Barmeyer C, Erko I, **Awad K**, Fromm A, Bojarski C, Meissner S, Loddenkemper C, Kerick M, Siegmund B, Fromm M, Schweiger M, Schulzke JD, Epithelial barrier dysfunction in lymphocytic colitis through cytokine-dependent internalization of claudin-5 and -8. J. Gastroenterol, 2017. 52(10): 1090-1100.

7.4. Danksagung

In erster Linie möchte ich Prof. Dr. med. Jörg-Dieter Schulzke danken, der mir dieses Dissertationsthema angeboten und mir die Möglichkeit gegeben hat, meine wissenschaftliche Karriere in seinem Institut voranzubringen. Ich danke ihm herzlich für seine kontinuierliche Unterstützung und Betreuung, sowie für seine immer vorhandene Diskussionsbereitschaft und Hartnäckigkeit, welche das Abschließen dieser Arbeit schließlich ermöglicht hat. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. rer. nat. Roland Bücken und PD Dr. med. Christian Barmeyer für die ausgezeichnete Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Ich danke ihnen für die vielen Vorschläge und Anregungen sowie für ihren ansteckenden Optimismus und ihre gefühlt unendliche Geduld. Weiterhin möchte ich PD Dr. med. Christian Bojarski einen großen Dank aussprechen. Er hat für mich über zwei Jahre lang histologisches Material im Rahmen von Koloskopien zur Verfügung gestellt und somit erst die Grundlage für meine Experimente geliefert. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. In gleicher Weise möchte ich mich bei PD Dr. med. Michael Schumann bedanken, der stets Bereitschaft zeigte, für die Biopsieentnahmen einzuspringen, wenn Herr Dr. Bojarski verhindert war. Bei Ihm möchte ich mich besonders auch für sein strukturiertes und zielführendes Mentoring bedanken. PD Dr. rer. medic. Rita Rosenthal danke ich für die motivierende Zusprache, wenn ich an die Grenzen meiner Frustrationstoleranz kam, für die konstruktiven Gespräche sowie für ihre exzellente Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs. Besonders danken möchte ich auch Prof. Dr. rer. nat. Dorothee Günzel und PD Dr. rer. nat. Jörg Piontek, auf deren Hilfe ich stets vertrauen konnte bei größeren sowie auch kleineren technischen Problemen an der Ussing-Kammer und am konfokalen Lasermikroskop. Des Weiteren möchte ich In-Fah Lee, Britta Jebautzke und Anja Fromm meinen Dank äußern, die meine Arbeit durch das Anlernen der Labormethoden und die tatkräftige experimentelle Hilfestellung unterstützten. Ohne sie hätten viele Experimente dieser Arbeit nicht gelingen können. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Dr. med. Paul Tangermann und Cornelia Krohn bedanken, die zu Beginn meiner Arbeit eine klinische Studie zum Reizdarmsyndrom leiteten und mir in diesem Rahmen regelmäßig Patienten mit Reizdarmsyndrom vorstellten, die ich für meine Untersuchungen rekrutieren konnte. Ich möchte mich bei allen anderen hier nicht explizit genannten Kolleginnen und Kollegen der Klinischen Physiologie für den herzlichen Empfang und die lehrreiche und kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Besonderer Dank gilt der Sonnenfeld Berlin Stiftung für die finanzielle Unterstützung der Arbeit durch

Vergabe des Abschlussstipendiums. Ein abschließender Dank geht an meine Familie und Freunde für ihre Geduld, Ermutigung und Vertrauen in den Erfolg dieser Arbeit.