

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. Jobst Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Bedeutung von
 α -Synuclein
im enterischen Nervensystem**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
TOBIAS FRICKE
aus Hamburg

Kiel 2013

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Martina Böttner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peer Wulff

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2015

Zum Druck genehmigt,

Kiel, den 02.06.2014

gezeichnet: Prof. Dr. Johann Roider

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Aufbau des Gastrointestinaltraktes.....	1
1.1.1 Makroskopischer Aufbau und Funktion.....	1
1.1.2 Histologischer Aufbau.....	1
1.2 Enterisches Nervensystem (ENS).....	2
1.2.1 Einführung	2
1.2.2 Anatomie, Histologie und Funktionen des ENS	3
1.2.3 GDNF im enterischen Nervensystem	5
1.3 Die Prinzipien der synaptische Transmission	5
1.3.1 Synaptische Vesikel.....	5
1.3.2 SNARE-Proteine.....	5
1.4 α -Synuclein	7
1.4.1 Charakteristika von α -Synuclein	7
1.4.2 Die Synuclein Protein- Familie.....	8
1.4.3 Synucleinopathien	8
1.4.4 Funktionen von α -Synuclein	9
1.4.5 α -Synuclein im ENS.....	9
1.5 ENS-assoziierte Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes	10
1.5.1 Morbus Hirschsprung	10
1.5.2 Die Divertikelkrankheit.....	10
1.6 Fragestellung und Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Humane Gewebe.....	13
2.1.1.1 Genehmigung der Ethik-Kommission	13
2.1.1.2 Kontrollgewebe.....	13
2.1.1.3 Morbus Hirschsprung Gewebe	13
2.1.1.4 Divertikulitis Gewebe	13
2.1.2 Zellkulturen	14
2.1.3 Chemikalien.....	14
2.1.4 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	15

2.1.5 Kits	16
2.1.6 Antikörper	16
2.1.7 Nucleotide, Wachstumsfaktoren und Enzyme	17
2.1.8 Puffer und Lösungen	18
2.2 Methoden	18
2.2.1 Prozessierung des humanen Gewebes	18
2.2.2 Isolierung und Kultivierung von enterischen Nervenzellen	19
2.2.3 Laser capture microdissection	20
2.2.4 mRNA-Expressionsstudien	21
2.2.4.1 RNA-Isolierung	21
2.2.4.2 cDNA-Synthese	22
2.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion	23
2.2.4.4 Auswertung der Daten	25
2.2.5 Immunhistochemie	26
2.2.5.1 Prinzipien der Immunhistochemie	26
2.2.5.2 LSAB-Protokoll für humane Gewebe	26
2.2.5.3 Prinzipien der morphometrischen Messung	28
2.2.5.4 Prinzipien der Dual-Label-Fluoreszenz-Immunhistochemie	29
2.2.5.5 Fluoreszenz-Immunhistochemie-Protokoll für humanes Gewebe	29
2.2.5.6 Fluoreszenz-Protokoll für Zellkulturen	31
2.2.6 Statistik	33
3 Ergebnisse	34
3.1 α -Synuclein-Expression im humanen Gewebe	34
3.1.1 mRNA-Expression von α -Synuclein in humanen myenterischen Ganglien	34
3.1.2 Dual-Label Immunhistochemie für α -Synuclein im humanen Kolon	35
3.2 α -Synuclein-Expression in kultivierten enterischen Neuronen	39
3.2.1 mRNA-Expression von α -Synuclein in kultivierten enterischen Neuronen in Abhängigkeit von GDNF	40
3.2.2 Dual-Label-Immunzytochemie für α -Synuclein in kultivierten enterischen Neuronen	41
3.3 α -Synuclein-Expression bei Patienten mit Morbus Hirschsprung	44
3.3.1 Vergleich von normoganglionären und aganglionären Abschnitten bei	

Morbus Hirschsprung Patienten	46
3.4 α -Synuclein-Expression bei Patienten mit Divertikulitis.....	47
3.4.1 mRNA-Expression von α -Synuclein bei Divertikulitis-Patienten und Kontrollgruppe	47
3.4.2 Immunhistochemischer Vergleich des ENS zwischen Divertikulitis- und Kontrollpatienten mittels PGP 9.5 und α -Synuclein	48
3.4.2 Morphometrie der Nervenfaserdichte in Längsmuskulatur und Ringmuskulatur des humanen Kolons bei Divertikulitis-Patienten und Kontrollgruppe	50
3.4.3 Immunhistochemischer Vergleich des ENS von Divertikulitis- und Kontrollpatienten mit Antikörpern gegen phosphoryliertes α -Synuclein.....	52
4 Diskussion	54
4.1 α -Synuclein-Expression in enterischen Neuronen	54
4.2 α -Synuclein in synaptischen Vesikel	56
4.3 α -Synuclein und die SNARE-Proteine.....	58
4.4 Beeinflussungen der α -Synuclein-Expression durch GDNF.....	60
4.5 Expression von α -Synuclein bei Patienten mit Morbus Hirschsprung	61
4.6 Expression von α -Synuclein bei Patienten mit Divertikulitis	62
4.7 Die Bedeutung des enterischen α -Synucleins für die Entstehung von Morbus Parkinson.....	65
4.8 Aussichten.....	66
5 Zusammenfassung.....	68
6 Literaturverzeichnis.....	70
7 Danksagung	82
8 Lebenslauf.....	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schema der Wandschichten des Verdauungskanals	2
Abbildung 1.2: Flächenhafte Darstellung des Plexus myentericus	3
Abbildung 1.3: Dreidimensionales Schema des ENS im humanen Kolon	4
Abbildung 1.4: Der molekulare Apparat der synaptischen Transmitterfreisetzung	6
Abbildung 2.1: Laser capture microdissection eines myenterischen Ganglions	21
Abbildung 2.2: Markierung von Nervenfasern zur morphometrischen Messung.....	29
Abbildung 3.1: Relative mRNA-Expression von α -Synuclein in myenterischen Ganglien des humanen Kolons.....	34
Abbildung 3.2: Dual-Label-Immunhistochemie für α -Synuclein und HuC/D im humanen ENS	35
Abbildung 3.3: Dual-Label-Immunhistochemie für α -Synuclein und PGP 9.5 im humanen ENS	36
Abbildung 3.4: Dual-Label-Immunhistochemie für α -Synuclein und Synaptophysin im humanen ENS	37
Abbildung 3.5: Dual-Label-Immunhistochemie für α -Synuclein und Synaptobrevin im humanen ENS	38
Abbildung 3.6: Dual-Label-Immunhistochemie von α -Synuclein und SNAP-25 im humanen ENS	39
Abbildung 3.7: mRNA-Expression von α -Synuclein in kultivierten enterischen Neuronen in Abhängigkeit des neurotrophen Faktors GDNF	40
Abbildung 3.8: Fluoreszenz-Immunzytochemie für α -Synuclein und PGP 9.5 in kultivierten enterischen Neuronen	41
Abbildung 3.9: Fluoreszenz-Immunzytochemie von α -Synuclein und Synaptophysin in kultivierten enterischen Neuronen	42
Abbildung 3.10: Fluoreszenz-Immunzytochemie von α -Synuclein und Synaptobrevin in kultivierten enterischen Neuronen	43
Abbildung 3.11: Fluoreszenz-Immunzytochemie von α -Synuclein und SNAP-25 in kultivierten enterischen Neuronen	44
Abbildung 3.12: Immunhistochemie für PGP 9.5 im Kolon von Patienten mit Morbus Hirschsprung.	45

Abbildung 3.13: Immunhistochemie für α -Synuclein im Kolon von Patienten mit Morbus Hirschsprung.	46
Abbildung 3.14: α -Synuclein-mRNA-Expression in der <i>Tunica muscularis</i> von Patienten mit Divertikulitis	48
Abbildung 3.15: Immunhistochemie für PGP 9.5 im Kolon von Patienten mit Divertikulitis	49
Abbildung 3.16: Immunhistochemie für α -Synuclein im Kolon von Patienten mit Divertikulitis	50
Abbildung 3.17: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der Nervenfasern in Ring- und Längsmuskulatur im Vergleich.....	51
Abbildung 3.18: Immunhistochemie für phosphoryliertes α -Synuclein im im Kolon von Patienten mit Divertikulitis	52
Abbildung 3.19: Immunhistochemie von phosphoryliertem α -Synuclein im im Kolon von Patienten mit Divertikulitis	52
Abbildung 3.20: Prozentualer Anteil der immunreaktiven Fläche von phosphoryliertem α -Synuclein in myenterischen Ganglien bei Divertikulitis	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.....	14
Tabelle 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte	15
Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Kits	16
Tabelle 5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper	17
Tabelle 6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Nucleotide, Wachstums-faktoren und Enzyme.....	17
Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen	18
Tabelle 8: Protokoll der Paraffineinbettung	19
Tabelle 9: Protokoll der Reversen Transkription (+DNase-Verdau)	22
Tabelle 10: Protokoll der qPCR.....	24
Tabelle 11: Verwendete Primer der qPCR	25
Tabelle 12: Protokoll der LSAB-Methode für humane Paraffinschnitte	27
Tabelle 13: Antikörper der LSAB-Methode für humane Paraffinschnitte	28
Tabelle 14: Protokoll der Fluoreszenz-Immunhistochemie für humane Paraffinschnitte	30
Tabelle 15: Antikörper der Fluoreszenz-Methode an humanen Paraffinschnitten	31
Tabelle 16: Protokoll der Fluoreszenz-Methode für Zellkulturen	32
Tabelle 17: Antikörper der Fluoreszenz-Immunzytochemie an enterischen Nervenzellkulturen	32

Abkürzungsverzeichnis

6FAM	6-(Carboxy-Fluorescein)
al.	andere
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
cm	Zentimeter
CT	threshold cycle
D	Deutschland
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIV	Divertikelkrankheit
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENS	Enterisches Nervensystem
Fc	kristallines Fragment
FRET	fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunden
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
hDAT	Humaner Dopamintransporter
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl- Transferase
HuC/D	human neuronal protein HuC/HuD
ICC	Interstitielle Zellen von Cajal

Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KG	Kontrollgruppe
l	Liter
LCM	Laser capture microdissection
LM	Längsmuskulatur
LSAB	labeled Strept-Avidin-Biotin- Methode
M.	Morbus
MEM	minimum essential medium
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
n	Einheiten
NAC	non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid
NACP	precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ns	Nanosekunde
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OP	Operation
p	Signifikanzwert
P	Postnatahtag
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEN	Polyethylen Naphtalat
PGP 9.5	protein-gene-product 9.5
PNS	Peripheres Nervensystem
qPCR	Quantitative Polymerase- Kettenreaktion

RM	Ringmuskulatur
RNA	Ribonucleinsäure
RT	reverse Transkription
SEM	Standard Error of the Mean
SNAP-25	synaptosomal associated protein 25
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBS	Tris buffered saline

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
t-SNARE	target synaptosome-associated protein receptor
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
vs.	versus
v-SNARE	vesicle synaptosome-associated protein receptor
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Aufbau des Gastrointestinaltraktes

1.1.1 Makroskopischer Aufbau und Funktion

Das Verdauungssystem (*Systema digestorium*) besteht aus dem Verdauungskanal und den extramuralen Drüsen (Mundspeicheldrüsen, Bauchspeicheldrüse und Leber). Der Verdauungskanal gliedert sich in den Kopfdarm (Mundhöhle und Rachen) und den Rumpfdarm.

Der Rumpfdarm wiederum gliedert sich in den *Ösophagus*, der als Transportorgan dient, und den Magen-Darm-Kanal, der in weitere Abschnitte gegliedert wird.

Der Dünndarm (*Interstinum tenue*) bildet mit 4-6 Metern den längsten Abschnitt des Magen-Darm-Kanals. Er wird in 3 Abschnitte unterteilt: Zwölffingerdarm (*Duodenum*), Leerdarm (*Jejunum*) und Krummdarm (*Ileum*). Im Dünndarm wird der Hauptteil der Nahrung verdaut und resorbiert. Zu diesem Zweck wird die Epitheloberfläche durch Kerckring-Falten (*Plicae circulares*), Dünndarmzotten (*Villi intestinales*) und Mikrovilli stark vergrößert. Gleichzeitig bilden diese die Charakteristika des Dünndarms.

Der sich anschließende Dickdarm (*Interstinum crassum*) besteht aus 4 Abschnitten: Blinddarm (*Caecum*) mit dem Wurmfortsatz (*Appendix vermiformis*), Grimmdarm (*Colon*), Mastdarm (*Rectum*) und der Analkanal (*Canalis analis*). Die regionalen Besonderheiten des Kolons sind die weitgehend auf sogenannte Tänen beschränkte äußere Längsmuskulatur, Aussackungen (*Haustra coli*) und zipfelförmige Anhängsel (*Appendices epiploicae*). Die Hauptaufgaben des Dickdarmes sind die Resorption von Wasser und Elektrolyte sowie der weitere Abbau von Nährstoffen durch Bakterien (Drenckhahn et al. 2003).

1.1.2 Histologischer Aufbau

Die Wand des Magen-Darm-Kanals ist in allen Abschnitten grundsätzlich gleich aufgebaut. Die Schleimhaut (*Tunica mucosa*) mit den drei Schichten *Lamina epithelialis*, *Lamina propia* und *Lamina muscularis mucosae* bildet die innerste Schicht der Darmwand.

Unter dieser Schleimhaut liegt die *Tela submucosa*, welche sich durch lockeres Bindegewebe auszeichnet, in dem Blutgefäße, Lymphbahnen und Nervengeflechte verlaufen. In der *Tunica muscularis* sind quer und längs verlaufende glatte Muskelzellen angeordnet. In dieser Muskelschicht eingelagerte Nervengeflechte sorgen für eine koordinierte Innervation der Ring- und Längsmuskulatur, was zu einer

Darmperistaltik führt, durch die die Nahrung weiter transportiert wird (Lüllmann-Rauch 2009). Eine Übersicht über die einzelnen Schichten in den jeweiligen Abschnitten des Magen-Darm-Kanals ist in Abbildung 1.1 zu sehen.

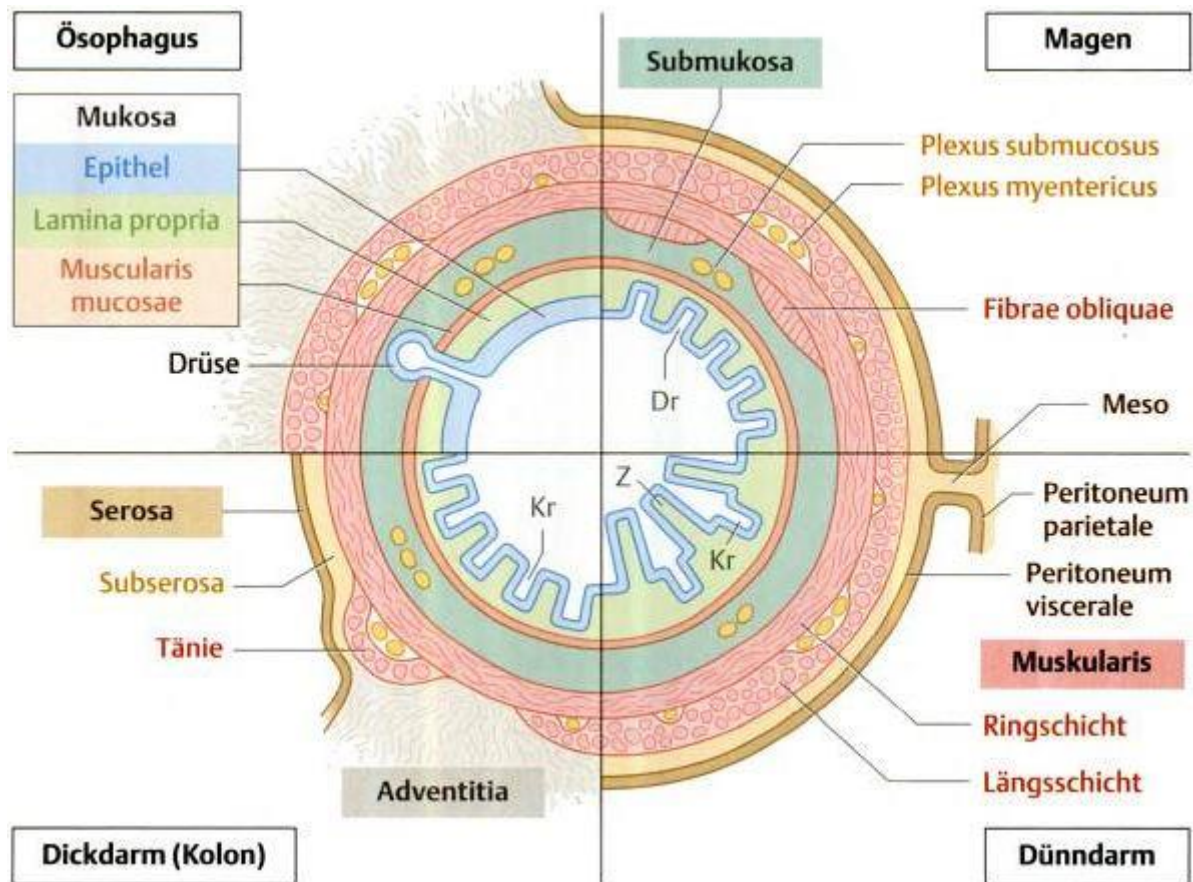


Abbildung 1.1: Schema der Wandschichten des Verdauungskanals
[Lüllmann-Rauch 2009], Entwurf: B. Kurz

1.2 Enterisches Nervensystem (ENS)

1.2.1 Einführung

Seit mehr als hundert Jahren ist bekannt, dass zwei Nervengeflechte im Gastrointestinaltrakt existieren. Im Jahr 1857 beschrieb Meissner einen Nervenplexus in der *Submucosa* (Meissner 1857). Wenige Jahre später wies Auerbach einen weiteren Nervenplexus zwischen den Muskelschichten nach (Auerbach 1862). Dieser *Plexus myentericus* ist in Abbildung 1.2 exemplarisch gezeigt. Neuronale und gliale Elemente bilden die Nervengeflechte dieses enterischen Nervensystems (ENS). Das ENS erstreckt sich vom *Ösophagus* bis zum *Anus* und innerviert zudem die Bauchspeicheldrüse, die Leber und die Gallenblase (Costa et al. 1987).

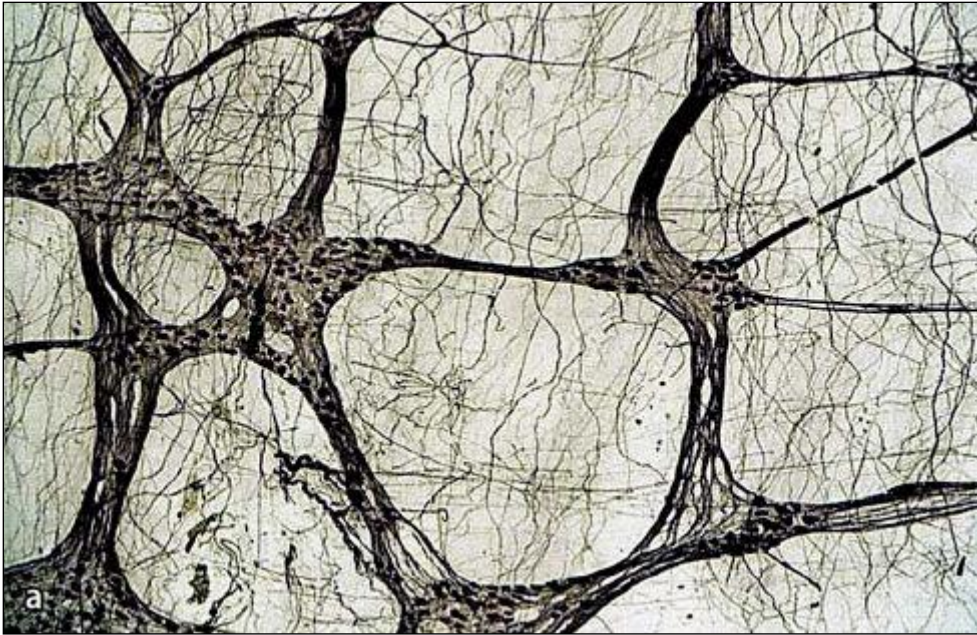


Abbildung 1.2: Flächenhafte Darstellung des Plexus myentericus

Häutchenpräparat, menschliches Kolon (adult), immunhistochemische Behandlung mit dem neuronalen Marker Protein-Gen-Produkt 9.5, 200x Vergrößerung [Wedel et al. 2007]

Aufgrund der Tatsache, dass das ENS mit über 150 Millionen Neuronen die größte Ansammlung von Nervenzellen außerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) darstellt, welche zudem unabhängig von diesem arbeiten, bezeichnet man das ENS als „second brain“ (Gershon 1981; Furness and Costa 1987; Wood 1987; Wood 1999). Koordination und Kontrolle der grundlegenden gastrointestinalen Funktionen, wie zum Beispiel Motilität, Resorption und Sekretion, stellen die wesentlichen Aufgaben des ENS dar (Surprenant 1994).

1.2.2 Anatomie, Histologie und Funktionen des ENS

Das ENS befindet sich in der Wand des GIT und besteht aus Nervenzellen, die in verschieden großen Ganglien organisiert sind, die wiederum durch interganglionäre Nervenfasern miteinander in Kontakt stehen. Diese neuronalen Netzwerke formen die beiden Hauptplexus, den luminal gelegenen *Plexus submucosus* innerhalb der *Tela submucosa* und den *Plexus myentericus* in der *Tunica muscularis* zwischen Längs- und Ringmuskulatur. Der *Plexus submucosus* lässt sich noch weiter unterteilen: *Plexus submucosus externus* (Schabadasch-Plexus), welcher der Ringmuskulatur anliegt, und *Plexus submucosus internus* (Meissner-Plexus), welcher in Nachbarschaft zur Schleimhaut liegt (Schabadasch 1930; Gunn 1968; Scheuermann and Stach 1984). Am menschlichen Kolon konnte basierend auf Befunden von Schnitt- und Schichtpräparaten ein Bauplan des ENS erstellt werden

(siehe Abbildung 1.3), der neben den genannten Plexus noch weitere, weitgehend nervenzellfreie Plexus einschließt (Wedel et al. 1999).

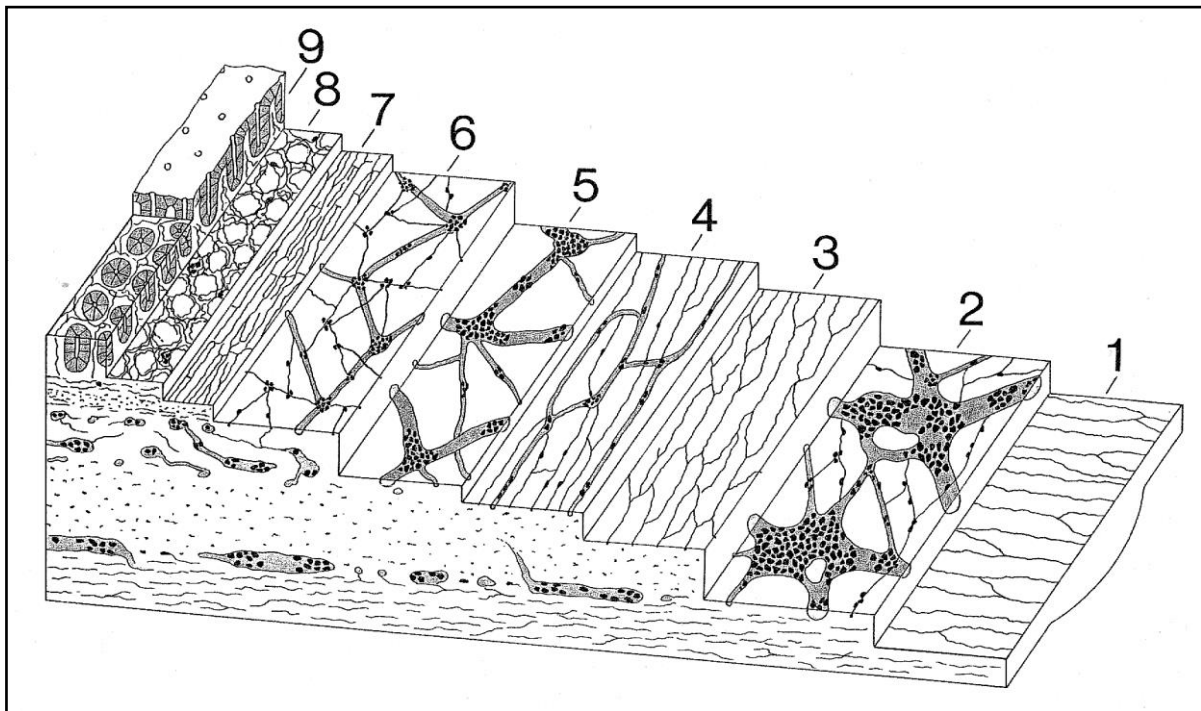


Abbildung 1.3: Dreidimensionales Schema des ENS im humanen Kolon

[Wedel et al. 1999] 1: Plexus muscularis longitudinalis; 2: Plexus myentericus; 3: Plexus muscularis circularis; 4: Plexus submucosus extremus; 5: Plexus submucosus externus; 6: Plexus submucosus internus; 7: Plexus muscularis mucosae; 8: Plexus mucosus subglandularis; 9: Plexus mucosus periglandularis

Die Neuronen des ENS lassen sich funktionell in sensorische Neurone, verschaltende Interneurone und motorische Neurone unterteilen. Diese Verschaltungen können als neuronale Kreisläufe bezeichnet werden und gewährleisten damit die Registrierung, Verarbeitung und Beantwortung von Reizen. Sensorische Neurone sind aufgrund ihrer Rezeptorfunktion in der Lage, thermische, chemische und mechanische Stimuli des GIT zu erfassen und diese an Interneurone, die den Hauptteil des ENS ausmachen, weiterzuleiten. Motorneurone, die ihre Informationen von den Interneuronen erhalten, stellen die Effektoren des ENS dar, wobei man zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen unterscheidet. Somit können Reaktionsmuster ausgelöst, erhalten oder gehemmt werden (Wood 1987). Als wesentliche Effektoren des ENS zählen im GIT die glatten Muskelzellen, das exkretorische und resorptive Epithel, die Blutgefäße sowie enteroendokrine und immunkompetente Zellen (Gabella 1976). Entsprechend zählen zu den gesteuerten Qualitäten unter anderem die Regulierung des Blutflusses der *Mucosa*, die Sekretion der Epithelzellen sowie der Wasser- und Ionentransport (Furness and Costa 1987).

Des Weiteren finden sich im ENS Gliazellen und Interstitielle Zellen von Cajal (ICC). Die ICC-Zellen sind fibroblastenähnliche Zellen, die als Schrittmacher und Vermittler zwischen ENS und Muskulatur wichtig sind (Ward 2000).

1.2.3 GDNF im enterischen Nervensystem

Der *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) ist ein entscheidendes Signalmolekül für die Entwicklung und das Überleben von zentralen und peripheren Neuronen (Airaksinen and Saarma 2002). GDNF ist aber auch für die Entwicklung und das Überleben von enterischen Neuronen wichtig. Eine GDNF-Ablation führt zu einem vollständigen Verlust von Nervenzellen im Darm, was erhebliche Motilitätsstörungen verursacht (Moore et al. 1996; Pichel et al. 1996; Sanchez et al. 1996). Vorarbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass kultivierte enterische Neurone ohne GDNF-Behandlung, kein oder nur kaum Wachstum aufweisen (Schafer and Mestres 1999).

1.3 Die Prinzipien der synaptische Transmission

1.3.1 Synaptische Vesikel

In Neuronen werden Neurotransmitter in synaptischen Vesikeln gespeichert, die bei Erregung durch Exozytose freigesetzt werden. Diese Freisetzung wird durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle reguliert (Ikeda and Bekkers 2009). Synaptophysin ist ein Vesikelprotein, welches auch als „major synaptic vesicle protein p38“ bekannt ist. Die exakte Funktion ist noch unbekannt. Es ist ein Glykoprotein, welches praktisch in allen Nervenzellen, die an der synaptischen Übertragung teilnehmen, vorkommt. Seine Allgegenwart in Synapsen macht man sich zu Nutze, um immunhistochemische Färbungen zur Quantifizierung von Synapsen durchzuführen (Calhoun et al. 1996).

Des Weiteren enthalten synaptische Vesikel zwei obligatorische Klassen von Proteinen: Transportproteine, die an der Neurotransmitter-Aufnahme beteiligt sind und „trafficking“-Proteine, die an Exozytose, Endozytose und Recycling beteiligen sind. Zu den Letzteren gehören auch die SNARE-Proteine (Augustine et al. 1999; Gasnier 2000).

1.3.2 SNARE-Proteine

In den späten achtziger Jahren wurden die SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*)-Proteine entdeckt, welche eine Schlüsselrolle für die Fusion biologischer Membranen und beim Transport

niedermolekularer Moleküle spielen. Viele SNAREs liegen überwiegend oder sogar selektiv in bestimmten subzellulären Kompartimenten vor. Beispiele hierfür sind SNAP-23 und SNAP-25 an der Plasmamembran, sowie Synaptobrevin in synaptischen und neurosekretorischen Vesikeln (Jahn and Scheller 2006).

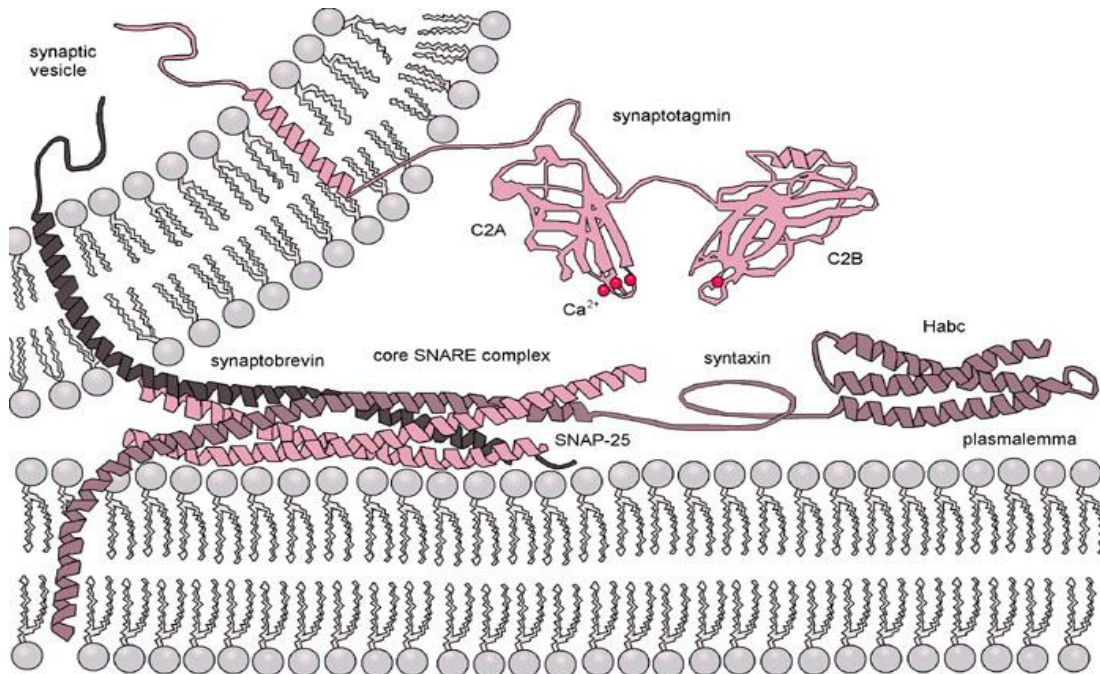


Abbildung 1.4: Der molekulare Apparat der synaptischen Transmitterfreisetzung
[Georgiev et al. 2007]

Beim Menschen sind 36 Vertreter der SNAREs bekannt. SNAREs befinden sich in gegenüberliegenden, fusionierenden Membranen und medieren die Fusion. Eine Formierung zu festen Helixbündeln führt zu einer dichten Verbindung der Membranen, welche verschmelzen sollen (Jahn and Scheller 2006). Eine Übersicht über die SNARE-Proteine an der synaptischen Membran ist in Abbildung 1.4 zu sehen. Ursprünglich wurde angenommen, dass es eine strikte Trennung zwischen SNAREs auf der Donor- und der Akzeptor-Seite gibt, was dazu geführt hat, dass sie in v-SNAREs (vesicle-membrane SNAREs) und t-SNAREs (target-membrane SNAREs) eingeteilt wurden. Unter anderen wurde Synaptobrevin als v-SNARE und SNAP-25 als t-SNARE identifiziert (Sollner et al. 1993).

Die Fusion wird durch einen molekularen Reiz getriggert (Sudhof 2004). Freie SNAREs binden an viele verschiedene Proteine. Welche Bedeutung diese Bindungen haben, ist noch nicht vollständig geklärt. Denkbar sind Aufgaben bei der Sortierung, dem Recycling, der Rekrutierung von SNAREs beim Vesikelverkehr und der Bildung von Docking-Komplexen (Jahn and Scheller 2006).

1.4 α -Synuclein

1.4.1 Charakteristika von α -Synuclein

Die Proteinsequenz von α -Synuclein wurde zuerst 1988 von Maroteaux im kalifornischen Zitterrochen (*Torpedo californica*) beschrieben (Maroteaux et al. 1988). Die Bezeichnung resultiert aus der damals identifizierten synaptischen und nukleären Lokalisation. Unabhängig davon wurde 1993 eine 35 Aminosäuren große Sequenz in Amyloid Plaques von Morbus Alzheimer Patienten nachgewiesen, die einen Teil eines 140 AS großen Vorläuferprotein NACP oder auch „*non-amyloid α component precursor protein*“ repräsentierte (Ueda et al. 1993). 1995 wurde ein Protein im Zebrafinken entdeckt, welches homolog zum NACP war. Man nannte es Synelfin (George et al. 1995). Nachfolgend wurden Synuclein, NACP und Synelfin als dasselbe Protein identifiziert, welches als α -Synuclein bezeichnet wurde.

α -Synuclein ist ein 140 AS großes Protein (Ueda et al. 1993), welches 0,5-1% aller zytosolischen Proteine in Neuronen ausmacht (Iwai et al. 1995). In nativer Form ist es ein gefaltetes Tetramer von 58 kDa, mit einer α -helix-Struktur (Bartels et al. 2011). Dieses Protein ist jedoch in der Lage, verschiedenste Konformationen anzunehmen, weshalb es auch als Chamäleon bezeichnet wird (Silva et al. 2012). α -Synuclein liegt teilweise frei-, teilweise Membran-assoziiert vor (McLean et al. 2000). Etwa 15% des α -Synucleins in der Zelle findet sich membrangebunden. Die membrangebundene Form hat eine stärkere Tendenz, Aggregate zu bilden (Lee et al. 2002). α -Synuclein befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran (Liu et al. 2009), bindet aber auch an Vesikel, die saure Phospholipide enthalten (Davidson et al. 1998).

α -Synuclein besteht aus drei Abschnitten, die sich in Struktur und Funktion unterscheiden:

Der erste Abschnitt besteht aus einem amphipathischen N-Terminus (AS 1-65), dem die hydrophobe NAC-Region (AS 66-95) und der saure C-Terminus (AS 96-140) folgen (Clayton and George 1998).

Die NAC-Domäne ist für die Bildung und Aggregation der α -ähnlichen Protofibrillen verantwortlich (Du et al. 2003). Diese Protofibrillen werden zu unlöslichen Fibrillen und häufen sich in Form von Lewy-Körperchen an (Goedert et al. 1998). Die Expression von α -Synuclein wird vom Transkriptionsfaktor GATA2 kontrolliert (Kurzawski et al. 2010).

Überexpression von α -Synuclein hat zahlreiche Veränderungen in verschiedenen biologischen Prozessen zur Folge. Die Anzahl hochregulierter Gene betrug 96,

während 137 Gene herunterreguliert wurden, was darauf hinweist, dass α -Synuclein-Überexpression eher eine negative Regulation der Transkription vermittelt. Die verschiedenen Gene werden u.a. den Gebieten synaptischen Plastizität, Signalweiterleitung, Transkription, Apoptose und Neurogenese zugeordnet (Cabeza-Arvelaiz et al. 2011).

1.4.2 Die Synuclein Protein- Familie

Neben dem α -Synuclein wurden auch das β -Synuclein und das γ -Synuclein entdeckt. In ihrer Struktur sind alle drei Synucleine ähnlich aufgebaut (Spillantini et al. 1995). β -Synuclein wird bevorzugt in den präsynaptischen Nervenendigungen des Gehirns exprimiert (Jakes et al. 1994). γ -Synuclein wurde im peripheren Nervensystem und in der Retina gefunden. Seine Expression in Mammatumoren ist ein Marker für Tumorprogression (George 2002). β -Synuclein und γ -Synuclein bilden keine Amyloid-ähnlichen Fibrillen, sondern verhindern deren Ausbildung (Uversky and Fink 2002).

1.4.3 Synucleinopathien

Der Morbus Alzheimer war die erste neurodegenerative Erkrankung, welche man mit α -Synuclein in Verbindung brachte. Bei Untersuchungen der Aminosäuresequenzen von typischen Amyloid-Ablagerungen fand man neben dem schon bekannten Hauptbestandteil beta/A4-protein (A beta) auch noch zwei weitere unbekannte Peptide: NAC und das dem α -Synuclein entsprechende NACP (Ueda et al. 1993; Jakes et al. 1994).

Wenige Jahre später fand man α -Synuclein in Lewy-Körperchen (Spillantini et al. 1997) beim Morbus Parkinson und der Lewy-Körperchen-Demenz (Baba et al. 1998). Im gleichen Jahr konnte α -Synuclein auch in den typischen fadenförmigen Einschlüssen bei der Multi System Atrophie, einer Parkinson-ähnlichen neurodegenerativen Erkrankung, identifiziert werden (Spillantini et al. 1998). Schließlich fasste man unter dem Begriff „Synucleinopathien“ alle neurodegenerativen Krankheiten zusammen, die diese pathologischen Ablagerungen des α -Synuclein aufweisen (Spillantini and Goedert 2000). Unter bestimmten pathogenen Bedingungen aggregiert α -Synuclein zu Oligomeren und bildet unlösliche Fibrillen mit einer erhöhten β -Faltblatt-Konfiguration (Tofaris and Spillantini 2007).

Allerdings liegt α -Synuclein überwiegend phosphoryliert in den Synucleinopathien vor (Fujiwara et al. 2002). Die Phosphorylierung von α -Synuclein am Serin 129 ist das Schlüsselereignis bei der Bildung von Lewy-Körperchen (Anderson et al. 2006).

Im gesunden Gehirn ist weniger als 5% des α -Synucleins phosphoryliert, in Lewy-Körperchen sind 89% des α -Synucleins phosphoryliert (Visanji et al. 2011). Die Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten enthalten neben α -Synuclein auch Neurofilamente und Ubiquitin (Spillantini et al. 1997). Auch die spinale Muskelatrophie, eine seltene Erkrankung, die durch einen fortschreitenden Untergang von motorischen Nervenzellen im Vorderhorn des Rückenmarks verursacht wird, ist assoziiert mit einer signifikant niedrigeren α -Synuclein-Expression (Acsadi et al. 2011).

1.4.4 Funktionen von α -Synuclein

Trotz vielfältiger Forschungsarbeiten ist die physiologische Funktion von α -Synuclein noch nicht vollständig geklärt, denn es hat sich gezeigt, dass es an einer Vielzahl von Vorgängen in der Zelle teilnimmt. In seinen biochemischen Eigenschaften ähnelt das α -Synuclein den Chaperonproteinen (Chandra et al. 2005). Chaperone sind Proteine, die am Transport und an der Faltung anderer Proteine beteiligt sind. Sie verhindern die Fehlfaltung oder irreversible Verklumpung ungefalteter Proteine (Hartl and Hayer-Hartl 2002). Unter anderem hat α -Synuclein auch Einflüsse auf die Zellproliferation, die Mikrotubuli-Montage, auf die Atmungskette und auf den Calciumeinstrom in die Zelle (Alim et al. 2002; Alim et al. 2004; Liu et al. 2009; Yin et al. 2011; Guo et al. 2012). α -Synuclein blockiert den Vesikelverkehr vom endoplasmatischem Retikulum zum Golgi-Apparat (Cooper et al. 2006). Zahlreiche Befunde weisen darauf hin, dass α -Synuclein im gesunden Gehirn essentielle Anteile in verschiedenen Vorgängen der Neurotransmission, der synaptischen Plastizität, des Vesikelrecyclings, der Neurotransmittersynthese und der Neurotransmitterfreisetzung ausübt (Cheng et al. 2011).

Etwa 90% der α -Synuclein-Aggregate bei der Lewy-Körperchen-Demenz finden sich an den Präsynapsen in Form von sehr kleinen Ablagerungen. Möglicherweise führt nicht der Zelltod, sondern eine synaptische Dysfunktion durch α -Synuclein-Aggregate zur Neurodegeneration (Schulz-Schaeffer 2010). α -Synuclein ist ein essentieller präsynaptischer, aktivitätsabhängiger Negativregulator der Dopamin-Neurotransmission und eine Überexpression führt zur Degeneration von Nervenendigungen mit einer Neurotransmitter-Reduktion (Abeliovich et al. 2000; Cabin et al. 2002; Bellucci et al. 2012).

1.4.5 α -Synuclein im ENS

α -Synuclein wurde im enterischen Nervensystem bisher wenig untersucht und wenn, dann nur im Zusammenhang mit den Synucleinopathien. Verschiedene Studien

zeigten, dass der degenerative Prozess beim Parkinson sehr umfangreich ist und nicht nur Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem hat, sondern auch das periphere vegetative Nervensystem und die Organe außerhalb des Gehirns miteinschließt. Dazu gehören vor allem der Magen-Darm-Trakt (Djaldetti et al. 2009). Magen-Darm-Störungen werden bei Parkinson Patienten häufig beobachtet. Lewy-Körperchen wurden das erste Mal 1984 im ENS beschrieben (Qualman et al. 1984).

1.5 ENS-assoziierte Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes

1.5.1 Morbus Hirschsprung

Morbus Hirschsprung ist eine Erkrankung, welche durch eine vollständige Abwesenheit der neuronalen Ganglienzellen, vorwiegend im Rektosigmoid gekennzeichnet ist. Die Krankheit manifestiert sich bereits nach der Geburt. Die Inzidenz beläuft sich in Mitteleuropa auf etwa 1:5000 Lebendgeburten (Badner et al. 1990; Parisi and Kapur 2000).

Morbus Hirschsprung ist eine Neurocristopathie, also eine Migrationsstörung von Zellen und Geweben der Neuralleiste und kann als isolierter Befund oder als Teil einer Multisystemerkrankung auftreten. Im missglückenden Kompensationsversuch wachsen vermehrt Nervenfasern ein und verursachen eine Dauerkontraktion.

Der proximale Darmanteil wird dadurch teilweise monströs erweitert, daher auch der Ausdruck Megakolon. Die betroffenen Kinder fallen häufig in den ersten beiden Monaten des Lebens durch eine Beeinträchtigung der Darmmotilität auf. Dazu gehören: Fehlender Mekoniumabgang innerhalb der ersten 48 Stunden des Lebens, Verstopfung, Erbrechen, Bauchschmerzen, Blähungen und Durchfall.

M. Hirschsprung Patienten haben ein erhöhtes Risiko für eine Enterokolitis und potentiell tödliche Darm-Perforationen. Histopathologisch fallen fehlende enterische Ganglien und aberrante verdickte Nervenfasern auf (Parisi 1993; Heinzeller and Büsing 2001; Suita et al. 2005).

1.5.2 Die Divertikelkrankheit

Als Divertikulose werden multiple, asymptotische Ausstülpungen der Schleimhaut durch präformierte Schwachstellen der Kolonwand bezeichnet. Die Herniation der Mukosa erfolgt durch Muskellücken entlang der intramuralen Blutgefäße (*loci minoris resistentiae*). Die Divertikelkrankheit entsteht durch eine klinisch apparente Entzündung der Divertikel (Divertikulitis), die auf benachbartes Gewebe übergreifen (Peridivertikulitis, Pericolitis) und zu komplizierten Verläufen (Perforation, Blutung,

Abszess, Stenose, Fistel) führen kann. Divertikel entwickeln sich in unseren Breitengraden überwiegend im *Colon sigmoideum* mit steigender Prävalenz im Alter. Aufgrund der aktuellen Datenlage lässt sich die Pathogenese der Divertikelkrankheit nicht auf einen singulären Faktor reduzieren, sondern muss als ein multifaktorielles Geschehen angesehen werden. Während klassische pathogenetische Konzepte auf Risikofaktoren wie zunehmendes Alter, ballaststoffarme Ernährung und Bindegewebsschwächen eingehen, berücksichtigen neue Konzepte auch die gestörte intestinale Motilität. Patienten mit einer Divertikulose haben eine reduzierte Dichte an Neuronen in allen enterischen Nervenplexus. Über 44,4% der Patienten mit Divertikulose haben in myenterischen Ganglien eine enterische Gliose. Sie zeigen also wesentliche strukturelle Veränderungen im ENS in Form einer oligoneuronalen Hypoganglionose auf, die für begleitende Motilitätsstörungen verantwortlich sein kann. Neben der Veränderung in den enterischen Ganglien, verändert sich auch die glatte Muskulatur der Kolons morphologisch (Hypertrophie, fibrotische Transformation) und auf molekularer Ebene (Defizite in der Genexpression) (Wedel et al. 2010; Böttner und Wedel 2012).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Während die α -Synuclein Expression im ENS häufig mit der Pathogenese von M. Parkinson in Zusammenhang gebracht wurde, zeigen Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe, dass natives α -Synuclein ubiquitär im ENS adulter Menschen ohne begleitende Synucleinopathien exprimiert wird. Aufbauend auf diesen Vorbefunden sollen im Hinblick auf eine potenzielle physiologische Rolle von α -Synuclein in der Regulation synaptischer Plastizität im ENS in der vorliegenden Arbeit folgende Aspekte untersucht werden:

1. Ist α -Synuclein-mRNA-Expression in isolierten myenterischen Ganglien des humanen Kolons nachweisbar?
2. Ist die Quelle nativen α -Synucleins im humanen ENS neuronalen Ursprungs?
3. Ist eine Ko-Lokalisation von α -Synuclein und synaptischen Vesikelmarkern und SNARE-Proteinen im humanen ENS detektierbar?
4. Wird die mRNA-Expression von α -Synuclein in kultivierten enterischen Neuronen der Ratte durch den Wachstumsfaktor GDNF reguliert?
5. Ist eine Ko-Lokalisation von α -Synuclein und synaptischen Vesikelmarkern und SNARE-Proteinen in kultivierten enterischen Neuronen nach GDNF-Behandlung nachweisbar?
6. Ist der Nachweis nativen α -Synucleins bereits im Darm von Kleinkindern (1 Jahr alt) möglich und ist diese Expression bei Patienten mit M. Hirschsprung verändert?
7. Ist die mRNA- und Proteinexpression von α -Synuclein bei Patienten mit Divertikulitis im Vergleich zu Kontrollen verändert?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Gewebe

2.1.1.1 Genehmigung der Ethik-Kommission

Die Genehmigung zur Studie an humanem Gewebe stammte von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland (B299/07).

2.1.1.2 Kontrollgewebe

Das humane Gewebe, welches als Grundlage für die Untersuchungen am ENS diente, stammte aus OP-Resektaten von Patienten, die sich aufgrund eines nicht-stenosierenden Karzinoms des distalen Gastrointestinaltraktes einer Kolonteil-, Sigma- oder Rektumresektion unterziehen mussten. Die Operationen wurden im Städtischen Krankenhaus Kiel durchgeführt. Die Patienten zeigten keine Anzeichen für enterische Neuropathien, was mit dem *Cleveland Clinic Constipation Score* („Wexner Score“) validiert wurde. Die Aufbereitung der Präparate erfolgte wie in Kap. 2.2.1 beschrieben.

2.1.1.3 Morbus Hirschsprung Gewebe

Die Vollwandpräparate stammen aus Operationsresektaten von Patienten, die aufgrund eines Morbus Hirschsprung operiert werden mussten. Diese Operationen wurden an der kinderchirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck durchgeführt. Die Präparate wurden aus dem Institut für Pathologie konsiliarisch zur Verfügung gestellt. Die Patienten waren im Alter von 3 Monaten bis 4 Jahren und sowohl männlich, als auch weiblich. Die Aufbereitung der Präparate erfolgte wie in Kap. 2.2.1 beschrieben.

2.1.1.4 Divertikulitis Gewebe

Die Vollwandpräparate stammen aus Operationsresektaten von Patienten, die aufgrund einer Divertikulitis operiert werden mussten. Diese Operationen wurden in der chirurgischen Klinik im Städtischen Krankenhaus Kiel durchgeführt. Die Aufbereitung der Präparate erfolgte wie in Kap. 2.2.1 beschrieben.

2.1.2 Zellkulturen

Die entnommenen enterischen Neurone stammen von neugeborenen Wistar-Ratten (2. Postnataltag). Eine Genehmigung zur Tötung und Organentnahme lag vor.

2.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien, welche in dieser Arbeit verwendet worden sind, sind in Tabelle 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Produkt	Hersteller
3-3'-Diaminobenzidin (DAB)	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Antikörperdiluent	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aquatex	Merck, Darmstadt, D
B 27 Supplementmix	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Sigma, Dreisenhofen, D
Blockserum „normal goat-serum“	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Citrat	Roth, Karlsruhe, D
DAPI	Roche, Mannheim, D
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Promega, Madison, USA
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, D
DNase Puffer	Promega, Madison, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Promega, Madison, USA
Glutamine	Sigma, Dreisenhofen, D
Hämalaun nach Mayer	Roth, Karlsruhe, D
Hanks Balanced Salt Solution	Promocell, Heidelberg, D
Immumount	Thermo Scientific, Bremen, D
Isomount	Labonord, Templemars, Frankreich
Kaliumchlorid [KCl]	Roth, Karlsruhe, D
Kalium-Dihydrogen-Phosphat [KH ₂ PO ₄]	Merck, Darmstadt, D
Kristall-Violett Lösung	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Methronidazol	Ratiopharm, Ulm, D
Methylbenzoat	Roth, Karlsruhe, D
Minimal Essential Medium (MEM)	Promocell, Heidelberg, D

Natriumchlorid [NaCl]	Roth, Karlsruhe, D
Natrium-Hydrogen-Phosphat [Na ₂ HPO ₄]	Merck, Darmstadt, D
Neurobasalmedium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Paraffin	Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Polylysin/ Laminin	Sigma, Dreisenhofen, D
PCR-Puffer	Promega, Madison, USA
Pen Strep-Lösung (10000 Units/ml Penicillin + 10000 µg/ml Streptomycin)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Refobacin	Merck, Darmstadt, D
RNase freies Wasser	Macherey-Nagel, Düren, D
Reverse Transkriptase-Puffer	Promega, Madison, USA
Shandon Cryomatrix	Thermo Scientific, Bremen, D
TRIS	Roth, Karlsruhe, D
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Roth, Karlsruhe, D

2.1.4 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte

Laborgerät	Bezeichnung	Hersteller
Cryostat	2800 Frigocut N	Reichert-Jung, Heidelberg, D
Digitalkamera	Axiocam	Zeiss, Oberkochen, D
Digitalkamera	digital slight	Nikon, Tokio, Japan
Durchlicht-Mikroskop	eclipse E600	Nikon, Tokio, Japan
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen, D
Kühlschrank -20 Grad	electronic	Bosch, Gerlingen, D
LCM-Instrument	PALM MicroBeam	Carl Zeiss Microimaging, München, D
Mikrotom	Autocut	Reichert-Jung, Heidelberg, D
Mikrowelle	1100 W	Panasonic, Hamburg, D
Pipetten (1, 10, 100, 1000 µl)	Research, Research Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Rüttler	Promax 2020	Heidolph, Schwabach, D

Thermocycler	ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
	Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Rodgau, D
Vortex-Schüttler	REAX top	Heidolph, Schwabach, D
Wärmeschrank	VO 400	Memmert, Schwabach, D
Wasserbad	WNE 14	Memmert, Schwabach, D
Zentrifugen	Minifuge 2	Heraeus Christ, Osterode, D
	Biofuge	Heraeus Christ, Osterode, D
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
AMPLIseal	Greiner, Frickenhausen, D
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
HistoBond®	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Objektträger	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshafen, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt, D
Polyethylen Naphtalat (PEN) beschichteter Objektträger	Carl Zeiss Microimaging, München, D
Probengefäße (Tubes 1,5 ml)	Eppendorf, Sarstedt, D
96 Well Platten	Greiner Bio-one, Monroe, USA

2.1.5 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 4 aufgelistet und nach Anleitung des Herstellers verwendet worden.

Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Kits

Kit	Hersteller
ABC Elite Kit	Vector Laboratories, Eching, D
Liquid DAB+ (Diaminobenzidin)	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Nucleospin XS-Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
Nucleospin RNA II-Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
qPCR Master Mix Plus	Eurogentec, Köln, D

2.1.6 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Verdünnungen der Antikörper sind den anhängenden Tabellen der jeweiligen

Detektionsmethode zu entnehmen.

Tabelle 5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Antikörper	Wirtsorganismus	Hersteller
Primär		
Anti-Synuclein alpha	rabbit	Millipore, Schwalbach, D
Anti-PGP 9.5	mouse	Acris, Herford, D
Anti-HuC/D	mouse	Molecular probes, Leiden, NL
Anti-Synaptophysin	mouse	Millipore, Schwalbach, D
Anti-Synaptobrevin IgG	mouse	Thermoscientific, Rockford, USA
Anti-SNAP-25	mouse	LifeSpan Biosciences, Vertrieb durch Biozol, Eching, D
Anti-phosphoryliertes Synuclein alpha	rabbit	Wako Chemicals, Neuss, D
Sekundär (LSAB)		
Alpha E 0432	goat, anti-rabbit, biotyniliert	Dako, Hamburg, D
Sekundär (Fluoreszenz)		
Alexa Fluor 488	goat, anti-mouse	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 488	goat, anti-rabbit	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 546	goat, anti-mouse	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 546	goat, anti-rabbit	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.7 Nucleotide, Wachstumsfaktoren und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Nucleotide, Wachstumsfaktoren und Enzyme sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Nucleotide, Wachstumsfaktoren und Enzyme

Nucleotide	Hersteller
Random hexamer-Primer (reverse Transkription)	Thermoscientific, Ulm, D
Spezifische PCR-Primer (Sequenzen in Tabelle 11)	Eurogentec, Köln, D
Wachstumsfaktoren	
GDNF (100 µg/ml)	PeptoTech, Hamburg, D
Enzym	

Collagenase	Sigma, Dreisenhofen, D
Desoxyribonuklease I (DNase)	Promega, Madison, USA
M-MLV Reverse Transkriptase (RT)	Promega, Madison, USA
Trypsin/EDTA (0.25 µg/ml)	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe, D

2.1.8 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen

Lösung/Puffer	Methode	Herstellung
MEM+Antibiose	Zellkultur	500,00 ml MEM-Fertiglösung 6,00 ml Pen Strep-Lösung 1,00 ml Metronidazol (500mg/ml) 0,50 ml Refobacin (40mg/ml)
Neurobasalmedium+B27	Zellkultur	500,00 ml Neurobasalmedium 10,00 ml B27 Supplementmix 1,25 ml Glutamine 6,00 ml Pen Strep-Lösung
PBS „phosphat buffered saline“	humanes Material	16,00 g NaCl 2,88 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 0,48 g KH ₂ PO ₄ 0,40 g KCl ad 2 l H ₂ O _{bidest} ; pH auf 7,2
TBS „TRIS buffered saline“	Immunhisto- chemie	9 Teile H ₂ O _{bidest} 1 Teil TBS-10x-Stammlösung: 242,28 g TRIS 344,40 g NaCl ad 4 l H ₂ O _{bidest} ; pH auf 7,6
Citrat-Puffer	Immunhisto- chemie	2,1 g Citrat; ad 1 l H ₂ O _{dest} ; pH auf 6,0

2.2 Methoden

2.2.1 Prozessierung des humanen Gewebes

Direkt nach der Resektion wurden die ca. 6x3 cm großen Areale isoliert und dabei ein Sicherheitsabstand von mindestens 10 cm zum Tumor eingehalten. Für den Transport zum Labor wurden die Präparate in eine PBS-Lösung gelegt. Zur Aufbereitung wurde das entnommene Darmareal im Labor spannungsfrei mit Nadeln

fixiert. Für die Paraffineinbettung wurden quer zur Darmrichtung verlaufende, ca. 5mm breite und 25mm lange Vollwandstreifen (inklusive eines randständigen Tänien-Anschnitts zur Orientierung) zugeschnitten und wie in Tabelle 8 prozessiert.

Tabelle 8: Protokoll der Paraffineinbettung

Substanz	Konzentration	Durchführung	Dauer	Zweck
Paraformaldehyd	4% in PBS	bei 6°C	über Nacht	Fixierung
		fließend wässern (Leitungswasser)	2 h	
		Ränder für Einbettung zuschneiden		glatte Schnittkante im Paraffinblock
aufsteigende Alkoholreihe	50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%	je 2x	je 30 min	Dehydrierung
Methylbenzoat	100%	1x	über Nacht	Intermedium
Methylbenzoat	100%	2x	30 min	Intermedium
Paraffin	100%	3x bei 60°C im Wärmeschrank		Einbettung
		Präparat ausrichten und Paraffin auskühlen lassen		

2.2.2 Isolierung und Kultivierung von enterischen Nervenzellen

Zunächst wurden Därme von 2 Tage alten Ratten entnommen, von ihren Mesenterien befreit und in MEM + Antibiotika (Refobacin 40 mg/ml + Metronidazol 500 mg/ml) auf Eis gelagert. Anschließend wurde die *Tunica muscularis* von den restlichen Schichten abgetrennt. Die *Tunica muscularis* wurde mit 900 µl HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) und 100 µl Collagenase-SL (entspricht ≥ 1250 collagen digesting units/ml) bei 37°C im Brutschrank für 2 h verdaut, so dass sich die Muskulatur auflöste und nur die Nervenplexus übrig blieben. Diese wurden anschließend mit einer Pipette eingesammelt, in MEM auf Eis gelegt und für 5 min bei 184 g zentrifugiert. Um die einzelnen Nervenzellen komplett zu isolieren, wurden die *Plexus* mit 500 µl 0.25% Trypsin-EDTA vermischt und für 1.5 min bei 37°C inkubiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 5 µl der Zellsuspension mit 5 µl Trypanblau vermengt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in der Neubauer Zählkammer, einem Hämocytometer.

Für die Beschichtung der Deckgläser wurden 100µl Poly-D-Lysin (0,01%) auf jedes Deckglas gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden die Deckgläschen für 30 min zum Trocknen in den Brutschrank gelegt. Von einer Laminin Fertiglösung (1 mg/ml) wurden 5 µg/ml in Medium angesetzt und 2 h im Brutschrank bei 37°C gelagert, mit destilliertem Wasser dreimal gespült und für 18 h bei Raumtemperatur getrocknet.

Pro beschichtetem Deckgläschen wurden ca. 100.000 Einzelzellen ausgesät und in 1 ml definiertem Medium, welches aus Neurobasalmedium + B27 bestand, kultiviert. Außerdem wurde zur Wachstumsstimulation der Zellen der neurotrophe Faktor GDNF (50 ng/ml) dazugegeben. Die Kultivierungsdauer für die Immunohistochemie betrug drei Wochen, für mRNA-Expressionsstudien 7 Tage. Das Nährmedium inklusive GDNF wurde 3x pro Woche erneuert um Stoffwechselabbauprodukte der Zellen zu beseitigen.

2.2.3 Laser capture microdissection

Die *Laser capture microdissection* (LCM) ist eine Methode, mit deren Hilfe es möglich ist, spezifisch Zellen oder Gewebsverbände zu isolieren. Bevor dieses getan werden konnte, mussten die Gewebe nach ihrer Gewinnung möglichst schnell prozessiert werden. Hierzu wurden sie in eine Cryolösung (Polymer aus Polyvenylalkohol und Polyethylenglykol) eingebettet und bei -80°C aufbewahrt. Die möglichst schnelle Einbettung sollte den Abbau der RNA durch RNasen und die Proteindegradierung durch unspezifische Proteasen verhindern. Mittels eines Cryostaten wurde das Gewebe auf 14µm zugeschnitten und auf einen, mit PEN (Polyethylennaphtalat) beschichteten Objektträger gelegt. Das PEN diente als stabilisierendes Gerüst. Nach einer Trockenzeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur in einem Umluftschrank erfolgte eine Schnellfärbung mit Kristallviolett. Hierzu wurden die Schnitte zunächst für zwei Minuten in 70% Ethanol gestellt. Darauf folgte die Färbung mit 1% Kristall-Violett Lösung für 30 Sekunden. Der Färbung folgte ein Eintauchen in 70% und anschließend 100% Ethanol für je 10 Sekunden. Die gefärbten Schnitte wurden für 2 Minuten an der Luft getrocknet.

Anschließend waren die Schnitte bereit für die eigentliche Isolierung der Gewebsverbände. Dieses erfolgte mit Hilfe eines inversen Mikroskops, das an einen Laser und einen Computer gekoppelt ist, sodass die Zellen oder Gewebsverbände digital detektiert werden konnten. Anschließend wurde das detektierte Areal mittels eines fokussierten Laserstrahls ausgeschnitten, um dann mittels eines gepulsten

Laserstrahl in ein entsprechendes, mit Öl beschichtetes, 2 ml Reaktionsgefäß katapultiert zu werden. Das Schnittpräparat selbst lag auf einer Folie auf einem Objektträger vor, welcher nicht eingedeckelt wurde. Beim Ausschneiden des definierten Areals verschmolz die inerte Membran mit dem Gewebeausschnitt und konnte im darauffolgenden Schritt entfernt werden. Durch den kurzen Kontakt des Gewebes mit dem Laserstrahl von nur 1 ns wurde dieses nicht verändert und blieb somit intakt. Die LCM eines myenterischen Ganglions ist in Abbildung 2.1 zu sehen.

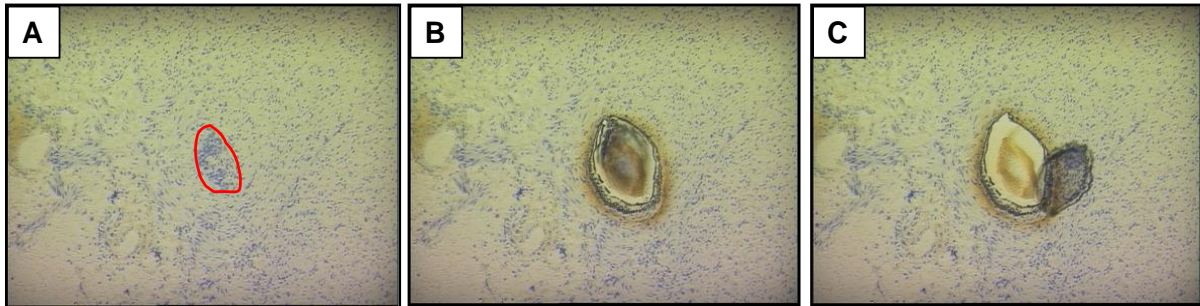


Abbildung 2.1: Laser capture microdissection eines myenterischen Ganglions

A: Die Ganglien werden identifiziert und computergestützt markiert; B: Im nächsten Schritt werden sie mittels eines fokussierten Laserstrahls ausgeschnitten; C: Im letzten Schritt werden die Ganglien durch einen gepulsten Laserstrahl in ein Reaktionsgefäß katapultiert [Böttner et al. 2010]

2.2.4 mRNA-Expressionsstudien

Der quantitative mRNA-Nachweis wurde mit Hilfe der Reverse Transkriptase-quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) durchgeführt. Die RT-qPCR ist eine Technik zur Amplifizierung von Nukleinsäuren, welche auf der herkömmlichen PCR beruht. Zusätzlich ist es möglich, das gewonnene DNA-Produkt in Echtzeit (*real-time*) zu quantifizieren. Diese Methode benötigt mehrere Arbeitsschritte: RNA-Isolierung, Reverse Transkription (RT), *real-time* PCR (qPCR) mit anschließender Auswertung der Daten.

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Im ersten Schritt musste die RNA aus Zellen der Gewebe isoliert werden. Dieses erfolgte bei den Zellkulturen mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Kits. Das NucleoSpin® RNA II Kit ist geeignet zur RNA-Isolierung in Zellkulturen und Geweben, also z.B. auch für Ganzwandpräparate. Das NucleoSpin® RNA XS Kit hingegen eignet sich für einzelne Zellen oder sehr kleine Gewebsverbände (bis 5 mg Gesamtgewicht). Dieses Kit wurde zur RNA Isolierung einzelner Nervenzellganglien verwendet. Alle hierbei verwendeten Reagenzien befinden sich in den jeweiligen Kits. Die Aufreinigung erfolgte jeweils nach Angaben des Herstellers. Bei den Analysen der Zellkulturen wurden etwa 100.000 Zellen pro Kultur verwendet.

Bei den Proben der Gewebeschnitte der *Tunica muscularis* wurden je 20 Kryoschnitte à 18 µm verwendet, während bei den Proben, die mittels LCM isoliert wurden, jeweils 2×10^6 µm² (Schnittdicke von 14 µm) Ganglien ausgeschnitten wurden. Die jeweiligen Proben wurden in 350 µl Lysis-Puffer, der mit 1% Mercaptoethanol komplettiert wurde, gelöst und anschließend zur Homogenisierung mehrfach durch eine 0,9 mm Kanüle passagiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine vom Hersteller mitgelieferte Säule gegeben und abzentrifugiert, um nicht benötigtes Zellmaterial zu entfernen. Das Filtrat wurde mit 350µl 70%igem Ethanol gemischt und auf eine RNA-bindende Säule gegeben, welche anschließend nach dem Waschprotokoll des Herstellers gereinigt wurde. Mittels RNase-freiem Wasser wurde zu einem finalen Volumen von 12 µl eluiert. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 cDNA-Synthese

Die isolierte mRNA wurde mittels der reversen Transkription in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Diese Reaktion wird von dem Enzym reverse Transkriptase katalysiert. Die reverse Transkriptase benötigt ein Startmolekül, einen random Hexamer Primer (6bp DNA-Fragmente mit zufälliger Basenverteilung). Die genauen Abläufe der Reversen Transkription sind in Tabelle 9 dargestellt. Das Produkt ist eine stabile cDNA, die bei -20°C eingefroren werden und anschließend in verschiedenen PCR-Reaktionen eingesetzt werden kann.

Tabelle 9: Protokoll der Reversen Transkription (+DNase-Verdau)

Substanz	Menge [µl]	Durchführung	Dauer	Zweck
RNA in H ₂ O	12			
DNase-Puffer	1,5			
DNase	1,5	Inkubation bei Raumtemperatur	15 min	Verhinderung der Amplifizierung genomischer DNA
EDTA (20mM)	1,5	Thermocycler	10 min bei 70°C	Denaturierung der Sekundärstränge und Inaktivierung der DNase
5x RT-Puffer	6			
DTT (0,1M)	3			

dNTPs (je 10mM)	1,5			
N6 Primer (250ng/µl)	1,5			
M-MLV-Reverse Transkriptase	1,5	Thermocycler	10 min bei 25°C	Primer-Annealing
			50 min bei 42°C	Kettenverlängerung/ Umschreibung
			15 min bei 70°C	Denaturierung der RNA/cDNA-Hybride

2.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische Nukleinsäuresequenzen *in vitro* vervielfältigt werden. Dazu verwendet man das Enzym DNA-Polymerase, welches die cDNA als Matrize für die Verfielfältigung benutzt. Der Begriff „Kettenreaktion“ bezeichnet den Umstand, dass die Endprodukte eines Zyklus als Ausgangsprodukte für den nächsten Zyklus dienen.

Die PCR dient dem Nachweis und der Quantifizierung (mit Hilfe der real-time Detektion) spezifischer DNA-Sequenzen.

Die PCR besteht generell aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei der Denaturierung trennen sich die beiden Stränge der ursprünglichen DNA (*Template-DNA*). Daraufhin wird die Temperatur abgesenkt und die im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer lagern sich an die einzelsträngige *Template-DNA* an (Annealing). Im letzten Schritt wird die Temperatur wieder auf das Temperaturoptimum der thermostabilen Taq-Polymerase erhöht. Die Polymerase nimmt ihre Arbeit auf und verlängert die Primer (Elongation) bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Damit ist ein Zyklus beendet und aus einem Doppelstrang sind zwei entstanden.

In dieser Arbeit wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. 2 min Denaturierung der cDNA und Aktivierung der Polymerase bei 95°C
2. 15 Sekunden Denaturierung der cDNA
3. 60 Sekunden Annealing der Primer an die cDNA und Elongation der Polymerase bei 60°C.

Die Schritte 2 und 3 werden 40-mal in einem speziellen Gerät (Thermocycler) wiederholt. Mit jedem neuen Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der Doppelstränge.

Zur Quantifizierung der Nukleinsäuren bedient man sich dem Prinzip der *real-time*

Detektion. Die Methode basiert auf der Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).

Das Prinzip dabei ist, dass ein sequenzspezifisches, doppelt fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (TaqMan-Sonde) auf dem einzelsträngigen *Template* angebracht wird. Auf der Sonde befinden sich 2 Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome). Die Fluorochrome werden durch Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt und strahlen die Energie in Form von (fluoreszierendem) Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab.

Bei intakter Sonde wird die Fluoreszenz des Fluorochroms am 5'-Ende (Reporter) von der Fluoreszenz des Fluorochroms am 3'-Ende (Quencher) durch Energieübertragung unterdrückt. Die Taq-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, welche man sich nun zu Nutze macht. Wird der Reporter auf der einen Seite durch die Taq-Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtproduktion bei der spezifischen Wellenlänge an. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke. Als Reporter dient hier der Fluoreszenzfarbstoff 6FAM (6-[Carboxy-Fluorescein]), als Quencher dient der Fluoreszenzfarbstoff TAMRA (Tetramethylrhodamin). Für die quantitativen mRNA-Expressionstudien wurden die Platten entsprechend Tabelle 10 bestückt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 10: Protokoll der qPCR

Substanz/Agens	Menge [µl]	Zweck
cDNA	2	Template
qPCR MasterMix Plus	10	Enthält Taq-Polymerase, Nukleotide und Puffer
Primer sense (100nM)	0,18	Markiert 5'Ende der Zielsequenz
Primer antisense (100nM)	0,18	Markiert 3'Ende der Zielsequenz
TaqMan-Sonde (10nM)	0,448	Detektion
H ₂ O (RNase frei)	7,19	
Gesamtvolumen einer Reaktion	20	

Anschließend wurde die Platte mit einer selbstklebenden Abdeckfolie (AMPLIseal) verschlossen und für 40 Zyklen in das „ABI PRISM Sequence Detection System“ überführt (Dauer ca. 110 Minuten). Die detektierbare Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus durch das ABI PRISM Sequence Detection System gemessen.

2.2.4.4 Auswertung der Daten

Um die Expression des Zielgens in Relation zur gesamten Genexpression quantifizieren zu können, wird sie auf die Expression des Housekeeping Gens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) normalisiert. Ein Housekeeping Gen ist ein Gen, welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird.

Zur Quantifizierung der Signale macht man sich die Kinetik der PCR-Reaktion zu nutze. Das Gerät misst den sog. CT-Wert („threshold cycle“). Dieser Wert zeigt die Zykluszahl an, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Ab diesem Zeitpunkt ist das Wachstum exponentiell.

Zu Quantifizierung benutzt man folgende Formel: $\Delta CT = 2^{\Delta (CT \text{ Zielgen} - CT \text{ HPRT})}$. Je höher der CT-Wert ist, desto niedriger ist die Konzentration der DNA, da mehr Zyklen benötigt werden, um den Schwellenwert zu erreichen.

Tabelle 11: Verwendete Primer der qPCR

Primer	Orientierung	Sequenz	Beginn der kodierenden Sequenz	Länge der Oligonukleotide
rHprt	sense	5'-gccagcttctctcaga-3'	17	19
	antisense	5'-ggtcataacctgggtcatcact-3'	121	25
	Sonde	5'-ttttcccgagccgaccgg-3'	40	20
rSnca	sense	5'-cctttcaccctcttgattg-3'	62	21
	antisense	5'-tccttggccttgaaagtcct-3'	202	22
	Sonde	5'-tgcggaagcctagagagccgtgtg-3'	119	25
rNse	sense	5'-cacagccaatgtaggatcca-3'	921	21
	antisense	5'-gcagacagttgcaggcctt-3'	1021	20
	Sonde	5'-tgaccaacccaaaacgtattgagcg-3'	965	25
rS100b	sense	5'-gaaatcaaagagcaggaggttg-3'	139	24
	antisense	5'-atggcaacaaggccatgaa-3'	239	20
	Sonde	5'-acactggacaatgatggagacggcg-3'	178	25

2.2.5 Immunhistochemie

2.2.5.1 Prinzipien der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis spezifischer Proteine in einem histologischen Präparat. Im Mittelpunkt der Immunhistochemie steht die Reaktion eines Antikörpers mit einem gesuchten Zielantigen. Diese Reaktionen finden auf Gewebeschnitten, bzw. Zellkulturen statt. Der unmarkierte Primärantikörper bindet spezifisch an eine Stelle auf dem Zielantigen (Epitop). Um weitestgehend nur an das Zielantigen zu binden und mögliche Kreuzreaktionen auszuschließen, ist eine hohe Spezifität und Affinität von großer Bedeutung. Um die Antikörper-Antigen-Reaktion sichtbar zu machen, wurden hier Doppelmarkierungen mittels Sekundärantikörpern verwendet. Der Sekundärantikörper dient der Visualisierung der oben beschriebenen Reaktion. Dieser kann hierfür mit verschiedenen Substanzen, wie z.B. kleinen Molekülen, Enzymen oder Fluoreszenzfarbstoffen, gekoppelt sein. Er bindet an das Fc-Fragment (*Fragment crystallizable*) des Primärantikörpers. Durch chromogene Substratlösungen, Immunofluoreszenzfarbstoffe oder Enzymumsetzung können diese dann sichtbar gemacht und das gesuchte Antigen detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Protokolle verwendet, die nachfolgend beschrieben werden. Die Auswertung der Versuche erfolgte mittels Durchlicht-, bzw. Fluoreszenzmikroskopen.

2.2.5.2 LSAB-Protokoll für humane Gewebe

Die Labelled Strept-Avidin-Biotin-Methode (LSAB) ist gut geeignet, um einzelne Antigene darzustellen. Diese Methode gehört zu den gebräuchlichsten immunhistochemischen Methoden und zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus. Die Sensitivität beruht auf der hohen Affinität von Avidin und Streptavidin zu Biotin. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, das kovalent an den Sekundärantikörper gebunden ist (biotinyliert). Nach der Inkubation mit einem Avidin-Enzym-Konjugat bindet Avidin an Biotin. Das im Avidin-Enzym-Konjugat enthaltene Enzym ist die Meerrettichperoxidase, sie bildet nach Zugabe der chromogenen Substratlösung 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ein bräunliches Endprodukt und macht dadurch den Antikörper-Avidin-Biotin-Enzym-Komplex sichtbar.

Zunächst wurde das Gewebe nach seiner Gewinnung konserviert. Hierzu diente die Fixierung mittels Paraformaldehyd. Dieser Prozess führt jedoch zu einem Verlust der Antigenität. Die Epitope können nicht mehr von Antikörpern erkannt werden, da sie

Quervernetzungen ausbilden. Um diesen Effekt teilweise rückgängig zu machen, führt man bei der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten zuvor eine sogenannte Antigendemaskierung (Antigen-Retrieval) durch. So können die entstandenen Quervernetzungen wieder gelöst werden. Zur Antigendemaskierung kamen, abhängig vom Antikörper, Enzyme, Mikrowellen oder Dampfhitze zum Einsatz.

Ergänzend ist es möglich, eine Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer durchzuführen. Hierfür wurden die Präparate im Anschluss an die DAB-Färbung für etwa 10 Sekunden in unverdünntes Hämalaun getaucht. Hämalaun färbt die Zellkerne blau. Die Bindung des Farbstoffes erfolgt im stark sauren Milieu. Um die blaue Färbung zu erhalten, muss anschließend ein pH-Wert über 3 eingestellt werden, was durch intensives Spülen mit Leitungswasser (Bläuen) erreicht wird. Außerdem erhöht man so die Haltbarkeit der Färbung, da der Farbstoff im alkalischen Milieu schlecht löslich ist. Nach dreimaligem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte 10 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach erneutem Spülen in destilliertem Wasser erfolgte die Dehydrierung und Fixierung der Schnitte gemäß dem Standardprotokoll (Tabelle 12).

Im Rahmen der abschließenden Fixierung mit Isomount wurde der auf dem Objektträger liegende Paraffinschnitt mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Nach einer Wartezeit von mindestens einer Stunde können die fertigen Paraffinschnitte lichtmikroskopisch mit dem „Nikon eclipse E600“ analysiert werden. Zur Herstellung der LSAB-Färbungen wurden die humanen Paraffinschnitte gemäß dem Protokoll aus Tabelle 12 prozessiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 12: Protokoll der LSAB-Methode für humane Paraffinschnitte

Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
Xylol	>99,9%	3x10 min	Deparaffinierung
absteigende Alkoholreihe	100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%	je 3 min	Rehydrierung
H ₂ O _{seradest}		3x	Spülen
Wasserstoffperoxid	3%	10 min	Blockierung der unspezifischen Peroxidase
H ₂ O _{seradest}		3x	Spülen
Ggf. Citrat-Puffer	siehe Tab. 18	20 min Wasserbad	Antigendemaskierung

(pH=6,0)		(95°C)	
H ₂ O seradest		3x	Spülen
TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
Primärer Antikörper	siehe Tab. 8	über Nacht	Antigenbindung
TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
Sekundärer Antikörper	siehe Tab. 8	45 min	Primärantikörperbindung, biotinyliert
TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
ABC-Elite Kit		45 min	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
Liquid DAB+		5 min	Chromogen zur Visualisierung der AK-Bindung
H ₂ O seradest		3x	Spülen
Ggf. Hämalaunfärbung nach Mayer			Kernfärbung (s.o.)
aufsteigende Alkoholreihe	50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%	je 2x 3 min	Dehydrierung
Isomount			Fixierung von Gewebe und Deckgläschen

Tabelle 13: Antikörper der LSAB-Methode für humane Paraffinschnitte

Antikörper		Wirtsorganismus	Konzentration
Primärer Antikörper	Anti- α -Synuclein	Rabbit (polyklonal)	1:5000 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-PGP 9.5	Mouse (monoklonal)	1:50000 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-phosphoryliertes α -Synuclein	Mouse (monoklonal)	1:5000 in Diluent
Sekundärer Antikörper	Alpha E0432	Goat, anti-rabbit	1:400 in Diluent

2.2.5.3 Prinzipien der morphometrischen Messung

Um diese immunhistochemische Befunde quantifizierbar zu machen, wurde sich einer morphometrischen Messmethode bedient. Als Beispiel dient hier Abbildung 2.2.

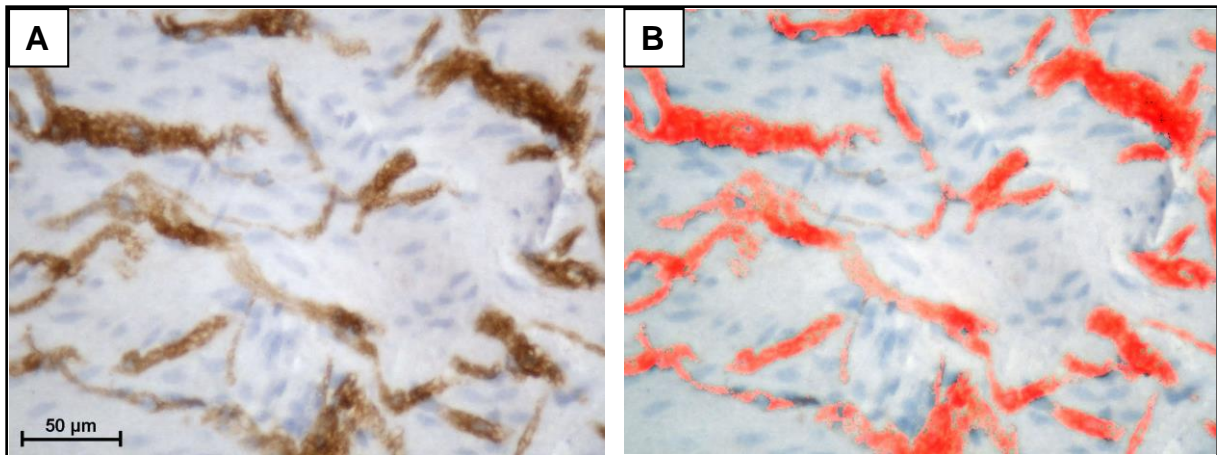


Abbildung 2.2: Markierung von Nervenfasern zur morphometrischen Messung

A: Immunhistochemische Markierung von enterischen Nervenfasern mit Antikörpern gegen PGP 9.5 im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat; **B:** Computergestützte Markierung der Nervenfasern zur Bestimmung des prozentualen Anteils an der Fläche; Vergrößerung: 400fach. Hämalaun-Gegenfärbung.

Die Nervenfaserbündel, welche beispielsweise in Abbildung 2.2 mit dem neuronalen Marker PGP 9.5 sichtbar gemacht wurden, werden mit Hilfe des Programmes „Nikon NIS-Elements BR“ markiert. Entscheidend ist hier der Farbton. Markiert man einen Teil der braun gefärbten Nervenfasern, markiert das Computerprogramm automatisch alle Bildelemente, welche gleich gefärbt sind. Wurden alle Nervenfasern markiert, berechnet das Programm die markierte Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche und gibt den prozentualen Anteil an. Die Bilder wurden alle in 400-facher Vergrößerung gemacht.

2.2.5.4 Prinzipien der Dual-Label-Fluoreszenz-Immunhistochemie

Die Dual-Label-Fluoreszenz-Immunhistochemie ist ein Verfahren, welches gut geeignet ist, um zwei verschiedene Antigene auf einem Präparat zu detektieren und um ihre Lage zueinander (Ko-Lokalisation) zu analysieren. Prinzipiell funktioniert diese Methode wie die anderen immunhistochemischen Methoden auch. Der Antigen-Antikörperkomplex wird hierbei jedoch nicht enzymatisch mit Hilfe einer Farbreaktion detektiert, sondern durch fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper, welche durch Licht, dessen Wellenlänge dem jeweiligen Emissionsspektrum entspricht, im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

2.2.5.5 Fluoreszenz-Immunhistochemie-Protokoll für humanes Gewebe

Die Fluorophoren Alexa Fluor 488 (grün) und Alexa Fluor 546 (rot) haben zwei unterschiedliche Emissionsspektren. So ist es möglich, zwei Proteine gleichzeitig auf einem Schnitt zu analysieren. Die primären und sekundären Antikörper müssen so

ausgewählt werden, dass es nicht zu Kreuzreaktionen der Antigen-Antikörper-Komplexe kommt. So ist es wichtig, dass jeweils Primärantikörper gewählt werden, die von verschiedenen Spezies stammen (z.B. Maus und Kaninchen).

Das Protokoll, welches in dieser Arbeit zur Anwendung kam, dauerte 3 Tage. Die Primärantikörper wurden jeweils über Nacht inkubiert. Da die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper lichtempfindlich sind, wurden sie nach dem Auftragen vor Licht geschützt. Die Zellkerne wurden am dritten Tag mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) markiert, einem Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet und nach Anregung im ultravioletten Bereich mit blauer bis cyaner Farbe (461nm Wellenlänge) fluoresziert. Zur Herstellung der Fluoreszenz-Färbungen wurden die humanen Paraffinschnitte gemäß dem Protokoll aus Tabelle 14 prozessiert.

Tabelle 14: Protokoll der Fluoreszenz-Immunhistochemie für humane Paraffinschnitte

Substanz/Agenz	Konzentration	Dauer	Zweck
Xylol	>99,9%	3x10 min	Deparaffinierung
absteigende Alkoholreihe	100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%	je 3 min	Rehydrierung
H ₂ O _{seradest}		3x	Spülen
Citrat-Puffer (pH=6,0)	siehe Tab. 18	2 x 5 min Mikrowelle (750W)	Antigendemaskierung
H ₂ O _{seradest}		3x	Spülen
TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
Erster primärer Antikörper	siehe Tab. 8	über Nacht	Antigenbindung
TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
Erster sekundärer Antikörper	siehe Tab. 8	45 min	Primärantikörperbindung, fluoreszenzmarkiert
TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
Zweiter primärer Antikörper	siehe Tab. 8	über Nacht	Antigenbindung
TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
Zweiter sekundärer Antikörper	siehe Tab. 8	45 min	Primärantikörperbindung, fluoreszenzmarkiert
TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
DAPI		30 min	Kern-Gegenfärbung

TBS	siehe Tab. 18	3x 10 min	Spülen
H ₂ O seradest		1x	Spülen
Immumount			Fixierung und Erhalt der Fluoreszenz

Die fertigen Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop „Zeiss Axiovert 200“ analysiert. Nachdem die einzelnen Abbildungen von der Kamera (Axiocam, Zeiss, Oberkochen, D) aufgenommen wurden, wird mit Hilfe spezieller Software (AxioVision Version 4.7.2, Zeiss, Oberkochen, D) eine Überlagerung der einzelnen Bilder angefertigt.

Sind die beiden Antigene an der gleichen Stelle lokalisiert, entsteht eine gelbe Mischfarbe. Zur Lokalisationsanalyse wurde α -Synuclein mit den SNARE-Proteinen Synaptobrevin und SNAP-25, mit dem Vesikelprotein Synaptophysin und mit den neuronalen Markern *protein gene product 9.5* (PGP 9.5) und HuC/D doppelt detektiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Antikörper der Fluoreszenz-Methode an humanen Paraffinschnitten

Antikörper		Wirtsorganismus	Konzentration
Primärer Antikörper	Anti- α -Synuclein	Rabbit (polyklonal)	1:1000 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-Synaptophysin	Mouse (monoklonal)	1:1000 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-Synaptobrevin	Mouse (monoklonal)	1:200 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-SNAP25	Mouse (monoklonal)	1:10000 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-PGP 9.5	Mouse (monoklonal)	1:1000 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-HuC/D	Mouse (monoklonal)	1:200 in Diluent
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 488 (grün)	Goat, anti-mouse	1:250 in Diluent
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 546 (rot)	Goat, anti-rabbit	1:250 in Diluent
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 488 (grün)	Goat, anti-rabbit	1:250 in Diluent
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 546 (rot)	Goat, anti-mouse	1:250 in Diluent

2.2.5.6 Fluoreszenz-Protokoll für Zellkulturen

Das Prinzip der Dual-Label-Fluoreszenz-Immunzytochemie bei Zellkulturen ist das Gleiche wie bei der Dual-Label-Fluoreszenz-Immunhistochemie von humanen Gewebeschnitten. Das Protokoll ist jedoch ein wenig anders. Um die enterischen Neuronenverbände zu fixieren, müssen die vitalen Zellen zunächst 30 Minuten lang

mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung behandelt werden. Nachdem dreimal mit TBS gespült wurde, wurden die Kulturen mit 4°C kaltem, 99,9%igem Methanol 10 min lang permeabilisiert. Die Permeabilisierung dient dazu, die Zellen empfänglicher für die Antikörper zu machen. Erst dann können die Deckgläschen aus der Kulturschale herausgenommen werden und gemäß dem Protokoll aus Tabelle 16 prozessiert werden. Zur Detektion wurde das Fluoreszenzmikroskop „Zeiss Axiovert 200“ verwendet. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 16: Protokoll der Fluoreszenz-Methode für Zellkulturen

Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
Normal goat serum	1:10 in TBS	30 min	Blockierung unspezifischer Signale (Hintergrund)
TBS	siehe Tab. 18	3x	Spülen
Primärer Antikörper	siehe Tab. 10	60 min	Antigenbindung
TBS	siehe Tab. 18	3x	Spülen
Sekundärer Antikörper	siehe Tab. 10	30 min	Primärantikörperbindung, fluoreszenzmarkiert
TBS	siehe Tab. 18	3x	Spülen
DAPI		30 min	Kern-Gegenfärbung
TBS	siehe Tab. 18	3x	Spülen
H ₂ O _{seradest}		1x	Spülen
Immumount			Fixierung und Erhalt der Fluoreszenz

Tabelle 17: Antikörper der Fluoreszenz-Immunzytochemie an enterischen Nervenzellkulturen

Antikörper	Wirtsorganismus	Konzentration	
Primärer Antikörper	Anti-α-Synuclein	Rabbit (polyklonal)	1:100 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-Synaptophysin	Mouse (monoklonal)	1:100 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-Synaptobrevin	Mouse (monoklonal)	1:100 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-SNAP-25	Mouse (monoklonal)	1:500 in Diluent
Primärer Antikörper	Anti-PGP 9.5	Mouse (monoklonal)	1:1000 in Diluent
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 488 (grün)	Goat, anti-mouse	1:250 in Diluent
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 546 (rot)	Goat, anti-rabbit	1:250 in Diluent
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 488 (grün)	Goat, anti-rabbit	1:250 in Diluent
Sekundärer Antikörper	Alexa Fluor 546 (rot)	Goat, anti-mouse	1:250 in Diluent

2.2.6 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit $p < 0.05$ gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 α -Synuclein-Expression im humanen Gewebe

Zum Nachweis der α -Synuclein-mRNA-Expression im *Plexus myentericus* des humanen Kolons wurden die einzelnen Ganglien zunächst mit Hilfe der *Laser capture microdissection* isoliert und mit Hilfe der *real-time* Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert.

Mit Hilfe von immunhistochemischen Fluoreszenz-Doppelmarkierungen wurde eine Ko-Lokalisation von α -Synuclein in Ganglien des humanen Kolons mit den pan-neuronalen Markern HuC/D und PGP 9.5, sowie den Plastizitätsmarkern Synaptophysin, Synaptobrevin und SNAP-25 untersucht. Die überlagerten Bilder (*merge*) zeigen die Ko-Lokalisationen. Negativkontrollen durch Weglassen des Erstantikörpers zeigten keine Signale (Daten nicht gezeigt).

3.1.1 mRNA-Expression von α -Synuclein in humanen myenterischen Ganglien

Bei der Analyse der mRNA-Expression von α -Synuclein in myenterischen Ganglien des humanen Kolons, welche vorher mit Hilfe der *Laser capture microdissection* vom restlichen Gewebe isoliert wurden, zeigte sich, dass α -Synuclein hoch exprimiert wird (Abbildung 3.1). α -Synuclein wird durchschnittlich um den Faktor 1,61 höher exprimiert als der neuronale Marker Neuronenspezifische Enolase (NSE) und um den Faktor 6,75 niedriger als der Glia-Marker S100b.

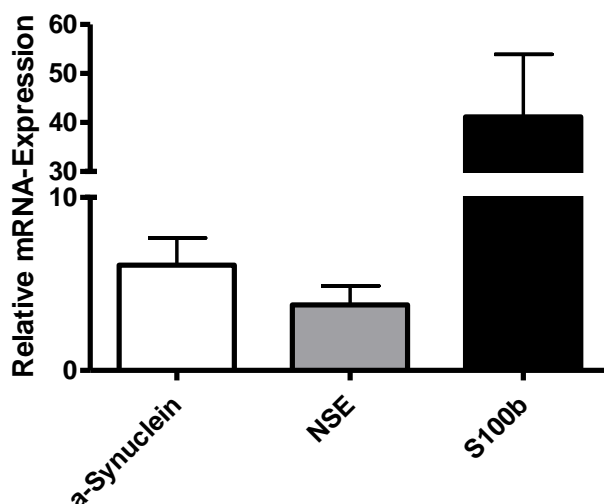


Abbildung 3.1: Relative mRNA-Expression von α -Synuclein in myenterischen Ganglien des humanen Kolons

α -Synuclein-mRNA-Expression ist in Laser-mikrodissezierten Ganglien des humanen Kolons detektierbar. Die relative mRNA Expression ist sogar stärker als die des neuronalen Markers NSE. Vergleich mit dem glialen Marker S100b. Die Daten wurden auf die Expressionslevel des House-keeping Gens HPRT normalisiert und dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=4).

3.1.2 Dual-Label Immunhistochemie für α -Synuclein im humanen Kolon

Um zu überprüfen, in welchen Bereichen der enterischen Ganglien α -Synuclein exprimiert wird, wurden zunächst immunhistochemische Fluoreszenz-Doppelmarkierungen in Ganzwandbiopsaten des humanen Kolons mit α -Synuclein und dem neuronalen Marker HuC/D durchgeführt (Abbildung 3.2). HuC/D ist lediglich in neuronalen Somata und Zellkernen, nicht jedoch in Fortsätzen lokalisiert. Zwischen den Somata befindet sich das Neuropil, welches dementsprechend mit den Antikörpern gegen HuC/D nicht visualisiert wurde. α -Synuclein zeigt Immunreaktivitäten sowohl in den neuronalen Somata (Pfeile in Abbildung 3.2), als auch im Neuropil des humanen *Plexus myentericus* (Abbildung 3.2 A-C) und *Plexus submucosus* (Abbildung 3.2 D-F).

α -Synuclein zeigt im gesamten neuronalen Soma eine starke Immunreaktivität und eine granuläre Form (Abbildung 3.2 A+D). Zwar zeigen sich im Neuropil punktuell auch kräftige Immunreaktionen und granuläre Muster, jedoch nicht in dieser flächenhaften Ausbreitung.

In den meisten Fällen zeigen die gesamten Somata eine α -Synuclein-Immunreaktivität, es kommen jedoch auch in den Somata kleine, runde Aussparungen (Abbildung 3.2 D-F) vor.

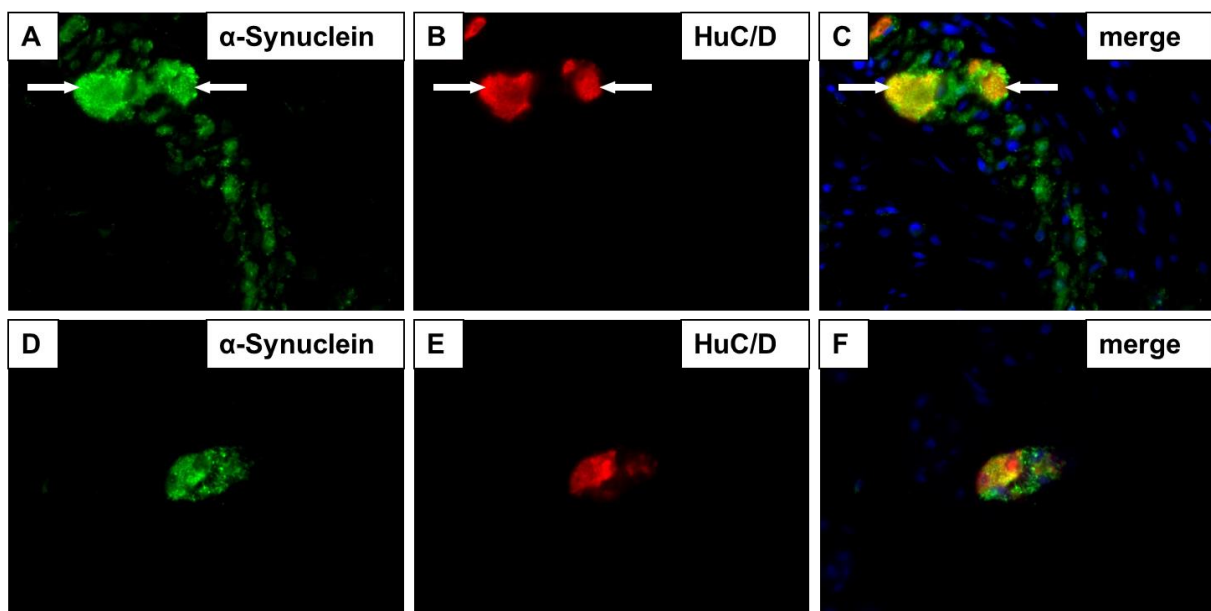


Abbildung 3.2: Dual-Label-Immunhistochemie für α -Synuclein und HuC/D im humanen ENS

Doppelmarkierung von α -Synuclein (grün) und HuC/D (rot) im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat. A-C: Plexus myentericus, Pfeile markieren neuronale Somata. D-F: Plexus submucosus; Blau: DAPI-Kernfärbung; Vergrößerung: 400fach.

Die immunhistochemische Fluoreszenz-Doppelmarkierung von Ganzwandbiopsien des humanen Kolons mit α -Synuclein und dem pan-neuronalen Marker PGP 9.5 (Abbildung 3.3), welcher sich in sämtlichen neuronalen Strukturen detektieren lässt, zeigt in allen Teilen des enterischen Nervensystems dasselbe Muster: Im *Plexus myentericus* (Abbildung 3.3 A-C), im *Plexus submucosus* (Abbildung 3.3 D-F) und in den Nervenfasern (Abbildung 3.3 G-I) deckt sich die Immunreaktivität von α -Synuclein mit der Immunreaktivität des pan-neuronalen Markers PGP 9.5. Besonders hervorzuheben ist die granuläre Akkumulation von α -Synuclein in neuronalen Somata und Nervenfasersfortsätzen.

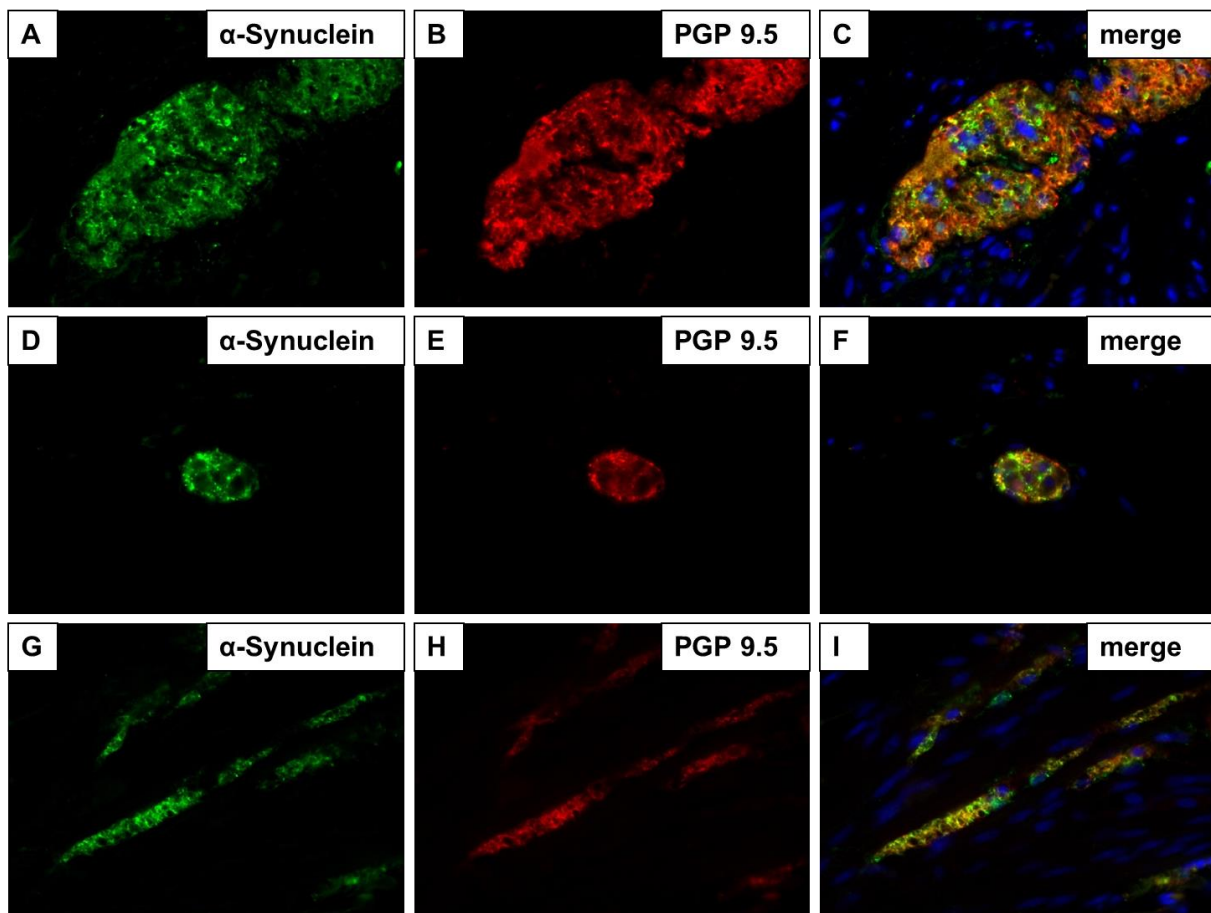


Abbildung 3.3: Dual-Label-Immunhistochemie für α -Synuclein und PGP 9.5 im humanen ENS

Doppelmarkierung von α -Synuclein (grün) und PGP 9.5 (rot) im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat. A-C: Plexus myentericus; D-F: Plexus submucosus; G-I: Nervenfasern der Ringmuskulatur; Blau: DAPI-Kernfärbung; Vergrößerung: 400fach.

Nachfolgend wurde eine immunhistochemische Fluoreszenz-Doppelmarkierung mit α -Synuclein und dem Vesikelmarker Synaptophysin durchgeführt (Abbildung 3.4). Synaptophysin zeigt eine granuläre Immunreaktivität über die gesamten *Plexus* verteilt und zeigt sich in einigen Bereichen besonders konzentriert. Im *Plexus myentericus* (Abbildung 3.4 A-C) ist die Synaptophysin-Immunreaktivität (punktuell

betont) im gesamten Plexus lokalisiert, die Zellkerne sind ausgespart. Im *Plexus submucosus* (Abbildung 3.4 D-F) findet sich eine Synaptophysin Immunreaktivität im gesamten *Plexus*, ebenfalls unter Aussparung der Zellkerne. Auch in den Nervenfasern (Abbildung 3.4 G-I) ist eine granuläre Synaptophysin-Immunreaktivität detektierbar.

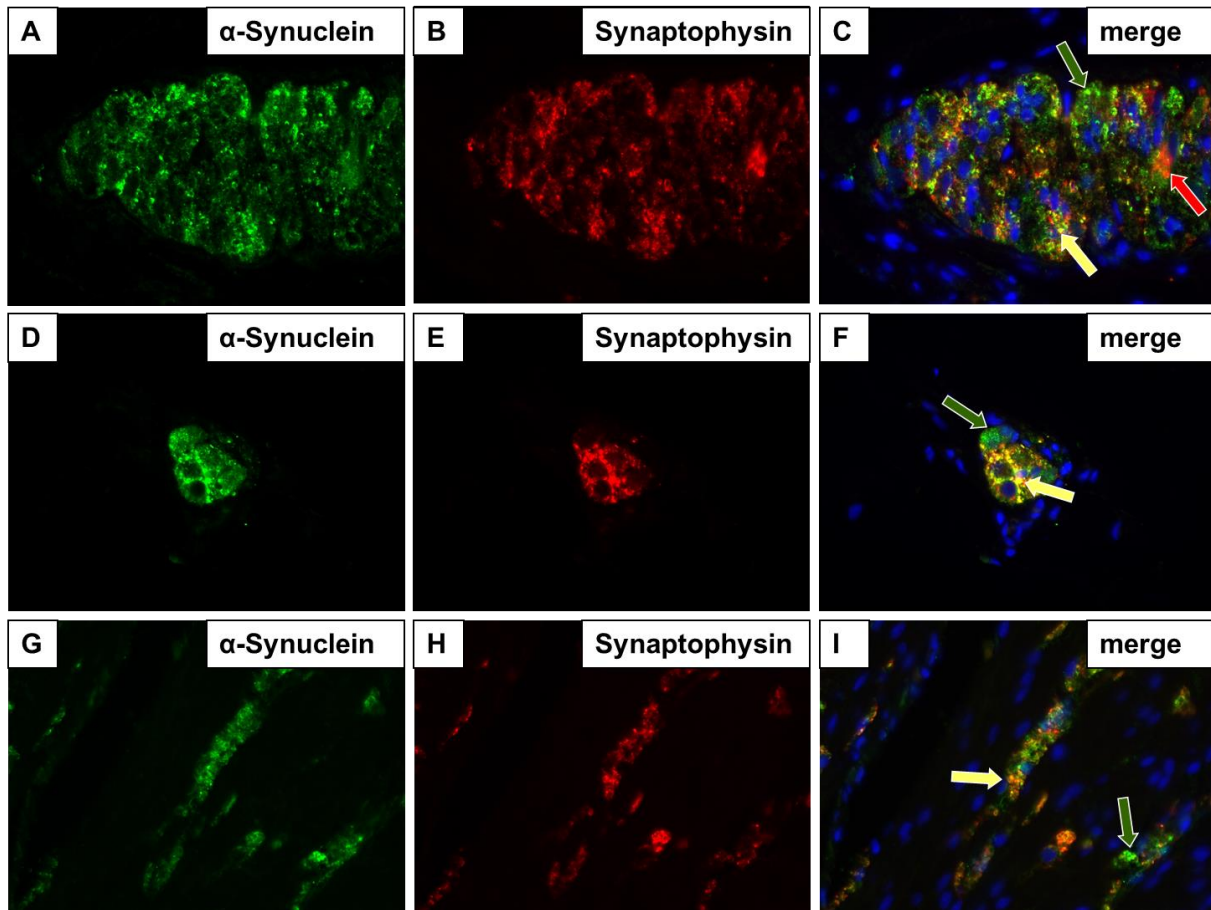


Abbildung 3.4: Dual-Label-Immunhistochemie für α -Synuclein und Synaptophysin im humanen ENS

Doppelmarkierung von α -Synuclein (grün) und Synaptophysin (rot) im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat. A-C: Plexus myentericus; D-F: Plexus submucosus; G-I: Nervenfasern der Ringmuskulatur; Gelbe Pfeile: Ko-Lokalisation von α -Synuclein und Synaptophysin; Rote Pfeile: Synaptophysin überwiegt optisch; Grüne Pfeile: α -Synuclein überwiegt optisch; Blau: DAPI-Kernfärbung; Vergrößerung: 400fach.

Beide Proteine zeigen in der Doppelfärbung partielle Ko-Lokalisation (Abbildung 3.4 C,F,I, gelbe Pfeile). An anderen Stellen lassen sich teilweise nur die einzelnen Proteine lokalisieren, bzw. ein Fluoreszenzsignal überwiegt stark (rote und grüne Pfeile in Abbildung 3.4 C,F,I).

Die Doppelmarkierung mit α -Synuclein und Synaptobrevin (Abbildung 3.5) zeigt, dass Synaptobrevin in den Plexus große Flächen ausspart, während α -Synuclein diese Flächen rasenartig bedeckt. Besonders deutlich wird dieses im *Plexus myentericus* (grüne Pfeile in Abbildung 3.5 C). Um diese Flächen herum ordnet sich

Synaptobrevin, teilweise saumartig, an. Im *Plexus submucosus* (Abbildung 3.5 D-F), zeigt sich dieses Bild ebenfalls. Aufgrund der geringeren Plexusgröße erscheint es jedoch nicht ganz so ausgeprägt. Die Immunreaktivität in den Nervenfasern erscheint relativ deckungsgleich (gelbe Pfeile in Abbildung 3.5 I). Hier gibt es nur wenige Abweichungen (grüne Pfeile in Abbildung 3.5 I). Besonders im *Plexus myentericus* ist zu sehen, dass Synaptobrevin nicht immer mit α -Synuclein vergesellschaftet ist, sondern dass die Immunreaktivität auch teilweise recht großflächig, als Einzelsignal detektierbar ist (rote Pfeile in Abbildung 3.5 C).

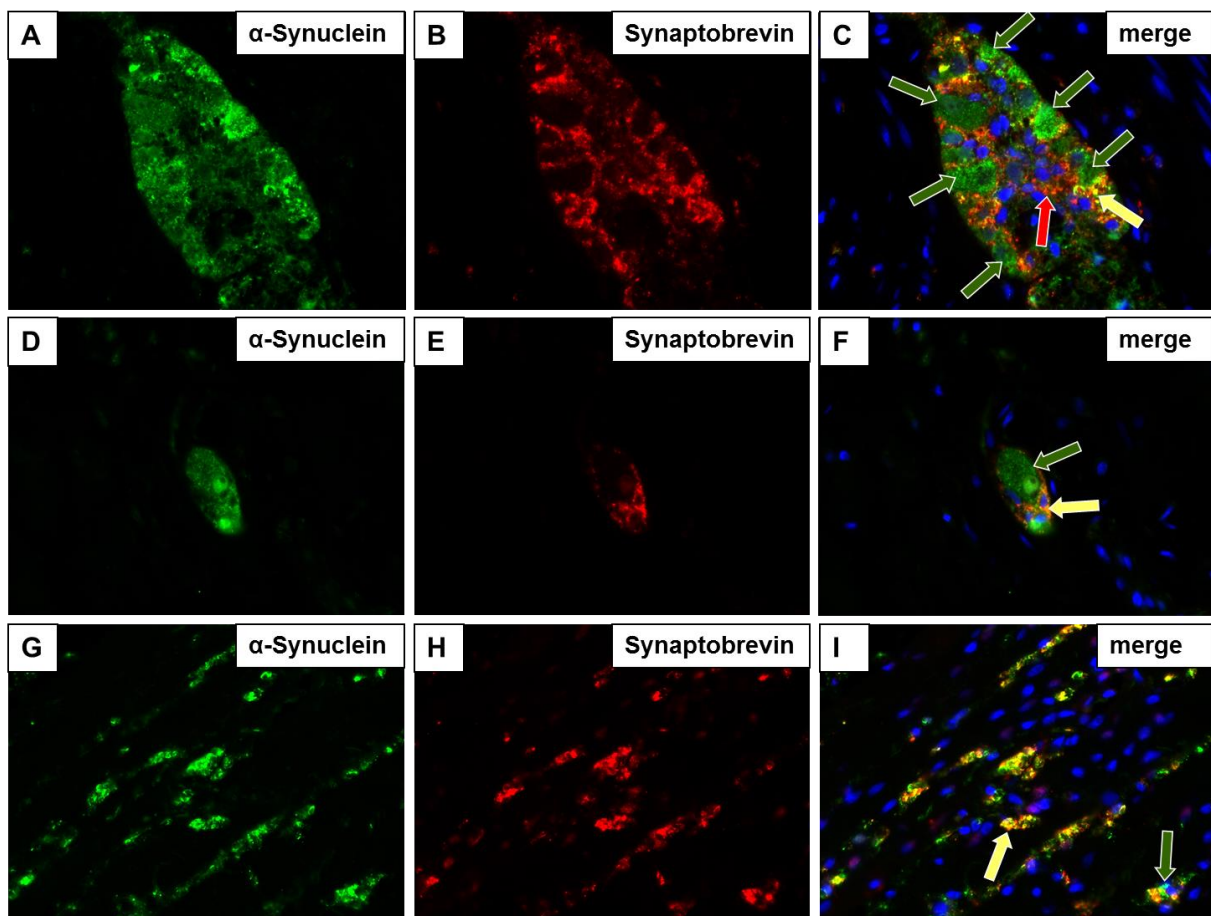


Abbildung 3.5: Dual-Label-Immunhistochemie für α -Synuclein und Synaptobrevin im humanen ENS

Doppelmarkierung von α -Synuclein (grün) und Synaptobrevin (rot) im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat. A-C: Plexus myentericus; D-F: Plexus submucosus; G-I: Nervenfasern der Ringmuskulatur; Gelbe Pfeile: gemeinsame Lokalisation; Rote Pfeile: Synaptobrevin überwiegt optisch; Grüne Pfeile: α -Synuclein überwiegt optisch; Blau: DAPI-Kernfärbung; Vergrößerung: 400fach.

Es zeigt sich bei der Doppelmarkierung mit α -Synuclein und SNAP-25 (Abbildung 3.6) ein ähnliches Bild wie bei der oben beschriebenen Doppelmarkierung mit α -Synuclein und Synaptobrevin (Abbildung 3.5). In den *Plexus* gibt es größere Flächen, die nur α -Synuclein beinhalten (grüne Pfeile in Abbildung 3.6 C und F). Außerhalb dieser Flächen liegen die beiden Proteine größtenteils ko-lokalisiert (gelbe Pfeile in

Abbildung 3.6) vor. Aber auch unabhängige Immunreaktionen sind zu beobachten (Grüne und rote Pfeile in Abbildung 3.6 C und F). In den Nervenfasern liegt SNAP-25 meist mit α -Synuclein ko-lokalisiert vor (Gelber Pfeile in Abbildung 3.6 I). Allerdings sind die Signale für α -Synuclein stärker und kommen auch isoliert vor (grüne Pfeile in Abbildung 3.6 I).

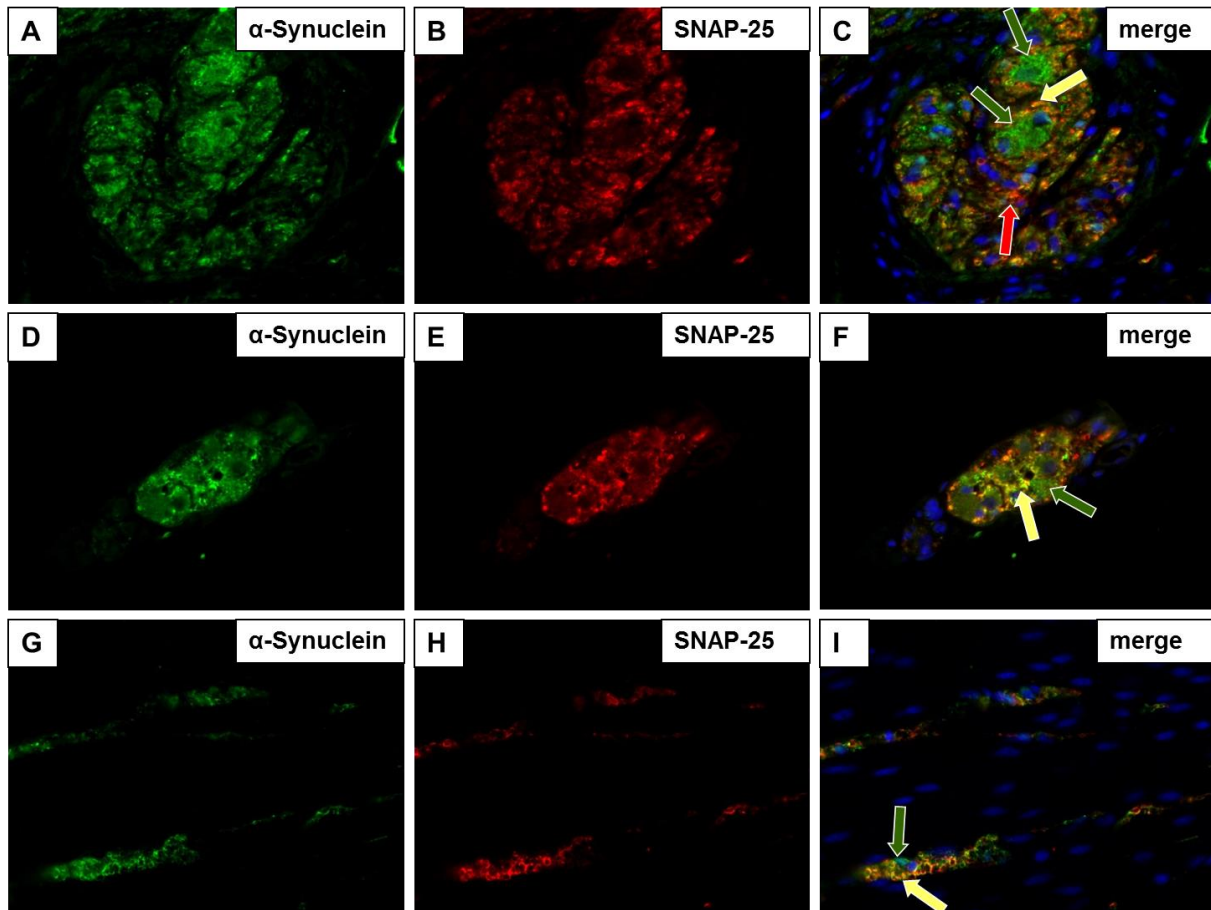


Abbildung 3.6: Dual-Label-Immunhistochemie von α -Synuclein und SNAP-25 im humanen ENS

Doppelmarkierung von α -Synuclein (grün) und SNAP-25 (rot) im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat. A-C: Plexus myentericus; D-F: Plexus submucosus; G-I: Nervenfasern der Ringmuskulatur; Gelbe Pfeile: gemeinsame Lokalisation; Rote Pfeile: SNAP-25 überwiegt optisch; Grüne Pfeile: α -Synuclein überwiegt optisch; Blau: DAPI-Kernfärbung; Vergrößerung: 400fach.

3.2 α -Synuclein-Expression in kultivierten enterischen Neuronen

Die kultivierten enterischen Neurone wurden für diese Arbeit aus enterischen myenterischen Ganglien des Darms postnataler Ratten gewonnen. Zur Kultivierung werden diese Zellen mit dem neurotrophen Faktor GDNF zu Wachstum und Differenzierung angeregt. Um die Abhängigkeit der α -Synuclein-mRNA-Expression kultivierter enterischer Neurone von GDNF-Behandlung zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression von α -Synuclein bei ansteigenden GDNF-Konzentrationen mit

Hilfe der *real-time* Polymerase-Kettenreaktion gemessen. Des Weiteren wurde α -Synuclein mit Hilfe der immunzytochemischen Fluoreszenz-Doppelmarkierung mit den Proteinen PGP 9.5, Synaptophysin, Synaptobrevin und SNAP-25 ko-lokalisiert, um das Verteilungsmuster von α -Synuclein in kultivierten myenterischen Neuronen zu bestimmen. Die überlagerten Bilder (*merge*) zeigen die Ko-Lokalisationen. Negativkontrollen durch Weglassen des Erstantikörpers zeigten keine Signale (Daten nicht gezeigt).

3.2.1 mRNA-Expression von α -Synuclein in kultivierten enterischen Neuronen in Abhängigkeit von GDNF

Um die Abhängigkeit der α -Synuclein-mRNA-Expression von GDNF zu messen, wurden die Kulturen für sechs Tage mit ansteigenden Konzentrationen von GDNF behandelt.

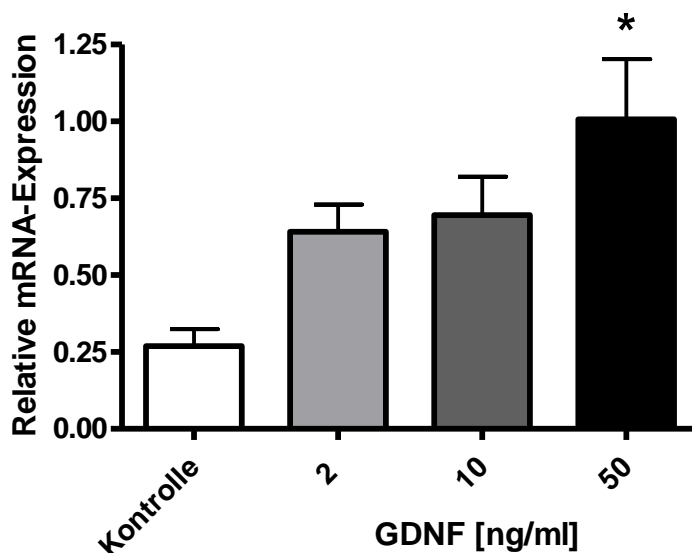


Abbildung 3.7: mRNA-Expression von α -Synuclein in kultivierten enterischen Neuronen in Abhängigkeit des neurotrophen Faktors GDNF

Kultivierte enterische Neurone wurden 6 Tage mit GDNF behandelt. Die α -Synuclein mRNA Expression steigt in Abhängigkeit von der GDNF-Konzentration. Die Daten wurden auf die Expressionslevel des House-keeping Gens HPRT normalisiert und dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=10-12); *p<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Kulturen wurden für sechs Tage mit 0, 2, 10 oder 50 ng/ml GDNF behandelt. Anschließend wurde die mRNA extrahiert und α -Synuclein Expression mittels qPCR gemessen. Es zeigte sich eine dosisabhängige Heraufregulierung der α -Synuclein-mRNA-Expression, die bei 50ng/ml GDNF ihr Maximum erreichte und 2.59fach über den α -Synuclein-mRNA-Spiegeln der Kontrollen lag (Abbildung 3.7).

3.2.2 Dual-Label-Immunzytochemie für α -Synuclein in kultivierten enterischen Neuronen

Um zu überprüfen, wo α -Synuclein in den enterischen Nervenzellkulturen exprimiert wird, wurde zunächst eine Fluoreszenz-Doppelmarkierung mit dem pan-neuronalen Marker PGP 9.5 durchgeführt (Abbildung 3.8).

Es zeigte sich, dass die Immunreaktivitäten von α -Synuclein (Abbildung 3.8 A) und PGP 9.5 (Abbildung 3.8B) nahezu deckungsgleich sind. α -Synuclein befindet sich also in allen neuronalen Somata und in den dazugehörigen Fortsätzen. Bei der Doppelmarkierung mit α -Synuclein und Synaptophysin (Abbildung 3.9) lässt sich erkennen, dass beide Proteine Immunreaktionen in Zellen und Zellfortsätzen zeigen. Die α -Synuclein-Immunreaktivität (Abbildung 3.9A) zeigt in den neuronalen Somata neben einer homogenen Färbung auch ein granuläres Muster.

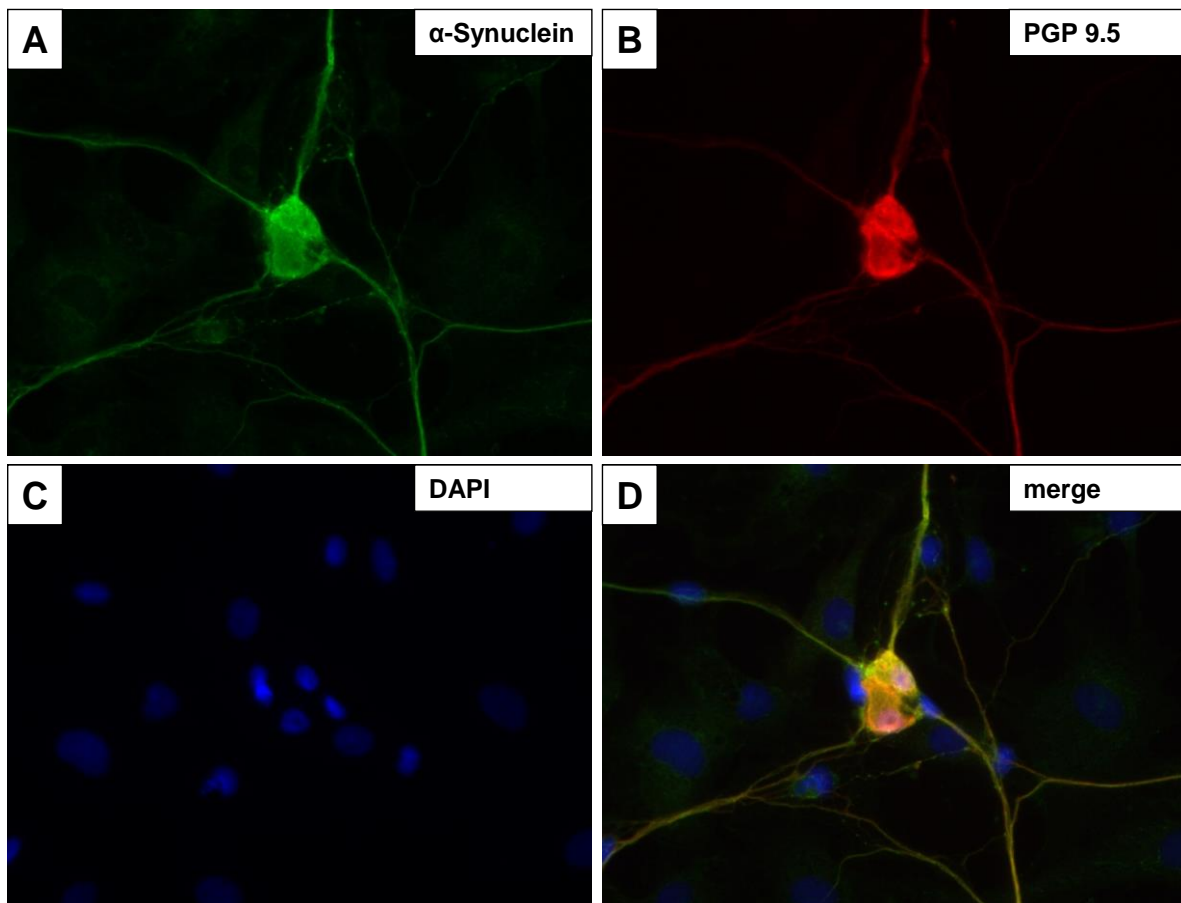


Abbildung 3.8: Fluoreszenz-Immunzytochemie für α -Synuclein und PGP 9.5 in kultivierten enterischen Neuronen

Doppelmarkierung von α -Synuclein (A) und PGP 9.5 (B) mit DAPI-Kernfärbung (C) und dem überlagerten Bild (D); Vergrößerung: 400fach.

Bezüglich der α -Synuclein-Immunreaktion zeigen die Randbereiche der Ganglien die stärksten Signale. In den Nervenzellfortsätzen überwiegt der granuläre Charakter.

Synaptophysin (Abbildung 3.9 B) zeigt überwiegend ein granuläres Bild und hat die stärksten Immunreaktionen an den Rändern des Ganglions, sowie in den Nervenzellfortsätzen. Betrachtet man das überlagerte Bild (Abbildung 3.9D), sieht man mehrere Ko-Lokalisationen, besonders am Randbereich des Ganglions. Wenn die Nervenfasern netzförmige Strukturen ausbilden, überwiegt die Synaptophysin-Immunreaktivität.

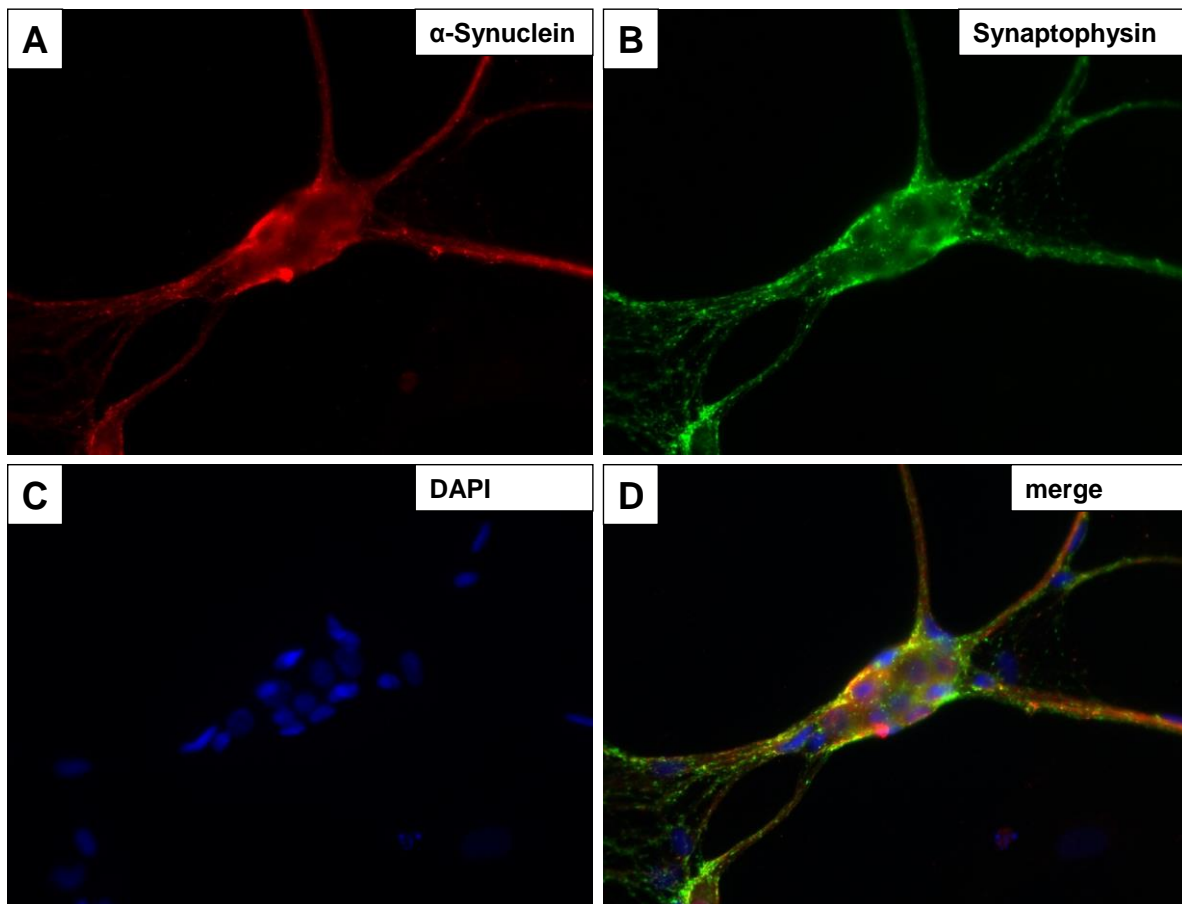


Abbildung 3.9: Fluoreszenz-Immunzytochemie von α -Synuclein und Synaptophysin in kultivierten enterischen Neuronen

Doppelmarkierung von α -Synuclein (A) und Synaptophysin (B) mit DAPI-Kernfärbung (C) und dem überlagerten Bild (D); Vergrößerung: 400fach.

Ein etwas anderes Bild zeigt die Doppelmarkierung mit α -Synuclein und Synaptobrevin (Abbildung 3.10). α -Synuclein (Abbildung 3.10A) zeigt Immunreaktivitäten im gesamten Ganglion und in den Nervenfasern. Synaptobrevin (Abbildung 3.10B) zeigt lediglich eine schwache Immunreaktivität in den Nervenfasern. In den Ganglien sieht man häufig starke, granuläre Immunreaktionen. Einige Flächen im Ganglion sind auch komplett frei von Synaptobrevin-Immunreaktivität.

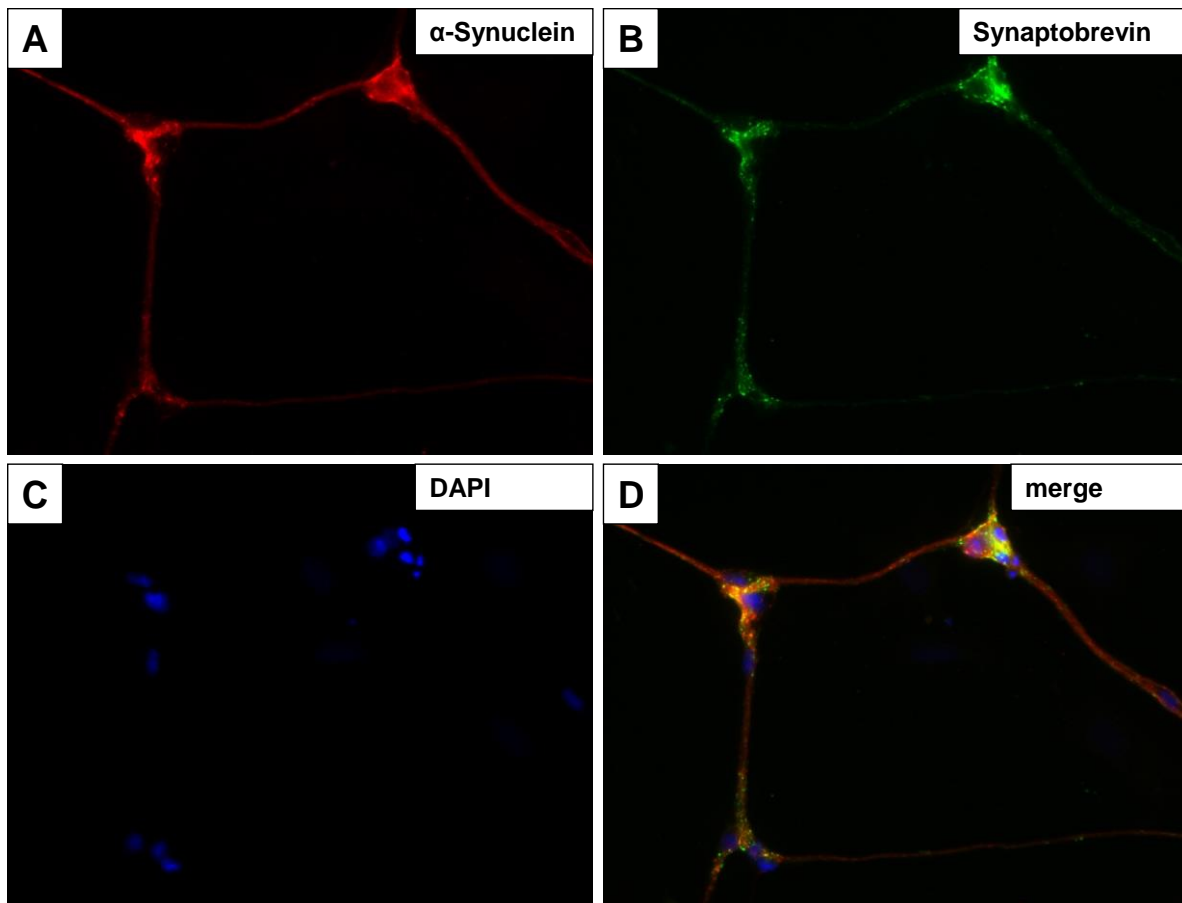


Abbildung 3.10: Fluoreszenz-Immunzytochemie von α -Synuclein und Synaptobrevin in kultivierten enterischen Neuronen

Doppelmarkierung von α -Synuclein (A) und Synaptobrevin (B) mit DAPI-Kernfärbung (C) und dem überlagerten Bild (D); Vergrößerung: 400fach.

Legt man die Bilder übereinander (Abbildung 3.10D), sieht man in den Ganglien deutliche Ko-Lokalisationen.

Im Gegensatz zum SNARE-Protein Synaptobrevin (Abbildung 3.10B) zeigt das SNARE-Protein SNAP-25 eine sehr starke Immunreaktivität in den Nervenfasern der enterischen Nervenzellkulturen (Abbildung 3.11B). Mit Ausnahme dieses Unterschiedes sind die Verteilungsmuster in den immunzytochemischen Doppelmarkierungen α -Synuclein mit SNAP-25 (Abbildung 3.11) und α -Synuclein mit Synaptobrevin (Abbildung 3.10) ähnlich.

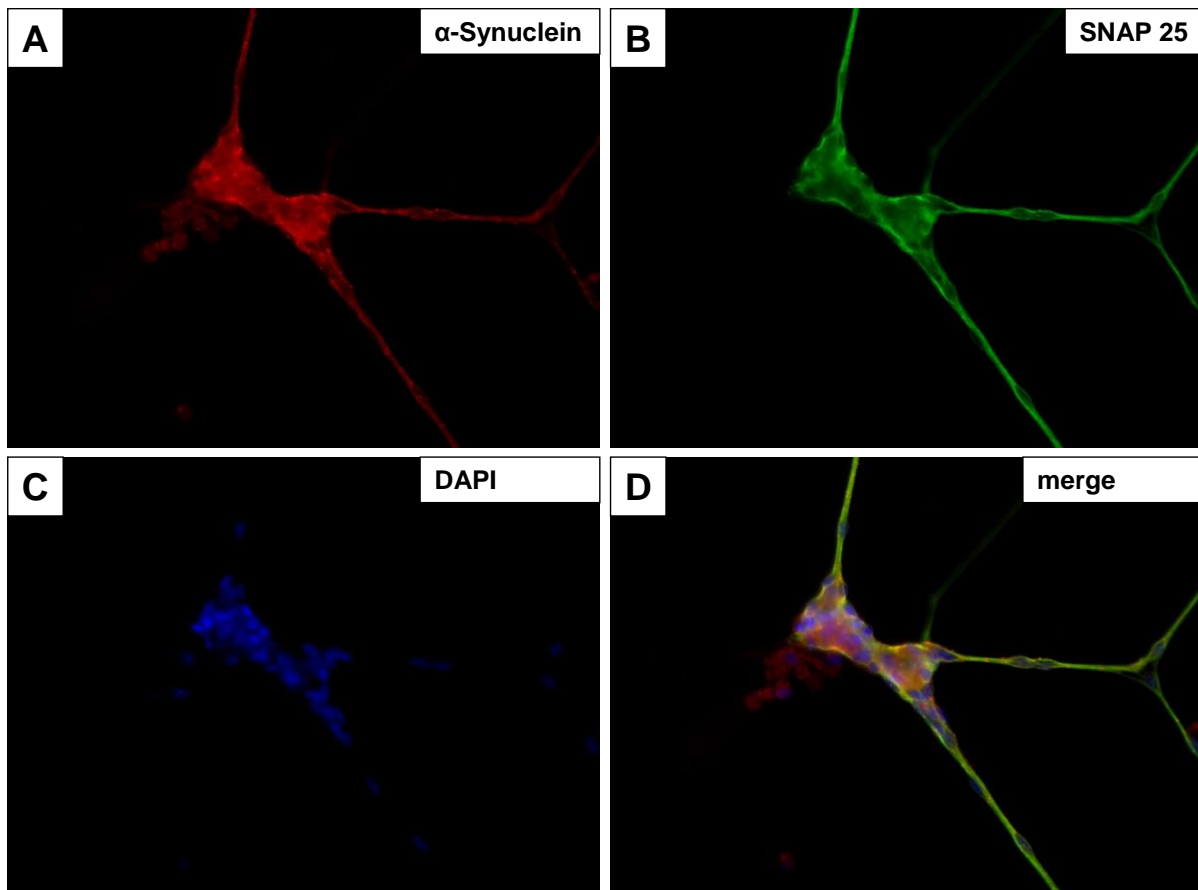


Abbildung 3.11: Fluoreszenz-Immunzytochemie von α -Synuclein und SNAP-25 in kultivierten enterischen Neuronen

Doppelmarkierung von α -Synuclein (A) und SNAP-25 (B) mit DAPI-Kernfärbung (C) und dem zusammengeführten Bild (D); Vergrößerung: 400fach.

3.3 α -Synuclein-Expression bei Patienten mit Morbus Hirschsprung

Um die Expression von α -Synuclein in hypo- und aganglionären Kolonabschnitten von Patienten mit Morbus Hirschsprung zu untersuchen, wurde eine Immunhistochemie an Ganzwandpräparaten des Kolons durchgeführt. Die Präparate stammen aus Operationsresektaten. Die Patienten waren zur Zeit der Resektion alle im Kleinkindalter (1 Jahr alt).

Zunächst wurden die typischen Charakteristika des ENS bei Morbus Hirschsprung Patienten mit Hilfe einer immunhistochemischen Markierung gegen PGP 9.5 dargestellt. Vergleichend wurde eine immunhistochemische Markierung gegen α -Synuclein durchgeführt. Negativkontrollen durch Weglassen des Erstantikörpers zeigten keine Signale (Daten nicht gezeigt).

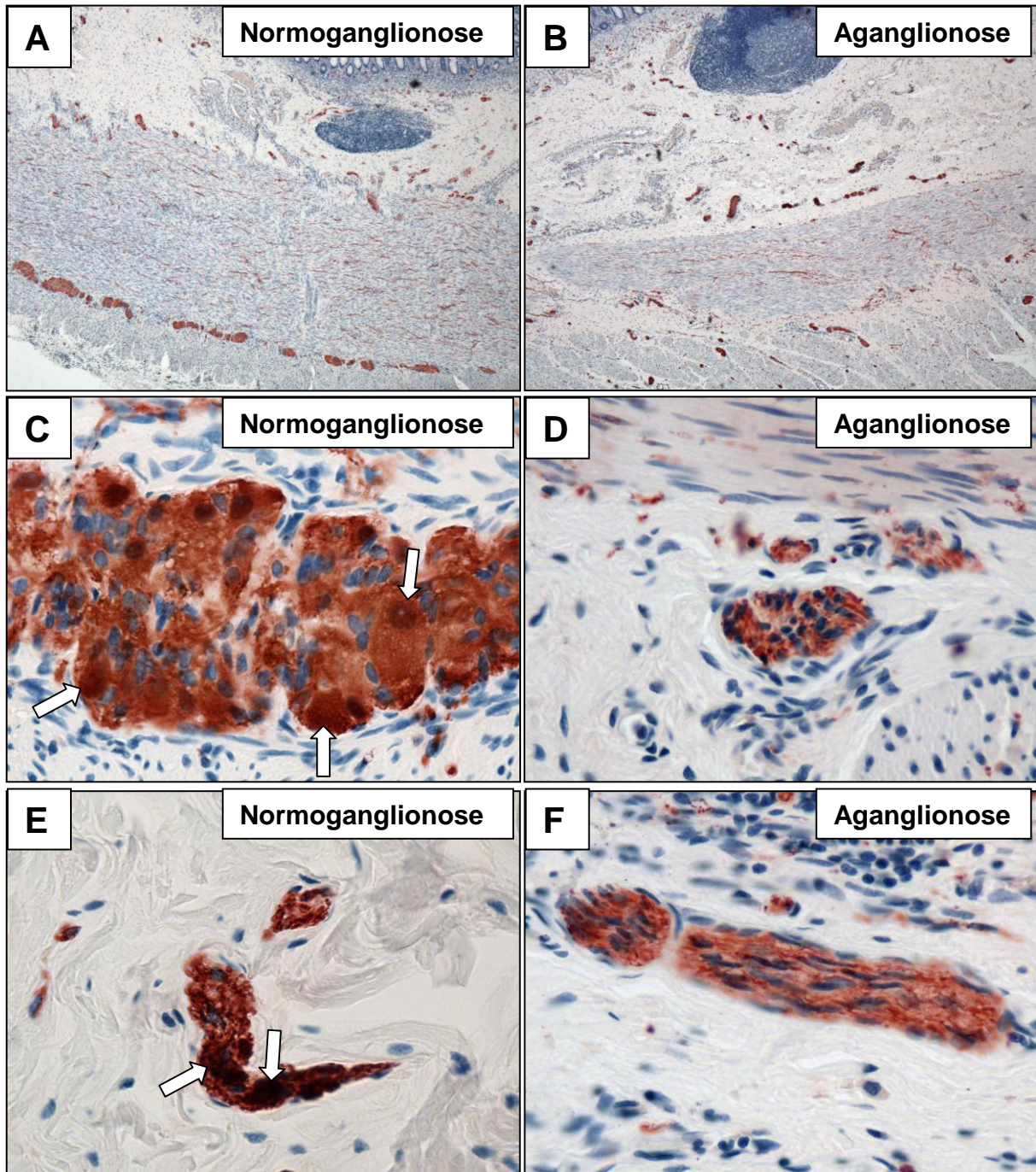


Abbildung 3.12: Immunhistochemie für PGP 9.5 im Kolon von Patienten mit Morbus Hirschsprung.

Vergleich von normoganglionären- und aganglionären Abschnitten im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat A,C,E: normoganglionäre Abschnitte; B,D,F: aganglionäre Abschnitte; A+B: Übersicht in 40facher Vergrößerung; C+D: Bereich des Plexus myentericus in 600facher Vergrößerung; E+F: Bereich des Plexus submucosus in 600facher Vergrößerung; Pfeile in C+E zeigen auf Neurone; Hämalaun-Gegenfärbung.

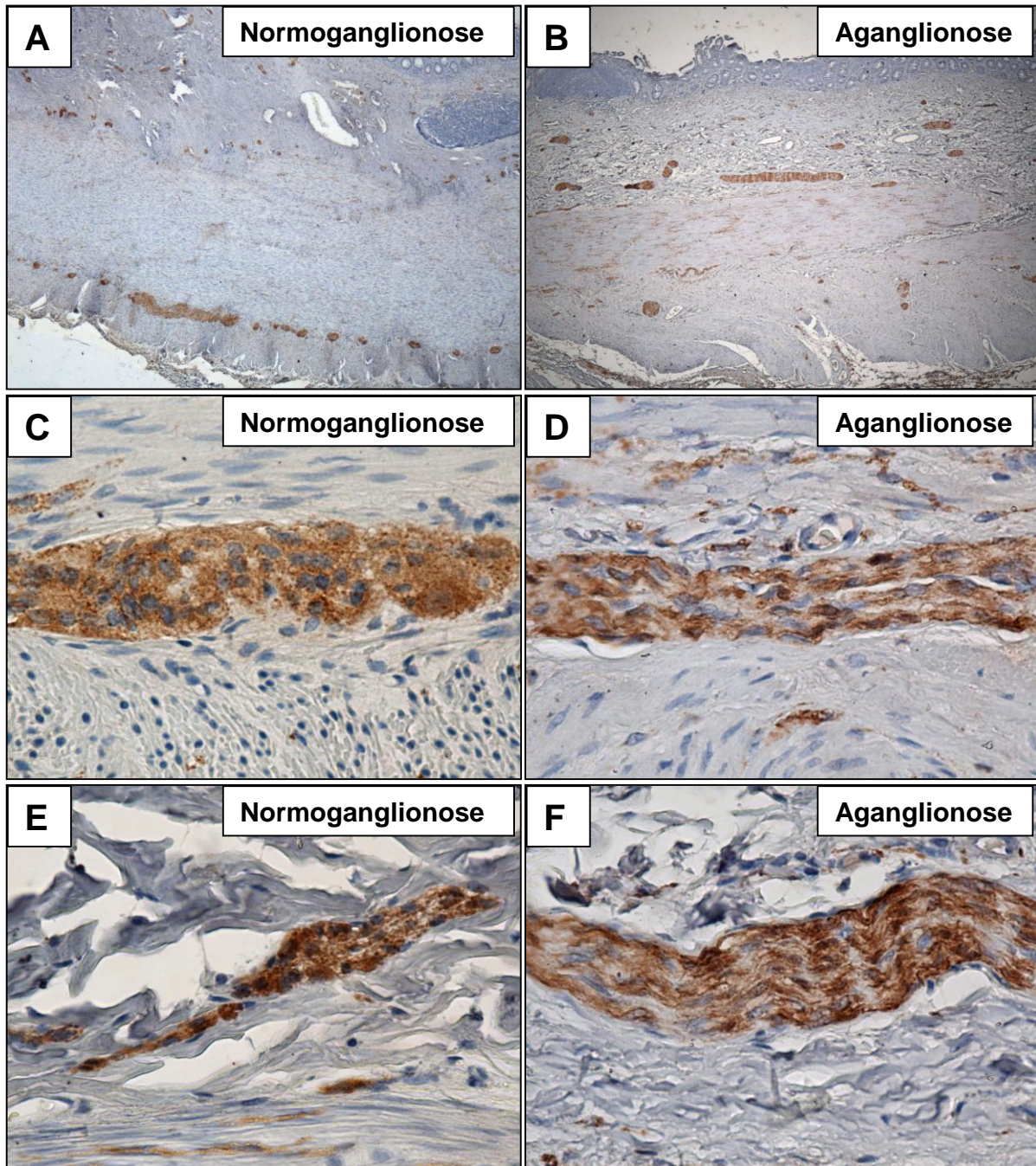


Abbildung 3.13: Immunhistochemie für α -Synuclein im Kolon von Patienten mit Morbus Hirschsprung.

Vergleich von normoganglionären- und aganglionären Abschnitten im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat. A,C,E: normoganglionäre Abschnitte; B,D,F: aganglionäre Abschnitte; A+B: Übersicht in 40facher Vergrößerung; C+D: Bereich des Plexus myentericus in 600facher Vergrößerung; E+F: Bereich des Plexus submucosus in 600facher Vergrößerung; Hämalaun-Gegenfärbung.

3.3.1 Vergleich von normoganglionären und aganglionären Abschnitten bei Morbus Hirschsprung Patienten

Die immunhistochemische Markierung der normoganglionären und aganglionären Abschnitte der Kolonresektate mit PGP 9.5 (Abbildung 3.12) stellt die veränderte

Architektur im enterischen Nervensystem dar. In 40facher Vergrößerung (Abbildung 3.12 A+B) sieht man bereits eine veränderte Architektur, fehlende *Plexus* und ektope, verdickte Nervenfasern in den aganglionären Abschnitten. Die Vergrößerung des *Plexus myentericus* (Abbildung 3.12 C+D) auf 600fach zeigt, dass die Neurone in den aganglionären Abschnitten fehlen und lediglich verdickte Nervenfasern zu erkennen sind.

Das gleiche Bild zeigt sich auch in der *Submucosa* (Abbildung 3.12 E+F). In den aganglionären Abschnitten fehlen die *Plexus*. Die Pfeile in Abbildung 3.12 E zeigen auf Nervenzellen. In den aganglionären Abschnitten ziehen nur dicke Nervenfaserbündel durch die *Submucosa* (Abbildung 3.12 F).

Das immunhistochemische Bild von α -Synuclein im ENS der Morbus Hirschsprung-Patienten (Abbildung 3.13) unterscheidet sich nicht von dem, das PGP 9.5 nachweist (Abbildung 3.12). Auch hier zeigen sich fehlende Ganglien und verdickte, ektope Nervenfasern in den aganglionären Abschnitten.

3.4 α -Synuclein-Expression bei Patienten mit Divertikulitis

Die Divertikulitis ist eine Krankheit, welche mit einer gestörten intestinalen Motilität und einer enterischen Neuro-/Myopathie einhergeht. Um zu überprüfen, ob sich die α -Synuclein-Expression bei dieser Erkrankung verändert, wurde zunächst die mRNA-Expression in der *Tunica muscularis* des Kolons von Divertikulitis-Patienten mit der von Kontrollpatienten verglichen. Danach wurden Kolon-Ganzwandpräparate angefertigt, welche immunhistochemisch mit Antikörpern gegen PGP 9.5 und α -Synuclein markiert wurden. Anschließend wurden morphometrische Untersuchungen durchgeführt, um die Dichte der Nervenfasern in den Muskelschichten zu vergleichen. Abschließend wurden Präparate von Divertikulitispatienten und Kontrollpatienten immunhistochemisch mit Antikörpern gegen phosphoryliertes α -Synuclein markiert.

3.4.1 mRNA-Expression von α -Synuclein bei Divertikulitis-Patienten und Kontrollgruppe

Die α -Synuclein-mRNA-Expression in der *Tunica muscularis* von Divertikulitis-Patienten (17 Proben) ist im Vergleich zu der Kontrollgruppe (18 Proben) signifikant ($p=0,0139$) verringert (Abbildung 3.14).

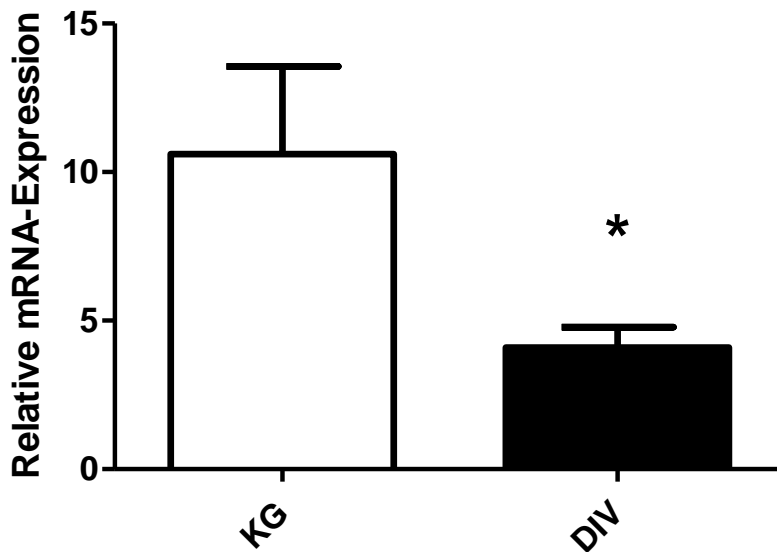


Abbildung 3.14: α -Synuclein-mRNA-Expression in der *Tunica muscularis* von Patienten mit Divertikulitis

α -Synuclein ist in der Kontrollgruppe (KG) höher exprimiert als bei Patienten mit Divertikulitis (DIV). Die Daten wurden auf die Expressionslevel des House-keeping Gens HPRT normalisiert und dargestellt als Mittelwert \pm SEM (Kontrollgruppe: n=18; Divertikulitis: n=17); * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.4.2 Immunhistochemischer Vergleich des ENS zwischen Divertikulitis- und Kontrollpatienten mittels PGP 9.5 und α -Synuclein

Anhand der Immunreaktivität für PGP 9.5 zeigen die Ganglien des *Plexus myentericus* im Vergleich von Divertikulitis- und Kontrollpatienten keine Unterschiede (Abbildung 3.15). Die Nervenfasern in der Ringmuskelschicht (Abbildung 3.15 C+D) zeigen sich bei den Divertikulitis-Patienten bildmorphologisch kaliberschwächer und weiter voneinander entfernt. Man sieht mehr kleinere Einzelfasern als bei der Kontrollgruppe. Bei Divertikulitispatienten verlaufen die Nervenfasern weniger parallel zu den Muskelzellkernen ausgerichtet, als bei den Kontrollen. Die Abstände zwischen den Nervenfasern scheinen vergrößert zu sein.

Bei den immunhistochemischen Markierungen mit Antikörpern gegen α -Synuclein, (Abbildung 3.16) stellt sich die Immunreaktivität etwas schwächer dar, als die für PGP 9.5. Die Immunreaktivitäten von α -Synuclein in den myenterischen *Plexus* der Divertikulitis- und Kontrollpatienten (Abbildung 3.16 A+B) unterscheiden sich nicht voneinander. Die Nervenfasern (Abbildung 3.16 C+D) zeigen die gleiche Bildmorphologie wie in Abbildung 3.15, sind aber generell schwächer markiert. Negativkontrollen durch Weglassen des Erstantikörpers zeigten keine Signale (Daten nicht gezeigt).

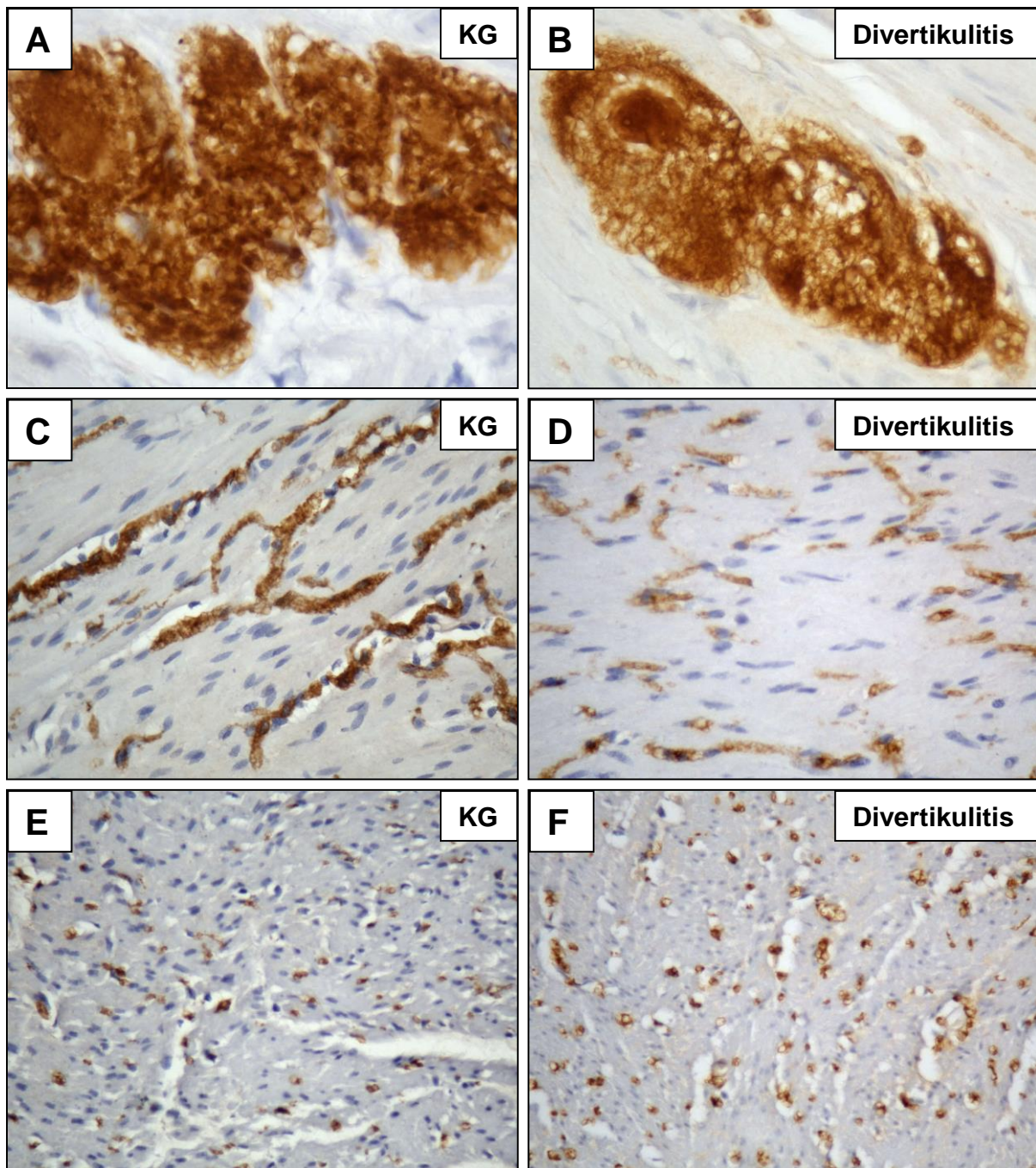


Abbildung 3.15: Immunhistochemie für PGP 9.5 im Kolon von Patienten mit Divertikulitis

Vergleich von Kontrollgruppe (KG) und Divertikulitis Patienten im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat. A+B: Plexus myentericus C+D: Nervenfasern der Ringmuskulatur; E+F: Nervenfasern der Längsmuskulatur; Vergrößerung: 400fach; Hämalan-Gegenfärbung.

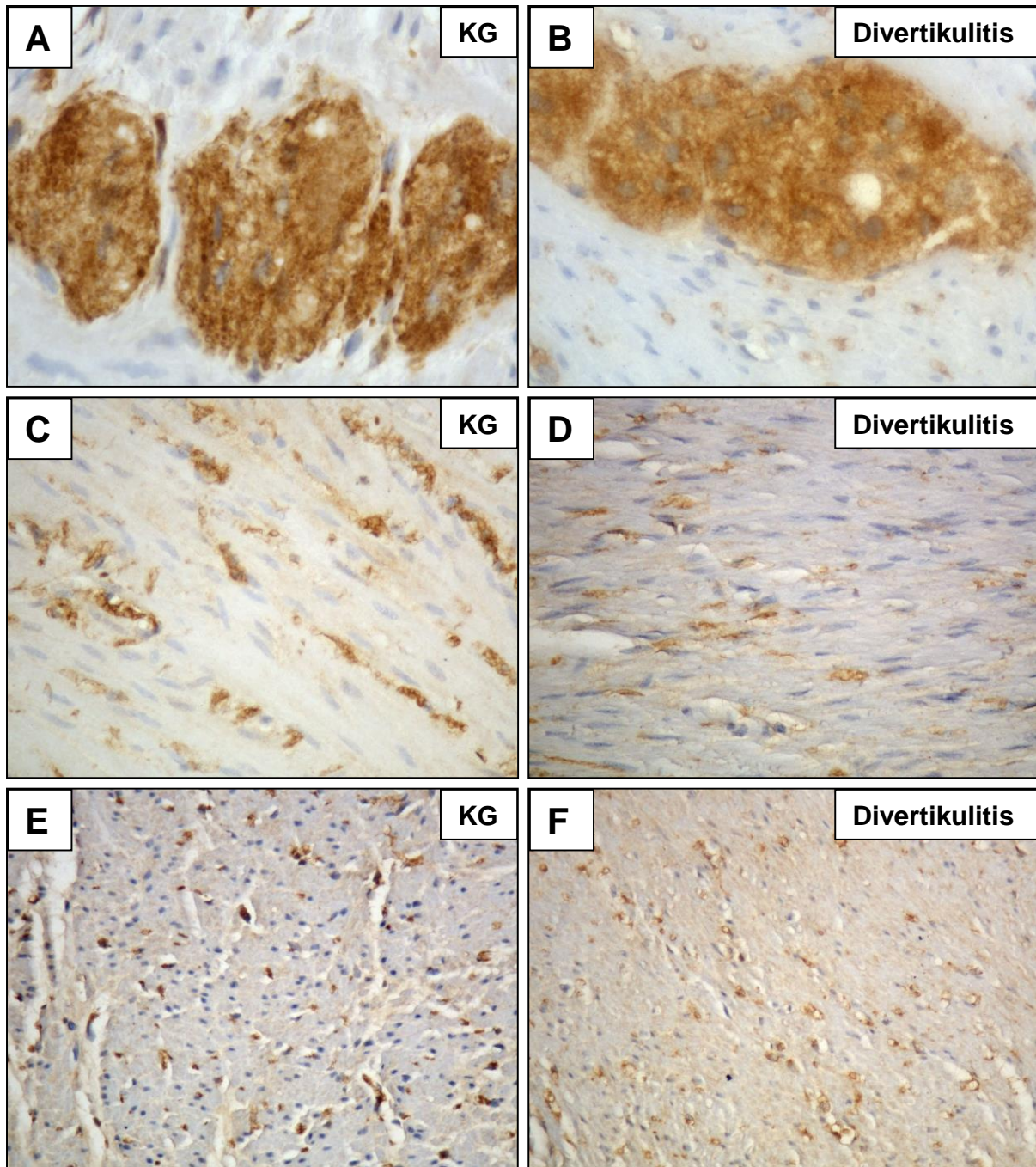


Abbildung 3.16: Immunhistochemie für α -Synuclein im Kolon von Patienten mit Divertikulitis

Vergleich von Kontrollgruppe (KG) und Divertikulitis Patienten im humanen Kolon-Ganzwandbiopsat. A+B: Plexus myentericus; C+D: Nervenfasern der Ringmuskulatur; E+F: Nervenfasern der Längsmuskulatur; Vergrößerung: 400fach; Hämalaun-Gegenfärbung.

3.4.2 Morphometrie der Nervenfaserdichte in Längsmuskulatur und Ringmuskulatur des humanen Kolons bei Divertikulitis-Patienten und Kontrollgruppe

Um die in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Unterschiede zwischen Divertikulitis-Patienten und Kontrollgruppe zu quantifizieren, wurde die Immunreaktivität der Nervenfasern

morphometriert und mittels einer Binärflächenmessung quantifiziert. Die markierte immunopositive Fläche wurde entsprechend vermessen und in Proportion zur gesamten Bildfläche (bei 400facher Vergrößerung) gesetzt.

In Abbildung 3.17 sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der Nervenfasern in Ring- und Längsmuskulatur dargestellt. Bei den Ganzwandresektaten, welche mit Antikörpern gegen PGP 9.5 (Abbildung 3.17 A) markiert wurden, sieht man eine durchschnittliche Verringerung der Nervenfaserdichten besonders in der Ringmuskulatur und kaum in der Längsmuskulatur von Divertikulitis-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten. Die Veränderungen sind jedoch beide nicht signifikant.

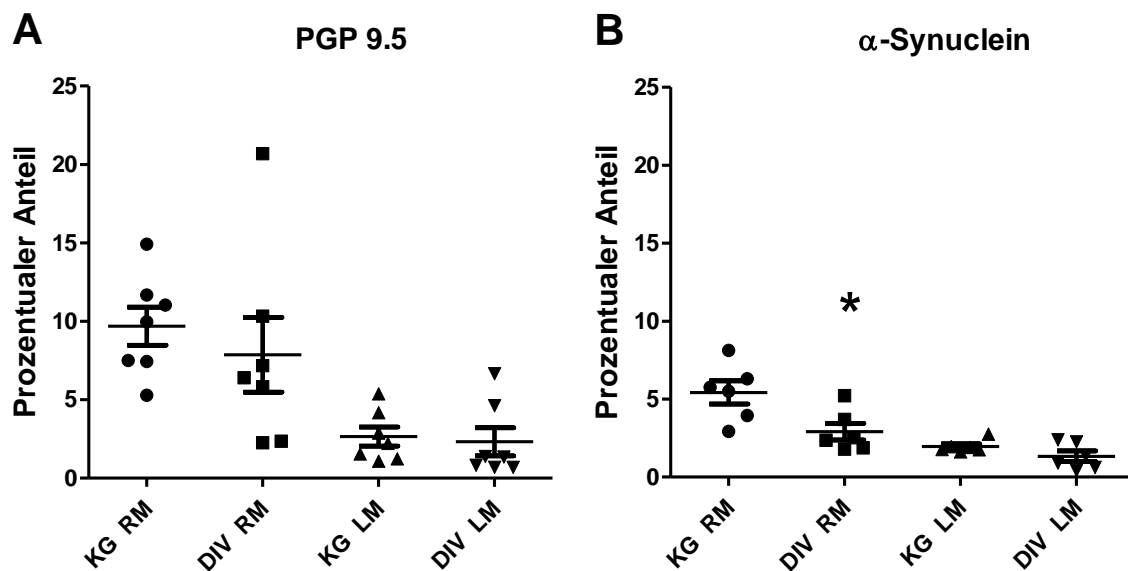


Abbildung 3.17: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der Nervenfasern in Ring- und Längsmuskulatur im Vergleich

A: Prozentualer Anteil der Nervenfaserfläche in Ring- und Längsmuskulatur, die mit Antikörpern gegen PGP 9.5 markiert wurde (n= jeweils 7); **B:** Prozentualer Anteil der Nervenfaserfläche in Ring- und Längsmuskulatur, die mit Antikörpern gegen α-Synuclein markiert wurde (n= jeweils 6), *p<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe; KG= Kontrollgruppe, DIV= Divertikulitis-Patienten, RM= Ringmuskulatur, LM= Längsmuskulatur.

Bei der Immunhistochemie für α-Synuclein (Abbildung 3.17 B) zeigt sich in der Ringmuskulatur von Divertikulitispatienten eine signifikante Reduktion der Nervenfaserdichte. In der Längsmuskelschicht waren keine signifikanten Veränderungen detektierbar.

3.4.3 Immunhistochemischer Vergleich des ENS von Divertikulitis- und Kontrollpatienten mit Antikörpern gegen phosphoryliertes α -Synuclein

Um zu überprüfen, ob der Gehalt an phosphoryliertem, aggregiertem α -Synuclein im ENS bei Divertikulitis-Patienten verändert ist, wurden Kolon-Ganzwandresektate von Divertikulitis- und Kontrollpatienten immunhistochemisch mit Antikörpern gegen phosphoryliertes α -Synuclein markiert und miteinander verglichen.

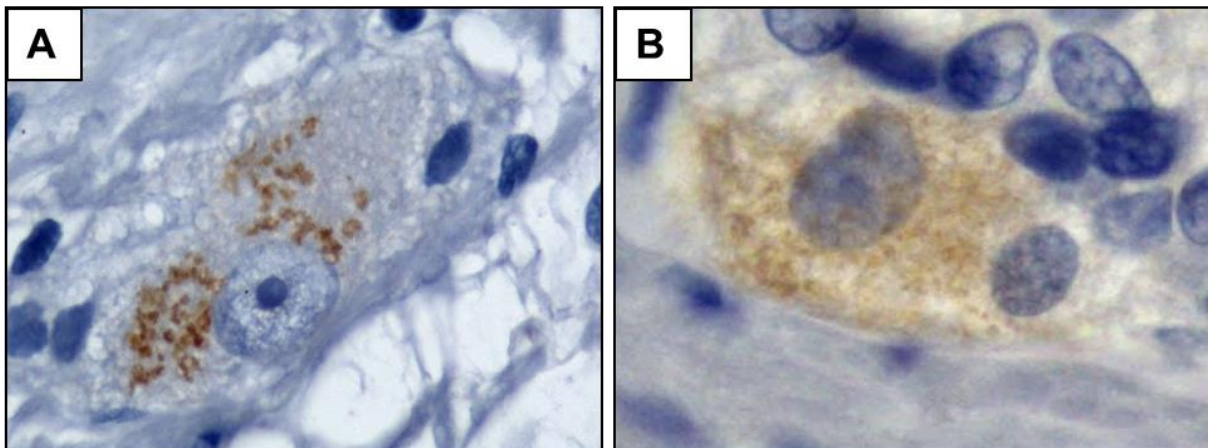


Abbildung 3.18: Immunhistochemie für phosphoryliertes α -Synuclein im Kolon von Patienten mit Divertikulitis

Humanes Kolon-Ganzwandbiopsat; A+B: Vergleich von zwei unterschiedlichen Formen der Immunreaktivität in myenterischen Neuronen in 1000facher Vergrößerung.

In Abbildung 3.18 sind zwei unterschiedliche Färbemuster von phosphoryliertem α -Synuclein in Neuronen des *Plexus myentericus* des humanen Kolons dargestellt.

Während sich die Anwesenheit von phosphoryliertem α -Synuclein in Abbildung 3.18 A punktuell und grob-granulär darstellt, sieht man in dem Neuron in Abbildung 3.18 B ein eher homogenes und nur fein-granuläres Muster.

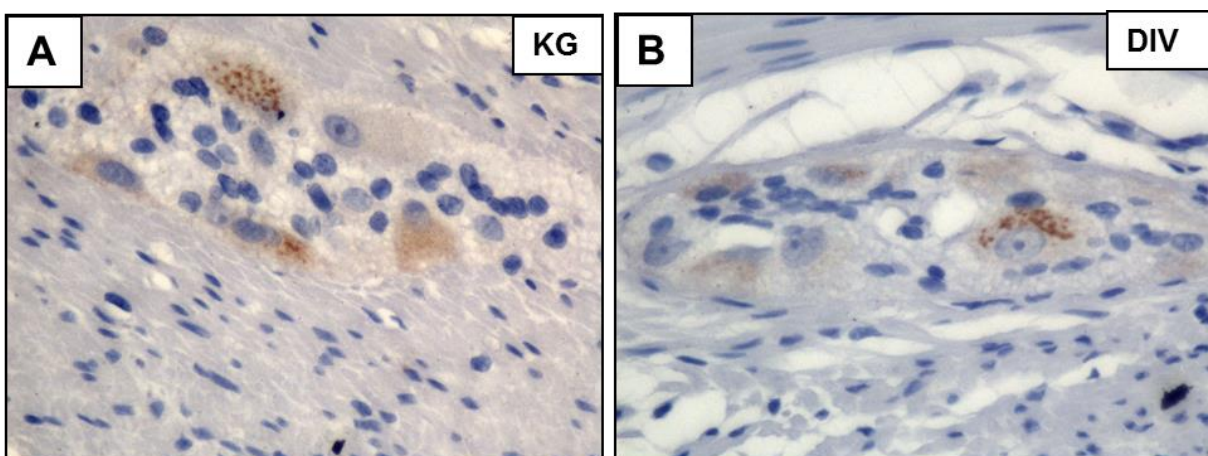


Abbildung 3.19: Immunhistochemie von phosphoryliertem α -Synuclein im Kolon von Patienten mit Divertikulitis

Humanes Kolon-Ganzwandbiopsat; A+B: Vergleich von myenterischen Ganglien zwischen Kontrollgruppe (KG) und Divertikulitis-Patienten (DIV) in 600facher Vergrößerung.

Vergleicht man die myenterischen Ganglien der Divertikulitis-Patienten (Abbildung 3.19 B) mit denen der Kontrollgruppe (Abbildung 3.19 A), sieht man, dass in beiden Ganglien beide Muster vorkommen.

Um diese Ergebnisse quantifizieren zu können, wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche in jeweils 3 myenterischen Ganglien pro Schnitt morphometrisch gemessen. Anschließend wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Die Durchschnittswerte sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

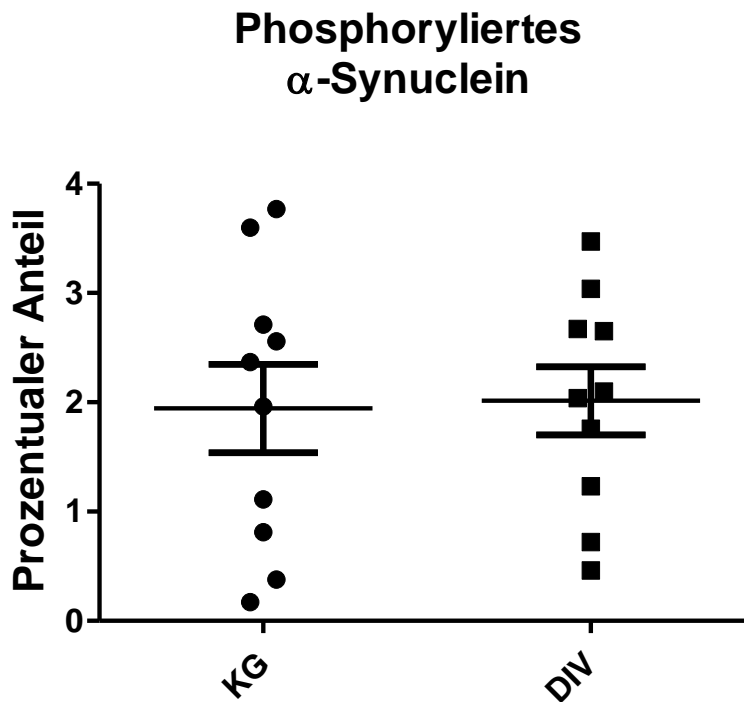


Abbildung 3.20: Prozentualer Anteil der immunreaktiven Fläche von phosphoryliertem α -Synuclein in myenterischen Ganglien bei Divertikulitis

Der durchschnittliche prozentuale Anteil an immunhistochemisch markierten Flächen in den myenterischen Ganglien von Divertikulitis-Patienten (DIV) unterscheidet sich nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe (KG), n= 10.

In Abbildung 3.20 sieht man, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Divertikulitis-Patienten und Kontrollpatienten in Bezug auf den prozentualen Anteil von phosphoryliertem α -Synuclein in myenterischen Ganglien besteht.

4 Diskussion

Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, dass α -Synuclein im gesunden Gehirn essentielle Bedeutung an verschiedenen Vorgängen der Neurotransmission, der synaptischen Plastizität, des Vesikelrecyclings, der Neurotransmittersynthese und der Neurotransmitterfreisetzung hat (Cheng et al. 2011). In dieser Arbeit sollte die Expression von α -Synuclein im enterischen Nervensystem untersucht werden.

Folgende Erkenntnisse kann man aus den Ergebnissen ziehen:

- 1) α -Synuclein wird ubiquitär im humanen- und Ratten-ENS exprimiert.
- 2) α -Synuclein wird bereits im ENS von Kleinkindern exprimiert.
- 3) α -Synuclein befindet sich reichlich in Synapsen des ENS und ist dort mit PGP 9.5-, Synaptophysin-, sowie den SNARE-Proteinen Synaptobrevin und SNAP-25, partiell ko-lokalisiert.
- 4) α -Synuclein befindet sich über das gesamte Axon verteilt und ist dort mit PGP 9.5 und SNAP-25 ko-lokalisiert.
- 5) α -Synuclein befindet sich in neuronalen Somata und ist dort mit PGP 9.5, Hu C/D und Synaptophysin ko-lokalisiert.
- 6) Die α -Synuclein-Expression wird durch den neurotrophen Faktor GDNF stimuliert.
- 7) α -Synuclein wird in pathologisch veränderten Nervenfasern beim Morbus Hirschsprung exprimiert.
- 8) Die α -Synuclein-mRNA-Expression ist bei Divertikulitis-Patienten verringert.
- 9) Die Nervenfaserdichte in immunhistochemischen Präparaten, welche mit Antikörpern gegen α -Synuclein markiert wurden, ist bei Divertikulitis-Patienten geringer als in der Kontrollgruppe.
- 10) Der Gehalt phosphorylierten α -Synucleins ist im ENS von Divertikulitis-Patienten nicht verändert.

Diese Ergebnisse sollen im Folgenden näher erörtert werden.

4.1 α -Synuclein-Expression in enterischen Neuronen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass α -Synuclein in isolierten enterischen Ganglien (siehe Kap. 3.1.1) exprimiert wird. Die α -Synuclein-mRNA-Expression ist im Durchschnitt um den Faktor 1,6 höher, als die des neuronalen Markers NSE. Diese mRNA-Expression wurde auch auf Proteinebene durch die ubiquitäre Immunreaktivität im ENS bestätigt.

Abbildung 3.3 macht die ubiquitäre α -Synuclein-Expression im gesamten enterischen Nervensystem (*Plexus myentericus*, *Plexus submucosus* und Nervenfasern) deutlich. Die Immunreaktivitäten für α -Synuclein und für den pan-neuronalen Marker PGP 9.5 sind nahezu kongruent. Das gleiche Bild zeigt sich in den enterischen Nervenzellkulturen (Abbildung 3.8). Auch hier sieht man, dass α -Synuclein in allen Neuronen, sowie allen Nervenfortsätzen flächendeckend exprimiert wird.

Anhand der Ko-Lokalisation mit dem neuronalen Markers HuC/D (nur in Somata exprimiert) sieht man, dass α -Synuclein durchgehend in den Somata zu finden ist (Abbildung 3.2). Eine etwas lückenhaftere Immunreaktivität zeigt auch das zwischen den Somata liegende Neuropil.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Andringa et al. (2003) mit einem anderen Antikörper α -Synuclein-Immunreaktivität in Somata, Axonen und Neuriten in mehreren Regionen (Kortex, Hippocampus, Hirnstamm) des ZNS von Ratten nachweisen.

Phillips et al. (2008) beschrieben α -Synuclein-Immunreaktivität in myenterischen Ganglien und in vagalen Afferenzen des oberen Gastrointestinaltraktes von Ratten.

Die Arbeitsgruppe Shannon et al. (2012) untersuchte in 2 Studien muköse/submuköse Kolonbiopsien (der Submucosa) von Patienten, die an Morbus Parkinson erkrankten. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass nur Patienten, die an Morbus Parkinson leiden, immunpositiv für natives α -Synuclein sind. Die Kontrollgruppe war immunnegativ für α -Synuclein. Das wirft die Frage auf, ob α -Synuclein im ENS als Biomarker zur Morbus Parkinson Diagnostik verwendet werden kann.

Eine andere klinische Untersuchung führten Sunwoo et al. (2013) durch. Sie untersuchten Patienten, bei denen aufgrund von Magentumoren eine Gastrektomie durchgeführt wurde. Die entnommenen Biopsien wurden unter anderem immunhistochemisch mit Antikörpern gegen α -Synuclein im Plexus myentericus untersucht. Das Resultat dieser Untersuchung war, dass Patienten, die unter einem postoperativen Delir litten, vermehrt α -Synuclein-positive Biopsien hatten (56% vs. 12,5%), im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten konnten zeigen, dass die Expression von α -Synuclein im ENS nicht als pathologisch zu werten ist, sondern physiologisch ist. In den Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3 kann man die ubiquitäre und reichliche Expression von α -Synuclein im humanen enterischen Nervensystem nachvollziehen. Die

Präparate stammen von Patienten, die neurologisch unauffällig waren und keine intestinalen Motilitätsstörungen aufwiesen.

Zwar lässt sich ein präsymptomatischer Morbus Parkinson bei diesen Individuen nicht ausschließen, aber die Tatsache, dass schon einjährige Patienten eine Immunreaktivität für α -Synuclein in allen Bereichen des enterischen Nervensystems zeigen (Abbildung 3.13), spricht dafür, dass natives α -Synuclein beim Menschen von Geburt an physiologisch exprimiert wird. Bloch et al. (2006) konnten *post-mortem* α -Synuclein-Immunreaktivität im Hirnstamm, im *Nervus olfaktorius*, im Rückenmark und im peripheren Nervensystem bei Patienten ohne neurologische Erkrankungen nachweisen. Im Einklang mit diesen Daten konnten Iwai et al. (1995) nachweisen, dass α -Synuclein 0,5-1% aller zytosolischen Proteine in ZNS-Neuronen ausmacht.

α -Synuclein wurde im zentralen Nervensystem die Beteiligung an zahlreichen Vorgängen in der Zelle und in den Zellfortsätzen zugeschrieben, wie z.B. die Regulation der Zellproliferation, der Mikrotubuli-Montage, der Atmungskette, des Calciumeinstroms in die Zelle und des Vesikelverkehrs vom endoplasmatischem Retikulum zum Golgi-Apparat (Alim et al. 2002; Alim et al. 2004; Cooper et al. 2006; Liu et al. 2009; Yin et al. 2011; Guo et al. 2012).

Des Weiteren konnte α -Synuclein in Neuronen von Ratten nachgewiesen werden. Phillips et al. (2008) wiesen α -Synuclein-Immunreaktivität in myenterischen Ganglien und in vagalen Afferenzen des oberen Gastrointestinaltraktes von Ratten nach.

Die Nervenzellkulturen in dieser Arbeit (Kapitel 3.2) wurden mit enterischen Neuronen aus Wistarratten des Postnataltags 2 gezüchtet. Auch hier ist zu sehen, dass α -Synuclein ubiquitär exprimiert wird. Weiterhin haben Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass Ratten von Geburt an α -Synuclein im enterischen Nervensystem exprimieren (Müller 2011).

Der Morbus Parkinson hat zwar Auswirkungen auf den Magen-Darm-Trakt und die Motilität (Djaldetti et al. 2009; Singaram et al. 1995), aber sowohl die Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe und anderer Arbeitsgruppen als auch die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass natives α -Synuclein ein physiologisch exprimiertes Protein im enterischen Nervensystem darstellt und nicht als pathologischer Biomarker für Morbus Parkinson oder andere Erkrankungen verwendet werden kann.

4.2 α -Synuclein in synaptischen Vesikel

α -Synuclein ist im ZNS mit synaptischen Vesikeln und dem Vesikelverkehr assoziiert. Eine Suppression der α -Synuclein-Expression reduziert den distalen Vesikelpool und

führt zu einem beschleunigten Vesikeltransport aus dem Reservepool. α -Synuclein scheint also auch im Vesikelverkehr ein aktivitätsabhängiger Negativregulator zu sein. Eine Überexpression resultiert in einer Akkumulation von angedockten Vesikeln im präsynaptischen Bereich (Abeliovich et al. 2000; Larsen et al. 2006; Yavich et al. 2004; Yavich et al. 2006).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Überexpression von α -Synuclein im ZNS zur Herunterregulierung des Vesikulären-Monoamin-Transporters, markanten Defiziten in der Transmitter-Freisetzung, einer Anhäufung von zytosolischem Dopamin, einer verringerten Dopamin-Wiederaufnahme und zu vergrößerten synaptischen Vesikeln führt (Lotharius et al. 2002; Scott et al. 2010; Lundblad et al. 2012). Weiterhin wurde α -Synuclein in anderen Arbeiten bereits mit Synaptophysin in den Synapsen von hippocampalen Neuronen ko-lokalisiert (Murphy et al. 2000).

Untersuchungen zu einer Beteiligung von α -Synuclein an der synaptischen Übertragung im ENS liegen bisher nicht vor. Daher wurde in dieser Arbeit α -Synuclein mit dem Vesikelprotein Synaptophysin ko-lokalisiert. Synaptische Transmission bedeutet, dass die synaptischen Vesikel an eine präsynaptische, aktive Zone der Nervenendigung andocken und dort die jeweiligen Neurotransmitter freisetzen (Südhof 1995; Südhof 2004). Synaptophysin ist ein Vesikelprotein, welches zum Nachweis von Synapsen verwendet wird (Calhoun et al. 1996). Im humanen ENS (siehe Kap. 3.1.2, Abbildung 3.4) lagen beide Proteine, α -Synuclein und Synaptophysin, in vielen Bereichen ko-lokalisiert vor. In nur wenigen Bereichen der *Plexus myentericus* und *submucosus* lagen beiden Proteine zusätzlich auch getrennt voneinander vor.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnten Lee et al. (2002) demonstrieren, dass in ZNS-Neuronen etwa 15% des α -Synucleins in der Zelle membrangebunden vorliegt. α -Synuclein bindet an Vesikel, die saure Phospholipide enthalten (Davidson et al. 1998). Dementsprechend liegen 85% des α -Synucleins in freier Form vor, was erklärt, dass α -Synuclein und Synaptophysin an einigen Stellen nicht ko-lokalisiert vorliegen.

Varikositäten repräsentieren die Orte der Neurotransmitterfreisetzung im ENS. Sie befinden sich in den Nervenzellfortsätzen (Burnstock 2008). Varikositäten stellen sich bei der immunhistochemischen Markierung mit Synaptophysin granulär dar (Huang and Lin 1984). In den Nervenfasern des humanen ENS (Abbildung 3.4 H) kann man

dieses granuläre Muster erkennen und es zeigte sich, dass α -Synuclein in diesen Varikositäten häufig mit Synaptophysin ko-lokalisiert vorliegt.

Ein ähnliches Bild ließ sich bei den enterischen Nervenzellkulturen (siehe Kap. 3.2.2, Abbildung 3.9) erkennen. Hier sieht man eine noch etwas deutlichere Ko-Lokalisation von α -Synuclein und Synaptophysin. In den Nervenfortsätzen war α -Synuclein etwas ubiquitärer exprimiert, die Varikositäten waren eher vom Synaptophysin dominiert.

Diese Beobachtung zeigt, dass die synaptische Übertragung vornehmlich an den Varikositäten und an der Zellmembran (also am Rand der Zelle) stattfindet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit wies die Arbeitsgruppe Sharrad et al. (2013) eine Ko-Immunreaktivität von α -Synuclein und Synaptophysin in 98 % der untersuchten Axone im Ileum vom Meerschweinchen nach.

Inhibitiert man die α -Synuclein-Promoteraktivität, wachsen die Neuriten schneller und der Vesikelmarker Synaptophysin wird stärker exprimiert (Zhou et al. 2011). α -Synuclein übt auch Funktionen in der Neurotransmitteraufnahme und -freisetzung aus. α -Synuclein bindet im ZNS an den humanen Dopamintransporter (hDAT) in Synapsen und beschleunigt die zelluläre Dopaminaufnahme. Dazu passend zeigten Mäuse ohne α -Synuclein eine Abnahme der hDAT-Expression (Lee et al. 2001; Chadchankar et al. 2011; Bellucci et al. 2008).

Insgesamt decken sich diese Ergebnisse aus dem enterischen Nervensystem mit den Erkenntnissen aus dem zentralen Nervensystem, welche auf einen Zusammenhang von α -Synuclein und dem synaptischen Vesikelverkehr hindeuten. Die Daten, welche in dieser Arbeit erhoben wurden, unterstützen die Annahme, dass α -Synuclein auch im enterischen Nervensystem an der synaptischen Transmission beteiligt ist.

Ein teilweise getrenntes Vorliegen beider Proteine zeigt aber auch, dass α -Synuclein wahrscheinlich noch andere Funktionen in der enterischen Nervenzelle hat, so wie es beispielsweise in den α -Zellen des Pankreas mit dem K(ATP)-Kanal interagiert und die Insulinsekretion herunterreguliert (Geng et al. 2011).

4.3 α -Synuclein und die SNARE-Proteine

Die SNARE-Proteine sind eng mit der synaptischen Übertragung verbunden. Sie sorgen für die Verschmelzung von synaptischen Vesikeln und der präsynaptischen Membran (Jahn and Scheller 2006). α -Synuclein ist ein Protein, welches in großen Mengen in den Synapsen vorliegt (Yu et al. 2007).

In dieser Arbeit wurden Kollokalisationsstudien mit α -Synuclein und zwei SNARE-Proteinen durchgeführt: Synaptobrevin als v-SNARE (Vesikel) und SNAP-25 als t-SNARE (synaptische Membran) (Sollner et al. 1993).

Die durchgeführten Ko-Lokalisationsstudien mit α -Synuclein und Synaptobrevin (siehe Kap. 3.1.2, Abbildung 3.5) zeigten, dass die Synaptobrevin-Immunreaktivität in den *Plexus* die Somata großflächig ausspart, während α -Synuclein die Somata rasenartig bedeckt, was auch schon in Abbildung 3.2 deutlich wurde.

Um die Somata herum ordnet sich Synaptobrevin teilweise saumartig an. Ein identisches Verteilungsmuster zeigten Baumert et al. (1989) im ZNS von Ratten. Auch dort wurde eine Synaptobrevin-Immunreaktivität im Neuropil und in den Synapsen der Nervenfasern beschrieben. Diese Befunde machen deutlich, dass α -Synuclein im enterischen Nervensystem auch außerhalb von Synapsen Funktionen erfüllt.

In den Nervenfasern waren die Immunreaktivitäten nahezu deckungsgleich. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass sich Synaptobrevin in den Vesikeln der Synapsen befindet, welche außerhalb der Somata liegen. Gerade in den Nervenfasern findet man viele Synapsen, welche die glatte Muskulatur „en passant“ versorgen (Burnstock 2008). Da hier viele synaptische Vesikel vorliegen, in denen sowohl Synaptobrevin als auch α -Synuclein in großen Mengen vorliegen (Baumert et al. 1989; Yu et al. 2007), ist die Ko-Lokalisierung dort die logische Konsequenz.

Die räumliche Nähe dieser Proteine macht also eine Interaktion möglich. Synaptische Ansammlungen von α -Synuclein-Aggregaten in transgenen Mäusen werden begleitet von einer Umverteilung der SNARE-Proteine SNAP-25 und Synaptobrevin, sowie von einer Reduktion der Dopamin-Freisetzung. *In vitro* bindet α -Synuclein an Synaptobrevin und fördert den SNARE-Zusammenbau. Knockout-Mäuse, denen die Synucleine fehlten, zeigten eine gestörte SNARE-Funktion und starben wesentlich früher als gesunde Mäuse (Burre et al. 2010; Garcia-Reitböck et al. 2010).

Bei der Ko-Lokalisationsstudie mit α -Synuclein und SNAP-25 im humanen Kolon (siehe Kap. 3.1.2, Abbildung 3.6) zeigte sich ein ähnliches Bild wie in der Ko-Lokalisationsstudie mit α -Synuclein und Synaptobrevin. Dieses ähnliche Bild lässt sich damit begründen, dass Synaptobrevin und SNAP-25 SNARE-Proteine sind und sich somit in den Synapsen befinden (Sollner et al. 1993).

In den Zellkulturen stellt sich ein anderes Bild dar. Hier findet man weniger Axon-

Varikositäten, die durch Synapsen gebildet werden, sondern Zellen, welche relativ weit auseinander liegen und sich durch Nervenfasern vernetzen. Synaptobrevin zeigte kaum Immunreaktivität in den Nervenfasern (siehe Kap. 3.2.2, Abbildung 3.10). An den Rändern der Somata sah man teilweise starke, granuläre Immunreaktionen, allerdings nicht überall, denn die Nervenfortsätze reichen mit ihren Synapsen (in denen sich u.a. Synaptobrevin befindet) an bestimmten Stellen an die Somata und bedingen die Freisetzung von Neurotransmittern. Einige Anteile in den Zellen sind auch komplett frei von Synaptobrevin-Immunreaktivität. Legt man die Bilder übereinander, sieht man in den Zellen stellenweise deutliche Ko-Lokalisationen von α -Synuclein und Synaptobrevin, welche sich beide in Synapsen befinden (Baumert et al. 1989; Yu et al. 2007).

Im Gegensatz zu der fehlenden Immunreaktivität von Synaptobrevin in den Nervenfasern sieht man, dass SNAP-25 eine sehr deutliche Immunreaktivität in den Nervenfasern der enterischen Nervenzellkulturen zeigte (Abbildung 3.11).

In den Nervenfasern zeigt SNAP-25, welches sich an Zellmembranen befindet (Jahn and Scheller 2006), eine ausgeprägte Ko-Lokalisation mit α -Synuclein. Die Beobachtung, dass SNAP-25 über die gesamte Axonmembran verteilt vorliegt, wurde auch schon im ZNS und PNS von Ratten gemacht. Dort wurde gezeigt, dass SNAP-25 entlang des gesamten Axons immunreaktiv ist und nicht nur an den Axonterminalen lokalisiert ist (Duc and Catsicas 1995; Garcia et al. 1995).

Bezüglich der Zell-Somata sind die Bilder bei den immunzytochemischen Doppelmarkierungen α -Synuclein mit SNAP-25 (siehe Kap. 3.2.2, Abbildung 3.11) und α -Synuclein mit Synaptobrevin (siehe Kap. 3.2.2, Abbildung 3.10) recht ähnlich. Die Somata werden ausgespart und am Rand der Somata gibt es synaptische Verbindung und deutliche Ko-Lokalisationen mit α -Synuclein.

4.4 Beeinflussungen der α -Synuclein-Expression durch GDNF

Der *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) ist ein entscheidendes Signalmolekül für die Entwicklung und das Überleben von zentralen und peripheren Neuronen (Airaksinen and Saarma 2002). Auch für enterische Neurone konnte gezeigt werden, dass GDNF für die Entwicklung essentiell ist und dass enterische Zellkulturen ohne GDNF ein gestörtes Neuritenwachstum aufzeigen (Schafer and Mestres 1999). Ein GDNF-*knockout* führt bei Mäusen zu einer kompletten Aganglionose (Moore et al. 1996; Pichel et al. 1996).

Zeng et al. (2010) fanden heraus, dass GDNF die synaptische Kommunikation in

kultivierten myenterischen Neuronen steigert und die Expression von Serotonin-Rezeptoren heraufreguliert. Da α -Synuclein ein Protein ist, das im ZNS an mehreren Prozessen der synaptischen Transmission beteiligt ist (Cheng et al. 2011), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch die α -Synuclein-Expression im ENS von GDNF beeinflusst wird. Wie aus Kapitel 3.2.1 ersichtlich wird, steigt die α -Synuclein-Expression in Abhängigkeit von der GDNF-Dosis. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression von α -Synuclein bei steigender GDNF-Konzentration (Abbildung 3.7). Die durchschnittliche mRNA-Expression war bei der 50 ng/ml GDNF-Applikation um den Faktor 3,7 erhöht. Als Untermauerung dieser Daten konnte im ZNS nachgewiesen werden, dass eine erhöhte GDNF-Dosis in dopaminergen Nervenzellkulturen des ZNS zu einer erhöhten Anzahl von Synapsin1-positiven Granula pro Neuron führt (Bourque and Trudeau 2000). Synapsin1 ist ein präsynaptisches Vesikelprotein, das stark in Synapsen exprimiert wird und in nahezu allen terminalen Nervenendigungen nachzuweisen ist (De Camilli et al. 1983). GDNF zeigt aber keinen Effekt auf die α -Synuclein-Aggregation (Decressac et al. 2011). Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass GDNF einen wichtigen Wachstums- und Überlebensfaktor für die Zelle im Allgemeinen und für die α -Synuclein-Expression im Speziellen darstellt. Des Weiteren weisen die Daten darauf hin, dass α -Synuclein auch im ENS eine Rolle bei der synaptischen Transmission spielt. Dabei scheint GDNF pathophysiologisch nicht an der Entstehung der Synucleinopathien beteiligt zu sein.

4.5 Expression von α -Synuclein bei Patienten mit Morbus Hirschsprung

Aus den immunhistochemischen Markierungen von α -Synuclein in den aganglionären und normoganglionären Darmabschnitten von Patienten, welche an Morbus Hirschsprung litten, lassen sich 2 Schlüsse ziehen. Zum ersten sieht man in den normoganglionären Abschnitten eine ubiquitäre α -Synuclein-Expression im gesamten ENS. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Kolon-Teilresektion erst 1 Jahr alt. Also kann man daraus schließen, dass Menschen schon im Kindesalter, vermutlich von Geburt an, α -Synuclein exprimieren.

Unterstützend dazu konnten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Ratten in verschiedenen Altersstufen (Postnataltage 0 (Geburtstermin), 3, 6, 21, adult) α -Synuclein exprimieren. Die mRNA-Expression nahm im Zeitverlauf der Entwicklung ab. Im Gegensatz zum Dünndarm (signifikante Abnahme von P21 und Adult in Bezug

auf P0), handelte es sich beim Kolon nur um eine tendenzielle Abnahme (Müller 2011).

In Übereinstimmung damit konnte im ZNS gezeigt werden, dass im Alter die α -Synuclein-mRNA-Expression in der *Substantia nigra* sinkt. Die Protein-Spiegel bleiben allerdings konstant (Li et al. 2004). Andere Befunde zeigen auch einen altersabhängigen mRNA-Verlust in der *Substantia nigra*, dort geht dieser aber mit einer deutlichen Reduktion des Proteins α -Synuclein einher. In diesem Zusammenhang wird eine synaptische Dysfunktion im alternden Gehirn vermutet (Mak et al. 2009). Zusammenfassend kann man feststellen, dass α -Synuclein im jungen Alter relativ hoch exprimiert wird und im Alter tendenziell abnimmt.

Zum zweiten zeigen die immunhistochemischen Markierungen von α -Synuclein, dass α -Synuclein in den Nervenfasern von aganglionären Darmabschnitten exprimiert wird. Da in den pathologischen Abschnitten die Ganglien fehlen, wachsen kompensatorisch vermehrt Nervenfasern ein und verursachen eine Dauerkontraktion. Diese Nervenfasern sind teilweise stark verdickt (Kapur 2006).

α -Synuclein ist in diesen verdickten Nervenfasern immunreaktiv. Das Verteilungsmuster von α -Synuclein und PGP 9.5 im ENS der aganglionären Abschnitte ist nahezu gleich.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass α -Synuclein eine Rolle in der synaptischen Plastizität spielt. Man sieht anhand der immunhistochemischen Markierung von α -Synuclein in den aganglionären Abschnitten, dass die Nervenfasern verstärkt auswachsen und α -Synuclein gleichzeitig verstärkt in diesen Fasern exprimiert wird. Auch in der Literatur wird α -Synuclein immer wieder mit synaptischer Plastizität in Verbindung gebracht. So entdeckte man z.B., dass α -Synuclein im Zebrafinken in definierten präsynaptischen Nervenendigungen während einer Phase des lernabhängigen synaptischen Rearrangements (George et al. 1995) exprimiert wird. Die Ergebnisse zum Einfluss von α -Synuclein auf die synaptische Plastizität sind jedoch sehr unterschiedlich und spiegeln entweder Unterschiede zwischen den untersuchten Hirnregionen wieder oder sind ein Zeichen der Komplexität bezüglich der Rolle von α -Synuclein in der synaptischen Plastizität (Cheng et al. 2011).

4.6 Expression von α -Synuclein bei Patienten mit Divertikulitis

Als Ursache für die Divertikulitis wird nach heutigem Kenntnisstand ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Neben den Faktoren Alter, Ernährung und

Bindegewebsschwäche, liegt dieser Erkrankung auch eine enterische Neuropathie, sowie eine enterische Myopathie zugrunde (Wedel et al. 2010; Böttner and Wedel 2012). Um herauszufinden, ob sich auch die α -Synuclein-mRNA-Expression in myenterischen Ganglien von Divertikulitis-Patienten verändert, wurde diese in Gewebeschnitten der *Tunica muscularis* von Patienten mit Divertikulitis untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die mRNA-Expression bei den Divertikulitis-Patienten war im Verhältnis zur Kontrollgruppe signifikant ($p=0,0139$) herunterreguliert (Abbildung 3.14). Das Durchschnittsalter der Divertikulitis-Patienten lag bei 61 Jahren, das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe bei 71 Jahren. In der Literatur wird berichtet, dass die α -Synuclein-mRNA-Expression im Alter eher abnimmt (Mak et al. 2009; Li et al. 2004; Müller 2011). In dieser Arbeit wurde allerdings eine signifikant niedrigere α -Synuclein-mRNA-Expression bei den Divertikulitis-Patienten im Verhältnis zur Kontrollgruppe gefunden, obwohl das Durchschnittsalter 10 Jahre unter dem der Kontrollgruppe lag. Fraglich ist, ob diese Reduktion Teil der Pathogenese ist oder ein Zeichen für den Untergang von Neuronen und somit einer verringerten Anzahl an Synapsen entspricht.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen untersuchte eine andere Arbeitsgruppe die α -Synuclein-mRNA-Expression in motorischen Nervenzellen im Vorderhorn des Rückenmarks von Patienten, die an spinaler Muskelatrophie litten. Die spinale Muskelatrophie ist eine seltene Erkrankung, die durch einen fortschreitenden Untergang von motorischen Nervenzellen im Vorderhorn des Rückenmarks verursacht wird. Auch hier wurde eine signifikant niedrigere α -Synuclein-Expression festgestellt (Acsadi et al. 2011).

Da die α -Synuclein-mRNA-Expression in Neuronen um den Faktor 1,61 höher ist als bei dem neuronalen Marker NSE (siehe Abbildung 3.1), ist die verringerte α -Synuclein-Expression in dieser Arbeit und in der Arbeit von Acsadi et al. (2011) am wahrscheinlichsten auf den Untergang der Neurone zurückzuführen, denn die Divertikulitis geht mit einer verminderten neuralen Ausstattung im Plexus myentericus einher (Wedel et al. 2010; Böttner and Wedel 2012). Es kann aber auch sein, dass durch den partiellen Verlust an Neuronen die mRNA-Expression in den verbleibenden Neuronen reaktiv heraufreguliert wird.

Interessanterweise haben mehrere Arbeitsgruppen anhand von Versuchen an Mäusen festgestellt, dass eine veränderte α -Synuclein-Expression auch die Darmmotilität beeinflusst. So fanden beispielsweise Kuo et al. (2010) heraus, dass

transgene Mäuse, welche die α -Synuclein-Mutationen A53T und A30P trugen, frühe Dysfunktionen im ENS zeigten. Eines dieser frühen Zeichen war eine geringere Kolonmotilität. Auch α -Synuclein-Überexpression führt zu Obstipation (Wang et al. 2008; Hallett et al. 2012; Wang et al. 2012). Da auch Divertikulitis-Patienten unter einer gesteigerten Motilität leiden (Bassotti et al. 2001), ist es auch durchaus denkbar, dass die verringerte α -Synuclein-Expression mit der veränderten Motilität zusammenhängt.

In der immunhistochemischen Markierung für α -Synuclein war zu erkennen, dass die Nervenfasern in der Ringmuskelschicht (Abbildung 3.16 C+D) sich bei den Divertikulitis-Patienten bildmorphologisch kaliberschwächer und weiter voneinander entfernt darstellten. Man sah mehr kleinere Einzelfasern als bei der Kontrollgruppe. Die Fasern waren insgesamt ungerichteter. Zur Quantifizierung dieser Befunde wurde der Anteil der Nervenfasern in der Muskulatur morphometrisch gemessen (Kap 3.4.2). Dabei wurden sowohl Schnitte verwendet, die mit Antikörpern gegen α -Synuclein markiert wurden, als auch Schnitte, die mit Antikörpern gegen PGP 9.5 markiert wurden.

Das Ergebnis zeigt, dass die Nervenfaserdichte in den PGP 9.5 markierten Biopsien bei den Divertikulitis-Präparaten in der Ringmuskelschicht durchschnittlich um 19 % verringert war. Bei den Biopsien, welche mit Antikörpern gegen α -Synuclein markiert wurden, war der Unterschied in der Ringmuskulatur deutlicher. Die Nervenfaserdichte in der Ringmuskulatur bei Patienten, die an einer Divertikulitis leiden, war um 46 % verringert. Dafür gibt es drei Erklärungsmodelle: Die erste Erklärung hierfür ist, dass Divertikulitis-Patienten an einer enterischen Myopathie leiden. Die Muskulatur ist hypertroph (Böttner and Wedel 2012). Dadurch liegen die Nervenfasern weiter auseinander, was die Nervenfaserdichte entsprechend verringert.

Eine weitere Erklärung ist, dass Divertikulitis-Patienten auch an einer enterischen Neuropathie (Böttner and Wedel 2012) leiden, d.h. es sind weniger Neurone vorhanden, deren Nervenfasern in die Muskulatur sprießen.

Eine letzte mögliche Erklärung ist, dass sich die in Kapitel 3.4.1 gemessene reduzierte α -Synuclein-mRNA-Expression auch auf die Protein-Expression auswirkt. Da die Dichte bei den PGP 9.5 markierten Biopsien auch geringer war, ist es denkbar, dass die ersten beiden Erklärungen für die PGP 9.5 markierten Biopsien zutreffen. Die noch größere Verringerung der Nervenfaserdichte bei den α -Synuclein-markierten Biopsien ist durch eine zusätzlich verringerte α -Synuclein-Expression zu

erklären.

Zum Abschluss sollte noch überprüft werden, ob es einen Unterschied beim Protein-Verteilungsmuster von phosphoryliertem α -Synuclein zwischen Divertikulitis- und Kontrollpatienten gibt. Die Ergebnisse haben zwar gezeigt, dass es Unterschiede in der Verteilungsform von phosphoryliertem α -Synuclein gibt (Abbildung 3.18; fein- oder grob granulär), jedoch keine quantitativen Unterschiede zwischen Divertikulitis- und Kontrollpatienten (Abbildung 3.20). Das spricht dafür, dass die Phosphorylierung von α -Synuclein einem normalen Alterungsprozess entspricht und kein pathogenetisches Ereignis darstellt.

4.7 Die Bedeutung des enterischen α -Synucleins für die Entstehung von Morbus Parkinson

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass α -Synuclein im ENS physiologisch und von Geburt an exprimiert wird und unter dem Einfluss des neurotrophen Wachstumsfaktors GDNF steht. Aber α -Synuclein ist auch von pathogenetischem Interesse, da es u.a. ein Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen ist, welche pathognomonisch für den Morbus Parkinson und andere Erkrankungen sind. In den Lewy-Körperchen liegt α -Synuclein jedoch nicht nativ, sondern überwiegend phosphoryliert und strukturell verändert vor. Häufig kündigt sich der Morbus Parkinson mit gastrointestinalen Störungen, wie Obstipationen an.

Braak et al. (2003) entwickelten die Hypothese, dass das ENS ein möglicher primärer Entstehungsort für den M. Parkinson ist. Der Hintergrund dieser Überlegungen war, dass die typischen Läsionen beim Parkinson in Form von Lewy-Neuriten und Lewy-Körperchen einen charakteristischen, aufsteigenden Verlauf nehmen, welcher wenig interindividuellen Schwankungen unterliegt. Zudem treten enterische Motilitätsstörungen häufig vor den motorischen Störungen auf.

In Autopsiepatienten, deren Gehirne auf Parkinson-assoziierten Synucleinopathien untersucht wurden, entdeckte man α -Synuclein-Einschlüsse in Neuronen des *Plexus submucosus*, dessen Axone in die Magenschleimhaut projizieren und in unmittelbarer Nähe der Fundus-Drüsen enden. Dieses führte zu der Hypothese, dass diese Elemente die ersten Glieder in einer ununterbrochenen Reihe von Suszeptibilitäts-Neuronen sind, die sich vom ENS über vagale Nervenfasen zum ZNS erstrecken (Braak et al. 2006).

Andere Arbeitsgruppen zeigten jedoch, dass nicht alle Patienten diesen aufsteigenden Krankheitsverlauf durchgemacht haben. Beispielsweise wurden 71

Proben von Parkinson-Patienten aus einer Londoner Hirngewebebank untersucht. Dabei wurden die Häufigkeit und die topographische Verteilung von α -Synuclein bewertet. 47% der Fälle folgten nicht der *caudo-rostralen* Ausbreitung und in 7% war der *Nucleus dorsalis nervi vagi* nicht betroffen, obwohl α -Synuclein-Einschlüsse in der *Substantia nigra* und in kortikalen Regionen gefunden wurden (Kalaitzakis et al. 2008).

In der Studie von Attems und Jellinger (2008) war bei 8,3% der Parkinson Kohorte der *Nucleus dorsalis nervi vagi* nicht beteiligt, obwohl Einschlüsse im Hirnstamm oder in kortikalen Arealen zu finden waren. Keine der Fälle war klinisch atypisch und alle waren L-Dopa-responsiv.

Wahrscheinlich ist, dass α -Synuclein seine physiologische Aufgabe bei der synaptischen Übertragung sowohl im enterischen Nervensystem, als auch im zentralen Nervensystem ausübt. Der Grund für diese Annahme ist, dass ein Protein, welches von Geburt an so reichlich exprimiert wird, sehr wahrscheinlich eine oder mehrere wichtige Funktionen hat. Daher erscheint es plausibel, dass eine Krankheit wie der Morbus Parkinson beide Nervensysteme betrifft. Möglicherweise sind die enterischen Neurone empfindlicher gegenüber Umwelteinflüssen und die Krankheit macht sich dort zuerst bemerkbar. Ob die Krankheit im Sinne einer festen Kette vom ENS zum ZNS aufsteigt, bleibt weiter offen. Einige Befunde bringen auch Gegenargumente gegen den von Braak postulierten aufsteigenden Verlauf (Attems and Jellinger 2008; Kalaitzakis et al. 2008), weshalb die initialen pathogenetischen Ereignisse bei Morbus Parkinson noch nicht bekannt sind. Ein interessanter, potentieller Ansatz zur Parkinson-Frühdagnostik ist die Kolonbiopsie mit einem Suchtest auf Lewy-Körperchen, bzw. Lewy-Neuriten (Lebouvier et al. 2010; Pouclet et al. 2012).

4.8 Aussichten

Aufgrund der ubiquitären Expression von α -Synuclein im enterischen Nervensystem sind zahlreiche Forschungsmöglichkeiten auf diesem Gebiet denkbar. Weiterführende Ansätze sind Untersuchungen auf Veränderungen der α -Synuclein-Expression, bzw. pathologische Anhäufungen von phosphoryliertem α -Synuclein bei anderen enterischen Neuropathien, wie z.B. der Achalasie. Die Ergebnisse zur Divertikulitis könnten noch weiter validiert werden (ELISA, Westernblot). Um zu prüfen, ob die niedrigere α -Synuclein-Expression mit einem Neuronenverlust zusammenhängt, wäre die gleichzeitige Messung der mRNA-Expression eines

neuronalen Markers interessant. Auch die Untersuchung der α -Synuclein-Expression bei anderen Motilitätsstörungen, wie z.B. der *Slow-transit-Obstipation*, wäre in dem Zusammenhang zu erwägen.

Um die Verbindung von α -Synuclein zu den SNAREs weiter zu untersuchen, könnte man sich der Methode der Co-Immunopräzipitation bedienen, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Eine weitere interessante Möglichkeit, die Verbindung zwischen α -Synuclein zu den SNAREs zu erforschen, wäre ein selektiver *knockout* von α -Synuclein mit anschließender Messung der mRNA-Expression von Synaptophysin, Synaptobrevin und SNAP-25 im ENS.

Die Erforschung der exakten physiologischen Funktion von α -Synuclein im enterischen Nervensystem könnte, gerade im Hinblick auf deren Verlust bei Pathologien, schließlich auch für die Parkinson-Forschung durchaus relevant sein und das ENS könnte dabei ein Vorreiter-Modell für die Veränderungen im ZNS darstellen.

5 Zusammenfassung

α -Synuclein ist ein Protein, welches 1988 entdeckt wurde und vielfältige Prozesse in Neuronen beeinflusst. Zahlreiche Befunde im zentralen Nervensystem deuten auf eine essentielle Beteiligung in verschiedenen Vorgängen der Neurotransmission, der synaptischen Plastizität, des Vesikelrecyclings, der Neurotransmittersynthese und der Neurotransmitterfreisetzung hin.

Bekannt wurde α -Synuclein als Bestandteil in Amyloid-Ablagerungen bei Morbus Alzheimer Patienten und in Lewy-Körperchen bei Morbus Parkinson Patienten. Diese und andere neurodegenerative Erkrankungen werden auch als „Synucleinopathien“ zusammengefasst. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen aggregiert α -Synuclein zu Oligomeren und bildet unlösliche Fibrillen mit einer erhöhten β -Faltblatt-Konfiguration. In Lewy-Körperchen liegt α -Synuclein überwiegend phosphoryliert vor. Die Neuronen des enterischen Nervensystems gleichen in vielerlei Hinsicht den Neuronen des zentralen Nervensystems. α -Synuclein wurde auch im enterischen Nervensystem nachgewiesen. Die darauf folgenden Forschungsarbeiten richteten jedoch überwiegend den Fokus auf die Manifestation von Morbus Parkinson im enterischen Nervensystem.

In der vorliegenden Arbeit sollte 1. im humanen Gewebe die physiologische Expression von α -Synuclein im enterischen Nervensystem und die Verbindung zum synaptischen Vesikelapparat, 2. die Beeinflussung der α -Synuclein Expression und Lokalisation in enterischen Nervenzellkulturen von Ratten durch den Wachstumsfaktor GDNF und 3. die Rolle von α -Synuclein in enterischen Neuropathien am Beispiel von Patienten mit Morbus Hirschprung und Patienten mit Divertikelkrankheit untersucht werden.

Mittels Lasermikrodissektion und nachfolgender qPCR konnte nachgewiesen werden, dass α -Synuclein in humanen myenterischen Ganglien exprimiert wird und dass diese mRNA-Spiegel sogar höher waren als die des neuronalen Markers NSE. Anhand von Dual-Label-Immunzytochemie an humanen Kolon-Ganzwandresektaten konnte nachgewiesen werden, dass α -Synuclein in Neuronen exprimiert wird. Dabei weist die Lokalisation insbesondere in den Nervenzellfortsätzen partiell granulären Charakter auf, was auf die Expression von α -Synuclein in neuronalen Varikositäten, d.h. den Orten der Neurotransmitterfreisetzung im ENS, hinweist. Weiterhin ließ sich teilweise Ko-Lokalisation von α -Synuclein mit dem Vesikelmarker Synaptophysin und den SNARE-Proteinen Synaptobrevin und SNAP-25 nachweisen.

Dieses Expressionsmuster ließ sich in einem Kulturmodell enterischer Neurone, welche aus Rattendärmen des Postnataltags 2 gewonnen wurden, reproduzieren. Diese Neurone bilden nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) neuronale Netzwerke, die der in vivo Situation des Plexus myentericus sehr nahe kommen. Nach einwöchiger GDNF-Behandlung konnte mittels qPCR nachgewiesen werden, dass GDNF die mRNA-Expression von α -Synuclein heraufreguliert. Konfirmierende Experimente auf immunocytochemischer Basis bestätigten die neuronale Lokalisation und eine partielle Ko-Lokalisation mit Synaptophysin, Synaptobrevin und SNAP-25, was auf eine Bedeutung von α -Synuclein in der Regulation neuronaler Plastizität hinweist.

In Patienten mit Morbus Hirschsprung, einer enterischen Neuropathie, welche sich durch Migrationsdefekte des ENS in einer partiellen Aganglionose des Dickdarms manifestiert, konnte gezeigt werden, dass α -Synuclein bereits im Kleinkindalter im ENS exprimiert wird und dass diese Expression sogar im aganglionären Darmwandabschnitt und dort in pathologisch hypertrophen Nervenfasern nachweisbar ist.

Die Studien an Darmresektaten von Patienten mit Divertikulitis, welche mit einer oligo-neuronalen Hypoganglionose, sowie einer Myopathie und daraus resultierenden Motilitätsstörungen assoziiert ist, zeigten, dass die α -Synuclein-mRNA in der Tunica muscularis herunterreguliert war. Morphometrische Analysen einer α -Synuclein-Immunzytochemie bestätigten eine verringerte α -Synuclein-positive Nervenfaserdichte in der Ringmuskulatur. Dagegen unterschied sich der Gehalt an phosphoryliertem α -Synuclein in enterischen Ganglien nicht von der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass α -Synuclein ubiquitär im humanen ENS und in Zellkulturen myenterischer Neurone der Ratte exprimiert wird und dort Funktionen in der Regulation neuronaler Plastizität ausüben könnte. Diese physiologische Funktion ist möglicherweise bei Patienten mit enterischen Neuropathien verändert. Im Hinblick auf eine potenzielle Bedeutung von α -Synuclein als Diagnostikum für M. Parkinson in Darmbiopsien lässt sich feststellen, dass der bloße Nachweis nativen α -Synucleins auf das Vorhandensein eines physiologisch vorkommenden Proteins schließen lässt, aus dem sich per se noch keine Pathologie ableiten lässt.

6 Literaturverzeichnis

- Abeliovich, A., Y. Schmitz, I. Farinas, D. Choi-Lundberg, W. H. Ho, P. E. Castillo, N. Shinsky, J. M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, and A. Rosenthal. "Mice Lacking Alpha-Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System." *Neuron* 25 (2000): 239-52.
- Acsadi, G., X. Li, K. J. Murphy, K. J. Swoboda, and G. C. Parker. "Alpha-Synuclein Loss in Spinal Muscular Atrophy." *J Mol Neurosci* 43 (2011): 275-83.
- Airaksinen, M. S., and M. Saarma. "The Gdnf Family: Signalling, Biological Functions and Therapeutic Value." *Nat Rev Neurosci* 3 (2002): 383-94.
- Alim, M. A., M. S. Hossain, K. Arima, K. Takeda, Y. Izumiyama, M. Nakamura, H. Kaji, T. Shinoda, S. Hisanaga, and K. Ueda. "Tubulin Seeds Alpha-Synuclein Fibril Formation." *J Biol Chem* 277 (2002): 2112-7.
- Alim, M. A., Q. L. Ma, K. Takeda, T. Aizawa, M. Matsubara, M. Nakamura, A. Asada, T. Saito, H. Kaji, M. Yoshii, S. Hisanaga, and K. Ueda. "Demonstration of a Role for Alpha-Synuclein as a Functional Microtubule-Associated Protein." *J Alzheimers Dis* 6 (2004): 435-42; discussion 443-9.
- Anderson, J. P., D. E. Walker, J. M. Goldstein, R. de Laat, K. Banducci, R. J. Caccavello, R. Barbour, J. Huang, K. Kling, M. Lee, L. Diep, P. S. Keim, X. Shen, T. Chataway, M. G. Schlossmacher, P. Seubert, D. Schenk, S. Sinha, W. P. Gai, and T. J. Chilcote. "Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of Alpha-Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease." *J Biol Chem* 281 (2006): 29739-52.
- Andringa, G., F. Du, T. N. Chase, and M. C. Bennett. "Mapping of Rat Brain Using the Synuclein-1 Monoclonal Antibody Reveals Somatodendritic Expression of Alpha-Synuclein in Populations of Neurons Homologous to Those Vulnerable to Lewy Body Formation in Human Synucleopathies." *J Neuropathol Exp Neurol* 62 (2003): 1060-75.
- Attems, J., and K. A. Jellinger. "The Dorsal Motor Nucleus of the Vagus Is Not an Obligatory Trigger Site of Parkinson's Disease." *Neuropathol Appl Neurobiol* 34 (2008): 466-7.
- Auerbach, L. "Über einen Plexus myentericus, einen bisher unbekanntem ganglionnervösen Apparat im Darmkanal der Wirbelthiere." Breslau, Morgenstern (1862).
- Augustine, G. J., M. E. Burns, W. M. DeBello, S. Hilfiker, J. R. Morgan, F. E.

- Schweizer, H. Tokumaru, and K. Umayahara. "Proteins Involved in Synaptic Vesicle Trafficking." *J Physiol* 520 (1999): 33-41.
- Baba, M., S. Nakajo, P. H. Tu, T. Tomita, K. Nakaya, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, and T. Iwatsubo. "Aggregation of Alpha-Synuclein in Lewy Bodies of Sporadic Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies." *Am J Pathol* 152 (1998): 879-84.
- Badner, J. A., W. K. Sieber, K. L. Garver, and A. Chakravarti. "A Genetic Study of Hirschsprung Disease." *Am J Hum Genet* 46 (1990): 568-80.
- Bartels, T., J. G. Choi, and D. J. Selkoe. "Alpha-Synuclein Occurs Physiologically as a Helically Folded Tetramer That Resists Aggregation." *Nature* 477 (2011): 107-10.
- Bassotti, G., E. Battaglia, F. Spinozzi, M. A. Pelli, and M. Tonini. "Twenty-Four Hour Recordings of Colonic Motility in Patients with Diverticular Disease: Evidence for Abnormal Motility and Propulsive Activity." *Dis Colon Rectum* 44 (2001): 1814-20.
- Baumert, M., P. R. Maycox, F. Navone, P. De Camilli, and R. Jahn. "Synaptobrevin: An Integral Membrane Protein of 18,000 Daltons Present in Small Synaptic Vesicles of Rat Brain." *EMBO J* 8 (1989): 379-84.
- Bellucci, A., G. Collo, I. Sarnico, L. Battistin, C. Missale, and P. Spano. "Alpha-Synuclein Aggregation and Cell Death Triggered by Energy Deprivation and Dopamine Overload Are Counteracted by D2/D3 Receptor Activation." *J Neurochem* 106 (2008): 560-77.
- Bellucci, A., L. Navarria, M. Zaltieri, C. Missale, and P. Spano. "Alpha-Synuclein Synaptic Pathology and Its Implications in the Development of Novel Therapeutic Approaches to Cure Parkinson's Disease." *Brain Res* 1432, (2012): 95-113.
- Bloch, A., A. Probst, H. Bissig, H. Adams, and M. Tolnay. "Alpha-Synuclein Pathology of the Spinal and Peripheral Autonomic Nervous System in Neurologically Unimpaired Elderly Subjects." *Neuropathol Appl Neurobiol* 32 (2006): 284-95.
- Bottner, M., F. Bar, H. Von Koschitzky, K. Tafazzoli, U. J. Roblick, H. P. Bruch, and T. Wedel. "Laser Microdissection as a New Tool to Investigate Site-Specific Gene Expression in Enteric Ganglia of the Human Intestine." *Neurogastroenterol Motil* 22 (2010): 168-72, e52.
- Bottner, M., and T. Wedel. "Abnormalities of Neuromuscular Anatomy in Diverticular

- Disease." *Dig Dis* 30 (2012): 19-23.
- Bourque, M. J., and L. E. Trudeau. "Gdnf Enhances the Synaptic Efficacy of Dopaminergic Neurons in Culture." *Eur J Neurosci* 12 (2000): 3172-80.
- Braak, H., R. A. de Vos, J. Bohl, and K. Del Tredici. "Gastric Alpha-Synuclein Immunoreactive Inclusions in Meissner's and Auerbach's Plexuses in Cases Staged for Parkinson's Disease-Related Brain Pathology." *Neurosci Lett* 396 (2006): 67-72.
- Braak, H., K. Del Tredici, U. Rub, R. A. de Vos, E. N. Jansen Steur, and E. Braak. "Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease." *Neurobiol Aging* 24 (2003): 197-211.
- Burnstock, G. "Non-Synaptic Transmission at Autonomic Neuroeffector Junctions." *Neurochem Int* 52 (2008): 14-25.
- Burre, J., M. Sharma, T. Tsetsenis, V. Buchman, M. R. Etherton, and T. C. Sudhof. "Alpha-Synuclein Promotes Snare-Complex Assembly in Vivo and in Vitro." *Science* 329 (2010): 1663-7.
- Cabeza-Arvelaiz, Y., S. M. Fleming, F. Richter, E. Masliah, M. F. Chesselet, and R. H. Schiestl. "Analysis of Striatal Transcriptome in Mice Overexpressing Human Wild-Type Alpha-Synuclein Supports Synaptic Dysfunction and Suggests Mechanisms of Neuroprotection for Striatal Neurons." *Mol Neurodegener* 6, (2011): 83.
- Cabin, D. E., K. Shimazu, D. Murphy, N. B. Cole, W. Gottschalk, K. L. McIlwain, B. Orrison, A. Chen, C. E. Ellis, R. Paylor, B. Lu, and R. L. Nussbaum. "Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking Alpha-Synuclein." *J Neurosci* 22 (2002): 8797-807.
- Calhoun, M. E., M. Jucker, L. J. Martin, G. Thinakaran, D. L. Price, and P. R. Mouton. "Comparative Evaluation of Synaptophysin-Based Methods for Quantification of Synapses." *J Neurocytol* 25 (1996): 821-8.
- Chadchankar, H., J. Ihalainen, H. Tanila, and L. Yavich. "Decreased Reuptake of Dopamine in the Dorsal Striatum in the Absence of Alpha-Synuclein." *Brain Res* 1382 (2011): 37-44.
- Chandra, S., G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O. M. Schluter, and T. C. Sudhof. "Alpha-Synuclein Cooperates with Cspalpha in Preventing Neurodegeneration." *Cell* 123 (2005): 383-96.

- Cheng, F., G. Vivacqua, and S. Yu. "The Role of Alpha-Synuclein in Neurotransmission and Synaptic Plasticity." *J Chem Neuroanat* 42 (2011): 242-8.
- Clayton, D. F., and J. M. George. "The Synucleins: A Family of Proteins Involved in Synaptic Function, Plasticity, Neurodegeneration and Disease." *Trends Neurosci* 21 (1998): 249-54.
- Cooper, A. A., A. D. Gitler, A. Cashikar, C. M. Haynes, K. J. Hill, B. Bhullar, K. Liu, K. Xu, K. E. Strathearn, F. Liu, S. Cao, K. A. Caldwell, G. A. Caldwell, G. Marsischky, R. D. Kolodner, J. Labaer, J. C. Rochet, N. M. Bonini, and S. Lindquist. "Alpha-Synuclein Blocks Er-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models." *Science* 313 (2006): 324-8.
- Costa, M., Furness, J. B. and Llewellyn-Smith, I. J. "Histochemistry of the enteric nervous system." Johnson LR (ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York (1987): 1-40.
- Davidson, W. S., A. Jonas, D. F. Clayton, and J. M. George. "Stabilization of Alpha-Synuclein Secondary Structure Upon Binding to Synthetic Membranes." *J Biol Chem* 273 (1998): 9443-9.
- De Camilli, P., S. M. Harris, Jr., W. B. Huttner, and P. Greengard. "Synapsin I (Protein I), a Nerve Terminal-Specific Phosphoprotein. II. Its Specific Association with Synaptic Vesicles Demonstrated by Immunocytochemistry in Agarose-Embedded Synaptosomes." *J Cell Biol* 96 (1983): 1355-73.
- Decressac, M., A. Ulusoy, B. Mattsson, B. Georgievska, M. Romero-Ramos, D. Kirik, and A. Bjorklund. "Gdnf Fails to Exert Neuroprotection in a Rat Alpha-Synuclein Model of Parkinson's Disease." *Brain* 134 (2011): 2302-11.
- Djaldetti, R., N. Lev, and E. Melamed. "Lesions Outside the Cns in Parkinson's Disease." *Mov Disord* 24 (2009): 793-800.
- Drenckhahn, D., B. Christ, and A. Benninghoff. "Zellen- Und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- Und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- Und Genitalsystem. " 16., völlig neu bearb. Aufl. ed. *Anatomie*. München [u.a.]: Urban & Fischer (2003).
- Du, H. N., L. Tang, X. Y. Luo, H. T. Li, J. Hu, J. W. Zhou, and H. Y. Hu. "A Peptide Motif Consisting of Glycine, Alanine, and Valine Is Required for the Fibrillization and Cytotoxicity of Human Alpha-Synuclein." *Biochemistry* 42

- (2003): 8870-8.
- Duc, C., and S. Catsicas. "Ultrastructural Localization of Snap-25 within the Rat Spinal Cord and Peripheral Nervous System." *J Comp Neurol* 356 (1995): 152-63.
- Fujiwara, H., M. Hasegawa, N. Dohmae, A. Kawashima, E. Masliah, M. S. Goldberg, J. Shen, K. Takio, and T. Iwatsubo. "Alpha-Synuclein Is Phosphorylated in Synucleinopathy Lesions." *Nat Cell Biol* 4 (2002): 160-4.
- Furness, J. B. and M. Costa. "The enteric nervous system." Edinburgh u.a., Churchill Livingstone (1987).
- Gabella, G. "Structure of the autonomic nervous system." London [u.a.], Chapman and Hall [u.a.] (1976).
- Garcia-Reitböck, P., O. Anichtchik, A. Bellucci, M. Iovino, C. Ballini, E. Fineberg, B. Ghetti, L. Della Corte, P. Spano, G. K. Tofaris, M. Goedert, and M. G. Spillantini. "Snare Protein Redistribution and Synaptic Failure in a Transgenic Mouse Model of Parkinson's Disease." *Brain* 133 (2010): 2032-44.
- Garcia, E. P., P. S. McPherson, T. J. Chilcote, K. Takei, and P. De Camilli. "Rbsec1a and B Colocalize with Syntaxin 1 and Snap-25 Throughout the Axon, but Are Not in a Stable Complex with Syntaxin." *J Cell Biol* 129 (1995): 105-20.
- Gasnier, B. "The Loading of Neurotransmitters into Synaptic Vesicles." *Biochimie* 82 (2000): 327-37.
- Geng, X., H. Lou, J. Wang, L. Li, A. L. Swanson, M. Sun, D. Beers-Stolz, S. Watkins, R. G. Perez, and P. Drain. "Alpha-Synuclein Binds the K(ATP) Channel at Insulin-Secretory Granules and Inhibits Insulin Secretion." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300 (2011): E276-86.
- George, J. M. "The Synucleins." *Genome Biol* 3 (2002): REVIEWS3002.
- Gershon, M. D. "The Enteric Nervous System." *Annu Rev Neurosci* 4 (1981): 227-72.
- Georgiev, D., Glazebrook, J. "Subneuronal processing of information by solitary waves and stochastic processes". In Lyshevski, Sergey Edward. *Nano and Molecular Electronics Handbook*. Nano and Microengineering Series. CRC Press (2007): 17-1–17-41.
- Gershon, M. D. "The enteric nervous system." *Annu Rev Neurosci* 4 (1981): 227-272.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, and S. W. Davies. "Filamentous Nerve Cell Inclusions in Neurodegenerative Diseases." *Curr Opin Neurobiol* 8 (1998): 619-32.
- Gunn, M. "Histological and Histochemical Observations on the Myenteric and

- Submucous Plexuses of Mammals." *J Anat* 102 (1968): 223-39.
- Guo, Y., B. Rosati, and S. Scarlata. "Alpha-Synuclein Increases the Cellular Level of Phospholipase Cbeta1." *Cell Signal* 24 (2012): 1109-14.
- Hallett, P. J., J. R. McLean, A. Kartunen, J. W. Langston, and O. Isacson. "Alpha-Synuclein Overexpressing Transgenic Mice Show Internal Organ Pathology and Autonomic Deficits." *Neurobiol Dis* 47 (2012): 258-67.
- Hartl, F. U., and M. Hayer-Hartl. "Molecular Chaperones in the Cytosol: From Nascent Chain to Folded Protein." *Science* 295 (2002): 1852-8.
- Heinzeller, T. and C. M. Büsing. "Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg : 47 Tabellen". Stuttgart [u.a.], Thieme (2001).
- Huang, H. T., and H. S. Lin. "Synaptic Junctions between the Adrenergic Axon Varicosity and the Pinealocyte in the Rat." *J Pineal Res* 1 (1984): 281-91.
- Ikeda, K., and J. M. Bekkers. "Counting the Number of Releasable Synaptic Vesicles in a Presynaptic Terminal." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009): 2945-50.
- Iwai, A., E. Masliah, M. Yoshimoto, N. Ge, L. Flanagan, H. A. de Silva, A. Kittel, and T. Saitoh. "The Precursor Protein of Non- α Beta Component of Alzheimer's Disease Amyloid Is a Presynaptic Protein of the Central Nervous System." *Neuron* 14 (1995): 467-75.
- Jahn, R., and R. H. Scheller. "Snares--Engines for Membrane Fusion." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (2006): 631-43.
- Jakes, R., M. G. Spillantini, and M. Goedert. "Identification of Two Distinct Synucleins from Human Brain." *FEBS Lett* 345 (1994): 27-32.
- Kalaitzakis, M. E., M. B. Graeber, S. M. Gentleman, and R. K. Pearce. "The Dorsal Motor Nucleus of the Vagus Is Not an Obligatory Trigger Site of Parkinson's Disease: A Critical Analysis of Alpha-Synuclein Staging." *Neuropathol Appl Neurobiol* 34 (2008): 284-95.
- Kapur, R. P. "Can We Stop Looking? Immunohistochemistry and the Diagnosis of Hirschsprung Disease." *Am J Clin Pathol* 126 (2006): 9-12.
- Kuo, Y. M., Z. Li, Y. Jiao, N. Gaborit, A. K. Pani, B. M. Orrison, B. G. Bruneau, B. I. Giasson, R. J. Smeyne, M. D. Gershon, and R. L. Nussbaum. "Extensive Enteric Nervous System Abnormalities in Mice Transgenic for Artificial Chromosomes Containing Parkinson Disease-Associated Alpha-Synuclein Gene Mutations Precede Central Nervous System Changes." *Hum Mol Genet* 19 (2010): 1633-50.

- Kurzawski, M., M. Bialecka, J. Slawek, G. Klodowska-Duda, and M. Drozdziak. "Association Study of Gata-2 Transcription Factor Gene (Gata2) Polymorphism and Parkinson's Disease." *Parkinsonism Relat Disord* 16 (2010): 284-7.
- Larsen, K. E., Y. Schmitz, M. D. Troyer, E. Mosharov, P. Dietrich, A. Z. Quazi, M. Savalle, V. Nemani, F. A. Chaudhry, R. H. Edwards, L. Stefanis, and D. Sulzer. "Alpha-Synuclein Overexpression in Pc12 and Chromaffin Cells Impairs Catecholamine Release by Interfering with a Late Step in Exocytosis." *J Neurosci* 26 (2006): 11915-22.
- Lebouvier, T., M. Neunlist, S. Bruley des Varannes, E. Coron, A. Drouard, J. M. N'Guyen, T. Chaumette, M. Tasselli, S. Paillusson, M. Flamand, J. P. Galmiche, P. Damier, and P. Derkinderen. "Colonic Biopsies to Assess the Neuropathology of Parkinson's Disease and Its Relationship with Symptoms." *PLoS One* 5 (2010): e12728.
- Lee, F. J., F. Liu, Z. B. Pristupa, and H. B. Niznik. "Direct Binding and Functional Coupling of Alpha-Synuclein to the Dopamine Transporters Accelerate Dopamine-Induced Apoptosis." *FASEB J* 15 (2001): 916-26.
- Lee, H. J., C. Choj, and S. J. Lee. "Membrane-Bound Alpha-Synuclein Has a High Aggregation Propensity and the Ability to Seed the Aggregation of the Cytosolic Form." *J Biol Chem* 277 (2002): 671-8.
- Li, W., C. Lesuisse, Y. Xu, J. C. Troncoso, D. L. Price, and M. K. Lee. "Stabilization of Alpha-Synuclein Protein with Aging and Familial Parkinson's Disease-Linked A53t Mutation." *J Neurosci* 24 (2004): 7400-9.
- Liu, G., C. Zhang, J. Yin, X. Li, F. Cheng, Y. Li, H. Yang, K. Ueda, P. Chan, and S. Yu. "Alpha-Synuclein Is Differentially Expressed in Mitochondria from Different Rat Brain Regions and Dose-Dependently Down-Regulates Complex I Activity." *Neurosci Lett* 454 (2009): 187-92.
- Lotharius, J., S. Barg, P. Wiekop, C. Lundberg, H. K. Raymon, and P. Brundin. "Effect of Mutant Alpha-Synuclein on Dopamine Homeostasis in a New Human Mesencephalic Cell Line." *J Biol Chem* 277 (2002): 38884-94.
- Lüllmann-Rauch, R. "Taschenlehrbuch Histologie." Stuttgart, Thieme (2009).
- Lundblad, M., M. Decressac, B. Mattsson, and A. Bjorklund. "Impaired Neurotransmission Caused by Overexpression of Alpha-Synuclein in Nigral

- Dopamine Neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012): 3213-9.
- Mak, S. K., A. L. McCormack, J. W. Langston, J. H. Kordower, and D. A. Di Monte. "Decreased Alpha-Synuclein Expression in the Aging Mouse Substantia Nigra." *Exp Neurol* 220 (2009): 359-65.
- Maroteaux, L., J. T. Campanelli, and R. H. Scheller. "Synuclein: A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal." *J Neurosci* 8 (1988): 2804-15.
- McLean, P. J., H. Kawamata, S. Ribich, and B. T. Hyman. "Membrane Association and Protein Conformation of Alpha-Synuclein in Intact Neurons. Effect of Parkinson's Disease-Linked Mutations." *J Biol Chem* 275 (2000): 8812-6.
- Meissner, G. "Über die Nerven der Darmwand." *Z.Ration.Med.N.F.* 8 (1857): 364 - 366.
- Moore, M. W., R. D. Klein, I. Farinas, H. Sauer, M. Armanini, H. Phillips, L. F. Reichardt, A. M. Ryan, K. Carver-Moore, and A. Rosenthal. "Renal and Neuronal Abnormalities in Mice Lacking Gdnf." *Nature* 382 (1996): 76-9.
- Müller, M. "Bedeutung von α -Synuclein im enterischen Nervensystem." Biologische Bachelorarbeit, Durchgeführt am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (2011).
- Murphy, D. D., S. M. Rueter, J. Q. Trojanowski, and V. M. Lee. "Synucleins Are Developmentally Expressed, and Alpha-Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons." *J Neurosci* 20, (2000): 3214-20.
- Parisi, M. A. "Hirschsprung Disease Overview." In *Genereviews*, edited by R. A. Pagon, M. P. Adam, T. D. Bird, C. R. Dolan, C. T. Fong and K. Stephens. Seattle (WA), 1993.
- Parisi, M. A., and R. P. Kapur. "Genetics of Hirschsprung Disease." *Curr Opin Pediatr* 12 (2000): 610-7.
- Phillips, R. J., G. C. Walter, S. L. Wilder, E. A. Baronowsky, and T. L. Powley. "Alpha-Synuclein-Immunopositive Myenteric Neurons and Vagal Preganglionic Terminals: Autonomic Pathway Implicated in Parkinson's Disease?" *Neuroscience* 153 (2008): 733-50.
- Pichel, J. G., L. Shen, H. Z. Sheng, A. C. Granholm, J. Drago, A. Grinberg, E. J. Lee, S. P. Huang, M. Saarma, B. J. Hoffer, H. Sariola, and H. Westphal. "Defects in Enteric Innervation and Kidney Development in Mice Lacking Gdnf." *Nature*

- 382 (1996): 73-6.
- Pouclet, H., T. Lebouvier, E. Coron, T. Rouaud, M. Flamant, F. Toulgoat, M. Roy, F. Vavasseur, S. Bruley des Varannes, M. Neunlist, and P. Derkinderen. "Analysis of Colonic Alpha-Synuclein Pathology in Multiple System Atrophy." *Parkinsonism Relat Disord* 18 (2012): 893-5.
- Qualman, S. J., H. M. Haupt, P. Yang, and S. R. Hamilton. "Esophageal Lewy Bodies Associated with Ganglion Cell Loss in Achalasia. Similarity to Parkinson's Disease." *Gastroenterology* 87 (1984): 848-56.
- Sanchez, M. P., I. Silos-Santiago, J. Frisen, B. He, S. A. Lira, and M. Barbacid. "Renal Agenesis and the Absence of Enteric Neurons in Mice Lacking Gdnf." *Nature* 382 (1996): 70-3.
- Schabadasch, A. "Intramurale Nervengeflechte des Darmrohrs." *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 10 (1930): 320-385.
- Schafer, K. H., and P. Mestres. "The Gdnf-Induced Neurite Outgrowth and Neuronal Survival in Dissociated Myenteric Plexus Cultures of the Rat Small Intestine Decreases Postnatally." *Exp Brain Res* 125 (1999): 447-52.
- Scheuermann, D. W., and W. Stach. "Fluorescence Microscopic Study of the Architecture and Structure of an Adrenergic Network in the Plexus Myentericus (Auerbach), Plexus Submucosus Externus (Schabadasch) and Plexus Submucosus Internus (Meissner) of the Porcine Small Intestine." *Acta Anat (Basel)* 119 (1984): 49-59.
- Schulz-Schaeffer, W. J. "The Synaptic Pathology of Alpha-Synuclein Aggregation in Dementia with Lewy Bodies, Parkinson's Disease and Parkinson's Disease Dementia." *Acta Neuropathol* 120 (2010): 131-43.
- Scott, D. A., I. Tabarean, Y. Tang, A. Cartier, E. Masliah, and S. Roy. "A Pathologic Cascade Leading to Synaptic Dysfunction in Alpha-Synuclein-Induced Neurodegeneration." *J Neurosci* 30 (2010): 8083-95.
- Shannon, K. M., A. Keshavarzian, H. B. Dodiya, S. Jakate, and J. H. Kordower. "Is Alpha-Synuclein in the Colon a Biomarker for Premotor Parkinson's Disease? Evidence from 3 Cases." *Mov Disord* 27 (2012): 716-9.
- Shannon, K. M., A. Keshavarzian, E. Mutlu, H. B. Dodiya, D. Daian, J. A. Jaglin, and J. H. Kordower. "Alpha-Synuclein in Colonic Submucosa in Early Untreated Parkinson's Disease." *Mov Disord* 27 (2012): 709-15.
- Sharrad, D. F., W. P. Gai, and S. J. Brookes. "Selective Coexpression of Synaptic

- Proteins, Alpha-Synuclein, Cysteine String Protein-Alpha, Synaptophysin, Synaptotagmin-1, and Synaptobrevin-2 in Vesicular Acetylcholine Transporter-Immunoreactive Axons in the Guinea Pig Ileum." *J Comp Neurol* 521 (2013): 2523-37.
- Silva, B. A., L. Breydo, and V. N. Uversky. "Targeting the Chameleon: A Focused Look at Alpha-Synuclein and Its Roles in Neurodegeneration." *Mol Neurobiol* 47, no. 2 (2013): 446-59.
- Singaram, C., W. Ashraf, E. A. Gaumnitz, C. Torbey, A. Sengupta, R. Pfeiffer, and E. M. Quigley. "Dopaminergic Defect of Enteric Nervous System in Parkinson's Disease Patients with Chronic Constipation." *Lancet* 346 (1995): 861-4.
- Sollner, T., M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller, and J. E. Rothman. "A Protein Assembly-Disassembly Pathway in Vitro That May Correspond to Sequential Steps of Synaptic Vesicle Docking, Activation, and Fusion." *Cell* 75 (1993): 409-18.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J. E. Rothman. "Snap Receptors Implicated in Vesicle Targeting and Fusion." *Nature* 362 (1993): 318-24.
- Spillantini, M. G., R. A. Crowther, R. Jakes, N. J. Cairns, P. L. Lantos, and M. Goedert. "Filamentous Alpha-Synuclein Inclusions Link Multiple System Atrophy with Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies." *Neurosci Lett* 251 (1998): 205-8.
- Spillantini, M. G., A. Divane, and M. Goedert. "Assignment of Human Alpha-Synuclein (Snca) and Beta-Synuclein (Sncb) Genes to Chromosomes 4q21 and 5q35." *Genomics* 27 (1995): 379-81.
- Spillantini, M. G., and M. Goedert. "The Alpha-Synucleinopathies: Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy." *Ann N Y Acad Sci* 920 (2000): 16-27.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert. "Alpha-Synuclein in Lewy Bodies." *Nature* 388 (1997): 839-40.
- Sudhof, T. C. "The Synaptic Vesicle Cycle: A Cascade of Protein-Protein Interactions." *Nature* 375 (1995): 645-53.
- Sudhof, T. C. "The Synaptic Vesicle Cycle." *Annu Rev Neurosci* 27, (2004): 509-47.
- Suita, S., T. Taguchi, S. Ieiri, and T. Nakatsuji. "Hirschsprung's Disease in Japan: Analysis of 3852 Patients Based on a Nationwide Survey in 30 Years." *J*

- Pediatr Surg 40 (2005): 197-201; discussion 201-2.
- Sunwoo, M. K., J. Y. Hong, J. Choi, H. J. Park, S. H. Kim, and P. H. Lee. "Alpha-Synuclein Pathology Is Related to Postoperative Delirium in Patients Undergoing Gastrectomy." *Neurology* 80 (2013): 810-3.
- Surprenant, A. "Control of the Gastrointestinal Tract by Enteric Neurons." *Annu Rev Physiol* 56 (1994): 117-40.
- Tofaris, G. K., and M. G. Spillantini. "Physiological and Pathological Properties of Alpha-Synuclein." *Cell Mol Life Sci* 64 (2007): 2194-201.
- Ueda, K., H. Fukushima, E. Masliah, Y. Xia, A. Iwai, M. Yoshimoto, D. A. Otero, J. Kondo, Y. Ihara, and T. Saitoh. "Molecular Cloning of Cdna Encoding an Unrecognized Component of Amyloid in Alzheimer Disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993): 11282-6.
- Uversky, V. N., and A. L. Fink. "Amino Acid Determinants of Alpha-Synuclein Aggregation: Putting Together Pieces of the Puzzle." *FEBS Lett* 522 (2002): 9-13.
- Visanji, N. P., S. Wislet-Gendebien, L. W. Oschipok, G. Zhang, I. Aubert, P. E. Fraser, and A. Tandon. "Effect of Ser-129 Phosphorylation on Interaction of Alpha-Synuclein with Synaptic and Cellular Membranes." *J Biol Chem* 286 (2011): 35863-73.
- Wang, L., S. M. Fleming, M. F. Chesselet, and Y. Tache. "Abnormal Colonic Motility in Mice Overexpressing Human Wild-Type Alpha-Synuclein." *Neuroreport* 19 (2008): 873-6.
- Wang, L., I. Magen, P. Q. Yuan, S. R. Subramaniam, F. Richter, M. F. Chesselet, and Y. Tache. "Mice Overexpressing Wild-Type Human Alpha-Synuclein Display Alterations in Colonic Myenteric Ganglia and Defecation." *Neurogastroenterol Motil* 24 (2012): e425-36.
- Ward, S. M. "Interstitial Cells of Cajal in Enteric Neurotransmission." *Gut* 47 Suppl 4, (2000): iv40-3; discussion iv52.
- Wedel, T., M. Bottner, and H. J. Krammer. "[the Enteric Nervous System and Interstitial Cells of Cajal. Changes in Chronic Constipation in Adults]." *Pathologie* 28 (2007): 143-8.
- Wedel, T., V. Busing, G. Heinrichs, K. Nohroudi, H. P. Bruch, U. J. Roblick, and M. Bottner. "Diverticular Disease Is Associated with an Enteric Neuropathy as Revealed by Morphometric Analysis." *Neurogastroenterol Motil* 22 (2010):

407-14, e93-4.

- Wedel, T., U. Roblick, J. Gleiss, T. Schiedeck, H. P. Bruch, W. Kuhnel, and H. J. Krammer. "Organization of the Enteric Nervous System in the Human Colon Demonstrated by Wholmount Immunohistochemistry with Special Reference to the Submucous Plexus." *Ann Anat* 181 (1999): 327-37.
- Wood, J. D. "Physiology of the enteric nervous system." *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven, New York (1987): 67-109.
- Wood, J. D. "Enteric Nervous Control of Motility in the Upper Gastrointestinal Tract in Defensive States." *Dig Dis Sci* 44 (1999): 44S-52S.
- Yavich, L., P. Jakala, and H. Tanila. "Abnormal Compartmentalization of Norepinephrine in Mouse Dentate Gyrus in Alpha-Synuclein Knockout and A30p Transgenic Mice." *J Neurochem* 99 (2006): 724-32.
- Yavich, L., H. Tanila, S. Vepsalainen, and P. Jakala. "Role of Alpha-Synuclein in Presynaptic Dopamine Recruitment." *J Neurosci* 24 (2004): 11165-70.
- Yin, J., J. Han, C. Zhang, Q. L. Ma, X. Li, F. Cheng, G. Liu, Y. Li, K. Ueda, P. Chan, and S. Yu. "C-Terminal Part of Alpha-Synuclein Mediates Its Activity in Promoting Proliferation of Dopaminergic Cells." *J Neural Transm* 118 (2011): 1155-64.
- Yu, S., X. Li, G. Liu, J. Han, C. Zhang, Y. Li, S. Xu, C. Liu, Y. Gao, H. Yang, K. Ueda, and P. Chan. "Extensive Nuclear Localization of Alpha-Synuclein in Normal Rat Brain Neurons Revealed by a Novel Monoclonal Antibody." *Neuroscience* 145 (2007): 539-55.
- Zeng, F., R. P. Watson, and M. S. Nash. "Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Enhances Synaptic Communication and 5-Hydroxytryptamine 3a Receptor Expression in Enteric Neurons." *Gastroenterology* 138 (2010): 1491-501.
- Zhou, Z., J. Kim, R. Insolera, X. Peng, D. J. Fink, and M. Mata. "Rho Gtpase Regulation of Alpha-Synuclein and Vmat2: Implications for Pathogenesis of Parkinson's Disease." *Mol Cell Neurosci* 48 (2011): 29-37.

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. Martina Böttner für die Bereitstellung des Themas und die erstklassige Betreuung bedanken. Sie war zu jeder Zeit ansprechbar, hilfsbereit und konstruktiv. Unser Verhältnis war von der ersten Minute an herzlich und von Humor geprägt.

Ich danke Herrn Professor Dr. Thilo Wedel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe, für die hervorragenden Bedingungen im Labor und für seine Unterstützung.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die tolle Atmosphäre im Labor bedanken. Für die geduldige Hilfe bei der praktischen Laborarbeit bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen Karin Stengel, Miriam Lemmer, Inka Geurink und Bettina Facompré.

Für die engagierte Hilfe bei der Arbeit mit der Computersoftware danke ich Frau Dr. Ines Hellwig.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Frau Dr. Martina Barrenschee für die zügige und sehr hilfreiche Korrektur. Sie hatte stets ein offenes Ohr.

Frau Gerlinde Wohlrab danke ich für die Korrektur der Rechtschreibung und der Grammatik.

Ich möchte mich auch bei meiner Freundin Julia Wohlrab bedanken. Sie ist in den letzten Jahren zu einem der bedeutendsten Menschen in meinem Leben geworden und war mir stets eine wichtige Stütze.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung. Meine Mutter hat stets alles für mich gegeben, auch wenn die Zeiten nicht immer leicht waren. Mein Vater zeigte mir, wie man beruflichen Erfolg mit Lebensfreude verbindet. Für seine finanzielle Unterstützung bin ich sehr dankbar. Ohne euch wäre ich heute nicht da wo ich bin, vielen Dank!

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Fricke

Vorname: Tobias

Geburtsdatum: 09.03.1984

Geburtsort: Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

SCHULISCHE AUSBILDUNG

08/1990 – 06/1994 Grundschule Rungwisch, Hamburg

08/1994 – 06/2003 Julius-Leber-Gesamtschule, Hamburg

06/2003 Abitur

ZIVILDIENTST

09/2003 – 06/2004 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Sozialstation Lokstedt-Stellingen, Hamburg

AUSBILDUNG

10/2004 – 09/2007 Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger im katholischen Marienkrankenhaus Hamburg

BERUFLICHER WERDEGANG

12/2007- 09/2008 Gesundheits- und Krankenpfleger im katholischen Marienkrankenhaus Hamburg

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

Seit 10/2008 Humanmedizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

09/2010 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Physikum

08/2013 Beginn des Praktischen Jahres

HILFSWISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

2011 – 2013 Betreuung des Kurses der Makroskopischen Anatomie
Anatomisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

AUS DER DISSERTATION HERVORGEGANGENE VORTRÄGE

02/2012 Vortrag auf der 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität zum Thema:

“Alpha-synuclein is associated with the synaptical vesicle apparatus in the human and rat enteric nervous system“, (T. Fricke, T. Wedel, M. Barrenschee , J. Harde, I. Hellwig, J.-H. Egberts, T.Becker, M. Böttner)

AUS DER DISSERTATION HERVORGEGANGENE PUBLIKATIONEN

12/2012 M. Böttner, D. Zorenkov, I. Hellwig, M. Barrenschee, J. Harde, T. Fricke, G. Deuschl, J. H. Egberts, T. Becker, A. Fritscher-Ravens, A. Arlt, and T. Wedel. "Expression Pattern and Localization of Alpha-Synuclein in the Human Enteric Nervous System." *Neurobiol Dis* 48, no. 3 (2012): 474-80.

12/2013 zur Zeit ist folgende Publikation in Arbeit:

“Alpha-Synuclein is a marker for synaptic plasticity in the enteric nervous system.“

Kiel, den 11.12.2013

Tobias Fricke