

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Ralph Lucius)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Expression und Funktion des Transforming Growth Factor- β Systems in
enterischen Ganglien und Muskelzellen**

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

vorgelegt von

SIMON PORSCHEK

aus Wedel

Kiel 2018

1. Berichterstatterin: PD Dr. rer. nat. Martina Böttner
Anatomisches Institut
2. Berichterstatter PD Dr. Sebastian Hinz
Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-,
Transplantations- und Kinderchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.04.2019

gez.

Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Prof. Dr. Thomas Herdegen

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das enterische Nervensystem	1
1.2 Makro- und mikroskopische Anatomie	1
1.3 Die TGF- β -Superfamilie	2
1.4 Das TGF- β -System	3
1.5 Die TGF- β -Synthese und Struktur	3
1.6 Die TGF- β -Rezeptoren und Signaltransduktion	4
1.7 Funktionen von TGF- β im zentralen Nervensystem	6
1.8 Funktionen von TGF- β im peripheren Nervensystem	8
1.9 Funktionen von TGF- β im enterischen Nervensystem	9
2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Material	12
3.1.1 Herkunft des humanen Materials	12
3.1.2 Herkunft der Plexus-myentericus-Primärkulturen	12
3.1.3 Herkunft der kultivierten gastrointestinalen Muskelzellen	12
3.1.4 Chemikalien	13
3.1.5 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	14
3.1.6 Kits	15
3.1.7 Antikörper	15
3.1.8 Nukleotide und Wachstumsfaktoren	16
3.1.9 Enzyme	17
3.1.10 Lösungen und Puffer	17
3.2 Methoden	18
3.2.1 Prozessierung des humanen Gewebes	18
3.2.2 Laser capture microdissection (LCM)	20
3.2.3 Isolierung und Kultivierung myenterischer Neurone	20
3.2.3.1 [...] für mRNA-Expressionsstudien	20
3.2.3.2 [...] für morphometrische Analysen	21

3.2.4 Isolierung und Kultivierung enterischer Muskelzellen für mRNA-Expressionsstudien und Immunhistochemie	21
3.2.5 mRNA-Expressionsstudien	22
3.2.5.1 Isolierungen der mRNA	22
3.2.5.2 Reverse Transkription	23
3.2.5.3 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	24
3.2.6 Immunhistochemie	30
3.2.6.1 Prinzip der Immunhistochemie	30
3.2.6.2 Markiertes Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-(ABC)-Protokoll für humanes Gewebe	31
3.2.6.3 Immunhistochemie mit dem Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-(ABC)-Protokoll für Zellkulturen	34
3.2.6.4 Prinzip der Fluoreszenz-Immunhistochemie.....	35
3.2.6.5 Prinzip der Fluoreszenz-Immunhistochemie an humanem Gewebe	36
3.2.7 Morphometrische Analyse der kultivierten myenterischen Nervenzellen	38
3.2.8 Statistische Auswertung	38
3.2.8.1 Auswertung der mRNA-Expressionsstudien	38
3.2.8.2 Auswertung der morphometrischen Analysen	38
4 Ergebnisse	39
4.1 Humanes Gewebe	39
4.1.1 Genexpression des TGF- β -Systems im humanen Kolon	39
4.1.1.1 mRNA-Expression in Vollwandproben und isolierten Wandschichten	39
4.1.1.2 mRNA-Expression in isolierten myenterischen Ganglien	40
4.1.2 Immunhistochemie des TGF- β -Systems im humanen Kolon	41
4.1.2.1 Immunhistochemie für die Liganden TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 im humanen Kolon	41
4.1.2.2 Immunhistochemie für T β R-1, T β R-2 und T β R-3 im humanen Kolon	43
4.1.3 Fluoreszenz-Immunhistochemie für TGF- β 1 im humanen Kolon	45
4.2 Zellkulturen	49
4.2.1 Primärkulturen des Plexus myentericus aus der Ratte	49
4.2.1.1 mRNA-Expression des TGF- β -Systems in Primärkulturen des Plexus myentericus	49
4.2.1.2 Morphometrische Analyse von Primärkulturen des Plexus myentericus nach Stimulation mit TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3	52

4.2.2 Enterische Muskelzellkulturen	52
4.2.2.1 mRNA-Expression des TGF- β -Systems in kultivierten enterischen Muskelzellen	52
4.2.2.2 Immunhistochemie von unbehandelten enterischen Muskelzellen in Zellkultur	54
4.2.2.3 mRNA-Expression enterischer Muskelzellen der Ratte nach Stimulation mit TGF- β 1	54
5 Diskussion	60
5.1 Grundlegende Erkenntnisse	60
5.2 Methodik	61
5.3 Humanes Gewebe	62
5.3.1 Submukosa und Immunsystem	63
5.3.2 Tunica muscularis und Myozyten	64
5.3.3 Plexus myentericus	64
5.3.4 Neuromuskuläre Interaktion und gastrointestinale Motilität	65
5.3.5 TGF- β und intestinale Erkrankungen	66
5.4 TGF- β in intestinalen Zellkultursystemen	66
5.4.1 Primärkulturen des Plexus myentericus	66
5.4.2 Vergleich von peripherem und enterischem Nervensystem	67
5.4.3 Vergleich von zentralem und enterischem Nervensystem	68
5.4.4 Enterische Muskelzellkulturen	69
5.4.5 Myoneurale Wechselwirkungen	70
5.4.6 Einfluss auf den myozytären Phänotypus	70
5.4.7 Modulation der Serotonin- und Acetylcholin-Transmittersysteme	71
5.4.8 Beeinflussung des neurotrophen GDNF-Systems	71
5.4.9 Autokrine Effekte des TGF- β -Zytokinsystems	72
5.5 Klinischer Ausblick	74
6 Zusammenfassung	75
7 Literaturverzeichnis	77
8 Danksagung	85
9 Wissenschaftliche Veröffentlichungen	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau der Darmwand und Lage des ENS	2
Abbildung 1.2: Struktur der TGF- β -Superfamilie	4
Abbildung 1.3: Kanonischer Signalweg von TGF- β	6
Abbildung 3.1: Laser capture microdissection (LCM) eines myenterischen Ganglions	20
Abbildung 4.1: mRNA-Expression des TGF- β -Systems im humanen Kolon	40
Abbildung 4.2: mRNA-Expression des TGF- β -Systems in isolierten myenterischen Ganglien des humanen Kolons	41
Abbildung 4.3: Immunhistochemie für TGF- β 1, - β 2 und - β 3 im humanen Kolon	43
Abbildung 4.4: Immunhistochemie für T β R-1, T β R-2 und T β R-3 im humanen Kolon	45
Abbildung 4.5: Immunfluoreszenz für TGF- β 1 und α -SMA im humanen Kolon	47
Abbildung 4.6: Immunfluoreszenz für TGF- β 1 und PGP 9.5 im humanen Kolon	48
Abbildung 4.7: mRNA-Expression des TGF- β -Systems in Primärkulturen des Plexus myentericus	49
Abbildung 4.8: Visualisierung von Neuronen in einer Primärkultur des Plexus myentericus nach Stimulation mit TGF- β	50
Abbildung 4.9: Morphometrische Analyse von Neuronen in einer Primärkultur des Plexus myentericus nach Stimulation mit TGF- β	51
Abbildung 4.10: mRNA-Expression des TGF- β -Systems in kultivierten enterischen Muskelzellen	52
Abbildung 4.11: Immunhistochemische Darstellung von TGF- β in kultivierten enterischen Muskelzellen	53
Abbildung 4.12: Immunhistochemische Darstellung von T β R-1 und T β R-2 in kultivierten enterischen Muskelzellen	54
Abbildung 4.13: mRNA-Expression von Proteinen des adulten Muskelphänotypus in kultivierten enterischen Muskelzellen nach Stimulation mit TGF- β 1	56
Abbildung 4.14: mRNA-Expression von muskarinergen und serotonergen Rezeptoren in kultivierten enterischen Muskelzellen nach Stimulation mit TGF- β 1	57
Abbildung 4.15: mRNA-Expression von Gdnf und seiner korrespondierenden Rezeptoren in kultivierten enterischen Muskelzellen nach Stimulation mit TGF- β 1	58
Abbildung 4.16: mRNA-Expression des TGF- β -Systems in kultivierten enterischen Muskelzellen nach Stimulation mit TGF- β 1	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien dieser Arbeit	13
Tabelle 3.2: Verwendete Laborgeräte dieser Arbeit	14
Tabelle 3.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien dieser Arbeit	15
Tabelle 3.4: Verwendete Kits dieser Arbeit	15
Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper dieser Arbeit	15
Tabelle 3.6: Verwendete Nukleotide und Wachstumsfaktoren dieser Arbeit	16
Tabelle 3.7: Verwendete Enzyme dieser Arbeit	17
Tabelle 3.8: Verwendete Lösungen	17
Tabelle 3.9: Verwendete Puffer	18
Tabelle 3.10: Protokoll der Paraffineinbettung	19
Tabelle 3.11: Protokoll der DNase-Reaktion	23
Tabelle 3.12: Protokoll der Synthese von cDNA mittels reverser Transkription	24
Tabelle 3.13: Protokoll des qPCR-Ansatzes	26
Tabelle 3.14: Verwendete humane Primer bei der qPCR	27
Tabelle 3.15: Verwendete Ratten-Primer bei der qPCR	28
Tabelle 3.16: Protokoll der ABC-Methode für humane Paraffinschnitte	32
Tabelle 3.17: Antikörper der ABC-Methode für humane Paraffinschnitte	33
Tabelle 3.18: Protokoll der ABC-Methode für Zellkulturen	34
Tabelle 3.19: Antikörper der ABC-Methode für Zellkulturen	35
Tabelle 3.20: Protokoll der Immunfluoreszenz-Methode für humane Paraffinschnitte	36
Tabelle 3.21: Antikörper der Immunfluoreszenz-Methode für humane Paraffinschnitte	37

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	mRNA	messenger Ribonukleinsäure (A = „acid“)
ABC	Avidin-Biotin-Enzym- Komplex	Muc	Mucosa
AG	Arbeitsgemeinschaft	n	Probenanzahl
α -SMA	alpha smooth muscle actin	NaCl	Natriumchlorid
cDNA	complementary DNA	ng	Nanogramm
Col1a	pro-alpha1 chains of type I collagen	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Crbp1	Cellular retinol-binding protein-1	p	P-Wert
DAB	3-3'-Diaminobenzidin	PEN	Polyethylen Naphtalat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	PM	Plexus myentericus
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PNS	Peripheres Nervensystem
DNase	Desoxyribonuklease	PS-Lösung	(Penicillin + Streptomycin)- Lösung
dNTP's	Desoxyribonukleosid triphosphate	PM	Plexus myentericus
DTT	Dithiothreitol	PSM	Plexus submucosus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	qPCR	Quantitative Polymerase- Kettenreaktion
ENS	Enterisches Nervensystem	Ret	Rearranged during infection
FCS	Fetales Kälberserum	RNA	Ribonukleinsäure (A = „acid“)
GABA	γ -Aminobuttersäure	SC	Stratum circulare
Gdnf	Glia derived neurotrophic factor	SEM	Standardfehler
Gfr α 1	Gliaderived factor receptor α 1	SL	Stratum longitudinale
Gfr α 2	Gliaderived factor receptor α 2	SM	Submucosa
GIT	Gastrointestinaltrakt	SMAD	Wortverschmelzung der Proteine Sma (small body size) und Mad (Mothers against decapentaplegic)
h	Stunde	Smmhc	smooth muscle myosin heavy chain
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution	Smurf1	Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1
Hprt	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase	T β R	Transforming growth factor beta Rezeptor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	TGF- β	Transforming growth factor beta
Htr3a	Serotonin Rezeptor 3a	TM	Tunica muscularis
Htr4	Serotonin Rezeptor 4	TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
ICC	interstitielle Zellen von Cajal	VW	Vollwand
KCl	Kaliumchlorid	ZNS	Zentrales Nervensystem
LMD	Laser capture microdissection		
M2r	muskarinenger Acetylcholin Rezeptor 2		
M3r	muskarinenger Acetylcholin Rezeptor 3		
MEM	Minimal Essential Medium		
ml	Milliliter		
mm	Millimeter		

1 Einleitung

1.1 Das enterische Nervensystem

Der menschliche Darm ist von einem Nervengeflecht (Plexus) durchzogen, das in der Wand (intramural) lokalisiert ist und als enterisches Nervensystem (ENS) bezeichnet wird. Es stellt das größte autonome Nervensystem in Bezug auf die Anzahl der Neurone dar (Furness, 2006b) und durchzieht den Gastrointestinaltrakt (GIT) sowie seine Anhangsdrüsen Gallenblase, Pankreas, Leber und die extrahepatischen Gallenwege (Furness, 2006a). Die Funktionen des weitgehend autonom arbeitenden ENS reichen von der Regulation der gastrointestinalen Motilität über Blutfluss, Sekretion und Resorption bis zur Beeinflussung des Immunsystems (Schemann and Neunlist, 2004).

1.2 Makro- und mikroskopische Anatomie

Das ENS ist in zwei großen Hauptplexus, bestehend aus Neuronen und peripheren Gliazellen, organisiert. Die Neurone sind in kleinen, aber zahlreichen intramuralen Ganglien organisiert. Umgeben werden die Nervenzellen in einem Ganglion von Gliazellen, die der Homöostase, Modulation und Isolation der Nervenzellen und ihrer interganglionären Nervenfasern (Axone) dienen. Der myenterische Plexus (Auerbach-Plexus) liegt zwischen den beiden Schichten der Tunica muscularis, dem Stratum circulare und dem Stratum longitudinale, welche er beide innerviert. Über Axone steht er mit dem submukösen (Meissner-Plexus) in Verbindung (Wedel et al., 1999). Der Meissner-Plexus besitzt einen innen liegenden submukösen und einen äußeren, der Ringmuskelschicht anliegenden Anteil. Spezialisierte Zellen, die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC), sind im ENS eingebettet. Sie fungieren als Schrittmacher der enterischen Motilität und koordinieren die Interaktion von ENS und glatter Muskulatur (Lüllmann-Rauch, 2012). Trotz der weitgehenden funktionalen Autonomie unterhält das ENS extrinsische Verbindungen über den Sympathikus und Parasympathikus zum ZNS (Benninghoff and Drenckhahn, 2008).

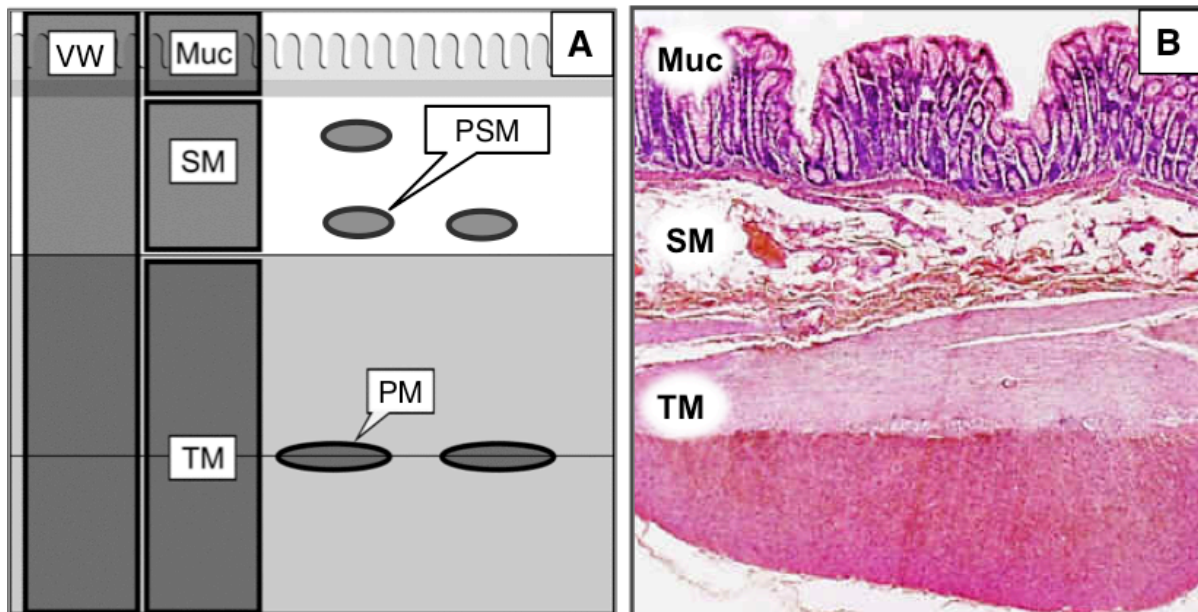


Abbildung 1.1: Aufbau der Darmwand und Lage des ENS. Gezeigt sind die schematische Darstellung (A) und die Lage im histologischen Präparat des humanen Darms (B). (A) nach (Böttner et al., 2012). (B) von Prof. T. Wedel, AG Wedel/Böttner, Anatomisches Institut CAU Kiel. VW = Vollwand; Muc = Mucosa; SM = Submucosa; TM = Tunica muscularis; PSM = Plexus submucosus (Meissner); PM = Plexus myentericus (Auerbach).

1.3 Die TGF- β -Superfamilie

Die Superfamilie der „Transforming growth factor betas“ (TGF- β s) ist eine Gruppe von Zytokinen, die in einer Vielzahl von Tieren (z.B. Wirbeltiere, Insekten, Seeigel und Fadenwürmer) vorkommen und beim Menschen derzeit 33 sekretorische Proteine umfassen (Krieglstein et al., 2011, Böttner et al., 2000). Auf Grund von Ähnlichkeiten in der carboxyterminalen Aminosäuresequenz lässt sie sich in die Subfamilien der „Glial cell line-derived neurotrophic factors“ (GDNFs), Activine/Inhibine, „decapentaplegic (Dpp) and vegetal-1 (Vg1)-related group“ (DVR group, oft auch als „bone morphogenetic proteins“ [BMPs] bezeichnet) sowie der TGF- β s selber einteilen.

Ihre Funktionen reichen von Regulation der Entwicklung diverser Zellpopulationen über Homöostase und Immunmodulation bis hin zum Zelltod (Derynck and Miyazono, 2008).

Benannt wurde die TGF- β -Superfamilie nach TGF- β 1, welches 1981 als erstes Mitglied isoliert wurde. Die Bezeichnung „growth factor“ erhielt es durch seine Fähigkeit, in Anwesenheit von Epidermal Growth Factor (EGF) normale Rattenfibroblasten aus der Niere (NRK) zu Koloniewachstum auf Soft Agar anzuregen (Roberts et al., 1980). Der Begriff

„Transforming“ rührt von der inzwischen widerlegten These her, es handle sich um einen Faktor, der nur von transformierten, also Tumorzellen gebildet werde.

1.4 Das TGF- β -System

Das TGF- β -System umfasst bisher 5 Liganden sowie 3 Rezeptoren (Böttner et al., 2000). In Säugetieren und damit auch im Menschen werden die Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 exprimiert (Ohta et al., 1987, Derynck et al., 1988, Madisen et al., 1988).

Bei TGF- β 4 und TGF- β 5 handelt es sich möglicherweise um die analogen Isoformen von TGF- β 1 des Huhns (TGF- β 4), bzw. des Krallenfrosches (TGF- β 5) (Böttner et al., 2000).

Zu den Funktionen der TGF- β s im heranreifenden und adulten Körper gehören Zellzyklus-Kontrolle, Regulation von Frühentwicklung, Differenzierung, Organisation und Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix, Hämatopoese, Angiogenese, Chemotaxis, Immunregulation und Apoptose (Böttner et al., 2000, Kingsley, 1994, Roberts et al., 1992, Shi and Massague, 2003).

Entsprechend ihrer vielfältigen Rolle als Regulationsproteine werden sie in diversen Geweben und Zellen exprimiert, wie beispielsweise in Mesenchym, Binde- und Stützgewebe, Epi- und Endothel, Thrombozyten, Immunzellen sowie zentralen und peripheren Nervengewebe (Böttner et al., 2000).

Die Effekte der Liganden sind stark kontextabhängig und variieren je nach Gewebetyp, Differenzierungszustand der Effektorzellen sowie der Anwesenheit anderer Zytokine (Nathan and Sporn, 1991).

1.5 Die TGF- β -Synthese & Struktur

Die Synthese der TGF- β -Isoformen erfolgt als Prä-Pro-Protein (Abb.1.2). An ein N-terminales Signalpeptid schließt sich eine Pro-Domäne variabler Länge an. Sie reguliert die korrekte Faltung, Dimerisation von Untereinheiten sowie die Faktoraktivität (Kingsley, 1994, Rodriguez-Martinez and Velasco, 2012). Das 110-140 Aminosäure lange, reife Protein am C-terminalen Ende ist hingegen nach Freisetzung für die biologischen Eigenschaften verantwortlich.

Nach der korrekten Zuordnung in den konstitutiven oder regulierten Sekretionsweg durch Hilfe des N-terminalen Signalpeptids erfolgt die Spaltung über das Pro-Peptid als

Zwischenstufe in das reife Protein im Transgolgi-Apparat. Die Spaltung erfolgt durch Furin-like Proteasen an Schnittstellen mit einem charakteristischen RXXR-Motiv. Nach abschließender Dimerisierung der reifen Proteine werden die Isoformen in den Extrazellularraum sekretiert, wo sie durch Protolyse aktiviert werden (Ten Dijke and Arthur, 2007).

Als Grundstruktur besitzen alle Mitglieder der TGF- β -Superfamilie eine hoch konservierte Struktur aus 7 Cysteinresten, die als *Cystinknotenmotiv* bezeichnet wird (McDonald and Hendrickson, 1993).

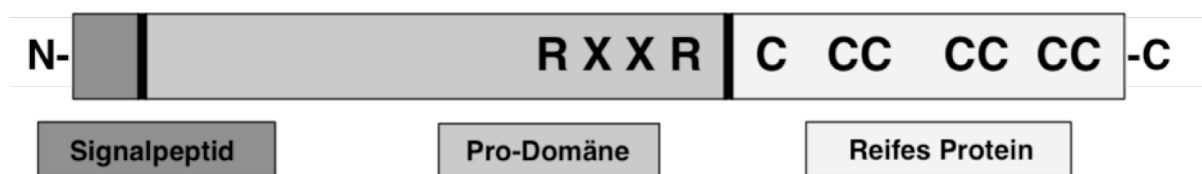


Abbildung 1.2: Struktur der TGF- β -Superfamilie. Darstellung der Struktur des Prä-Proteins der TGF- β -Superfamilie. Die Zuordnung in den Sekretorischen Weg erfolgt über ein n-terminales Signalpeptid. Das reife Protein am c-terminalen Ende wird nach proteolytischer Spaltung in der RXXR-Region freigesetzt. Basierend auf (Kingsley, 1994) und (Böttner et al., 2000).

1.6 Die TGF- β -Rezeptoren und Signaltransduktion

Die Liganden TGF- β 1-3 binden an membranständige Rezeptorkomplexe bestehend aus je zwei TGF- β -Typ-1- ($T\beta R1 = ALK5$ [*activin receptor-like kinase 5*]) sowie zwei TGF- β -Typ-2-Rezeptoren ($T\beta R2$) (Massague, 1990). Sie gehören zur Klasse der Serin/Threonin-Kinasen (Yamashita et al., 1994, Kriegelstein et al., 2011), was eine Besonderheit des TGF- β -Systems im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktorfamilien darstellt, die üblicherweise zu den Tyrosinkinassen gehören. Das menschliche Genom beinhaltet 12 Varianten der Serin/Threonin-Kinasen (7 Typ-I- und 5 Typ-II-Rezeptoren), die alle an der TGF- β -Signaltransduktion beteiligt sind (Manning et al., 2002). Beide Rezeptoren bestehen aus etwa 500 Aminosäuren und unterteilen sich in eine N-terminale extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne, eine Transmembranregion sowie eine C-terminale intrazelluläre Serin/Threonin-Kinase Domäne (Shi and Massague, 2003).

Die Bindung des dimeren Liganden an den $T\beta R2$ induziert die Rekrutierung von $T\beta R1$ zu einem tetrameren Komplex. $T\beta R2$ phosphoryliert $T\beta R1$ an ihrer Glycin-Serin-Domäne und aktiviert so die $T\beta R1$ -Kinase. Die anschließende kanonische Weiterleitung des Signals vom

Rezeptor zum Zellkern erfolgt über intrazelluläre SMAD-Proteine (zusammengesetzter Name aus den homologen Proteinen des Fadenwurmes *Caenorhabditis elegans* [„small body size“ = SMA] und der *Drosophila*-Fliege [„mothers against decapentaplegic“ = MAD]).

Die rezeptor-regulierten SMADs (R-SMADs) sind SMAD2 und SMAD3. Sie werden durch die T β R1-Kinase phosphoryliert und formen nach Aktivierung Homodimere im Zytoplasma (Ten Dijke and Hill, 2004). Zusammen mit dem common-mediator SMAD4 (co-SMAD) translozieren sie als Heterotetramer in den Nukleus, um dort als Transkriptionsfaktoren zu wirken. Schon unmittelbar nach TGF- β -Stimulation einer Zelle kommt es zu Änderungen in der Expression von über 300 Genen (Kang et al., 2003), deren überwiegende Mehrheit an der Regulation von Zelltod, Differenzierung und Zellfunktionen beteiligt ist (Shen et al., 2015).

Das inhibitorische SMAD 7 (I-SMAD) kann als Gegenregulation an den aktiven T β R1 binden und so die Phosphorylierung der R-SMADs verhindern (Krieglstein et al., 2011).

Die Terminierung des Signals kann über drei Mechanismen erfolgen: (I) Durch I-SMADs, (II) durch Ubiquitinierung durch Smurf1 (einer E3-ubiquitin Ligase) am aktiven T β R1 und folglich Degradierung im Proteasom oder (III) durch Protein-Phosphatase-1 abhängige Dephosphorylierung (Shi and Massague, 2003).

Zusätzlich zu diesem kanonischen Signalweg kann TGF- β auch Smad-unabhängig den Erk-, p38- und JNK-MAPK-Signalweg aktivieren (Derynck and Zhang, 2003).

Die Funktion des TGF- β -Typ-3-Rezeptors (T β R3, auch als Betaglycan bezeichnet) bedarf noch weiterer Klärung. Wahrscheinlich moduliert er die Interaktion zwischen Ligand und T β R2, was besonders für TGF- β 2 von Bedeutung zu sein scheint (Massague, 1998, Brown et al., 1999).

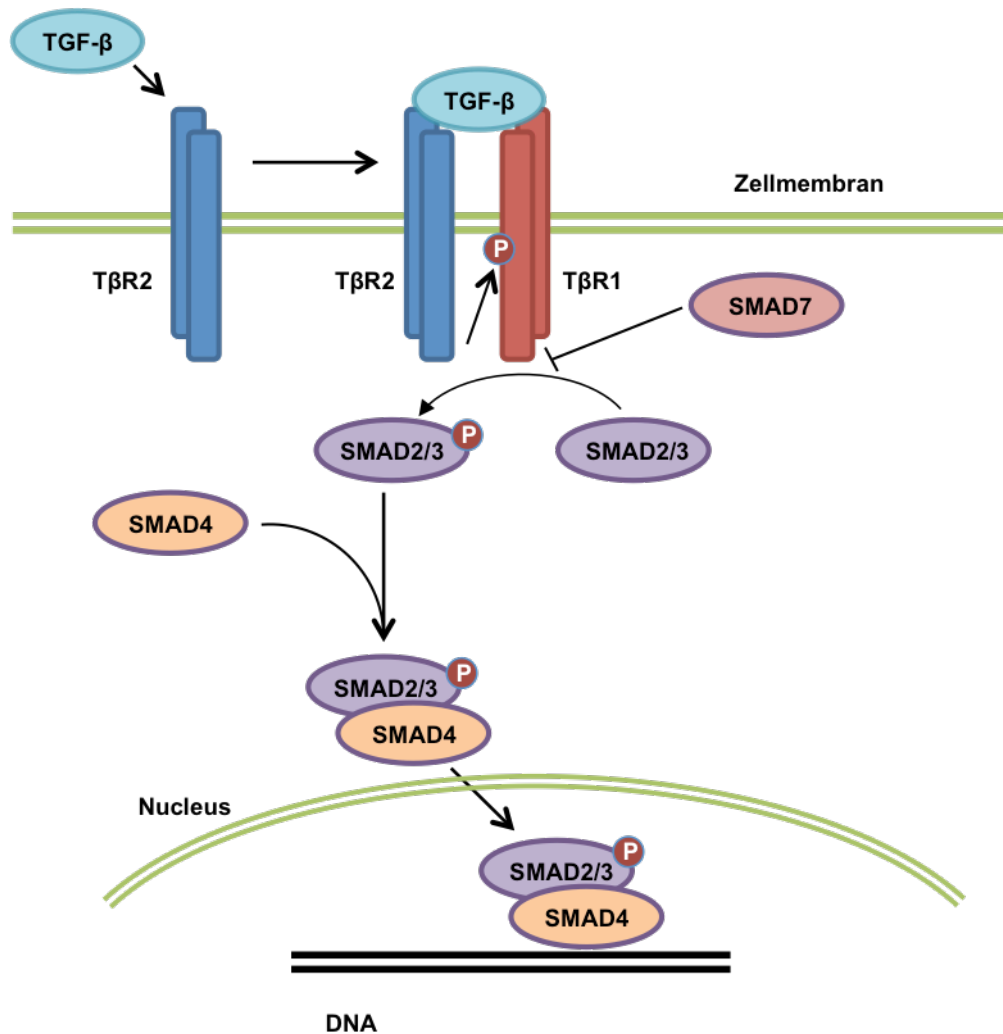


Abbildung 1.3: Kanonischer Signalweg von TGF-β. Schematische Darstellung des kanonischen Signalweges mittels unterschiedlicher SMAD-Proteine. Die extrazelluläre Bindung von TGF-β an TβR2 führt zu Rekrutierung und Phosphorylierung von TβR1 mit konsekutiver, intrazellulärer Signalkaskade mittels SMAD. Basierend auf (Kriegelstein et al., 2011) und (Aigner and Bogdahn, 2008).

1.7 Funktionen von TGF-β im zentralen Nervensystem

Gerade im zentralen Nervensystem (ZNS) zeigt das TGF-β-System ein weit verbreitetes Expressionsmuster. Dementsprechend sind zahlreiche Effekte von TGF-βs auf Neurone und Gliazellen beschrieben worden.

Ursprünglich als Zytokin bei Entzündungen und Nervenschädigungen verstanden, wird inzwischen die Funktion von TGF-β bei der Entwicklung des ZNS und der Neuroprotektion als ebenso wichtige Aufgabe gesehen (Rodriguez-Martinez and Velasco, 2012).

Alle drei Liganden sowie ihre Rezeptoren werden innerhalb des Nervensystems in Neuronen und Gliazellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung exprimiert (Rodriguez-Martinez and Velasco, 2012, Aigner and Bogdahn, 2008).

So sind TGF- β 2 und TGF- β 3 oft koexprimiert und sowohl im heranreifenden (Flanders et al., 1991) als auch im adulten (Unsicker et al., 1991) Gehirn in Neuronen und Gliazellen nachweisbar. Zu TGF- β 1 dagegen existieren widersprüchliche Daten. Allgemein anerkannt ist aber die Expressierung in den Meningen, dem Plexus choroideus und Gliazellen (Krieglstein et al., 2011) sowie in Neuronen nach einer Läsion des Rückenmarks (Buss et al., 2008).

Während der Entwicklung des ZNS ist die Expression der TGF- β s allgemein stärker als im adulten ZNS (Unsicker et al., 1991).

Die TGF- β s wirken auf die meisten Zellen des ZNS durch einen Zellzyklusarrest antiproliferativ (Krieglstein et al., 2011). In neuronalen Progenitorzellen induzieren die TGF- β s einen Zellzyklusexit und eine neuronale Differenzierung durch gesteigerte Expression von neuronalen Markern (Vogel et al., 2010).

So ist es nachvollziehbar, dass in Hirnregionen mit hoher Differenzierungsaktivität die Expression von TGF- β s höher ist als in Regionen mit viel Proliferationsaktivität (Flanders et al., 1991). TGF- β s sind bei der Proliferation von cerebellären (Constam et al., 1994), chromaffinen (Wolf et al., 1999) sowie möglicherweise GABAergen Zellen (Krieglstein et al., 2011) involviert und steigern das Überleben von motorischen (Martinou et al., 1990), sensorischen (Chalazonitis et al., 1992) und dopaminergen Neuronen (Krieglstein and Unsicker, 1994, Krieglstein, 2006).

Weiterhin spielen die TGF- β s eine wichtige Rolle als neurotrophe und -protektive Faktoren bei einem breiten Spektrum akuter und chronischer Hirnschadenmodelle (Unsicker and Krieglstein, 2002).

Sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Synapsen sind in ihrer Entwicklung und Funktion auf die Anwesenheit und Regulation von TGF- β s und anderen Mitgliedern der Superfamilie angewiesen (Packard et al., 2003, Zhang et al., 1997).

Fehlregulationen der TGF- β /Activin-Signalkaskade wirken sich auch auf das GABA- (γ -Aminobuttersäure) & NMDA-System (N-Methyl-D-Aspartat, ein Glutamatrezeptor) aus (Krieglstein et al., 2011). Diese Systeme sind die wichtigsten inhibitorischen bzw. exzitatorischen Neurotransmittersystem des ZNS und mitverantwortlich für synaptische Transmission und Plastizität, die als neuronale Grundlage für Gedächtnis und Verhalten gelten.

Auch bei einer Reihe neurologischer Erkrankungen, insbesondere bei neurodegenerativen und Motorneuronen-Erkrankungen finden sich Pathologien des TGF- β -Systems. So sind bei M.

Parkinson (Mogi et al., 1995, Vawter et al., 1996) und amyotropher Lateralsklerose (ALS) (Ilzecka et al., 2002) erhöhte Expressionslevel von TGF- β 1 und TGF- β 2 im ZNS und peripheren Blut, bei der ALS zusätzlich vermehrt mRNA aller Isoformen in Muskelbiopsien (Si et al., 2015) nachgewiesen worden. Auch bei M. Alzheimer (Review siehe (Zhang and Jiang, 2015)) und Chorea huntington (Battaglia et al., 2011, Chang et al., 2015) wurden Veränderungen der Expression von TGF- β 1 und TGF- β 2 im Plasma und ZNS gefunden, wobei in der Literatur noch diskutiert wird, ob es sich um Über- oder Unterexpressionen handelt, da widersprüchliche Daten vorliegen.

Ergänzend konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 in Kombination mit GDNF im retrograden M. Parkinson-Modell der Ratte neuroprotektiv wirkt (Gonzalez-Aparicio et al., 2010) und eine exogene Zuführung von TGF- β 2 im transgenen Mausmodell für die ALS die motorische Leistung verbessert (Day et al., 2005).

1.8 Funktionen von TGF- β im peripheren Nervensystem

Trotz des komplexen Wissens über das TGF- β -System im ZNS ist bisher nur sehr wenig über die Rolle im peripheren Nervensystem (PNS) bekannt.

Die Isoformen TGF- β 2 und - β 3 sind in embryonalen und adulten Neuronen des PNS, Sympathikus und Parasympathikus, sowie in peripheren Gliazellen (Schwann-Zellen) nachweisbar (Scherer et al., 1993, Flanders et al., 1991, Unsicker et al., 1991). TGF- β 1 mRNA wird ebenfalls in Schwann-Zellen exprimiert und nach Läsion von peripheren Nerven hochreguliert (Scherer et al., 1993).

Bei adulten Neuronen und Gliazellen des PNS wirken die Isoformen wachstumsstimulierend. So sind sie mitogen für Schwannzellen (Eccleston et al., 1989, Ridley et al., 1989) und erhöhen bei kultivierten Neuronen aus Hinterwurzel-Ganglien sowohl die Neuritenlänge als auch -anzahl (Unsicker et al., 1996).

Auch im Rahmen der neuromuskulären Übertragung spielen sie eine wichtige Rolle, da TGF- β 1 die Anzahl von Synapsen sowie die Acetylcholinrezeptor-Dichte an der neuromuskulären Endplatte fördert (Feng and Ko, 2008).

1.9 Funktionen von TGF- β im enterischen Nervensystem

Auch im ENS ist das Wissen über Vorkommen und Funktion des TGF- β -Systems sehr rar.

Es scheint, dass auch die Entwicklung und Funktion von Neuronen des ENS stark abhängig von der Anwesenheit und Interaktion von Wachstumsfaktoren aus der TGF- β -Superfamilie sind. So bleibt bei Fehlen von GDNF (*Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor*, einem Molekül der TGF- β -Superfamilie) durch Knock-out die Entwicklung des ENS im Dünndarm und Kolon aus (Moore et al., 1996).

Andere Familienmitglieder wie BMP-2 und BMP-4 (*Bone Morphogenetic Proteins*), beeinflussen die Neurogenese und -differenzierung sowie die Gliogenese während der ENS-Entwicklung (Chalazonitis and Kessler, 2012).

Auch die TGF- β s scheinen einen essentiellen Beitrag zu leisten. So wird TGF- β 2 bei Mäusen im myenterischen Plexus während der Embryogenese exprimiert. Bei aganglionären Darmwänden von RET-Knockout-Mäusen (RET = „*rearranged during transfection*“, Name eines GDNF-Rezeptors) ist TGF- β 2 signifikant reduziert (Heanue and Pachnis, 2006).

Auf glatten Muskelzellen sind ebenfalls diverse Effekte von TGF- β beschrieben worden.

Die Vorläuferzellen von glatter Muskulatur sind in ihrer Entwicklung, insbesondere der Migration und Interaktion mit Endothelzellen, auf TGF- β s angewiesen (Sanford et al., 1997). Die Permeabilität der gastrointestinalen Endothelbarriere und die Proliferation der Endothelzellen wird durch enterische Gliazellen mittels TGF- β reguliert (Sharkey, 2015, Neunlist et al., 2007, Konkel and Chen, 2011). Darüber hinaus sorgt TGF- β für eine Differenzierung der adulten glatten Muskelzellen in einen kontraktile Phänotypus. So sorgen TGF- β 1 und TGF- β 2 in Kooperation mit Acetylcholin-Rezeptoren für die Hochregulation wichtiger Gene des kontraktile Apparates wie etwa α SMA (Oenema et al., 2012, Rensen et al., 2007) und hemmen die Zellteilung (Rensen et al., 2007). Auch die Apoptose wird durch TGF- β /Smad3 inhibiert (Shi et al., 2014).

Jüngere Studien haben das Vorkommen der TGF- β -Isoformen in der extrazellulären Matrix (EZM) und der Interaktion mit dieser in den Fokus gerückt. Die TGF- β s werden über ein TGF- β -bindendes Protein an Komponenten der EZM wie Fibronectin und Fibrillin gebunden und so in dieser gespeichert (Ten Dijke and Arthur, 2007).

Trotz dieser bisherigen Erkenntnisse gibt es immer noch sehr wenige Daten zum Expressionsprofil vom TGF- β -System im ENS. Deshalb zielt diese Studie auf die

Charakterisierung des mRNA-Expressionsmusters aller genannten Mitglieder des TGF- β -Systems in der humanen Darmwand durch ortsspezifische Genexpressionsanalyse der Mukosa, der Tunica muscularis sowie isolierter myenterischer Ganglien ab. Ergänzend erfolgte eine Analyse von Darmvollwandschnitten mittels (fluoreszenz-) immunhistochemischer Untersuchung. Zusätzlich wurde die Expression des TGF- β -Systems in myenterischen Nerven- und enterischen glatten Muskelzellkulturen von Ratten untersucht. In einem zweiten Schritt wurde der Effekt von TGF- β 1, TGF- β 2 sowie TGF- β 3 auf die Differenzierung kultivierter Neurone bzw. von TGF- β 1 auf enterische Muskelzellkulturen untersucht.

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Trotz des breiten Vorkommens und der vielschichtigen biologischen Funktionen des TGF- β -Systems im Zentralnervensystem ist die Rolle der drei Isoformen TGF- β 1-3 und ihrer Rezeptoren T β R1-3 im humanen Darm und dem enterischen Nervensystem noch weitestgehend unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, grundlegende Kenntnisse über das TGF- β -System im humanen Darm, exemplarisch dem Kolon, zu gewinnen. Folgende Fragen wurden daher adressiert:

- Werden die TGF- β -Isoformen 1-3 und ihre Rezeptoren T β R1-3 im humanen Kolon exprimiert?
- In welchen Wandschichten sind die TGF- β -Isoformen und ihre Rezeptoren lokalisiert?
- In welchen Gewebearten des Darmes findet sich eine Exprimierung beim Menschen?
- Ist TGF- β 1 im enterischen Nervensystem lokalisiert?
- Lassen sich die einzelnen Komponenten des TGF- β -Systems in Primärkulturen des Plexus myentericus und enterischen glatten Muskelzellkulturen der Ratte nachweisen?
- Besitzen die Liganden TGF- β 1- 3 neurotrophe Effekte auf myenterische Nervenzellen in Rattenzellkultur mit Beeinflussung der Neuritenlänge und Anzahl der Neuritenverzweigungen?
- Zeigt der Ligand TGF- β 1 modulierende und/oder differenzierende Effekte auf die Expression folgender Gene in der enterischen glatten Muskelzellkultur?
 - Gene des strukturellen und kontraktiven Phänotypus
 - Gene der serotonergen und cholinergen Signaltransduktion
 - Gene des neuroprotektiven GDNF-Systems
 - Gene des TGF- β -Systems selbst

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft des humanen Materials

Alle humanen Gewebe, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, waren OP-Resektate von Patienten, die sich auf Grund eines nicht stenosierenden Karzinoms des Kolons oder Rektums einer Resektion im betroffenen Bereich unterzogen haben. Der Tumor wurde en bloc zusammen mit jeweils 10 cm gesundem Gewebe oral und aboral reseziert, aus welchem postoperativ in maximalem Abstand zum Tumor die Proben für diese Arbeit gewonnen wurden.

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

3.1.2 Herkunft der Plexus-myentericus-Primärkulturen

Die Datenerhebung von Primärkulturen des Plexus myentericus erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe C. Hagl & K.-H. Schäfer, Institut für Informatik und Mikrosystemtechnik der FH Kaiserslautern, Deutschland. Zur Gewinnung der Daten dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Zellkultursysteme verwendet:

Alle myenterischen Nervenzellkulturen, welche für die mRNA-Expressionsstudien (Abschnitt 3.2.3.1) genutzt wurden, stammten von neugeborenen Wistar-Ratten (Isolierung am 2. Postnataltag).

Die myenterischen Nervenzellen für die Durchführung der morphometrischen Analysen (Abschnitt 3.2.3.2) stammten von Sprague-Dawley-Ratten (Isolierung am 10. Postnataltag).

Die Genehmigung zur Tötung der Ratten und zur Organentnahme lag in beiden Fällen vor.

3.1.3 Herkunft der kultivierten gastrointestinalen Muskelzellen

Alle verwendeten Zellen für die Muskelzellkulturen stammten aus Därmen von neugeborenen Wistar-Ratten und wurden am 2. Postnataltag entnommen. Auch hier lag die Genehmigung zur Tötung und Organentnahme vor.

3.1.4 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien dieser Arbeit

Produkt	Hersteller
Antikörperdiluent "ready-to-use"	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aquatex	Merck, Darmstadt, D
B 27 Supplementmix	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Blockserum "normal goat-serum"	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Citronensäure-Monohydrat	Roth, Karlsruhe, D
DAB	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
DAPI	Roche, Mannheim, D
DNase Puffer	Promega, Madison, USA
dNTP's	Promega, Madison, USA
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, D
EDTA	Promega, Madison, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
FCS	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Glutamine	Sigma, Dreisenhofen, D
H ₂ O ₂	Roth, Karlsruhe, D
Hämalaun nach Mayer	Roth, Karlsruhe, D
HBSS	Promocell, Heidelberg, D
Immumount	Thermo Scientific, Waltham, USA
Isomount	Labonord, Templemars, Frankreich
Isopentan	Merck, Darmstadt, D
KCl	Roth, Karlsruhe, D
Kristallviolett	Merck, Darmstadt, D
MEM	Promocell, Heidelberg, D
β-Mercaptoethanol	Sigma, Dreisenhofen, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Methronidazol	Ratiopharm, Ulm, D
Methylbenzoat	Roth, Karlsruhe, D
NaCl	Roth, Karlsruhe, D
Neurobasalmedium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Paraffin	Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PEN	Carl Zeiss, Göttingen, D
Penicillin/Streptomycin-Lösung (PS-Lösung)	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Polylysin / Laminin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
PS-Lösung	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Refobacin	Merck, Darmstadt, D
Reverse Transkriptase-Puffer	Promega, Madison, USA
RNase-freies Wasser	Macherey-Nagel, Düren, D
Shandon Cryomatrix	Thermo Scientific, Waltham, USA
TRIS	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
Xylol	Roth, Karlsruhe, D

3.1.5 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit genutzten Laborgeräte sowie Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3.2 beziehungsweise 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Verwendete Laborgeräte dieser Arbeit

Laborgerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Forma Scientific	Labotect, Göttingen, D
Cryostat	2800 Frigocut N	Reichert-Jung, Heidelberg, D
Digitalkamera	Axiocam	Zeiss, Oberkochen, D
Digitalkamera	digital slight	Nikon, Tokio, Japan
Durchlichtmikroskop	eclipse E600	Nikon, Tokio, Japan
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen, D
Laser catapulting system	PALM MicroLaser System	Zeiss MicroImaging, Göttingen, D
Inverses Lichtmikroskop	Zeiss Axio Observer Z1	Zeiss MicroImaging, Göttingen, D
Mikrotom	Autocut	Reichert-Jung, Heidelberg, D
Mikrowelle	1.100 W	Panasonic, Hamburg, D
Pipetten (1, 10, 100, 1.000 µl)	Research, Research Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Plattformschüttler	Promax 2020	Heidolph, Schwabach, D
Bildprozessierung und Analysesystem	Quantimet 600 mit Leica DMR BE Mikroskop	Leica, Wetzlar, D
Thermocycler	ABI PRISM 7.000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
	Gene Amp PCR System 2.400	Perkin Elmer, Rodgau, D
Ultramicrotom	Ultracut	Reichert-Jung, Heidelberg, D
Wärmeschrank	VO 400	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge	Minifuge 2	Heraeus Christ, Osterode, D
	Biofuge	Heraeus Christ, Osterode, D
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 3.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien dieser Arbeit

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

3.1.6 Kits

Die in dieser Arbeit genutzten Kits sind in Tabelle 3.4 aufgelistet und nach Herstellerangaben verwendet worden.

Tabelle 3.4: Verwendete Kits dieser Arbeit

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

3.1.7 Antikörper

Die in dieser Arbeit genutzten Antikörper sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper dieser Arbeit

Antikörper	Wirtsorganismus	Hersteller
primär		
Anti-TGFβ1	rabbit (polyklonal)	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA
Anti-TGFβ2	goat (polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Anti-TGFβ3	goat (polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Anti-TβR1	rabbit (polyklonal)	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA
Anti-TβR2	goat (polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Anti-TβR3	rabbit (polyklonal)	Novus Biologicals, Cambridge, UK

Anti- α -SMA	mouse (monoklonal)	Dako, Hamburg, D
Anti PGP 9.5 *	mouse (monoklonal)	Acris, Herford, D
Anti PGP 9.5 **	rabbit (monoklonal)	Dako, Hamburg, D
sekundär (ABC-Methode)		
E 0432 (polyklonal)	goat, anti-rabbit, biotyniliert	Dako, Hamburg, D
E 0466 (polyklonal)	rabbit, anti-goat, biotyniliert	Dako, Hamburg, D
sekundär (Fluoreszenz-Methode)		
Alexa Fluor 488 (grün)	goat, anti-rabbit	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 546 (rot)	goat, anti-mouse	Invitrogen, Karlsruhe, D

* Immunfluoreszenzstudien humaner Paraffinschnitte

** Morphometriestudien myenterischer Nervenzellkulturen

3.1.8 Nukleotide und Wachstumsfaktoren

Die in dieser Arbeit genutzten Nukleotide und Wachstumsfaktoren sind in Tabelle 3.6 aufgelistet.

Tabelle 3.6: Verwendete Nukleotide und Wachstumsfaktoren dieser Arbeit

Produkt	Hersteller
Nucleotid	
Random hexamer Primer für reverse Transkription	Thermo Scientific, Waltham, USA
Spezifische Primer für PCR ¹	Eurogentec, Köln, D
Wachstumsfaktor	
TGF β 1	Tebu-bio, Offenbach, D
TGF β 2	Tebu-bio, Offenbach, D
TGF β 3	Tebu-bio, Offenbach, D
GDNF	Peptotech, Hamburg, D

¹Sequenzen siehe Tabelle 3.14 und 3.15

3.1.9 Enzyme

Die in dieser Arbeit genutzten Enzyme sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

Tabelle 3.7: Verwendete Enzyme dieser Arbeit

Enzym	Hersteller
Collagenase	Sigma, Dreisenhofen, D
Collagenase II	Worthington, Lakewood, USA
DNase I	Promega, Madison, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
Trypsin/EDTA(0,25 µg/ml)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D

3.1.10 Lösungen und Puffer

Die in dieser Arbeit genutzten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 3.8 und 3.9 aufgelistet.

Tabelle 3.8: Verwendete Lösungen

Lösung	Methode	Bestandteile	Menge/Herstellung
PS-Lösung	Zellkultur	Penicillin (1mg/ml) Streptomycin (1mg/ml)	
MEM + Antibiose	Zellkultur	MEM-Fertiglösung	493,50 ml
		PS-Lösung 1% (Penicillin + Streptomycin)	5,00 ml
		Metronidazol (500 µg/ml)	1,00 ml
		Refobacin (40 µg/ml)	0,50 ml
Neurobasalmedium	Zellkultur	Neurobasalmedium-Fertiglösung	483,75 ml
		B27 Supplementmix	10,00 ml
		PS-Lösung	5,00 ml
		Glutamine	1,25 ml
HBSS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Zellkultur	HBSS-Fertiglösung	495,00 ml
		PS-Lösung	5,00 ml
Dulbecco's modified Eagle medium ("DMEM/F12")	Zellkultur	DMEM/F12-Fertiglösung	445,00 ml
		FCS	50,00 ml
		PS-Lösung 1%	5,00 ml

Tabelle 3.9: Verwendete Puffer

Puffer	Methode	Bestandteile	Menge/Herstellung
PBS-Puffer (pH 7,2) <i>"phosphat buffered saline"</i>	humanes Material	NaCl	16,00 g
		Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	2,88 g
		KH ₂ PO ₄	0,48 g
		KCl	0,40 g
		H ₂ O _{bidest}	ad 2 l
TBS-Puffer (pH 7,6) <i>"TRIS buffered saline"</i>	IHC	H ₂ O _{bidest}	9 Teile H ₂ O _{bidest}
		TRIS-Base	1 Teil TBS-Lösung: 242,28 g TRIS
		Natriumchlorid	344,40 g NaCl
		H ₂ O _{bidest}	3,5 l H ₂ O _{bidest} pH auf 7,6
		H ₂ O _{bidest}	ad 4 l H ₂ O _{bidest}
Citrat-Puffer (pH 6,0)	IHC	Citrat	2,1 g
		H ₂ O _{dest}	ad 1l
RNA Lysis Puffer ¹	RNA Isolierung	Fertiglösung	350 µl

¹ Teil des Nucleospin RNA XS Kits und des Nucleospin RNA II Kits, siehe Tabelle 3.4

3.2 Methoden

3.2.1 Prozessierung des humanen Gewebes

Das humane Material für diese Arbeit stammt von intraoperativ gewonnenen Darmresektaten von Tumorpatienten. Der Tumor wurde *in toto* zusammen mit jeweils 10 cm gesundem Darmgewebe nach oral und aboral en bloc entfernt. Postoperativ erfolgte die Entnahme der Proben aus dem gesunden Darmgewebe mit maximalem Abstand zum Tumorrand.

Für den Transport wurden die Gewebeproben in PBS-Puffer entsprechend Tabelle 3.9 gelagert und nach Eintreffen im Labor mit Stecknadeln auf einer Korkplatte spannungsfrei fixiert.

Die weitere Prozessierung des Gewebes richtete sich nach der anschließenden Methode:

Um einen Abbau durch unspezifische RNasen und Proteasen zu verhindern, wurden die Proben möglichst zügig nach der Gewebegewinnung in eine Cryolösung (Polymer aus

Polyvenylalkohol und Polyethylenglykol; Shandon™ Cryomatrix™ von Thermo Scientific, USA) eingebettet und bei -80°C aufbewahrt.

Bei Verwendung der Resektate für die Immunhistochemie (siehe Abschnitt 3.2.6) wurde ein etwa 5 mm x 25 mm messender Vollwandstreifen quer zur Darmrichtung verlaufend herausgeschnitten und anschließend für die Paraffineinbettung entsprechend Tabelle 3.10 prozessiert.

Tabelle 3.10: Protokoll der Paraffineinbettung

Schritt	Substanz	Konzentration	Durchführung	Dauer	Zweck
1	Paraformaldehyd	4% in PBS	Inkubation bei 6°C	über Nacht	Fixierung
2	Leitungswasser		fließend wässern	2 h	Abwaschen von Resten
3			Ränder für die Einbettung zuschneiden		glatte Schnittkante im Paraffinblock
4	aufsteigende Ethanolreihe	50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%	je 2 x einlegen	je 30 min	Dehydrierung
5	Methylbenzoat	100%	2 x einlegen	je 30 min	Intermedium
		100%	3. Mal einlegen	über Nacht	Intermedium
6	Paraffin	100%	2x bei 60°C im Wärmeschrank		Einbettung
		100%	3. Mal bei 60°C im Wärmeschrank unter Vakuum	30 min	Einbettung
7			Präparat ausrichten und Paraffin auskühlen lassen		

3.2.2 Laser capture microdissection (LCM)

Die Laser capture microdissection (*LCM*) ist eine Methode, die sich dazu eignet, spezifische Zellverbände aus dem Gewebsverband unter lichtmikroskopischer Kontrolle selektiv herauszutrennen und damit deren isolierte Untersuchung in nachfolgenden Verfahren zu gewährleisten.

Die in Cryolösung bei -80°C gelagerten Darmvollwandstreifen (siehe 3.2.1) wurden mittels eines Cryostaten (Reichert-JUNG 2800 Frigocut N) zu $14\ \mu\text{m}$ dünnen Schnitten verarbeitet, auf mit Polyethylenaphtalat (PEN) beschichteten Objektträger gelegt und mit 1% Kristallviolett-Lösung angefärbt.

Anschließend erfolgte die digitale Markierung der Zellverbände am Computer, welcher an ein inverses Mikroskop und einen Infrarotlaser gekoppelt ist, um den Gewebeverband im Anschluss mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls auszuschneiden. Da der Objektträger mit einer dünnen ($1\ \mu\text{m}$) thermolabilen Membran aus PEN beschichtet ist, die beim Schneiden schmilzt und sich mit dem Gewebe verbindet, werden die Zellen zeitgleich fixiert, bevor sie durch einen gepulsten Laserstrahl in ein Reaktionsgefäß katapultiert werden. Da der Laserstrahl nur etwa $1\ \text{ns}$ mit dem Gewebe beim Schneiden in Kontakt kommt, wird das Zellmaterial nicht verändert und bleibt intakt.

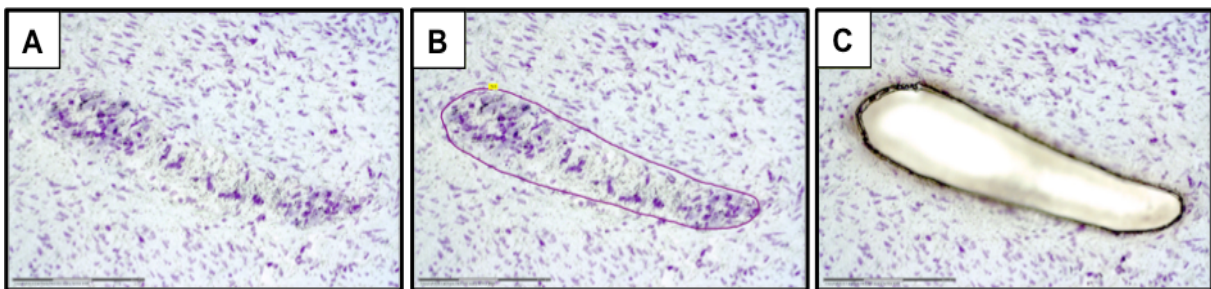


Abbildung 3.1: Laser capture microdissection (LCM) eines myenterischen Ganglions.

A: Lokalisierung des Ganglions; B: Markierung des Ganglions; C: Exzision des Ganglions mit Hilfe des Lasers; die Länge des Balkens beträgt $150\ \mu\text{m}$.

3.2.3 Isolierung und Kultivierung myenterischer Neurone

3.2.3.1 Isolierung und Kultivierung myenterischer Neurone für mRNA-Expressionsstudien

Alle für mRNA-Expressionsstudien verwendeten Neurone stammen aus myenterischen Nervenzellkulturen, deren Zellen aus Därmen von Wistar-Ratten am 2. Tag postnatal isoliert

und bis zur Weiterverarbeitung in antibiotikahaltigem MEM (siehe Tabelle 3.8) gelagert wurden.

Für die Erstellung der Nervenzellkulturen wurde zunächst das Mesenterium vom Darm entfernt und die Tunica muscularis von den übrigen Darmwandschichten manuell abpräpariert. Um den Plexus myentericus von der umgebenden Tunica muscularis zu isolieren, erfolgte ein Verdau der Muskelzellen durch Collagenase-Lösung ((1 mg/ml) in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Hanks' Balanced Salt Solution [HBSS]) für etwa 150 min bei 37°C im Brutschrank. Anschließend konnte der gelöste Plexus unter dem Lichtmikroskop abpipettiert (*fishing*) und durch Zugabe von Trypsin/EDTA (0,25 µg/ml) für ca. 1 min zu einzelnen Nervenzellen verdaut werden.

Es wurden jeweils ca. 100.000 gewonnene Neurone auf mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtete Deckgläschen ausgesät und mit einem Nährmedium (Neurobasalmedium + B27) versetzt. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation der ausgesäten Zellen mittels des neurotrophen Faktors GDNF in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 2, 10 und 50 ng/ml). Die Kultivierungszeit betrug 6 Tage, wobei das Nährmedium alle 2 bis 3 Tage ausgetauscht wurde.

3.2.3.2 Isolierung und Kultivierung myenterischer Neurone für morphometrische Analysen

Für die morphometrischen Analysen wurde zur Stimulation der Nervenzellen TGF- β 1, TGF- β 2 oder aber TGF- β 3 (jeweils 10 ng/ml) zugegeben. Ebenso wurden Nervenzellen ohne Wachstumsfaktor als Kontrollansatz kultiviert.

Nach 2 Tagen Kultivierung wurden die Neurone geerntet, mit 4% Paraformaldehyd für 10 min fixiert, anschließend mit PBS gewaschen und bis zur abschließenden Analyse bei 8°C gelagert.

3.2.4 Isolierung und Kultivierung enterischer Muskelzellen für mRNA-Expressionsstudien und Immunhistochemie

Sämtliche Zellen für die enterischen Muskelzellkulturen stammen aus den Därmen von 2 Tage alten Wistar-Ratten. Nach Entnahme der Därme erfolgte ein *Stripping* der Tunica muscularis wie bereits beschrieben (Abschnitt 3.2.3.1) und der Verdau in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS, siehe Tabelle 3.8) ohne PS-Lösung aber mit 10 mg/ml Collagenase für 150 min.

Anschließend wurde die Lösung dreimal stark aufgeschüttelt und 10 sec gevortext, um dann in ein mit HBSS befülltes Petrischälchen überführt zu werden. Hier wurden unter stereomikroskopischer Kontrolle die gut zu separierenden Stücke des Plexus myentericus abgefischt. Anschließend wurden große Muskelstücke separiert, mit Trypsin/EDTA (0,25%) bei 37°C für 30 min verdaut und mit 10% FCS gestoppt. Der Verdau wurde bei 4°C mit 600 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde abschließend in 3-5 ml DMEM (+ 10% FCS + 2 nM Glutamin + 1% PS und 0,2% Amphotericin) resuspendiert.

Für mRNA-Expressionsstudien wurde nach der Herstellung einer Zellsuspension mit 100.000 Zellen pro ml 1 DMEM-Kulturmedium diese in 12-Well-Platten Platten zusammen mit TGF- β 1 (0, 2, 10, 50 ng/ml) für 7 Tage kultiviert, wobei das Nährmedium alle 3 Tage gewechselt wurde.

Zur Anfertigung der Zellkulturen für die Immunhistochemie erfolgte obige Prozessierung und eine Inkubation in DMEM-Kulturmedium (ohne Zugabe von TGF- β 1) für 14 Tage, wobei das Nährmedium ebenfalls alle 3 Tage gewechselt wurde.

3.2.5 mRNA-Expressionsstudien

3.2.5.1 Isolierung der RNA

Nach Gewinnung der Zellen aus humanen Vollwandschnitten und isolierten Wandschichten (siehe Abschnitt 3.2.1) wurde die RNA mit Hilfe des Nucleospin RNA II Kits isoliert. Die Behandlung der Zellkulturen (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4) und der mittels LCM gewonnenen myenterischen Nervenzellen (siehe Abschnitt 3.2.2) erfolgte mit dem Nucleospin RNA XS Kit.

Zur Aufarbeitung der Vollwandschnitte wurden je 20 Kryoschnitte von 18 μ m Dicke analysiert, bei den LMD-Ganglien waren es Proben von $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ und einer Schnittdicke von 14 μ m. Die Analyse der Zellkulturen erfolgte mit jeweils ca. 100.000 Zellen pro Kultur.

Die entsprechenden Zellen wurden zunächst in einer Pufferlösung gelöst (350 μ l Lysis-Puffer des Kits + 3,5 μ l Mercaptoethanol), durch mehrfache Passagierung durch eine 0,9-mm-Kanüle homogenisiert und zur Entfernung von unerwünschten Rückständen auf eine mitgelieferte Trennsäule gegeben sowie abschließend zentrifugiert.

Die gewonnene Suspension wurde zum Ausfällen der Nukleinsäuren mit 350 μ l 70% Ethanol versetzt und auf eine RNA-bindende Säule gegeben. Danach erfolgte die Waschung und Aufreinigung entsprechend des Herstellerprotokolls.

Abschließend wurde die RNA mit RNase-freiem H₂O auf ein Probenvolumen von insgesamt 12 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen eluiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C zwischengelagert.

3.2.5.2 Reverse Transkription

Zum Umschreiben der mRNA in cDNA für die nachfolgende Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.2.5.3) wird das Enzym *reverse Transkriptase* (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) genutzt. Dieses benötigt als Startmolekül der Reaktion ein Oligonukleotid (*Primer*), das wegen seiner Länge von 6bp und der zufälligen Zusammensetzung der Nukleotide als *random Hexamer Primer* bezeichnet wird. Vor der Synthese der cDNA erfolgt die DNase-Reaktion, bei der mittels einer DNase im RNA-Ansatz vorhandene genomische DNA entfernt wird. Die folgende Tabelle (Tabelle 3.11) gibt das Protokoll des DNase-Verdaus wieder.

Tabelle 3.11: Protokoll der DNase-Reaktion

Schritt	Substanz	Menge [µl]	Durchführung	Dauer	Zweck
1	RNA in H ₂ O	12			
	DNase-Puffer	1,5			
	DNase	1,5	Inkubation bei Raumtemperatur	15 min	Entfernen der genomischen DNA aus RNA-Ansatz

Die in dieser Arbeit verwendete Prozessierung der aufgereinigten mRNA zu cDNA gibt Tabelle 3.12 wieder. Anschließend wurde die gewonnene cDNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C zwischengelagert.

Tabelle 3.12: Protokoll der Synthese von cDNA mittels reverser Transkription

Schritt	Substanz	Menge [μ l]	Durchführung	Dauer	Zweck
1	EDTA (20mM)	1,5			Verhinderung der Degradierung von Nukleinsäuren
2			Thermocycler	10 min bei 70°C	Denaturierung der Sekundärstränge und Inaktivierung der DNase
3	5fach RT-Puffer	6			
	DTT (0,1 M)	3			Supprimierung der Rnase-Aktivität
	dNTP's (je 10 mM)	1,5			Kettenverlängerung
	N6 Primer (250 ng/ μ l)	1,5			Primer
	M-MLV-Reverse Transkriptase	1,5			Enzym (RNA-abhängige DNA-Polymerase)
4		1 Durchgang	Thermocycler	10 min bei 25°C 50 min bei 42°C 10 min bei 70°C	Primer-Annealing Kettenverlängerung/ Umschreibung Stoppen der reversen Transkription durch Inaktivierung des Enzyms

3.2.5.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Bei der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR = quantitative *polymerase chain reaction*) handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, die auf der spezifischen Vervielfältigung (Amplifikation) von Nukleinsäure-Fragmenten, primär von DNA, *in vitro* dient. Sie ermöglicht darüber hinaus die Quantifizierung dieser gewonnenen DNA während jedes Zyklus mittels Fluoreszenz durch den Einsatz einer TaqMan-Sonde (*real-time-Prinzip*).

Als Vorlage (*template*) zur Amplifikation dient die mit Hilfe der reversen Transkription hergestellte cDNA (Abschnitt 3.2.5.2).

Zur Vermeidung späterer Amplifikation von unspezifischer DNA durch anfängliche Kontamination beinhaltet der qPCR MasterMix (Tabelle 3.13) das Enzym Uracil-N-Glycosylase (*UNG*) sowie Uracil-Nucleotide (*dUTP*'s) statt Thymin-Nucleotide (*dTTP*'s).

Die UNG ist ein DNA-Reperaturenzym von Bakterien und Säugetieren, das in der Lage ist, dUTP-haltige Amplikons zu hydrolysieren. Die initiale Inkubation für 2 min bei 50°C führt zur Elimination der durch unspezifische Bindung der Primer entstandenen kontaminierenden Amplifikate im Ansatz, da diese dUTP beinhalten. Die zu untersuchende cDNA bleibt intakt, da sie TTP's und keine UTP's besitzt.

Im Anschluss wird die nun aufgereinigte cDNA auf 95°C erhitzt, um die vorliegenden Doppelstränge zu Einzelsträngen aufzutrennen (*Hitze-Denaturierung*) und die UNG zu deaktivieren. Danach erfolgt eine Abkühlung auf 60°C, damit sich die als Startmolekül dienenden Oligonukleotide (*primer*) am 5'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Einzelstränge anlagern (*annealing*) können. Diese Primer sind 20-30 Basenpaare lang und dem DNA-Einzelstrang an den 5'-Enden komplementär.

Die anschließend zugesetzten Desoxynucleotide (*dNTP*'s = *desoxynucleotriphosphates*) werden durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase an den Primer synthetisiert (*Elongation*) und so der fertige Doppelstrang komplettiert. Da wiederholt für kurze Zeit die Temperatur auf 95°C angehoben werden muss, wird eine hitzebeständige DNA-Polymerase benötigt, die nicht denaturiert. Ein solches häufig genutztes Enzym stammt aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* und wird daher als *Taq-Polymerase* bezeichnet.

Um zusätzlich die Menge der Amplifikate nach jedem Zyklus bestimmen zu können, findet ein sequenzspezifisches Oligonukleotid (Hydrolyse-Sonde, in diesem Fall *TaqMan-Sonde*) Verwendung. Die TaqMan-Sonde bindet im mittleren Abschnitt der DNA-Matrize und trägt zwei Fluoreszenzfarbstoffe (*Fluorochrome*) an jedem ihrer Enden:

Reporter (5'-Ende):	6FAM (6-[Carboxy-Fluorescein])
Quencher (3'-Ende):	TAMRA (Tetramethylrhodamin)

Durch ihre räumliche Nähe bei intakter Sonde überträgt der Quencher (*eng. quench* = *löschen, abfangen*) als Donor Energie nach dem FRET-Prinzip (*FRET* = *fluorescence resonance energy transfer*) auf den Reporter und unterdrückt dadurch dessen Fluoreszenz.

Wird die DNA durch die Taq-Polymerase amplifiziert, hydrolisiert das Enzym die gebundene TaqMan-Sonde durch Exonuklease-Aktivität. Der Reporter kann abdiffundieren und seine Fluoreszenz wird nicht länger durch FRET unterdrückt. Die entstandene Fluoreszenz kann von einem Gerät mittels Laser detektiert und die Gesamtmenge der Amplifikate quantifiziert werden, da jedes freigesetzte Reporter-Fluorochrom einer DNA-Kopie entspricht.

Nach Komplettierung des Doppelstranges und Detektierung der Fluoreszenz ist ein Zyklus abgeschlossen und die ursprüngliche Menge DNA ist theoretisch verdoppelt worden.

Diese Prozedur, bestehend aus 3) und 4), wird 40fach im Thermocycler wiederholt, wobei Schritt 1) und 2) nur einmalig initial geschieht:

- 1) Entfernung der kontaminierenden Amplikons durch die **UNG-Aktivität** bei 50°C für 2 min
- 2) **Denaturierung** der DNA und Inaktivierung der UNG bei 95°C für 10 min
- 3) **Denaturierung** der DNA für 15 s bei 95°C
- 4) Anlagern (**Annealing**) der Primer an die DNA und **Elongation** des komplementären DNA-Stranges durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase durch Absenkung der Temperatur auf 60°C für 1 min

Dabei wird die vorhandene DNA exponentiell vermehrt, sodass nach n Zyklen theoretisch 2^n Amplifikate entstanden sind. Praktisch wird nach 40fachem Durchlaufen des Zyklus eine genügende Menge an DNA für die Quantifizierung amplifiziert. Ein Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

Tabelle 3.13: Protokoll des qPCR-Ansatzes

Substanz	Menge (µl)	Zweck
cDNA	2	Template
qPCR MasterMix Plus	10	Enthält Taq-Polymerase, Nukleotide und Puffer
Primer sense (100 nM)	0,18	Markierung des 5'-Endes der Zielsequenz
Primer antisense (100 nM)	0,18	Markierung des 3'-Endes der Zielsequenz

TaqMan-Sonde (10 nM)	0,448	Detektion
H ₂ O (RNase-frei)	7,19	

Vor dem Transfer in das „ABI PRISM Sequence Detection System“ wurde die 96-Wells-Platte mit einer selbstklebenden Folie (AMPLIseal) abgedeckt. Es erfolgten wie bereits oben beschrieben initial einmalig die Schritte 1) und 2), sowie danach 40 Zyklen repetitiv die Schritte 3) und 4), wobei die Fluoreszenz nach jedem Zyklus durch das „ABI PRISM Sequence Detection System“ detektiert wurde.

Die folgenden beiden Tabellen listen alle bei der quantitativen Real-Time PCR verwendeten Primer für humane (Tabelle 3.14) und Zellkultur-mRNA-Expressionsstudien (Ratten-Primer, Tabelle 3.15) auf:

Tabelle 3.14: Verwendete humane Primer bei der qPCR

Primer	Orientierung	Sequenz
Housekeeping Gen:		
HPRT	forward	5'-tgaacgtcttgctcgagatgtg-3'
	reverse	5'-ccagcaggtcagcaaagaattt-3'
	probe	5'-tgggaggccatcacattgtagcc-3'
TGF-β-System:		
TGF-β1	forward	5'-cgagcctgaggccgactact-3'
	reverse	5'-tgctgt gtgtactctgcttgaactt-3'
	probe	5'-tcaccccgctgctaattggtggaac-3'
TGF-β2	forward	5'-gaagacccccacatctctgcta-3'
	reverse	5'-agcaataggccgatccaa-3'
	probe	5'-cagaccaaccggcggaagaagcg-3'
TGF-β3	forward	5'-atgcaaagaatccataaattc-3'
	reverse	5'-gaagcggaaaaccttgaggta-3'
	probe	5'-ctggcggagcacaacgaactggc-3'
TβR-1	forward	5'-aggtacatggcccctgaagttc-3'
	reverse	5'-tcccagaataactaagcccattgc-3'
	probe	5'-ttttgaatccttcaaactgctgac-3'
	forward	5'-caaccaccaggcatcca-3'

TβR-2	reverse probe	5'-tgaagcgttctgccacacact-3' 5'-cccagaggcccgtctcacagcc-3'
TβR-3	forward reverse probe	5'-tttgttttgagctcctctgaatg-3' 5'-gctggaacctgtatcacaatgga-3' 5'-ctgcggtactcggccccggtg-3'

Tabelle 3.15: Verwendete Ratten-Primer bei der qPCR

Primer	Orientierung	Sequenz
Housekeeping Gen:		
Hprt	forward	5'-cgccagcttctcctcaga-3'
	reverse	5'-ggtcataacctggtcatcact-3'
	probe	5'-ttttccgcgagccgaccgg-3'
Muskelmarker:		
Smmhc	forward	5'-gccaagcagctaaaggaca-3'
	reverse	5'-gcgggtccatgttcttgg-3'
	probe	5'-tgctgggaaggtggactataatgca-3'
Smoothelin	forward	5'-cccgcagctcctggataca-3'
	reverse	5'-tctggaccagacagcgtaga-3'
	probe	5'-tgcggttcgagagcctgactgg-3'
Tropomyosin	forward	5'-ccgtaagctggtcatcatcga-3'
	reverse	5'-caagtggtcgtcaccgtttca-3'
	probe	5'-cggaggagagggtgagctctcg-3'
α-Sma	forward	5'-gacgaagcgagagcaagag-3'
	reverse	5'-gagtgggtccagatctttcca-3'
	probe	5'-tccgatagaacacggcatcacc-3'
Caldesmon	sense	5'-tcaagcagctgtggtctcaa-3'
	antisense	5'-cggatgctgcaggctcata-3'
	Sonde	5'-agccggctggagcaatataccaatg-3'
Crbp1	forward	5'-cctgcaagcaagtgttaagaa-3'
	reverse	5'-cagagagggtcctgaccatt-3'
	probe	5'-accttggtctcaggaacaagtggg-3'
Col1a	forward	5'-acgcatggccaagaagacat-3'
	reverse	5'-ttgtggcagatacagatcaagca-3'
	probe	5'-aagggtccctaatggtgagcgtgg-3'
Neurotransmitter:		
	forward	5'-cacaataatggcaggcatga-3'

M2r	reverse probe	<i>5'-tcctcaccctacgatgaactg-3'</i> <i>5'-atcctctgggcccagccatt-3'</i>
M3r	forward reverse probe	<i>5'-ccaggccatagctccatcct-3'</i> <i>5'-gcatttctctccacatccacagt-3'</i> <i>5'-cctgcagggtccaacgaggacctg-3'</i>
Htr3a	forward reverse probe	<i>5'-gctggctgcataccatcca-3'</i> <i>5'-ctcccactcgccttgattat-3'</i> <i>5'-acatcaacatttcctgtggcg-3'</i>
Htr4	forward reverse probe	<i>5'-tctacatcccgtttctcctcatg-3'</i> <i>5'-ggctcctgcccgttgtaac-3'</i> <i>5'-ctaaggagcatgccagcagatcca-3'</i>
GDNF-System:		
Gdnf	forward reverse probe	<i>5'-gtaggccaggcatgttgca-3'</i> <i>5'-ccgtttagcggaatgctttct-3'</i> <i>5'-cgtttttagacgacagcctggtt-3'</i>
Gfra1	forward reverse probe	<i>5'-gcgaatttgaggctcagaag-3'</i> <i>5'-gaggcaccagcgagaccat-3'</i> <i>5'-tgaatccaatgtgtcgggtagca-3'</i>
Gfra2	forward reverse probe	<i>5'-cgggccattgagctgtgt-3'</i> <i>5'-ccttattggccagcatggta-3'</i> <i>5'-aactgcagctccaggtagccacc-3'</i>
Ret	forward reverse probe	<i>5'-tcccggtgacggtgatgat-3'</i> <i>5'-tgccctcctccgcttaaac-3'</i> <i>5'-atgaagacgactccccgccacc-3'</i>
TGF-β-System:		
Tgfb1	forward reverse probe	<i>5'-aatatagcaacaattcctggcgta-3'</i> <i>5'-ctgccggacaactccagtga-3'</i> <i>5'-ctgctgacccccactgatacgctg-3'</i>
Tgfb2	forward reverse probe	<i>5'-agggctcttcgcttcagAAC-3'</i> <i>5'-cgctgggttgagatgttagg-3'</i> <i>5'-aaggccagagtggctgaacaacgg-3'</i>
Tgfb3	forward reverse probe	<i>5'-tcctggccctgctgaactt-3'</i> <i>5'-cctaattgctccaccctctt-3'</i> <i>5'-accttgacttcggccacatcaa-3'</i>
Tgfr1	forward reverse probe	<i>5'-gctgtgggtggtgctggatt-3'</i> <i>5'-tgacagagcagttgatcatt-3'</i> <i>5'-atgagcatggatccctttcgatt-3'</i>
	forward	<i>5'-agcggtgcggtcaagctt-3'</i>

Tgfbr2	reverse probe	5'-gaggtgacgctgcagttgct-3' 5'-acagctgtgcaagttttgcgacg-3'
Tgfbr3	forward reverse probe	5'-cttgagtcaggcgataatgga-3' 5'-gccgcaagctgcagttaaac-3' 5'-agaaactgccccctgagccgag-3'

Die Analyse der RT-qPCR-Daten erfolgte mit Hilfe der ΔCt - und $\Delta\Delta Ct$ -Methode.

Dazu wurde die gemessene mRNA-Expression des jeweiligen Zielgens auf die Expression des Referenzgens (House-keeping Gens; in dieser Arbeit die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase [HPRT]) normalisiert indem der ΔCt -Wert errechnet wurde. Der Ct-Wert (Ct = *cycle threshold*) ist der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, der ΔCt -Wert entsprechend die Differenz zweier Ct-Werte. Folgende Formel diente zum Berechnen des ΔCt -Werts:

$$\text{relative mRNA-Expression} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ HPRT})}$$

Um die Expressionsdaten zweier Gruppen, beispielsweise der Ziel- und Kontrollgruppe, zu vergleichen, kann die Differenz zweier ΔCt -Werte, also der $\Delta\Delta Ct$ -Wert, berechnet werden.

Folgende Formel diente zur Ermittlung des $\Delta\Delta Ct$ -Werts:

$$n\text{-fache Expression (Ziel- zu Kontrollgruppe)} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ Ziel} - \Delta Ct \text{ Kontrolle})}$$

3.2.6 Immunhistochemie

3.2.6.1 Prinzip der Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbemethode (*IHC = Immunhistochemie*) ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe spezifische Antigene in einzelnen Zellen oder ganzen Gewebsverbänden detektiert und visualisiert werden können.

Das Prinzip der immunhistochemischen Markierung beruht auf der spezifischen Bindung zwischen Antigen und Antikörper. Dabei dient ein Primärantikörper der Bindung des Antigens und ein Sekundärantikörper der Visualisierung dieser Bindung. Beide Antikörper

sollen eine hohe Affinität und Spezifität sowie möglichst keine Kreuzreaktion mit anderen Epitopen zeigen, um eine falsche Markierung auszuschließen.

Hat der Primärantikörper an ein Epitop des nachzuweisenden Antigens gebunden, wird er selber an seinem FC-Fragment (*Fc-Fragment = fragment crystalisable*) durch den Sekundärantikörper gebunden. Dieser Sekundärantikörper kann unterschiedliche Moleküle tragen, beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme, die durch eine Reaktion Substrate in farbige Produkte umsetzen und damit sichtbar machen.

Die im Vorfeld notwendige Fixierung des Gewebes mit Paraformaldehyd bringt allerdings den teilweisen oder vollständigen Verlust der Immunreaktivität mit sich. Das bedeutet, dass die eingesetzten Antikörper nicht mehr die Epitope der Zielantigene erkennen, was auf einer chemischen Quervernetzung der Antigene durch das Formalin beruht. Daher ist eine Antigendemaskierung (*Antigen-Retrieval*) von Paraffinschnitten vor der immunhistochemischen Färbung notwendig, um die entstandenen Quervernetzungen wieder zu lösen. Zur Antigendemaskierung eignen sich Hitze (z.B. Wasserbad, Mikrowellen) oder Enzyme.

3.2.6.2 Markiertes Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-(ABC)-Protokoll für humanes Gewebe

Bei der häufig eingesetzten Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-(*ABC*)-Methode handelt es sich um eine abgewandelte Form der klassischen Immunhistochemie. Mit ihr lässt sich eine hohe Sensitivität erzielen, indem die besondere Affinität der beiden Glykoproteine Avidin (Glykoprotein aus Hühnereiweiß) oder Streptavidin (Protein aus *Streptomyces avidinii*) für das Vitamin Biotin (Vitamin B7) ausgenutzt wird.

Bei der ABC-Methode bindet ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper (*biotinyliert*) einen zuvor ans Epitop gebundenen unkonjugierten Primärantikörper. Während der anschließenden Inkubation mit einem Avidin-Enzym-Komplex bindet Avidin an das Biotin des Sekundärantikörpers. Da Avidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, entsteht durch Amplifikation ein großer Antikörper-Avidin-Biotin-Enzym-Komplex in Form eines Makromoleküls und führt zur Verstärkung der anschließenden Farbreaktion. Dabei sorgt ein im Avidin-Enzym-Komplex enthaltenes Enzym durch Umsetzung einer chromogenen Substratlösung für einen Farbumschlag.

In dieser Arbeit wurde als Chromogen der Substratlösung 3-3'-Diaminobenzidin (*DAB*) genutzt, das durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase (*HRP*) zu einem braunen Farbpigment umgewandelt wird.

Tabelle 3.16 gibt das Protokoll zur Herstellung humaner Paraffinschnitte wieder. Nach der Färbung erfolgte eine lichtmikroskopische (Eclipse E600, Nikon, Japan) Analyse der Paraffinschnitte.

Tabelle 3.16: Protokoll der ABC-Methode für humane Paraffinschnitte

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
1	Xylol	> 99,9%	3 x 10 min	Deparaffinierung
2	absteigende Ethanolreihe	100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%	je 3 min	Rehydrierung
3	H ₂ O _{seradest}		3 x	Spülen
4	Wasserstoffperoxid	3%	10 min	Blockierung der unspezifischen Peroxidase
5	H ₂ O _{seradest}		3 x	Spülen
6	Citrat-Puffer (pH=6,0)	siehe Tabelle 3.9	2 x 5 min Mikrowelle (750 W)	Antigen-demaskierung
7	H ₂ O _{seradest}		3 x	Spülen
8	TBS	siehe Tabelle 3.9	3 x 10 min	Spülen
9	primärer Antikörper	siehe Tabelle 3.17	über Nacht	Antigenbindung
10	TBS		3 x 10 min	Spülen
11	sekundärer Antikörper	siehe Tabelle 3.17	45 min	Bindung Primärantikörper, biotinyliert
12	TBS		3 x 10 min	Spülen
13	ABC Elite Kit		45 min	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex

14	TBS		3 x 10 min	Spülen
15	Liquid DAB+		5 min	Chromogen zur Visualisierung der AK-Bindung
16	H ₂ O _{seradest}		3 x	Spülen
17	Ggf. Hämalanmarkierung nach Mayer			Kernmarkierung (s.u.)
18	aufsteigende Alkoholreihe	50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%	je 2 x 3 min	Dehydrierung
19	Isomount			Eindecken

Im Anschluss an die (ABC)-Methode kann eine Kernmarkierung durch Hämalan nach Mayer durchgeführt werden.

Dazu wurden die Schnitte ca. 20 Sekunden in unverdünntes Hämalan getaucht um die Kerne mit blauer Farbe zu markieren. Anschließend erfolgt eine dreimalige Spülung mit H₂O_{seradest}. Da der Farbstoff bei saurem pH bindet, erfolgt zu besseren Farbfixierung eine Alkalisierung durch 10-minütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser (Bläuen).

Nach erneutem Spülen mit H₂O_{seradest} wurden die Schnitte gemäß dem Standardprotokoll (Tabelle 3.16) dehydriert und fixiert.

Abschließend wurden die mit Isomount fixierten Paraffinschnitte mit Hilfe eines Deckgläschens abgedeckt.

Tabelle 3.17: Antikörper der ABC-Methode für humane Paraffinschnitte

	Antikörper	Wirtsorganismus	Konzentration
primär	Anti-TGFβ1	rabbit (polyklonal)	1:5000 in Diluent
	Anti-TGFβ2	goat (polyklonal)	1:100 in Diluent
	Anti-TGFβ3	goat (polyklonal)	1:500 in Diluent
	Anti-TβR1	rabbit (polyklonal)	1:1000 in Diluent
	Anti-TβR2	goat (polyklonal)	1:500 in Diluent
	Anti-TβR3	rabbit (polyklonal)	1:500 in Diluent
sekundär	Alpha E0432 (polyklonal)	goat, anti-rabbit, biotyniliert	1:400 in Diluent
	Alpha E0466 (polyklonal)	rabbit, anti-goat, biotyniliert	1:600 in Diluent

3.2.6.3 Immunhistochemie mit dem Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-(ABC)- Protokoll für Zellkulturen

Zur lichtmikroskopischen Auswertung der Zellkulturen erfolgte eine immunhistochemische Markierung der Zellen.

Die enterischen glatten Muskelzellen wurden zunächst mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung für 30 Minuten fixiert, wohingegen bei den Neuronen eine Behandlung mit 0,5% Triton X-100 und Zugabe von „blocking solution“ (10% normal goat serum in PBS) für 30 min erfolgte. Anschließend wurde drei Mal mit TBS gewaschen und die Zellen zur Permeabilisierung mit 99,9% Methanol (auf 4° C gekühlt) für 10 Minuten versetzt. Als Primärantikörper für die myenterischen Nervenzellkulturen diente PGP 9.5 (*protein-gene-product 9.5*) und das EnVision Kit (beide DAKO, Hamburg, D) wurde genutzt. PGP 9.5 ist ein pan-neuronaler Marker, der im ENS zur Darstellung der myenterischen Neurone verwendet werden kann (Krammer et al., 1993).

Für die enterischen glatten Muskelzellen kamen als primäre Antikörper die jeweiligen TGF- β Liganden bzw. Rezeptoren (siehe Tabelle 3.19) sowie das ABC Elite Kit (Vector Laboratories, Eching, D) zur Anwendung. In beiden Fällen diente DAB als Chromogen zur Visualisierung.

Tabelle 3.18 gibt die Prozessierung der Zellkulturen mittels Immunhistochemie, Tabelle 3.19 die genutzten Antikörper wieder. Abschließend wurden die gefärbten Zellen mittels eines Lichtmikroskopes (Eclipse E600, Nikon, Japan) analysiert.

Tabelle 3.18: Protokoll der ABC-Methode für Zellkulturen

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
1	Normal goat serum	1:10 in TBS	30 min	Blockierung unspezifischer Signale (Hintergrund)
2	TBS	siehe Tabelle 3.9	3 x	Spülen
3	Primärer Antikörper	siehe Tabelle 3.19	60 min	Antigenbindung
4	TBS		3 x	Spülen
5	Sekundärer Antikörper	1:1000 in Diluent	30 min	Bindung Primärantikörper,

			biotinyliert
6	TBS	3 x 10 min	Spülen
7	ABC Elite Kit	30 min	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
	<u>oder</u>		
	EnVision Kit	30 min	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
8	TBS	3 x 10 min	Spülen
9	Liquid DAB+	5 min	Chromogen zur Visualisierung der Antikörperbindung
10	H ₂ O _{seradest}	3 x	Spülen
11	Aquatex		Eindecken

Tabelle 3.19: Antikörper der ABC-Methode für Zellkulturen

	Antikörper	Wirtsorganismus	Konzentration
primär	Anti-PGP 9.5	rabbit (polyklonal)	1:400 in Diluent
	Anti-TGFβ1	rabbit (polyklonal)	1:100 in Diluent
	Anti-TGFβ2	goat (polyklonal)	1:100 in Diluent
	Anti-TGFβ3	goat (polyklonal)	1:100 in Diluent
	Anti-TβR1	rabbit (polyklonal)	1:200 in Diluent
	Anti-TβR2	goat (polyklonal)	1:200 in Diluent
sekundär	E0432 (polyklonal)	goat, anti-rabbit, biotyniliert	1:1000 in Diluent
	E0466 (polyklonal)	rabbit, anti-goat, biotyniliert	1:1000 in Diluent

3.2.6.4 Prinzip der Fluoreszenz-Immunhistochemie

Die Fluoreszenz-Immunhistochemie ähnelt vom Prinzip her stark der ABC-Methode (3.2.6.2), wobei beide Techniken sich durch den Substituenten am Sekundärantikörper sowie das Protokoll unterscheiden. Im Gegensatz zur Immunhistochemie mit DAB, welche zur Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes eine enzymkatalysierte Farbreaktion nutzt,

ist bei der Immunfluoreszenz-Technik ein Fluoreszenzfarbstoff (*Fluorophor*) an den Sekundärantikörper gekoppelt.

Werden Fluorophore unterschiedlicher Emissionsspektren verwendet, ist es möglich, verschiedene Antigene auf demselben Schnitt parallel sichtbar zu machen und ihre Lage zueinander zu beurteilen (*Kolokalisation*).

3.2.6.5 Fluoreszenz-Immunhistochemie an humanem Gewebe

Bei der Dual-Label-Fluoreszenz-Immunhistochemie werden zwei Primärantikörper verwendet, um die Kolokalisation zweier Proteine bestimmen zu können. Diese beiden werden jeweils durch einen Sekundärantikörper mit einem Fluorophor gebunden, der durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zum Fluoreszieren angeregt wird: Alexa Fluor 488 nm (emittiert grün) und Alexa Fluor 546 nm (emittiert rot).

Um eine Kreuzreaktion der beteiligten Antikörper zu verhindern, müssen die Primär- und Sekundärantikörper entsprechend ausgewählt werden. So stammten die Primär- und Sekundärantikörper in dieser Arbeit von unterschiedlichen Spezies (Maus, Ziege und Kaninchen, siehe Tabelle 3.19 und 3.21) Die Fluoreszenz-Markierung der humanen Paraffinschnitte erfolgte gemäß dem Protokoll aus Tabelle 3.20. Dabei wurden zur Doppelmarkierung eines Schnittes die Primärantikörper α SMA bzw. PGP 9.5 jeweils zusammen mit TGF β 1 verwendet. Ab der Verwendung des Sekundärantikörpers (Schritt 9, Tabelle 3.20) wurden alle weiteren Schritte im Dunkeln ausgeführt um das lichtinstabile Fluorochrom zu schützen.

Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (*DAPI*), einem DNA-bindenden Fluorophor, welches nach Anregung durch ultraviolettes Licht cyan-blau fluoresziert (Wellenlänge = 461 nm).

Die fertigen Fluoreszenzschnitte wurden bis zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, D) vor Licht geschützt bei 8°C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 3.20: Protokoll der Immunfluoreszenz-Methode für humane Paraffinschnitte

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
1	Xylol	> 99,9%	3 x 10 min	Deparaffinierung
2	absteigende	100%, 96%, 90%,	je 3 min	Rehydrierung

	Ethanolreihe	80%, 70%, 50%		
3	H ₂ O _{seradest}		3 x	Spülen
4	Citrat-Puffer (pH=6,0)	siehe Tabelle 3.9	2 x 5 min Mikrowelle (750 W)	Antigendemaskierung
5	H ₂ O _{seradest}		3 x	Spülen
6	TBS	siehe Tabelle 3.9	3 x 10 min	Spülen
7	primärer Antikörper	siehe Tabelle 3.21	über Nacht	Antigenbindung
8	TBS		3 x 10 min	Spülen
9	sekundärer Antikörper	siehe Tabelle 3.21	45 min	Bindung Primäranti- körper, fluoreszenzmarkiert
10	TBS		3 x 10 min	Spülen
11	DAPI		30 min	Kern-Gegenfärbung
12	TBS		3 x 10 min	Spülen
13	H ₂ O _{seradest}		1 x	Spülen
14	Immumount			Eindecken und Fluoreszenz- erhalt

Tabelle 3.21: Antikörper der Immunfluoreszenz-Methode für humane Paraffinschnitte

	Antikörper	Wirtsorganismus	Konzentration
Primär	Anti-TGFβ1	rabbit (polyklonal)	1:200 in Diluent
	Anti-αSMA	mouse (monoklonal)	1:200 in Diluent
	Anti-PGP 9.5	mouse (monoklonal)	1:1.000 in Diluent
Sekundär	Alexa Fluor 488 (grün)	goat, anti-rabbit	1:250 in Diluent
	Alexa Fluor 546 (rot)	goat, anti-mouse	1:250 in Diluent

3.2.7 Morphometrische Analyse der kultivierten myenterischen Nervenzellen

Die morphometrische Analyse von kultivierten myenterischen Nervenzellen erfolgte durch die Arbeitsgruppe C. Hagl & K.-H. Schäfer, Institut für Informatik und Mikrosystemtechnik der FH Kaiserslautern, Deutschland.

Ein Leica DMR BE Mikroskop (Leica DMR-BE, Quantimed 600) mit Leica Qwin Software und photographischer Dokumentation (Leica MPS 52, Jenoptic Prog Res C14) diente dabei zur Analyse.

Um das neurotrophe Potential von TGF β -Isoformen auf die neuronale Differenzierung objektivierbar zu machen, wurden zwei Parameter analysiert:

- (1) Totale Neuritenlänge pro Neuron: Sie wurde definiert als die Summe aller Neuritenlängen mit mindestens zwei Zellkörperlängen (*total neurite outgrowth*).
- (2) Anzahl der Verzweigungen des Neuritenbaumes (*Neuriten-Verzweigungsmuster*).

Die Auszählung erfolgte verblindet durch zwei unterschiedliche Auswerter. Es erfolgte für jeden Ansatz die Analyse von mindestens 100 Neuronen durch die Auswerter, um statistisch zuverlässige Ergebnisse zu erreichen.

3.2.8 Statistische Auswertung

3.2.8.1 Auswertung der mRNA-Expressionsstudien

Bei der statistischen Analyse der mittels qPCR gewonnenen Daten zur mRNA-Expression in den Zellkulturen wurde der n-fache Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe bestimmt.

Statistisch signifikante Ausreißer in den Daten wurden mittels des Grubb's Tests identifiziert und konsekutiv ausgeschlossen. Mit Hilfe des Statistikprogrammes *PrismTM GraphPad* (San Diego, CA, USA) erfolgte ein student's t-test der signifikanten Unterschiede, gefolgt von einem f-Test, sowie bei positivem f-Test eine Welsch-Korrektur. Abschließend wurden die Daten einer Post-hoc-Analyse (FDR [false discovery rate]-Methode) mittels R 2.8.0 (R-Core-Team, 2012) unterzogen. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

3.2.8.2 Auswertung der morphometrischen Analysen

Die statistische Analyse erfolgte durch die Arbeitsgruppe C. Hagl & K.-H. Schäfer mittels des Kruskal-Wallis-Tests. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Humanes Gewebe

4.1.1 Genexpression des TGF- β -Systems im humanen Kolon

Zur Untersuchung des TGF- β -Systems im humanen Kolon wurde die mRNA-Expression der Liganden TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 sowie der Rezeptoren T β R-1, T β R-2 und T β R-3 in Vollwandschnitten des Kolon gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Analyse einzelner, manuell separierter Schichten der Darmwand (Tunica mucosa und Tunica muscularis) sowie mittels Laser capture microdissection gewonnener myenterischer Ganglien.

4.1.1.1 mRNA-Expression in Vollwandproben und isolierten Wandschichten

In den untersuchten Vollwandgeweben der separierten Tunica mucosa und der Tunica muscularis konnte die mRNA-Expression aller Liganden (Tgfb1, Tgfb2 und Tgfb3) und der Rezeptoren (Tgfbr1, Tgfbr2 und Tgfbr3) detektiert werden (siehe Abbildung 4.1).

Bei allen analysierten Genen zeigte die Tunica muscularis stets die höchste Expression gegenüber den Vollwandbiopsien, mit Ausnahme von Tgfbr1. In der Tunica mucosa dagegen war stets die niedrigste mRNA-Expression aller Gene zu finden.

Gegenüber dem Vollwandgewebe waren Tgfb1 (1,8fach), Tgfb2 (4,2fach) und Tgfb3 (3,7fach) sowie die beiden Rezeptoren Tgfbr2 und Tgfbr3 (jeweils etwa 2,2fach) in der Tunica muscularis höher exprimiert. Lediglich die mRNA-Expression von Tgfbr1 zeigte sich im Verhältnis zum Vollwandgewebe um 30% gemindert.

Im Gegensatz dazu zeigte sich die mRNA-Expression von Tgfb1 (40%), Tgfb2 (80%), Tgfb3 (65%) sowie Tgfbr1, Tgfbr2 (jeweils 60%) und Tgfbr3 (50%) in der Tunica mucosa gegenüber den Vollwandgeweben erniedrigt.

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen mRNA-Level innerhalb eines Probengewebes zeigte sich, dass Tgfb1 der am stärksten exprimierte Ligand sowohl in der Tunica mucosa als auch in den Vollwandschnitten war. Dagegen wurde Tgfbr2 von allen untersuchten Rezeptoren in allen drei Gewebearten am stärksten exprimiert.

In den Vollwandproben überwog Tgfb1 in seiner mRNA-Expression den Liganden Tgfb2 um das etwa 5fache, während er etwa 1,3fach höher als Tgfb3 exprimiert war. Bei den Rezeptoren hingegen waren die gemessenen mRNA-Level von Tgfbr2 im Vergleich 1,8fach höher als die von Tgfbr1 und 9fach höher als die mRNA-Level von Tgfbr3. Auch in der

Tunica mucosa war Tgfb1 der am stärksten exprimierte Ligand (14fach höher als Tgfb2 und 2,3fach höher als Tgfb3) und Tgfb2 der stärkste Rezeptor (1,8fach gegenüber Tgfb1 und 7fach gegenüber Tgfb3).

In der Tunica muscularis hingegen war die mRNA von Tgfb3 etwa 1,5fach höher exprimiert als die von Tgfb1 beziehungsweise 3,4fach höher als die von Tgfb2. Als Rezeptor überwog erneut Tgfb2 in seiner mRNA-Expression, und zwar Tgfb1 um das 4fache und Tgfb3 um das 8fache.

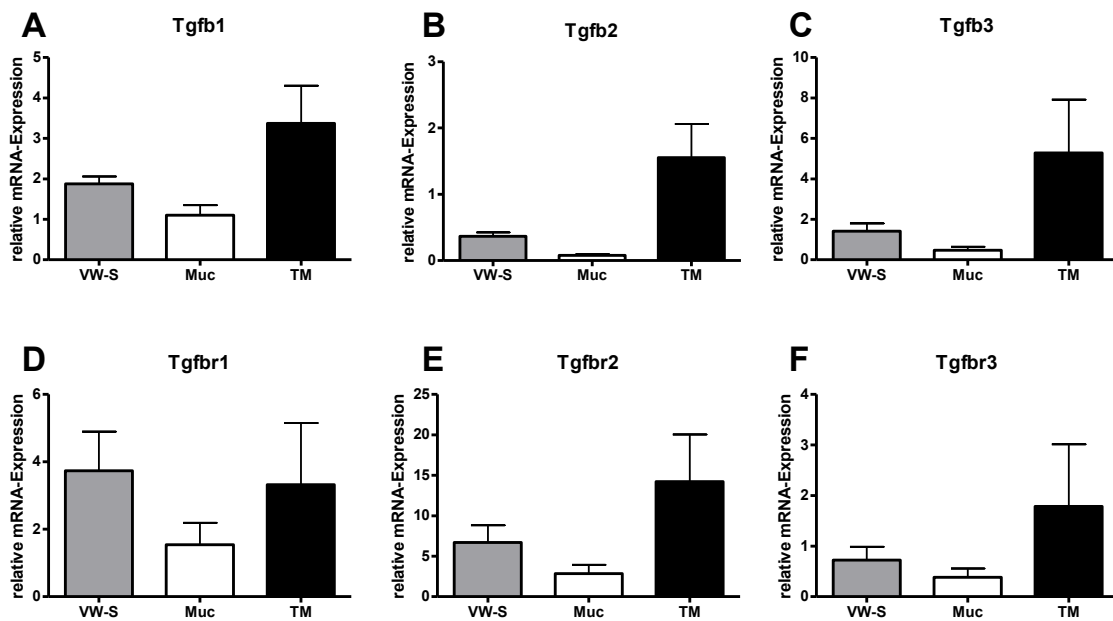


Abbildung 4.1: mRNA-Expression des TGF- β -Systems im humanen Kolon. Die mRNA-Expression aller drei Liganden und der drei Rezeptoren des Transforming Growth Factor- β Systems (TGF- β -Systems) wurde in Vollwandschnitten (VW-S) sowie der Tunica mucosa (Muc) und Tunica muscularis (TM) gemessen. Zur Analyse diente die qPCR, wobei die gewonnenen Daten auf die Expressionslevel des Housekeeping Gens HPRT normalisiert wurden. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt (n = 3 – 5).

4.1.1.2 mRNA-Expression in isolierten myenterischen Ganglien

Die Untersuchung der isolierten myenterischen Ganglien zeigte, dass die mRNA aller drei Liganden Tgfb1, Tgfb2 und Tgfb3 exprimiert wurde (siehe Abbildung 4.2). Dabei wurde eine 2,5fache höhere Expression von Tgfb1 sowie eine etwa 3,3fache höhere Expression von Tgfb2 jeweils im Vergleich zu Tgfb3 gemessen. Bei den drei analysierten Rezeptoren des TGF- β -Systems zeigten Tgfb2 und Tgfb3 eine etwa gleich starke Expression. Die

gemessenen mRNA-Level von Tgfb1 lagen dagegen etwa 4fach höher als die von Tgfb2 und Tgfb3.

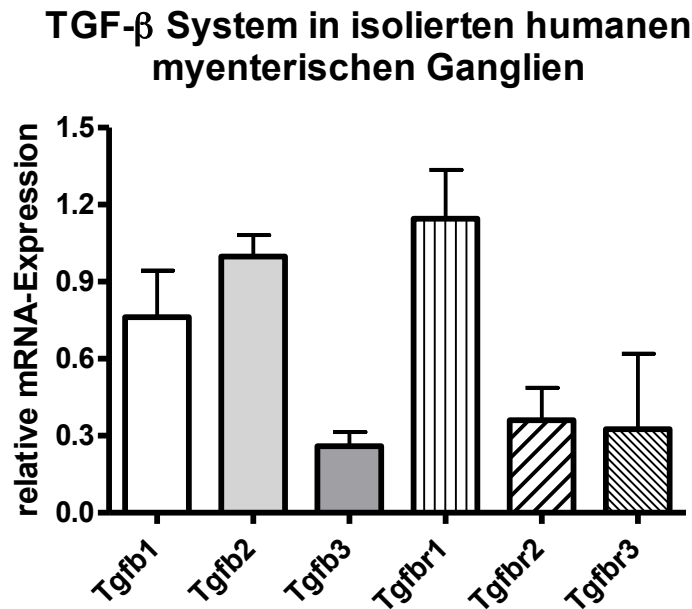


Abbildung 4.2: mRNA-Expression des TGF- β -Systems in isolierten myenterischen Ganglien des humanen Kolons. Die mRNA-Expression aller drei Liganden und der drei Rezeptoren des Transforming Growth Factor- β Systems (TGF- β -Systems) wurde in myenterischen Ganglien gemessen, deren Isolierung mittels Laser capture microdissection (LCM) erfolgte. Zur Analyse diente die qPCR, wobei die gewonnenen Werte auf die Expressionslevel des Housekeeping Gens HPRT normalisiert wurden. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt (n = 3 – 4).

4.1.2 Immunhistochemie des TGF- β -Systems im humanen Kolon

4.1.2.1 Immunhistochemie für die Liganden TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 im humanen Kolon

Bei der Visualisierung von TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 zeigte sich eine deutliche Immunreaktivität für alle Liganden sowohl im Plexus submucosus (PSM; Abbildung 4.3 A, B, C) als auch im Plexus myentericus (PM; Abbildung 4.3 G, H, I).

Alle untersuchten Ganglien in beiden Plexus zeigten eine fein bis grob granuläre Reaktivität des gesamten Ganglions sowohl in neuronalen als auch in glialen Strukturen.

Beim Vergleich von Neuronen der submukösen Ganglien fiel eine etwa gleich starke und relativ homogene Reaktivität auf (Abbildung 4.3 A, B, C), wohingegen die Reaktivität

innerhalb der Ganglien des Plexus myentericus variierte, sodass dort ein scholliges Muster mit stärker und schwächer reaktiven Neuronen resultierte (Abbildung 4.3 G, H, I).

Insgesamt zeigten die Neurone beider Plexus eine stärkere Immunreaktivität gegenüber den umgebenden Gliazellen, welche teilweise nur sehr schwach reaktiv waren und keine Beteiligung des Nukleus zeigten.

Weiterhin zeigte sich eine Immunreaktivität im periganglionären Bindegewebe des PSM und PM sowie in vereinzelt Fibrozyten mit Ausnahme der Immunhistochemie für TGF- β 3. Bezüglich der ganglionären Intensität der Immunreaktivität konnte kein Unterschied zwischen den Ganglien des submukösen und des myenterischen Plexus festgestellt werden.

Anders verhielten sich die beiden Schichten der Tunica muscularis, bei denen das Stratum circulare die stärkere Intensität beider Schichten bot. So fand sich für die Immunhistologie von TGF- β 1 und TGF- β 3 eine flächig schlierige Verteilung der Signale im gesamten Stratum circulare mit vereinzelter paranukleärer und nukleärer Reaktivität von Myozyten sowie deutliche Signale im begleitenden Bindegewebe (Abbildung 4.3 D, F). Im Stratum longitudinale zeigte sowohl das Muskel- als auch das Bindegewebe ein äquivalentes Signalmuster. Allerdings fiel hier ein betont fleckiges Muster beider Liganden mit Aussparung großer Bereiche auf (Abbildung 4.3 J, L). TGF- β 2 hingegen war weder im Stratum circulare noch im Stratum longitudinale nachweisbar (Abbildung 4.3 E, K).

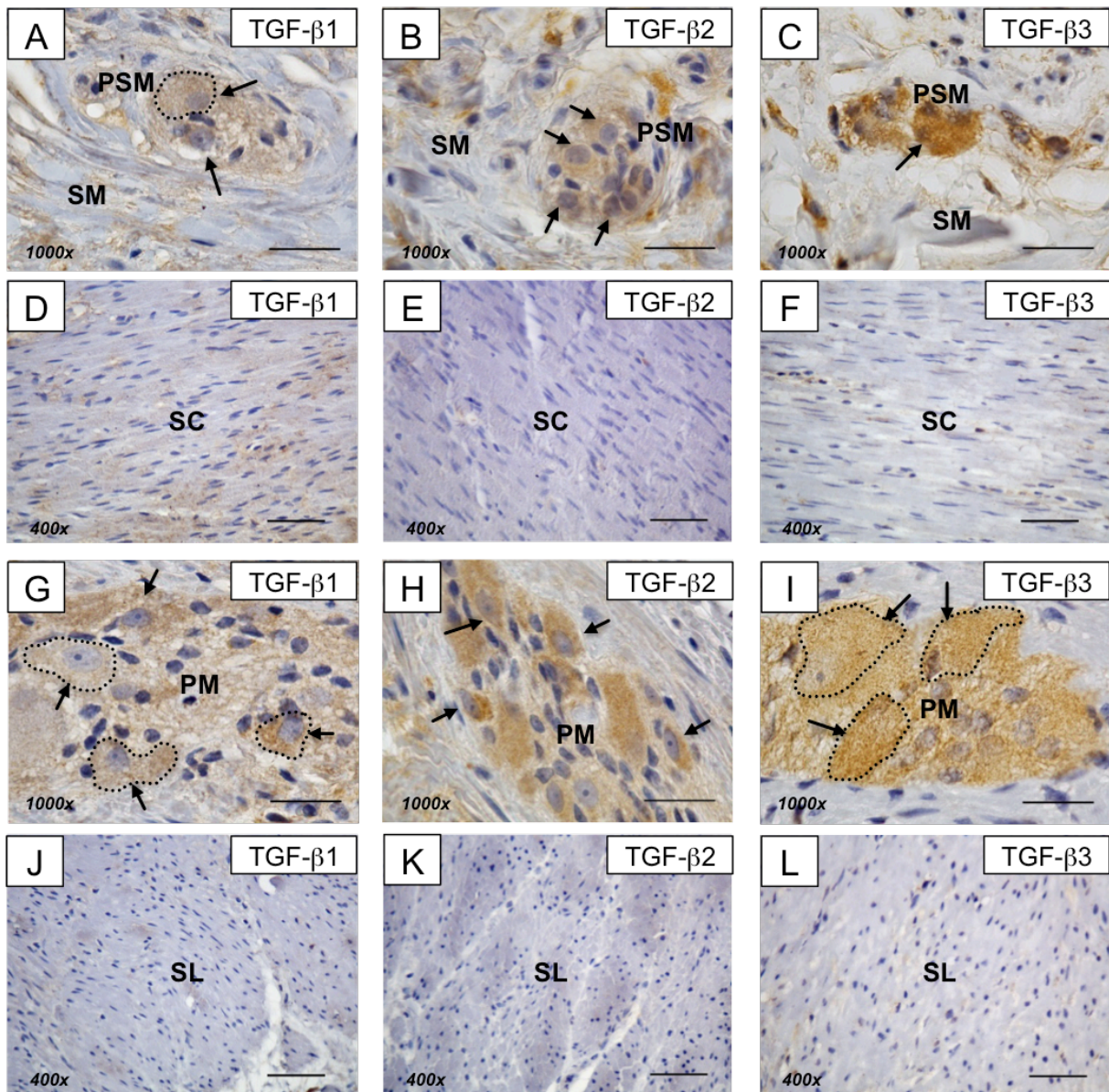


Abbildung 4.3: Immunhistochemie für TGF- β 1, - β 2 und - β 3 im humanen Kolon. Visualisierung der Immunreaktivität mit DAB und Kernmarkierung mit Hämalaun im humanen Kolon-Ganzwand-Biopsat. TGF- β 1 (A, D, G, J), TGF- β 2 (B, E, H, K) und TGF- β 3 (C, F, I, L). (A) – (C) Plexus submucosus; (D) – (F) Stratum circulare; (G) – (I) Plexus myentericus; (J) – (L) Stratum longitudinale. Abkürzungen: PSM = Plexus submucosus, SM = Submukosa, PM = Plexus myentericus, SC = Stratum circulare, SL = Stratum longitudinale, \rightarrow deuten auf Neurone hin. Die Länge eines Balkens entspricht 50 μ m bei 400facher und 25 μ m bei 1000facher Vergrößerung.

4.1.2.2 Immunhistochemie für T β R-1, T β R-2 und T β R-3 im humanen Kolon

Analog zur Visualisierung der TGF- β -Liganden zeigten die Rezeptoren T β R-1, T β R-2 und T β R-3 eine deutliche Immunreaktivität in den Ganglien sowohl des Plexus submucosus (Abbildung 4.4 A, B, C) als auch des Plexus myentericus (Abbildung 4.4 G, H, I). Auch hier variierte in Ganglien des Plexus myentericus die Intensität der Immunreaktivität einzelner

Neurone zueinander mit daraus resultierender Ausbildung eines scholligen Verteilungsmusters (Abbildung 4.4 G, H, I), wohingegen sie im Plexus submucosus gleichmäßig ausgebildet war (Abbildung 4.4 A, B, C). Bei hoher Auflösung zeigten die Antikörper für T β R-2 und T β R-3 in einzelnen Neuronen beider Plexus eine homogene Verteilung des Signals im Zytoplasma und Zellkern (Abbildung 4.4 B, C, H, I). Für T β R-1 konnte dagegen eine punktuelle Verteilung der Immunreaktivität im Kern gesehen werden (Abbildung 4.4 A, G).

Das Neuropil zeigte in Bezug auf die Immunreaktivität von T β R-1, T β R-2 und T β R-3 – im Vergleich zu den Neuronen – eine schwächere und weniger homogene Reaktivität, sondern wies ein eher fein bis grob granuliertes Muster auf. Im direkten Vergleich der Ganglien des PSM und PM miteinander konnten – wie bereits für die Liganden beobachtet (Abschnitt 4.1.2.1) - weder für die Neurone noch das Neuropil Unterschiede in der Signalintensität der Antikörper für T β R-1, T β R-2 und T β R-3 beobachtet werden. Bei allen untersuchten Rezeptoren war das periganglionäre Bindegewebe in der Submukosa und in der Schicht des PM diffus reaktiv mit paranukleärer Immunreaktivität einzelner Fibrozyten (Abbildung 4.4 A, B, C), wobei die Signalintensität im PM im Vergleich zur korrespondierenden Submukosa schwächer ausgeprägt war.

In der Tunica muscularis fand sich Immunreaktivität für T β R-1 und T β R-3 in beiden Schichten mit Überwiegen im Stratum circulare. Dort fand sich ein flächiges bis streifiges Muster und vereinzelt paranukleäre Immunreaktivitäten (Abbildung 4.4 D, F), wohingegen im Stratum longitudinale ebenfalls eine fleckige Verteilung zu beobachten war (Abbildung 4.4 J, L). Für T β R-2 wurde ähnlich wie bei TGF- β 2 keine Immunreaktivität in beiden Muskelschichten, mit Ausnahme einzelner Bindegewebssepten, nachgewiesen (Abbildung 4.4 E, K).

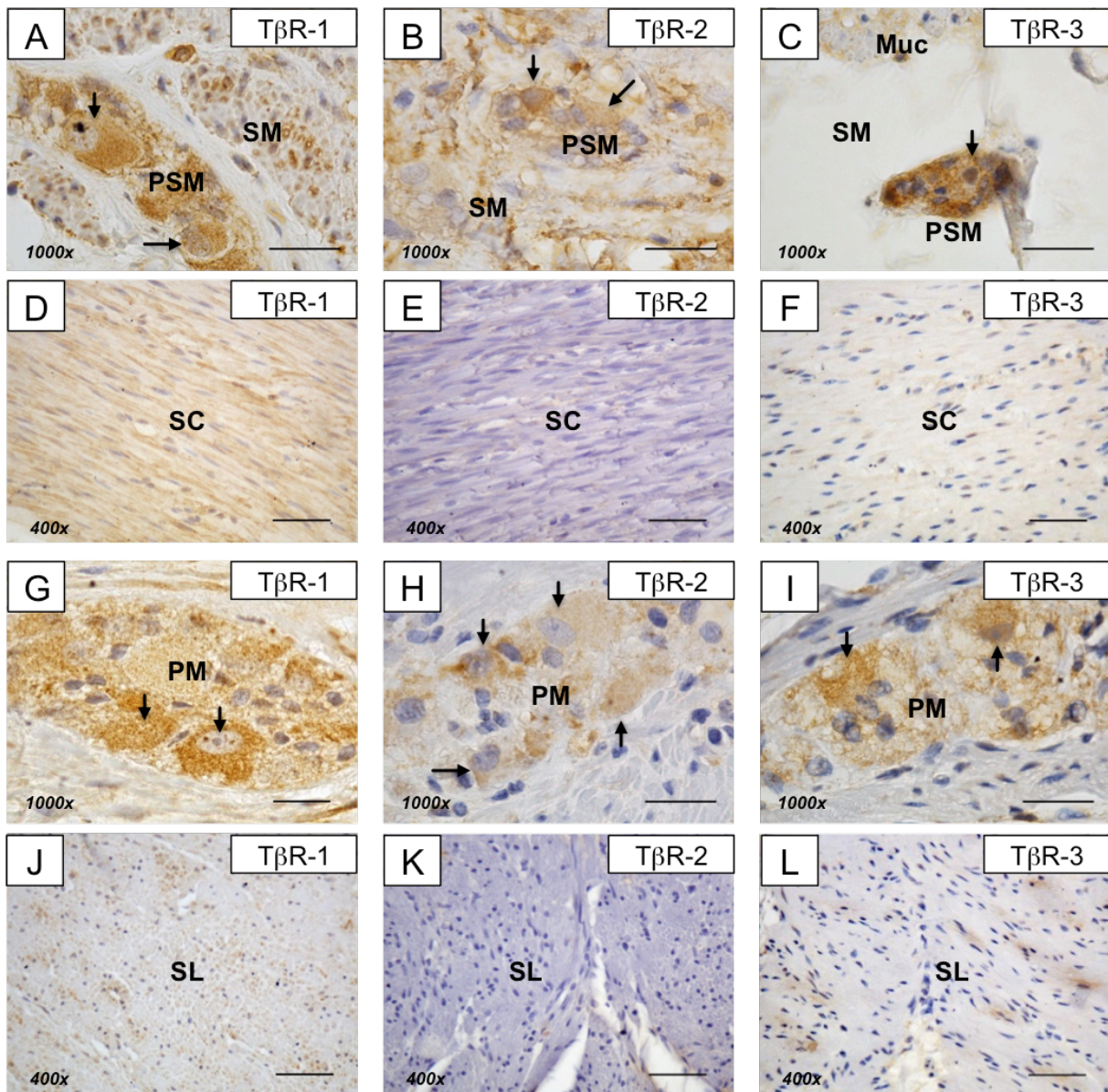


Abbildung 4.4: Immunhistochemie für T β R-1, T β R-2 und T β R-3 im humanen Kolon. Visualisierung der Immunreaktivität mit DAB und Kernmarkierung mit Hämalaun im humanen Kolon-Ganzwand-Biopsat. T β R-1 (A, D, G, J), T β R-2 (B, E, H, K) und T β R-3 (C, F, I, L). (A) – (C) Plexus submucosus; (D) – (F) Stratum circulare; (G) – (I) Plexus myentericus; (J) – (L) Stratum longitudinale. Abkürzungen: PSM = Plexus submucosus, SM = Submukosa, PM = Plexus myentericus, SC = Stratum circulare, SL = Stratum longitudinale, \rightarrow deuten auf Neurone hin. Die Länge eines Balkens entspricht 50 μ m bei 400facher und 25 μ m bei 1000facher Vergrößerung.

4.1.3 Fluoreszenz-Immunhistochemie für TGF- β 1 im humanen Kolon

Die gleichzeitige immunhistochemische Fluoreszenzmarkierung für TGF- β 1 und dem muskulären Strukturprotein α -SMA in Schnitten des humanen Kolons zeigte eine positive Reaktivität für TGF- β 1 in allen untersuchten Schichten (Abbildung 4.5). Bei sehr starken Signalen im Bindegewebe der Submukosa konnte für TGF- β 1 in allen untersuchten Ganglien

des Plexus submucosus nur ein schwaches Signal nachgewiesen werden. Hauptsächlich im Zytoplasma von Neuronen sahen wir ein homogenes, granuliertes Verteilungsmuster (Abbildung 4.5 A, B, C). Die Fluoreszenz-Immunreaktivität im Plexus myentericus dagegen zeigte – ähnlich dem Muster der Immunhistochemie der humanen Darmschnitte mittels DAB + Hämalaun (Abschnitt 4.1.2.1) – eine homogene Reaktivität im Zytoplasma der Neurone und Gliazellen mit einem fleckigen Muster unterschiedlicher Intensitäten. Im periganglionären Bindegewebe fand sich ebenfalls eine deutliche Reaktivität (Abbildung 4.5 G, H, I). In Bezug auf die Zellkerne zeigte sich sowohl in den Ganglien des PSM als auch des PM nur in vereinzelten Kernen von Neuronen und Neuropil ein schwaches Signal.

In beiden Muskelschichten imponierten ebenfalls Signale mit einem schlierigen bis netzartigen Verteilungsmuster. Teilweise sahen wir einen paramuskulären Nachweis, teilweise eine deutliche Kolo-kalisation von TGF- β 1 und α -SMA mit einem Signal innerhalb der Muskelzellen und paranukleärer Reaktivität (Abbildung 4.5 D, E, F und J, K, L).

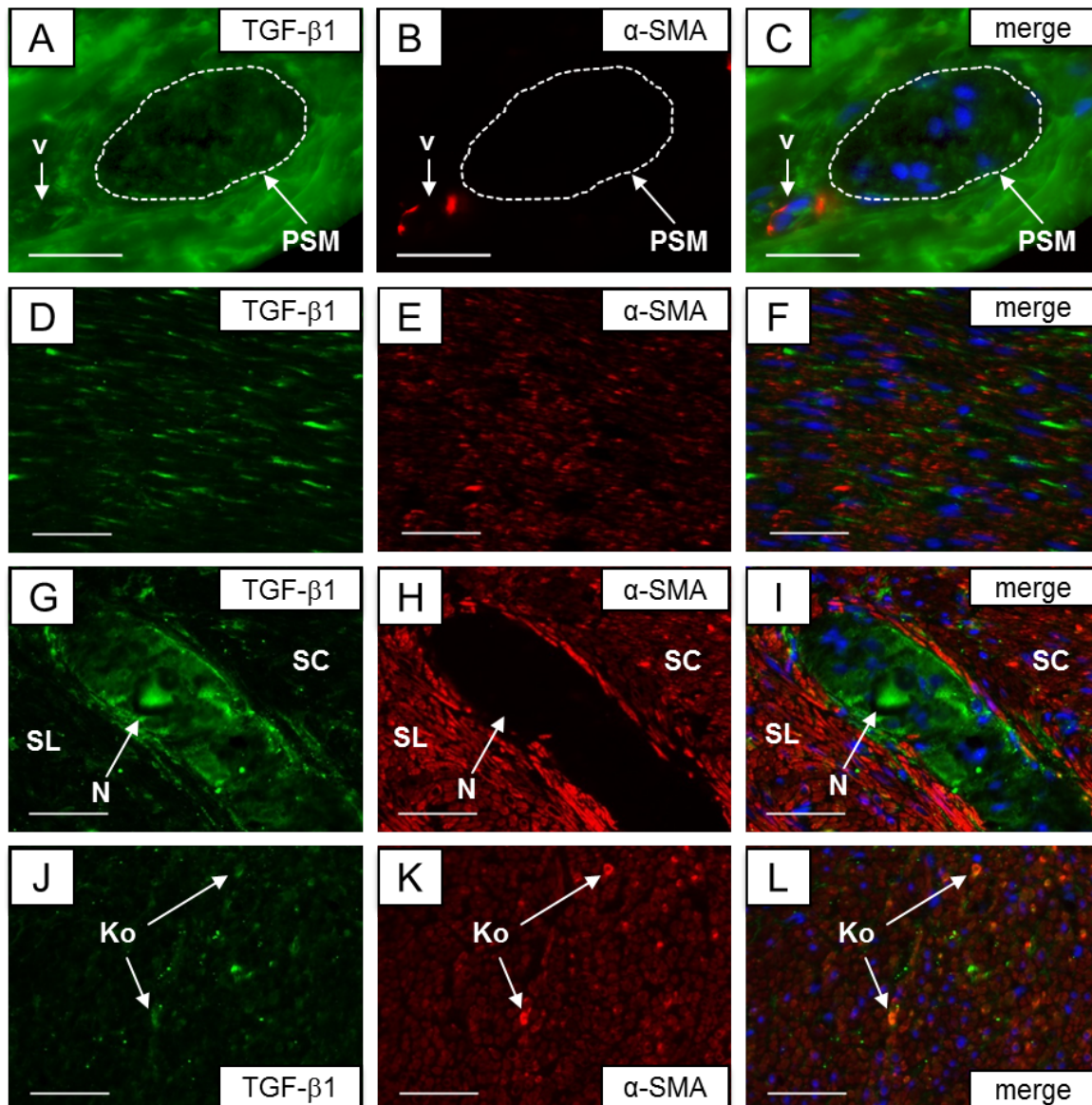


Abbildung 4.5: Immunfluoreszenz für TGF- β 1 und α -SMA im humanen Kolon. Parallele Fluoreszenzmarkierung für TGF- β 1 (grün) und α -SMA (rot) mit DAPI-Kernmarkierung (blau) im humanen Kolon-Ganzwand-Biopsat. (A) – (C) Plexus submucosus; (D) – (F) Stratum circulare; (G) – (I) Plexus myentericus; (J) – (L) Stratum longitudinale. Abkürzungen: PSM = Plexus submucosus, v = Gefäß, N = Nukleus, SC = Stratum circulare, SL = Stratum longitudinale, Ko = Kolokalisation. Vergrößerung: 400fach, die Länge eines Balkens entspricht 20 μ m in (A) – (C) und 50 μ m in (D) – (L).

Durch die Kolokalisation von TGF- β 1 mit PGP 9.5 konnte die neuronale Expression von TGF- β 1 in den Ganglien des Plexus submucosus und sehr stark im gesamten Bindegewebe der Submukosa bestätigt werden, wobei in das Signal in den Neuronen nur schwach ausfiel. Dabei wiesen die Neurone eine homogen bis fein granulierte Verteilung von TGF- β 1 innerhalb des Zytoplasmas mit Aussparung des Kerns auf. Das gesamte submuköse Bindegewebe zeigte dagegen ein deutliches, netzartig verteiltes Signal (Abbildung 4.6 A, B, C).

Ein nahezu identisches Muster der Fluoreszenz von TGF- β 1 war für die Ganglien des Plexus myentericus zu beobachten, wobei sich eine deutliche Reaktivität des Bindegewebes lediglich paraganglionär zeigte (Abbildung 4.6 G, H, I). Die beiden Schichten der Muskulatur wiesen erneut das schon in der α -SMA-Markierung beobachtete netzartige bis schlierige Muster auf. Durch die Visualisierung der Nervenfasern in der Muskulatur fiel ein starkes TGF- β 1-Signal paranerval, teilweise sogar eine Kolokalisation mit PGP 9.5 im Randbereich der Fasern auf (Abbildung 4.6 D, E, F und J, K, L).

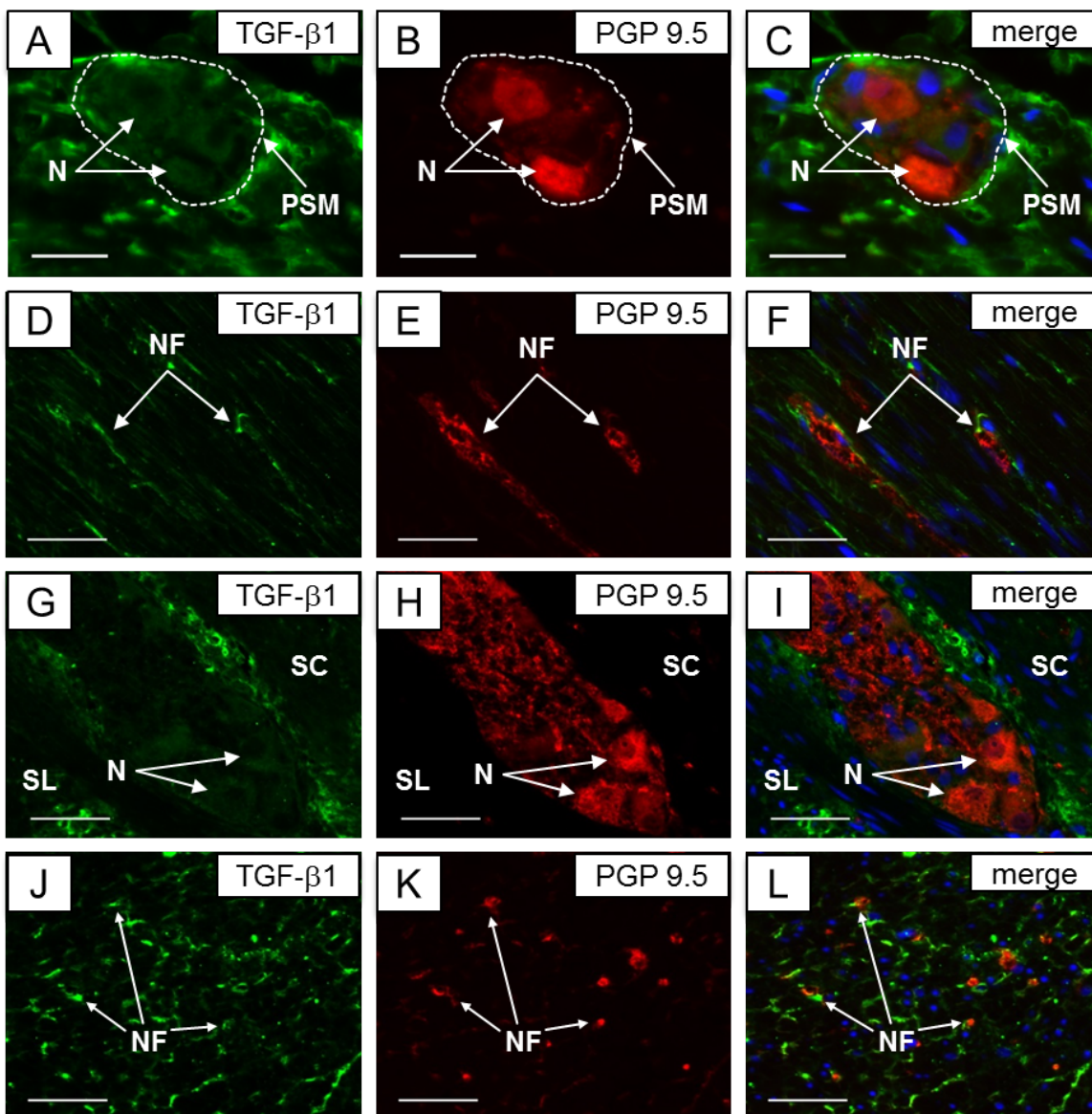


Abbildung 4.6: Immunfluoreszenz für TGF- β 1 und PGP 9.5 im humanen Kolon. Parallele Fluoreszenzmarkierung für TGF- β 1 (grün) und PGP 9.5 (rot) mit DAPI-Kernmarkierung (blau) im humanen Kolon-Ganzwand-Biopsat. (A) – (C) Plexus submucosus; (D) – (F) Stratum circulare; (G) – (I) Plexus myentericus; (J) – (L) Stratum longitudinale. Abkürzungen: PSM = Plexus submucosus, N = Nucleus, NF = Nervenfasern, SC = Stratum circulare, SL = Stratum longitudinale. Vergrößerung: 400fach, die Länge eines Balkens entspricht 20 μ m in (A) – (C) und 50 μ m in (D) – (L).

4.2 Zellkulturen

4.2.1 Primärkulturen des Plexus myentericus aus der Ratte

4.2.1.1 mRNA-Expression des TGF- β -Systems in Primärkulturen des Plexus myentericus

Bei der Analyse von mRNA aus Primärkulturen des Plexus myentericus zeigte sich eine Expression aller untersuchten Gene des TGF- β -Systems nach einer Kultivierung von 6 Tagen (Abbildung 4.7). Für Tgfb1 fand sich die höchste Expression unter den Liganden mit einer etwa 2,4fachen erhöhten mRNA-Expression gegenüber Tgfb2 und einer 1,3fach erhöhten mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression von Tgfb3 (Abbildung 4.7 A). Bei den Rezeptoren war Tgfr2 deutlich stärker exprimiert als Tgfr1 (Faktor 10) und Tgfr3 (Faktor 30) (Abbildung 4.7 B).

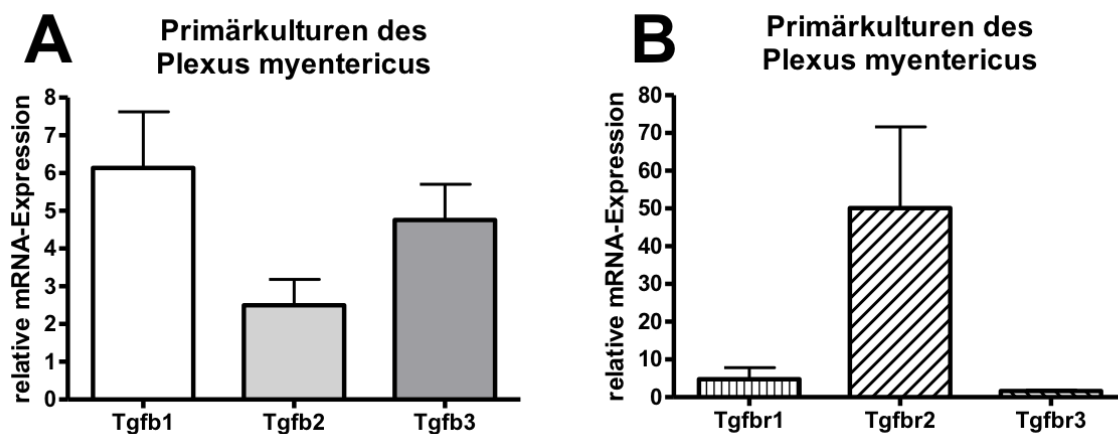


Abbildung 4.7: mRNA-Expression des TGF- β -Systems in Primärkulturen des Plexus myentericus. Die mRNA-Expression aller drei Liganden und der drei Rezeptoren des Transforming Growth Factor- β -Systems (TGF- β -Systems) wurde in Primärkulturen des Plexus myentericus nach 6-tägiger Kultivierung gemessen. Zur Messung diente die qPCR, wobei die gewonnenen Werte auf die Expressionslevel des Housekeeping Gens Hprt normalisiert wurden. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt (n = 6).

4.2.1.2 Morphometrische Analyse von Primärkulturen des Plexus myentericus nach Stimulation mit TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3

Zur Analyse möglicher wachstumsfördernder Effekte der TGF- β -Liganden erfolgte die Kultivierung myenterischer Neurone und zweitägige Stimulation mit den unterschiedlichen Wachstumsfaktoren TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3. Als morphologische Parameter wurden

die totale Länge der Neuriten sowie die Anzahl der Neuritenverzweigungen bestimmt. In Zellkulturen, die mit TGF- β 1 und TGF- β 3 stimuliert wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4.8 A, B, D). TGF- β 2-Stimulation hingegen führte zu einer Zunahme sowohl der Neuritenlänge als auch der Anzahl der Verzweigungspunkte (Abbildung 4.8 C).

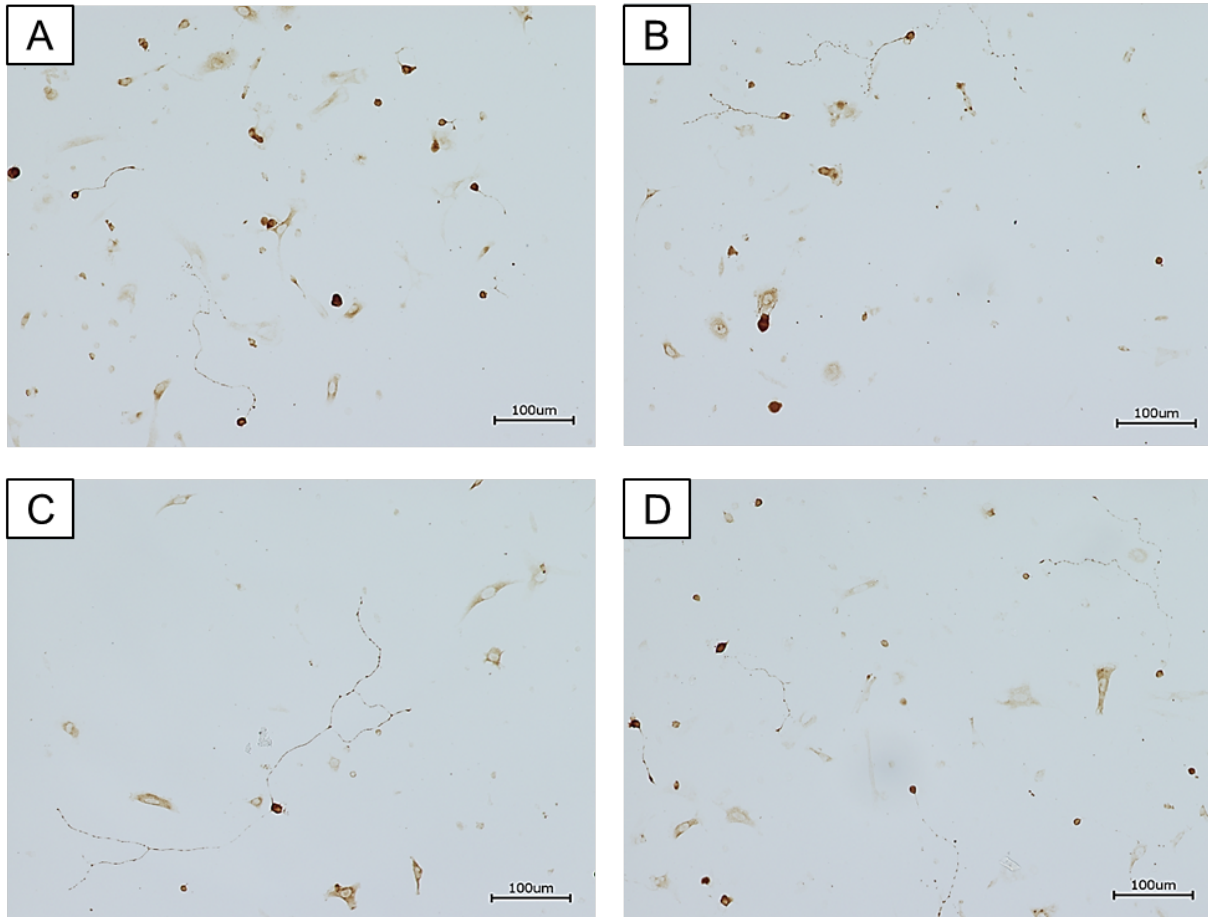


Abbildung 4.8: Visualisierung von Neuronen in einer Primärkultur des Plexus myentericus nach Stimulation mit TGF- β . Nach Gewinnung der myenterischen Neurone erfolgte die 2-tägige Kultivierung und Stimulation durch TGF- β 1 (B), TGF- β 2 (C) und TGF- β 3 (D) oder als Kontrollansatz (A). Visualisierung repräsentativer Neurone durch Immunzytochemie für PGP 9.5.

Die statistische Auswertung der morphologischen Parameter bestätigte eine signifikante Zunahme der Neuritenlänge bei TGF- β 2-Stimulation um das 1,4fache auf durchschnittlich 290 μ m gegenüber der Kontrolle, Tgfb1 und Tgfb3, bei denen sie jeweils etwa 210 μ m betrug (Abbildung 4.9 A). Die durchschnittliche Anzahl der Verzweigungen stieg ebenfalls von 1,4 (Kontrolle und TGF- β 1) bzw. von 1 (TGF- β 3) signifikant auf circa 2,6 nach Gabe von TGF- β 2 (Abbildung 4.9 B).

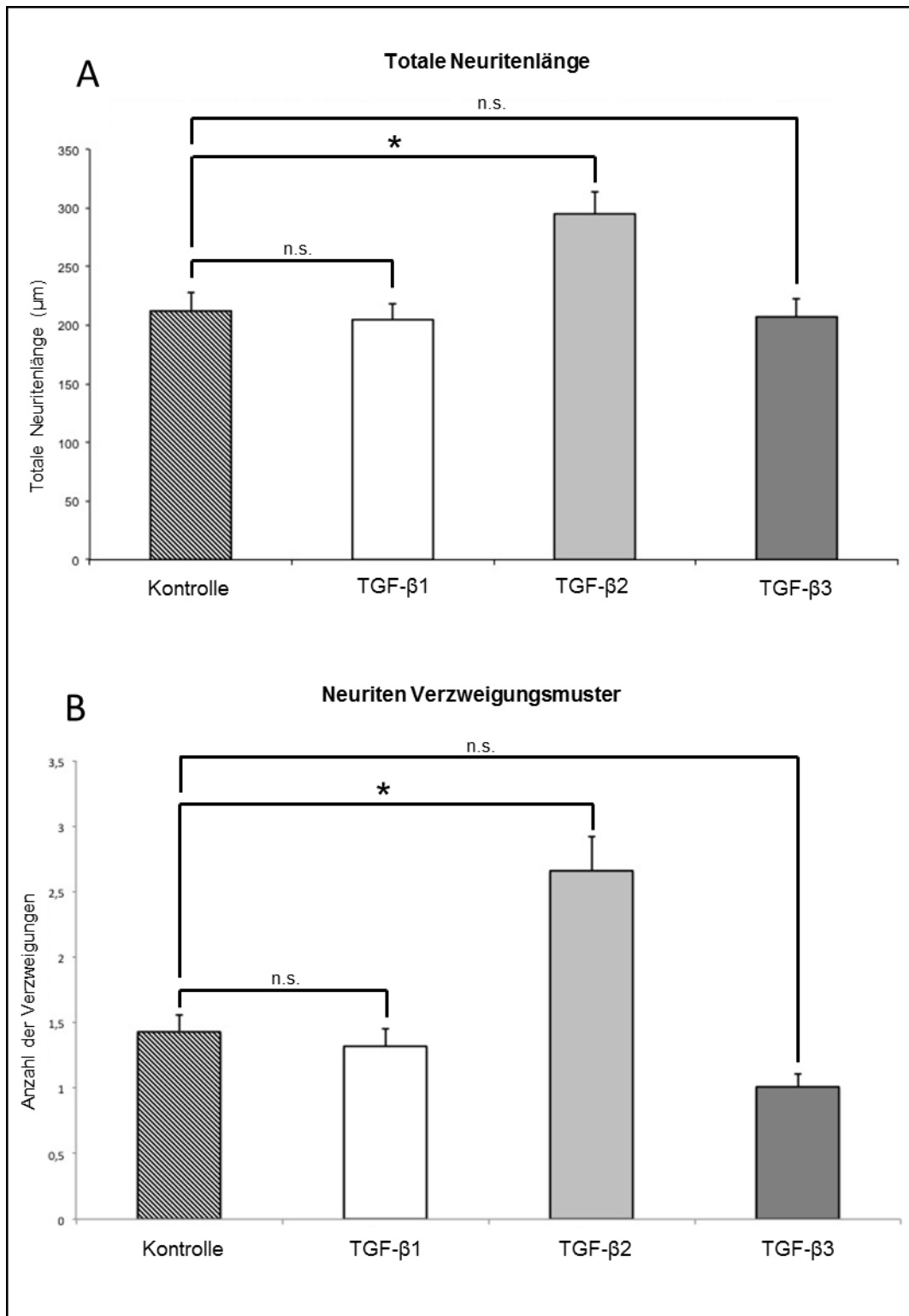


Abbildung 4.9: Morphometrische Analyse von Neuronen in einer Primärkultur des Plexus myentericus nach Stimulation mit TGF-β. Die Analyse erfolgte nach 2-tägiger Stimulation mit TGF-β1, TGF-β2 und TGF-β3. Zur Quantifizierung erfolgte die Messung der totalen Neuritenlänge pro Neuron (definiert als die Summe aller Neuritenlängen mit mindestens zwei Zellkörperlängen) (A) sowie die Anzahl der Verzweigungspunkte des Neuritenbaumes (B). Die Auswertung erfolgte verblindet durch 2 unterschiedliche Auswerter. Alle Daten sind als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) dargestellt (n = >100).

4.2.2 Enterische Muskelzellkulturen

4.2.2.1 mRNA-Expression des TGF- β -Systems in kultivierten enterischen Muskelzellen

Die kultivierten enterischen Muskelzellen aus der Ratte zeigten nach 7 Tagen Kulturdauer eine mRNA-Expression der untersuchten Gene Tgfb1, Tgfb2, Tgfb3, Tgfr1, Tgfr2 und Tgfr3 (Abbildung 4.10).

Ähnlich den Ergebnissen aus den Primärkulturen des Plexus myentericus (Abschnitt 4.2.1.1) zeigte Tgfb2 die niedrigste Expression im Vergleich zu Tgfb1 (3,2fach höher) und Tgfb3 (6,8fach höher). Auch der Rezeptor Tgfr2 überwog in seiner mRNA-Expression die Rezeptoren Tgfr1 (8,4fach) und Tgfr3 (30fach).

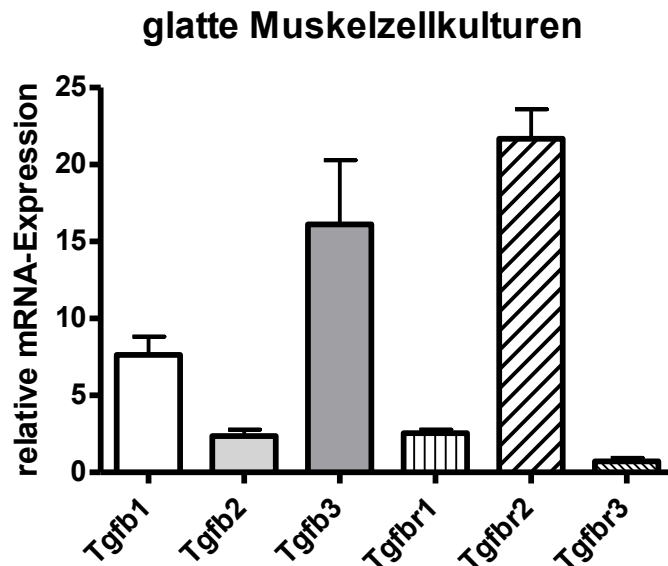


Abbildung 4.10: mRNA-Expression des TGF- β -Systems in kultivierten enterischen Muskelzellen. Die mRNA-Expression aller Liganden und Rezeptoren des Transforming Growth Factor- β -Systems (TGF- β -Systems) wurde in enterischen glatten Muskelzellen nach 7 tägiger Kultivierung gemessen, wobei die gewonnenen Werte auf die Expressionslevel des Housekeeping Gens Hprt normalisiert wurden. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt (n = 5).

4.2.2.2 Immunhistochemie von unbehandelten enterischen Muskelzellen in Zellkultur

Bei der Detektierung der Immunreaktivität von TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 sowie T β R-1 und T β R-2 in enterischer glatter Muskelzellkultur zeigte sich für TGF- β 1 eine flächige, granuläre

Reaktivität perinukleär, teils zusätzlich intranukleär mit Aussparung der Nucleoli (Abbildung 4.11 A und B). Auch für TGF- β 3 fand sich eine flächige, granuläre Immunreaktivität fast des gesamten Zytoplasmas mit Betonung perinukleär sowie nukleärer Reaktivität mit sehr deutlicher Aussparung der Nucleoli (Abbildung 4.11 E und F). Im Gegensatz dazu fand sich in Übereinstimmung zu den humanen Kolonschnitten (Abschnitt 4.1.2.1) kein Nachweis einer Expression von TGF- β 2 in den enterischen Muskelzellen (Abbildung 4.11 C, D).

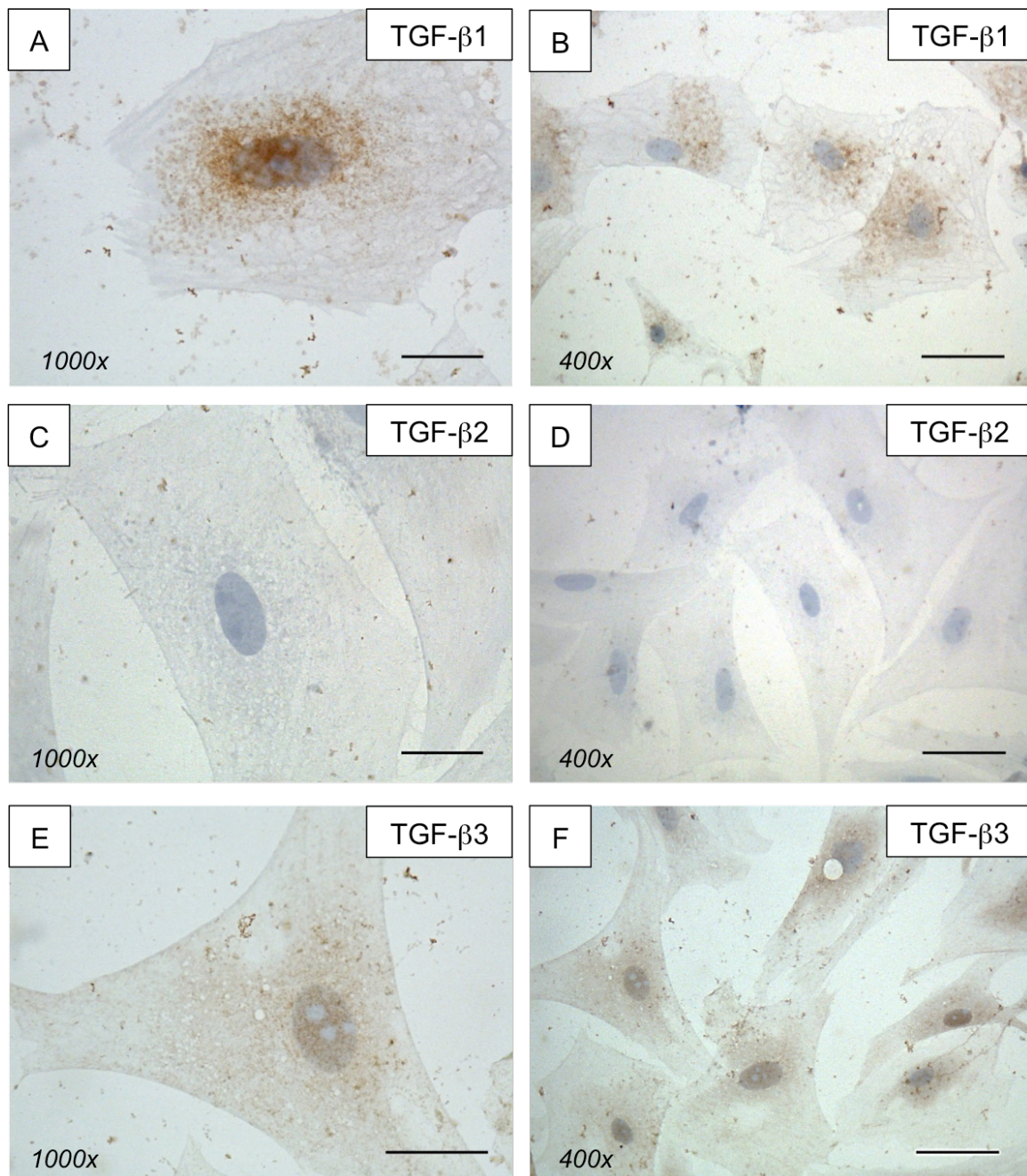


Abbildung 4.11: Immunhistochemische Darstellung von TGF- β in kultivierten enterischen Muskelzellen. Visualisierung der Immunreaktivität von TGF- β 1 (A, B), TGF- β 2 (C, D) und TGF- β 3 (E, F) mit DAB und Kernmarkierung mit Hämalaun in enterischen Muskelzellen aus Ratten. Die Länge eines Balkens entspricht 50 μ m bei 400facher und 20 μ m bei 1000facher Vergrößerung.

Auch bei der Visualisierung von T β R-1 fand sich eine starke, großflächig-granuläre Immunreaktivität des gesamten Zytoplasmas mit einem Schwerpunkt um den Zellkern sowie intranukleär unter Aussparung der Nukleoli (Abbildung 4.12 A, B). T β R-2 zeigte, wie bereits bei den humanen Proben (Abschnitt 4.1.2.2), in der Zellkultur keine Reaktivität (Abbildung 4.12 C, D).

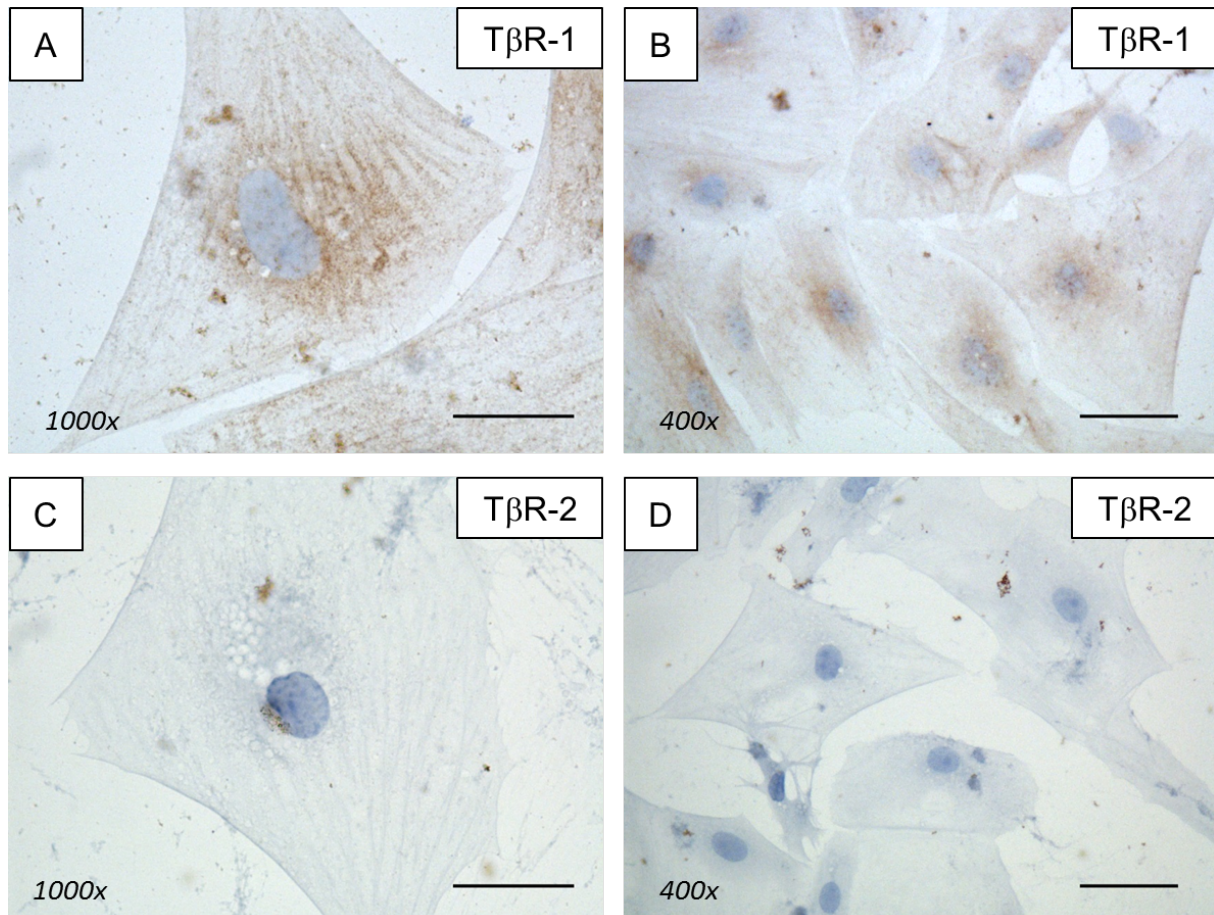


Abbildung 4.12: Immunhistochemische Darstellung von T β R-1 und T β R-2 in kultivierten enterischen Muskelzellen. Visualisierung der Immunreaktivität von T β R-1 (A, B) und T β R-2 (C, D) mit DAB und Kernmarkierung mit Hämalaun in enterischer Muskelzellkultur der Ratte. Die Länge eines Balkens entspricht 50 μ m bei 400facher und 20 μ m bei 1000facher Vergrößerung.

4.2.2.3 mRNA-Expression enterischer Muskelzellen der Ratte nach Stimulation mit TGF- β 1

Um den Einfluss von TGF- β 1 auf kultivierte enterische Muskelzellen zu bestimmen, wurden die Zellkulturen mit 2, 10 oder 50 ng/ml TGF- β 1, sowie ein weiterer Ansatz als Kontrolle ohne Zugabe von TGF- β 1, für 7 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der mRNA-Expression mittels qPCR. Dabei zeigte in der Gengruppe der zytoskeletalen

Strukturproteine (Smmhc, Smoothelin, Tropomyosin, α -Sma, Caldesmon) bzw. des Retinoltransports (Crbp1) und der Collagenformierung (Col1a) nur α -Sma eine signifikant stärkere Expression gegenüber der Kontrollgruppe (1,4fach signifikant nach Stimulation mit 10 ng/ml und 50 ng/ml (Abbildung 4.13 D)). Die anderen untersuchten Gene zeigten keine signifikante Erhöhung in ihrer mRNA-Expression unter TGF- β 1-Zugabe. Allerdings war bei Smmhc ein Trend einer erhöhten Expression zu erkennen (1,2fach erhöhte Expression bei 2ng/ml TGF- β 1-Stimulation und 1,5fach erhöhte Expression bei 10 ng/ml und 50 ng/ml; jeweils $p = 0,18$) (Abbildung 4.13 A).

Auch für Caldesmon war ein Trend zur Zunahme der Expression bei 10 ng/ml (1,7fach) sowie 50 ng/ml (1,5fach) zu erkennen (Abbildung 4.13 E), wobei für beide genannten Konzentrationen die Signifikanz knapp verfehlt wurde (für 10 ng/ml und 50 ng/ml jeweils $p = 0,067$).

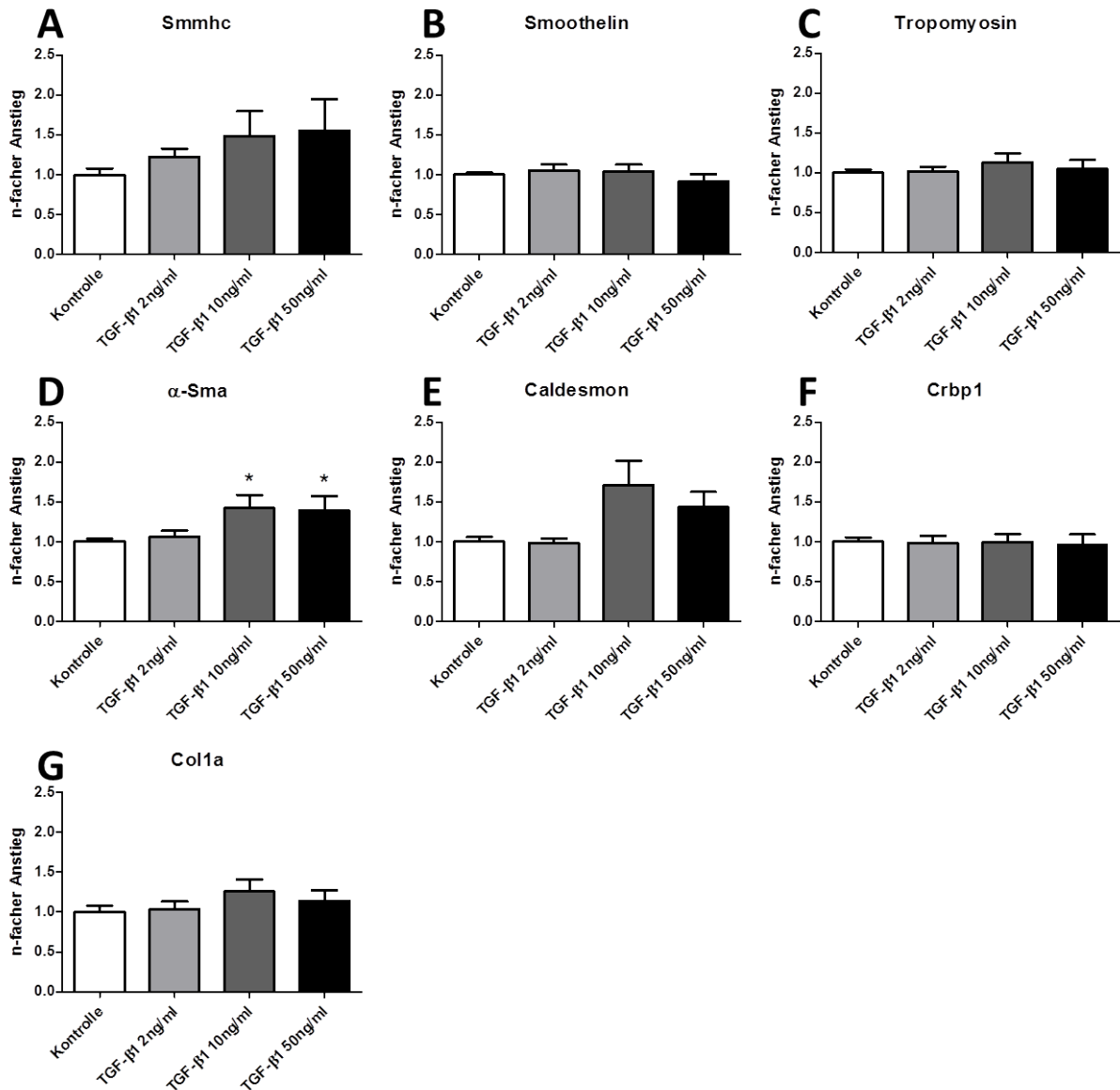


Abbildung 4.13: mRNA-Expression von Proteinen des adulten Muskelphänotypus in kultivierten enterischen Muskelzellen nach Stimulation mit TGF-β1. Die mRNA-Expression der zytoskelettalen Proteine Smmhc (smooth muscle myosin heavy chain), Smoothelin, Tropomyosin, α-SMA (alpha smooth muscle actin), Caldesmon, des Retinol bindenden Crbp1 (Cellular retinol-binding protein-1) und des Kollagen formierenden Proteins Col1a (pro-alpha1 chains of type I collagen) in enterischen glatten Muskelzellen wurde nach 7-tägiger TGF-β1-Stimulation (0/2/10/50 ng/ml) gemessen. Zur Bestimmung diente die qPCR, wobei die gewonnenen Werte auf die Expressionslevel des Housekeeping Gens Hprt normalisiert wurden. Alle Daten sind als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) dargestellt (n = 5 – 7). * = p < 0,05 vs. Kontrolle wurde als signifikant angesehen.

Bei den untersuchten Acetylcholin-Rezeptoren wies der M2r eine Zunahme der mRNA-Expression um das ca. 1,5fache bei TGF-β1-Stimulation mit 2 ng/ml gegenüber der Kontrolle auf, bei 10 ng/ml und 50 ng/ml wurde sogar eine 1,75fach erhöhte Expression gemessen (Abbildung 4.14 A). Ähnlich verhielt es sich bei dem M3r, bei dem ein 1,5facher Anstieg mit einer Stimulation von 2 ng/ml sowie 10 ng/ml beobachtet wurde (Abbildung 4.14 B).

Bei den beiden Serotoninrezeptoren Htr3a und Htr4 zeigte sich keine signifikante Zunahme, wohl aber ein Trend zu einer vermehrten Expression. So war Htr3a 1,2fach bei 10 ng/ml und 1,5fach bei 50 ng/ml erhöht. Htr4 zeigte nach TGF- β 1-Stimulation mit 10 ng/ml die höchsten mRNA-Level (2,4fache erhöhte mRNA-Expression) und bei 50 ng/ml eine noch 1,8fache Erhöhung (Abbildung 4.14 C, D).

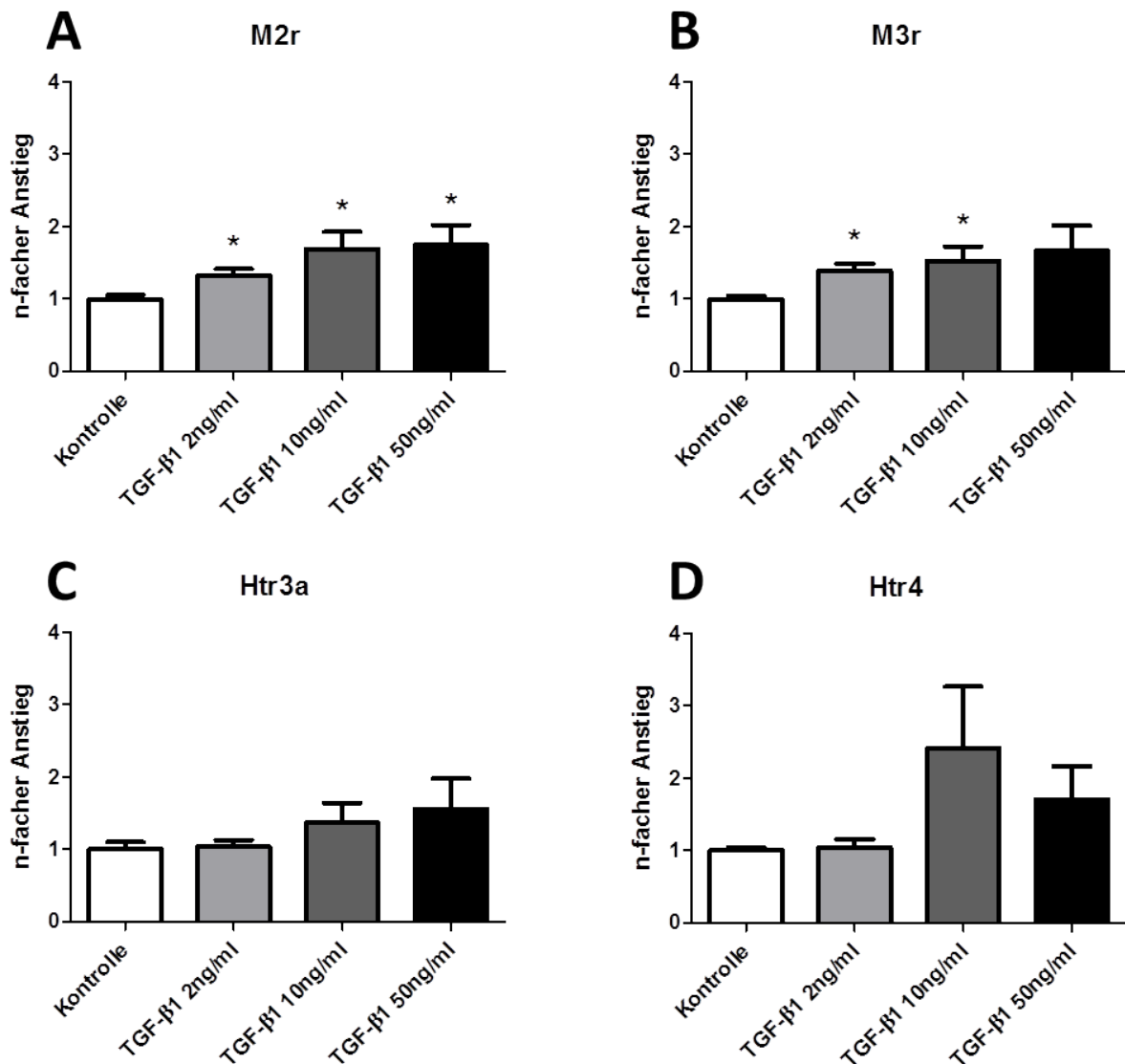


Abbildung 4.14: mRNA-Expression von muskarinergen und serotonergen Rezeptoren in kultivierten enterischen Muskelzellen nach Stimulation mit TGF- β 1. Die mRNA-Expression der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren 2 (M2r) und 3 (M3r) sowie der serotonergen Rezeptoren 3a (Htr3a) und 4 (Htr4) in enterischen Muskelzellen wurde nach 7-tägiger TGF- β 1-Stimulation (0/2/10/50 ng/ml) gemessen. Zur Bestimmung diente die qPCR, wobei die gewonnenen Werte auf die Expressionslevel des Housekeeping Gens Hprt normalisiert wurden. Alle Daten sind als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) dargestellt (n = 5). * = p < 0,05 vs. Kontrolle wurde als signifikant gesehen.

Die Messung des Wachstumsfaktors Gdnf und seiner Rezeptoren Gfra1, Gfra2 und Ret zeigte unter Stimulation mit TGF- β 1 signifikant erhöhte mRNA-Level für Gdnf bei 10 ng/ml (1,8fach erhöht) (Abbildung 4.15 A). Auch für Gfra2 konnte bei 10 ng/ml (1,9fach) und 50 ng/ml (1,7fach) eine signifikante Zunahme der Expression beobachtet werden (Abbildung 4.15 C). Bei den Rezeptoren Gfra1 und Ret konnte keine signifikant veränderte mRNA-Expression bei Stimulation (2/10/50 ng/ml) detektiert werden, obwohl jeweils eine leichte Zunahme unter 10 ng/ml (1,3fach für Gfra1 und 1,2fach für Ret) und 50 ng/ml (jeweils 1,2fach) zu erkennen war (Abbildung 4.15 B, D).

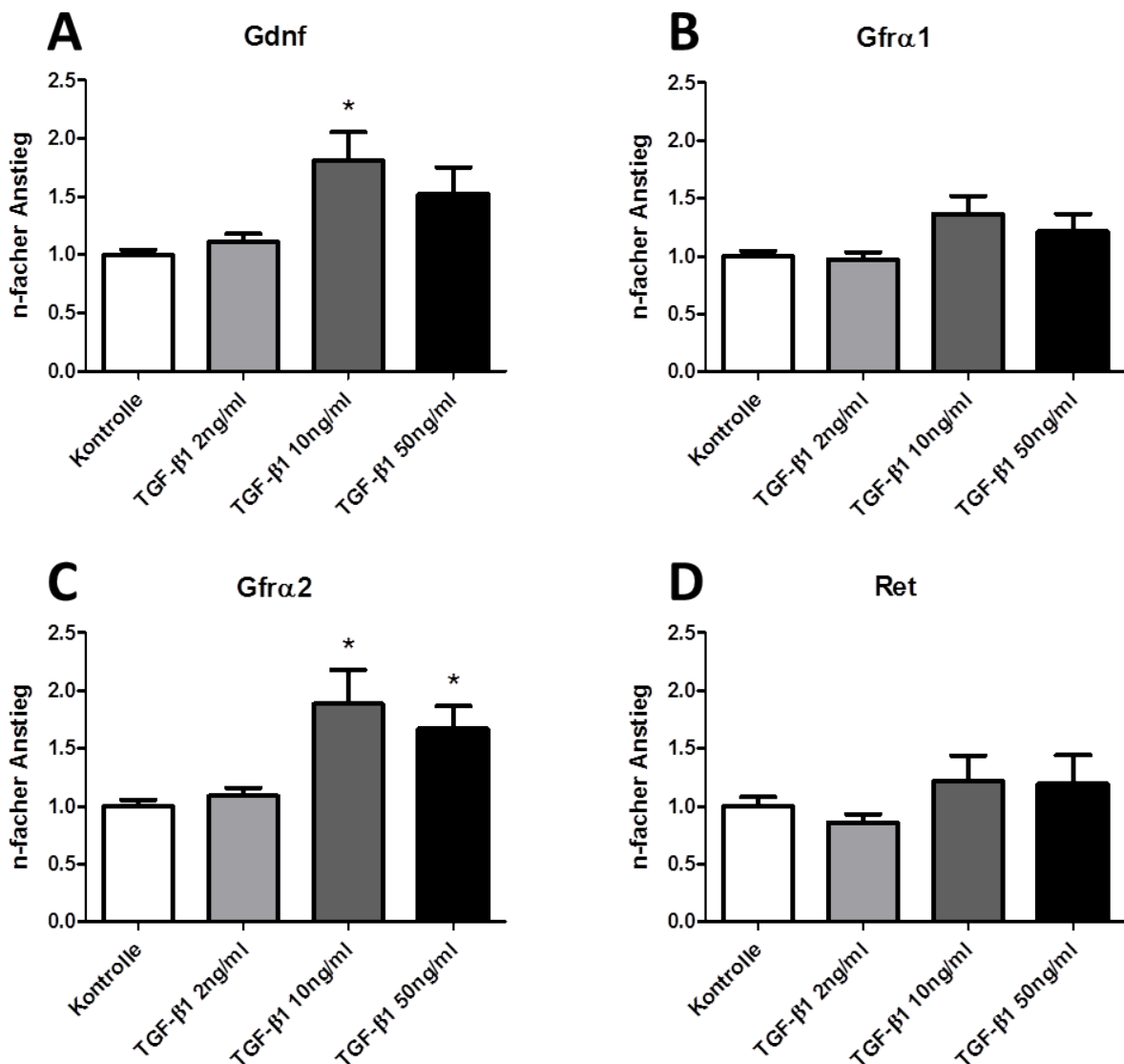


Abbildung 4.15: mRNA-Expression von Gdnf und seiner korrespondierenden Rezeptoren in kultivierten enterischen Muskelzellen nach Stimulation mit TGF- β 1. Die mRNA-Expression des glial cell line-derived neurotrophic factor (Gdnf) und seiner drei Rezeptoren GDNF family receptor α 1, α 2 (Gfra1 und Gfra2) und Rearranged during Transfection (Ret) in enterischen Muskelzellen wurde nach 7-tägiger TGF- β 1-Stimulation (0/2/10/50 ng/ml) gemessen. Zur Bestimmung diente die qPCR, wobei die gewonnenen Werte auf die Expressionslevel des Housekeeping Gens Hprt normalisiert wurden. Alle Daten sind als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) dargestellt (n = 5). * = p < 0,05 vs. Kontrolle wurde als signifikant angesehen.

Das TGF- β -System selber zeigte bei Stimulation mit TGF- β 1 eine signifikante Zunahme der mRNA-Level von Tgfb1, Tgfb2 sowie Tgfb1 (Abbildung 4.16).

So wies der Ligand Tgfb1 eine signifikant erhöhte Expression für 2 ng/ml (1,3fach), 10 ng/ml (2fach) und 50 ng/ml (2,3fach) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abbildung 4.16 A).

Für Tgfb2 war bei 2 ng/ml eine signifikante Zunahme der mRNA um das 1,3fache, um das 1,7fache bei 10 ng/ml und etwa das 1,9fache bei 50 ng/ml zu beobachten (Abbildung 4.16 B). Trotz fehlender Signifikanz für Tgfb3 waren die mRNA-Level etwa 2fach bei 10 ng/ml und 1,5fach bei 50 ng/ml erhöht (Abbildung 4.16 C).

Bei den untersuchten Rezeptoren konnte für Tgfb1 ein signifikanter Anstieg der mRNA (jeweils 1,3fach) bei 10 ng/ml und 50 ng/ml TGF- β 1 Stimulation erzielt werden (Abbildung 4.16 D). Die mRNA-Expression für Tgfb3 dagegen wies den Trend einer Abnahme (um 10% bei 2 ng/ml, 20% bei 10 ng/ml und 30% bei 50 ng/ml) auf (Abbildung 4.16 F). Tgfb2 zeigte bei allen Stimulationsversuchen keinerlei Veränderungen in der Genregulation (Abbildung 4.16 E).

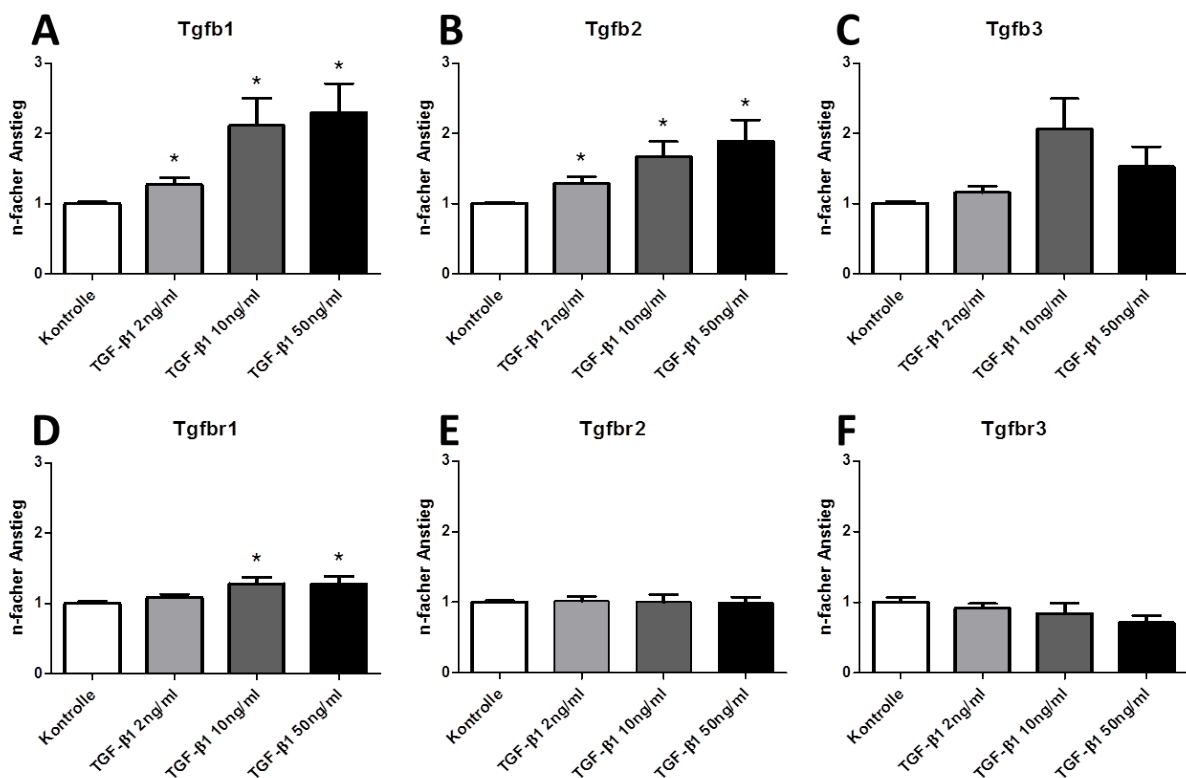


Abbildung 4.16: mRNA-Expression des TGF- β -Systems in kultivierten enterischen Muskelzellen nach Stimulation mit TGF- β 1. Die mRNA-Expression aller drei Liganden (Tgfb1, Tgfb2 und Tgfb3) und ihrer drei Rezeptoren (Tgfb1, Tgfb2 und Tgfb3) in enterischen glatten Muskelzellen wurde nach 7-tägiger TGF- β 1-Stimulation (0/2/10/50 ng/ml) gemessen. Zur Bestimmung diente die qPCR, wobei die gewonnenen Werte auf die Expressionslevel des House-keeping Gens Hprt normalisiert wurden. Alle Daten sind als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) dargestellt (n = 4 – 5). * = p < 0,05 vs. Kontrolle wurde als signifikant angesehen.

5 Diskussion

5.1 Grundlegende Erkenntnisse

Trotz der wichtigen Rolle des TGF- β -Systems im ZNS existieren wenige Daten zum ENS. Es war daher Ziel dieser Arbeit grundlegende Daten über TGF- β im humanen Darm – exemplarisch im Kolon – zu gewinnen (Abschnitt 5.3). Zusätzlich wurde die Expression des TGF- β -Systems in Zellkultursystemen enterischer Nerven- und Muskelzellen (Abschnitt 5.4) sowie der Einfluss von TGF- β -Liganden auf diese Zellkultursysteme untersucht (Abschnitt 5.5).

Aus den gewonnenen Daten dieser Arbeit konnte erstmalig die Expression und das Verteilungsmuster des TGF- β Systems in der Darmwand und im ENS des Menschen gezeigt werden. In neuronalen und myenterischen Zellkulturen aus Rattendarmgewebe wurden Expression und Einfluss des TGF- β Systems auf die kultivierten Zellen untersucht. Folgende Schlüsse können aus den durchgeführten Experimenten gezogen werden:

- (1) Es findet sich eine mRNA-Expression des gesamten TGF- β -Systems in humanen Vollwandbiopsien des Kolons und
- (2) In isolierten Wandschichten der Vollwandbiopsien (Mukosa, Tunica muscularis und isolierten Ganglien des Plexus myentericus) findet sich ebenfalls eine mRNA-Expression aller Mitglieder des TGF- β -Systems
- (3) Die immunhistochemische Untersuchung der humanen Kolonbiopsien zeigt ein Vorkommen des gesamten TGF- β -Systems in submukösen und myenterischen Ganglien. Dabei kommt das Protein sowohl in Neuronen als auch Gliazellen vor.
- (4) In den Myozyten beider Kolon-Muskelschichten (Stratum circulare und longitudinale) konnten TGF- β 1, TGF- β 3, T β R-1 und T β R-3 mittels Immunhistochemie lokalisiert werden.
- (5) Die untersuchten Zellkulturen der Ratte (Primärkultur des Plexus myentericus und Muskelzellkulturen) zeigten eine mRNA-Expression aller Mitglieder des TGF- β -Systems und
- (6) TGF- β 2 konnte als neurotropher Faktor im ENS charakterisiert werden.
- (7) TGF- β 1 und TGF- β 3 sowie T β R-1 zeigten eine Immunreaktivität in kultivierten glatten Muskelzellen aus dem Rattendarm.

- (8) TGF- β 1 zeigte in der glatten Myozytenkultur der Ratte einen trophischen Effekt auf das Zytoskelett sowie auf die Transmittersysteme von Acetylcholin und GDNF und autokrine Effekte auf das TGF- β -System selbst.

5.2 Methodik

Das gewonnene humane Vollwandgebe des Kolons wurde mittels der Immunhistochemie untersucht. Diese Methode ermöglicht eine Analyse des Gewebes im histologischen Zusammenhalt ohne Veränderung der strukturellen Integrität. Durch immunhistochemische Markierung und Hervorhebung bestimmter Strukturen können visuell Rückschlüsse auf Verteilungsmuster sowie Gewebespezifität von Antigenen gezogen werden.

Zur adäquaten Antikörpermarkierung der Zielstrukturen sind Verdünnungsreihen notwendig, um eine optimale Antikörperkonzentration und damit Darstellungsqualität zu erzielen. Bei ungenügender Markierung durch falsche Konzentration oder fehlerhaftem Antikörper sind falsch negative Aussagen zur Verteilung möglich. Weiterhin ist bei dieser Methodik nur eine visuelle Analyse mittels Mikroskop möglich. Genauere Aussagen wie beispielsweise das nachweisliche Vorkommen in bestimmten Zellpopulationen sind kaum sicher möglich.

Zur eindeutigen Identifizierung bestimmter Zellpopulationen im Zellverband und dem Nachweis bestimmter Antigene im Rahmen der Immunhistochemie diente in dieser Arbeit der Einsatz von Fluoreszenzmarkierung. Durch die simultane Markierung von zu untersuchendem Antigen und einem zellspezifischen Epitop kann eine Kolo-kalisation nachgewiesen werden.

Auch hier sind korrekte Verdünnungsreihen und wegen Lichtinstabilität des Fluoreszenzfarbstoffes zügiges Arbeiten notwendig. Aussagen über die Quantität eines nachgewiesenen Antigens können mit der Immunhistochemie allerdings nicht getroffen werden.

Zur Quantifizierung von Genprodukten kann die PCR genutzt werden. Durch den Nachweis von mRNA mittels RT-PCR kann ein Rückschluss auf die ursprüngliche Menge an Transkript gezogen werden. Ein weiterer Vorteil ist eine hohe Spezifität durch den Einsatz spezifischer Primer. Nachteilig ist die Zerstörung der strukturellen Integrität der Probe. Um eine adäquate Aussage über eine Zellpopulation oder einen definierten Gewebetyp machen zu können, muss vorher eine geeignete Selektion der Probe durchgeführt werden. Ansonsten kann es durch Verunreinigung der Probe zu falschen Ergebnissen kommen. In unserer Arbeit erfolgte dies durch die Separation von Kolonschichten und den Einsatz der LMD.

Trotz geeigneter Separation und Gewebselektion der Kolonproben handelt es sich – bedingt durch die physiologische Struktur des Gewebes – stets um gemischte Zellpopulationen. So beinhalten die mittels LMD gewonnenen Ganglien zwar neurales Gewebe, enthalten neben den zu untersuchenden Neuronen aber zusätzlich Glia- und Mesenchymzellen. Wir nutzten daher in weiterführenden Untersuchungen Zellkultursysteme, um möglichst reine Zellpopulationen auf Genprodukte zu untersuchen. Bedingt durch die Abhängigkeit der Neurone bei Neurogenese und Entwicklung auf Gliazellen handelt es sich bei den Primärkulturen des Plexus myentericus um Mischkulturen, sodass diese Ergebnisse nicht als rein neuronalen Ursprungs zu werten sind.

Zellkultursysteme sind im Gegensatz zu konservierten Gewebeproben aus dem OP vitale Systeme. Sie eignen sich daher gut, um dynamische Prozesse wie beispielsweise Einflüsse eines Zytokinsystems auf Zellpopulationen zu beurteilen. Vitale Zellen in vitro sind stark abhängig von ihrem Umgebungsmilieu, sodass sie leicht anfällig gegenüber Störungen sind. Dies kann schnell zu falschen Ergebnissen und im schlimmsten Fall dem Absterben der Kulturen führen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auf Zellkultursysteme zurückgegriffen, die in unserer Arbeit gut etabliert sind

Zwar sind Zellkulturen eine gute Näherung an physiologische Systeme, allerdings handelt es sich stets um vereinfachte Systeme, die nicht die physiologische Komplexität abbilden können. Die Übertragung statistisch signifikanter In-vitro-Daten auf In-vivo-Verhältnisse kann daher in Bezug auf physiologische Relevanz schwierig sein.

5.3 Humanes Gewebe

Über die Rolle des TGF- β -Systems im Gastrointestinaltrakt im Allgemeinen und im enterischen Nervensystem im Speziellen existieren trotz vieler Erkenntnisse in anderen Organsystemen nur wenige Daten.

Bestehende Studien haben oft die Rolle von TGF- β 's im Rahmen von Fibrose und Inflammation bei chronischen Gastrointestinalopathien oder bei Neoplasien beleuchtet. Im gesunden Gewebe sind grundlegende Daten dagegen rar. Der Fokus dieser Studien lag dabei hauptsächlich auf der Regulation zwischen Immunzellen, Epithelbarriere und Mukosa durch die TGF- β 's, welche hier eine entscheidende Schlüsselrolle in der Koordination einnehmen (Konkel and Chen, 2011, Sharkey, 2015, Neunlist et al., 2007). Eine Übersichtsstudie konnte

die mRNA- und Proteinexpression von TGF- β 1, TGF- β 2 sowie TGF- β 3 in der Mukosa sowie allen Schichten der Tunica muscularis bei der Maus zeigen (Barnard et al., 1993).

An humanem Gewebe konnte unsere Arbeit die ubiquitäre mRNA-Expression und immunhistochemische Lokalisation aller Liganden und aller Rezeptoren des TGF- β -Systems in jeder der untersuchten Darmschichten nachweisen.

5.3.1 Submukosa und Immunsystem

Allgemein wird die Tunica mucosa als Hauptsitz der TGF- β -Expression angesehen (Dignass and Sturm, 2001). Die schwerpunktmäßige Betrachtung des Epithels als immunzytologische Grenzfläche des Darms durch bisherige Studien legt diesen Schluss nahe.

Auch unsere Daten zeigen eine mRNA-Expression in der Mukosa, wobei ein Teil davon sicherlich nicht aus Darmgewebe stammt, sondern auf Immunzellen wie Lymphozyten zurückzuführen ist (Biancheri et al., 2014). Ebenfalls in Übereinstimmung mit der Literatur fanden wir einen immunhistochemischen Nachweis in Epithel und Bindegewebe (Pelton et al., 1991).

Unseres Wissens nach neu ist der von uns erzielte Nachweis für TGF- β 1-3 und T β R1-3 in Gliazellen und Neuronen der Plexus-Submucosus-Ganglien, der für TGF- β 1 mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Kolo-kalisierung mit dem neuronalen Marker PGP9.5 (Day and Thompson, 2010) bestätigt werden konnte. Im Einklang zu diesen Daten konnten (Neunlist et al., 2007) für TGF- β 1 eine mRNA-Expression durch enterische Gliazellen in vitro nachweisen und zeigen, dass die Zellen darüber Einfluss auf das Darmepithel ausüben.

Zwei Studien neueren Datums zeigen ferner eine bidirektionale Interaktion zwischen dem ENS und intestinalen Makrophagen (Muller et al., 2014, Matteoli et al., 2014). Da wir eine neuronale Expression der TGF- β -Liganden zeigen konnten und bekannt ist, dass Makrophagen in ihrer Aktivität und Funktion auf TGF- β angewiesen sind (Butovsky et al., 2014), lässt sich eine Beteiligung von TGF- β an dieser neuroimmunen Kommunikation vermuten. So zeigen sich im zentralen Nervensystem ebenfalls Neurone, die mittels TGF- β ZNS-spezifische Makrophagen (= Mikroglia) in ihrer Aktivität unterdrücken und so Neurodegeneration und -inflammation vorbeugen (Verheijden et al., 2015, Butovsky et al., 2014). Auch aus der Arterioskleroseforschung ist der inhibitorische Effekt von TGF- β 1 auf kultivierte Makrophagen bekannt (Argmann et al., 2001). Äquivalent könnte TGF- β im Darm neben den bekannten Mechanismen eine antiinflammatorische Wirkung über die Beteiligung an der Kommunikation zwischen ENS und Makrophagen entfalten. Da eine veränderte TGF-

β -Expression bei inflammatorischen Intestinopathien wie M. Crohn und Colitis ulcerosa bekannt sind (Sedda et al., 2015), sollten künftige Studien diesen Ansatz adressieren.

5.3.2 Tunica muscularis und Myozyten

Interessanterweise lokalisieren unsere Daten – im Gegensatz zum Literaturkonsensus – die Hauptquelle des TGF- β -Zytokinsystems beim Menschen in der Tunica muscularis mit durchgehend hohen mRNA-Konzentrationen aller Mitglieder. Mit der glatten Darmmuskulatur als Hauptanteil an dieser Schicht und der enormen Bedeutung von TGF- β für die Entwicklung und Funktion von Myozyten im muskelreichen kardiovaskulären und pulmonalen Organsystem (Gillis et al., 2013, Oenema et al., 2012, Bujak and Frangogiannis, 2007) lässt ein qualitativ starker Nachweis in der Tunica muscularis eine myozytäre Lokalisation vermuten. Hinweise finden sich bei einer Studie von (Plateroti et al., 1998), bei der eine TGF- β 1-Sekretion der Myofibroblasten aus proximalem Jejunum, distalem Ileum und proximalem Kolon gezeigt wurde. Auch in der Tunica muscularis des Rattendarmes und Ösophagus wurden TGF- β 1-3 immunhistochemisch nachgewiesen (Pelton et al., 1991). In Übereinstimmung fanden wir einen immunhistochemischen Nachweis aller Liganden und Rezeptoren in den Myozyten sowie eine immunfluoreszenzmikroskopische Kolo-kalisation von TGF- β 1 mit dem Muskelmarker α -SMA (Miettinen, 2014) in beiden Laminae der Muskularis. Auffällig war allerdings die fehlende Immunreaktivität für TGF- β 2 und T β R2, die sich auch in der Myozytenkultur nicht zeigte (siehe Abschnitt 5.4.1). Hier liegt eine auffällige Diskrepanz zwischen Transkript und Protein vor mit nachweisbaren mRNA-Leveln von TGF- β 2 und T β R2 in Zellkultur und Gewebe, aber jeweils fehlender Lokalisation mittels Immunhistochemie. Eine solche Diskrepanz wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen für TGF- β beobachtet (Pelton et al., 1991, Flanders et al., 1991) und eine „komplexe Regulation der Transkription, Translation und Sekretion“ postuliert (Pelton et al., 1991). Allerdings muss auch eine unzureichende Verdünnung oder ein fehlerhafter Antikörper in unserer Arbeit in Betracht gezogen werden.

5.3.3 Plexus myentericus

Neben der Muskulatur der Tunica muscularis stellt der Plexus myentericus eine weitere mögliche Quelle von TGF- β dar. Die mittels LCM isolierten Ganglien des Plexus zeigen eine mRNA-Expression aller TGF- β -Mitglieder mit deutlichen Werten für TGF- β 2 und T β R-2. Daher scheint der Ursprung der mRNA-Level von TGF- β 2 und T β R-2 in der Tunica

muscularis nur sehr gering in den Myozyten, dafür aber hauptsächlich in neuronalem Gewebe zu liegen. Diese Beobachtung ist in sofern interessant, als das wir TGF- β 2 als neurotrophen Faktor klassifizieren konnten (siehe Abschnitt 5.4.1). Weiterhin konnte eine Lokalisation von TGF- β 1 im Plexus myentericus äquivalent zu den Ganglien des PSM mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden. Das gliale und neuronale Vorkommen des kompletten TGF- β -Zytokinsystems lässt eine autokrine und/oder parakrine Wirkung innerhalb der adulten Ganglien des ENS vermuten.

Dafür sprechen Erkenntnisse aus Nervenzellnetzwerken im Hippocampus, in denen eine aktivitätsabhängige Sekretion von TGF- β 2 und - β 3 aus Neuronen und konsekutiv autokrine Beeinflussung beschrieben wurde (Lacmann et al., 2007). Auch die Erkenntnis, dass TGF- β 2 aus PC12-Zellen (den Neuronen verwandten Zellen des Nierenmarks) über regulierte Sekretion freigesetzt wird (Specht et al., 2003), passt zu dieser These. Vergleichbar den gut erforschten neurotrophen und neuroprotektiven Effekten von TGF- β im ZNS ist eine äquivalente Funktion im ENS wahrscheinlich.

5.3.4 Neuromuskuläre Interaktion und gastrointestinale Motilität

Der Tunica muscularis kommt eine Schlüsselrolle in der gastrointestinalen Motilität zu und hängt dabei maßgeblich von der Kommunikation zwischen ENS und glatter Muskulatur ab. Die klaren Nachweise von TGF- β in diesen beiden Hauptgeweben und die bekannte Bedeutung in anderen Organsystemen lassen auf eine essentielle Rolle des Zytokinsystems bei der myoneuralen Kommunikation schließen. Interessant ist in diesem Rahmen die paranervale Fluoreszenz-Lokalisierung von TGF- β 1 an ENS-Nervenfasern, welche die Darmmuskulatur durchziehen. Der Nachweis liegt genau an der Kontaktstelle von ENS und Myozyten. Zwar liegen in der Literatur keine Daten zum Darm vor, allerdings konnten (Jiang et al., 2000) für periphere Nerven zeigen, dass TGF- β 2 in Axonen von Motoneuronen antero- und retrograd transportiert wird und in den synaptischen Abschnitten von ausgereiften Muskelfasern lokalisiert ist, wo es eine für die synaptische Funktion typische Proteinverteilung aufweist. Zudem fördert TGF- β 1 die Anzahl von Synapsen sowie die Acetylcholinrezeptor-Dichte an der neuromuskulären Endplatte (Feng and Ko, 2008) und in Mäusedärmen konnte T β R-1 auf glatten Muskelzellen des Stratum longitudinale lokalisiert werden (Akiho et al., 2007).

Neben dem ENS und Myozyten sind für die Darmmotilität nach neueren Erkenntnissen auch Makrophagen relevant, deren Rolle weiter oben schon im Rahmen des intestinalen Immunsystems diskutiert wurde. Dabei wird ihre Interaktion mit dem ENS in der Tunica

muscularis über BMP2, einem dem TGF- β eng verwandten Protein aus der TGF- β -Superfamilie (Muller et al., 2014) beeinflusst. Daher ist auch eine Beteiligung des TGF- β -Zytokinsystems an dieser Kommunikation angesichts unseres Nachweises im Plexus myentericus denkbar und sollte durch weitere Studien überprüft werden.

5.3.5 TGF- β und intestinale Erkrankungen

Schlussendlich liefert eine Reihe von Studien an gastrointestinalen Erkrankungen wichtige Hinweise über die Funktion und Bedeutung von TGF- β im Magen-Darm-Trakt. Neben den angesprochenen Daten zu inflammatorischen Intestinopathien finden sich bei Aganglionosen, also Erkrankungen der fehlerhaften Anlage und Entwicklung des ENS, eine veränderte Konzentration von TGF- β 1 mRNA und Protein in betroffenem Gewebe von Morbus-Hirschsprung-Patienten (Shangjie et al., 2015). Ferner ist die Expression von TGF- β 2 bei aganglionären Mäusedärmen signifikant reduziert (Heanue and Pachnis, 2006).

Auch bei Patienten mit CAID-Syndrom, einer Störung der intestinalen und kardialen Motilität, zeigte sich eine veränderte TGF- β -Aktivität (Chetaille et al., 2014).

Zusammenfassend konnte für alle Mitglieder des TGF- β -Systems ein Nachweis in der gesamten humanen Darmwand erbracht werden. Deutliche Nachweise in den Myozyten und dem enterischen Nervensystem weisen dabei auf eine wesentliche Rolle von TGF- β in diesen Geweben und für die Darmmotilität hin. Daten aus diversen intestinalen Erkrankungen zeigen darüber hinaus ein verändertes TGF- β -System und unterstreichen diese These.

5.4 TGF- β in intestinalen Zellkultursystemen

Um eine möglichst gewebespezifische Analyse des TGF- β -Zytokinsystems in den beiden Geweben zu erhalten, welche in dieser Arbeit als Hauptquelle identifiziert haben, wurden aus Rattendärmen Zellkulturen von intestinalen Myozyten und Primärkulturen des Plexus myentericus angelegt und jeweils mit und ohne TGF- β -Stimulation analysiert.

5.4.1 Primärkulturen des Plexus myentericus

Die Primärkulturen des Plexus myentericus weisen in Übereinstimmung mit unseren Daten aus humanen LCM-Ganglien eine mRNA-Expression des kompletten TGF- β -Zytokinsystems auf. Interessanterweise zeigen TGF- β 2 und T β R-1 in der Kultur eine niedrige Expression, obwohl die entsprechenden mRNA-Level in den LCM-gewonnenen Ganglien unter den

Liganden und Rezeptoren jeweils am höchsten sind. Denkbare Erklärungsansätze dafür sind 1) eine unterschiedliche Expression von Ratte und Mensch, 2) externe, in der Kultur fehlende Einflüsse auf Ganglien im physiologischen Gewebeverbund (beispielsweise durch Myozyten, Immunzellen oder das autonome Nervensystem), 3) eine Dedifferenzierung der Zellen unter Kulturbedingungen sowie 4) ein unterschiedlicher Beitrag von Gliazellen und Neuronen zur mRNA-Konzentration bei verändertem qualitativem Verhältnis dieser Zellen in Zellkultur verglichen mit Ganglien. So zeigen Schwanzzellen *in vitro* das gleiche Liganden-Expressionsmuster wie unsere Primärkulturen mit höchsten mRNA-Leveln für TGF- β 1 vor TGF- β 2 und TGF- β 3 (Scherer et al., 1993).

Die komplette TGF- β -Expression in den Primärkulturen des ENS zusammen mit der gezeigten immunhistochemischen Lokalisation aller Mitglieder in den Ganglien lässt eine wichtige Funktion innerhalb der adulten Ganglien und gegenseitige Beeinflussung von Gliazellen und Neuronen vermuten. Um diese Fragestellung zu klären, wurden erstmals in dieser Studie Primärkulturen des Plexus myentericus mit TGF- β 1-3 *in vitro* stimuliert, um potentielle neurotrophe Effekte zu untersuchen. Dabei konnte TGF- β 2 als neurotropher Faktor im ENS klassifiziert werden. Im Vergleich zum Kontrollansatz kam es unter TGF- β 2 zu einer deutlichen Zunahme der Neuritenlänge und Anzahl der Neuritenverzweigungen.

Auffällig sind bei Betrachtung der Rezeptorexpression die niedrigen mRNA-Level von T β R-1 *in vitro* gegenüber dem humanen Gewebe. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang eine Studie von (Han et al., 2013), in der eine Inhibierung des Neuritenwachstums sensorischer Neurone über T β R-1 und konsekutive Herunterregulierung dieser rezeptorvermittelten Hemmung bei Nervenverletzung und -regeneration beschrieben wird. Unter Annahme einer inhibitorischen Wirkung via T β R-1 erscheint die niedrige mRNA-Expression *in vitro* angesichts einer hohen Rate an Neurogenese und Differenzierung in der Zellkultur folgerichtig und im Umkehrschluss finden sich hohe mRNA-Level in adulten ausdifferenzierten Ganglien.

5.4.2 Vergleich von peripherem und enterischem Nervensystem

Der Vergleich zwischen dem peripheren und enterischen Nervensystem zeigt ähnliche Expressionsmuster und ebenfalls neurotrophe Effekte von TGF- β bei peripheren Nerven. So erbrachte die Untersuchung am N. ischiadicus von Ratten mRNA-Nachweise für TGF- β 1-3 in Schwannschen Gliazellen und TGF- β 1 und TGF- β 3 in Axonen, wobei TGF- β 2 hier neuronal sogar komplett fehlte (Scherer et al., 1993). Auch in den Neuroperikarya dorsaler Hinterhornganglien wurde ein Proteinnachweis von TGF- β 2 und TGF- β 3 bei der Maus

erbracht (Flanders et al., 1991) und neurotrophe Effekte von TGF- β 1-3 mit Erhöhung der Verzweigungsanzahl und Neuritenlänge wurden in vitro beobachtet (Unsicker et al., 1996). TGF- β besitzt darüber hinaus einen potenten neuroprotektiven Effekt. So wird bei motorischen Neuronen durch TGF- β 1 (Martinou et al., 1990) und bei sensorischen Neuronen durch TGF- β 1 und TGF- β 2 die Überlebensrate in vitro deutlich erhöht (Chalazonitis et al., 1992).

Bezüglich der Frage nach Effekten auf Gliazellen lässt die Erkenntnis, dass TGF- β trotz seiner allgemein inhibitorischen Wirkung auf diverse Zelllinien auf Schwannzellen mitogen wirkt (Davis and Stroobant, 1990) und ihre DNA-Synthese beeinflusst (Eccleston et al., 1989), eine ähnliche Wirkung auch im ENS vermuten. Daher ist neurale Beeinflussung der Gliazellen mittels TGF- β und im Gegenzug ein neurotropher und protektiver Feedback-Mechanismus insbesondere durch TGF- β 2 innerhalb adulter Ganglien denkbar.

5.4.3 Vergleich von zentralem und enterischem Nervensystem

Auch der Blick ins zentrale Nervensystem offenbart dem enterischen Nervensystem ähnliche Muster. TGF- β 1-3 sowie T β R1 und T β R2 werden sowohl in Neuronen als auch Gliazellen des ZNS exprimiert (Böttner et al., 2000, Aigner and Bogdahn, 2008), wobei TGF- β 1 hauptsächlich in Meningen sowie Plexus choroideus und erst nach Schädigung in Neuronen exprimiert wird (Gomes et al., 2005, Flanders et al., 1991, Lindholm et al., 1992). Unsere Daten zeigen dagegen auch für TGF- β 1 eine mRNA- und Protein-Expression in Gliazellen und Neuronen des humanen ENS und hohe mRNA-Level in der Primärkultur des Plexus myentericus der Ratte. Die essentielle Rolle von TGF- β als wichtigem physiologischen Faktor für Neurogenese und -protektion ist im zentralen Nervensystem schon seit Längerem bekannt. So sind die TGF- β -Liganden wichtige Mediatoren für die Entwicklung und den Erhalt dopaminerger Neurone des Mesencephalons in vitro und in vivo (Farkas et al., 2003).

Die beobachtete Proliferationshemmung von TGF- β 2 auf cerebelläre Neurone in vitro (Constam et al., 1994) erscheint in Bezug auf die neurotrophe Wirkung im ENS widersprüchlich. Unter der Vorstellung einer dosisabhängigen Inhibierung der Zellvermehrung und Induktion einer Zelldifferenzierung lässt sich diese Beobachtung allerdings mit unseren Daten in Einklang bringen.

Zusammenfassend konnten wir für das enterische Nervensystem in vitro einen Nachweis aller Mitglieder des TGF- β -Systems erbringen und damit sowohl unsere Daten aus dem humanen Gewebe bestätigen, als auch TGF- β 2 als neurotrophen Faktor klassifizieren. Der Vergleich

mit Studien aus zentralem und peripherem Nervensystem zeigt ähnliche Expressionsmuster mit dem Unterschied, dass TGF- β 1 im ENS läSIONsunabhängig exprimiert wird.

5.4.4 Enterische Muskelzellkulturen

Auch in der enterischen Muskelzellkultur konnte für alle Mitglieder des TGF- β -Systems eine mRNA-Expression nachgewiesen werden. Bei den Liganden zeigte TGF- β 3 vor TGF- β 1 hohe Werte und bei den Rezeptoren war T β R-2 am höchsten exprimiert. Auffällig ist das identische Expressionsverhältnis der Liganden und der Rezeptoren jeweils untereinander, verglichen mit den mRNA-Daten der humanen Tunica muscularis. Bedenkt man, dass die Myozyten den größten Anteil der Tunica muscularis ausmachen, erscheint dieser Schluss logisch. Auch die Beobachtung, dass TGF- β 3 der am meisten durch Myozyten exprimierte Ligand ist, deckt sich mit Daten aus der M. Crohn-Forschung. Hier wurde entsprechend unseren Ergebnissen vorwiegend TGF- β 3 in gesunden, humanen Darmmyozyten exprimiert, wohingegen es nur im erkrankten Gewebe zu einem Abfall von TGF- β 3 und einem Anstieg von TGF- β 1 und TGF- β 2 kam (McKaig et al., 2002). In Bezug auf die TGF- β -Rezeptoren implizieren hohe Werte für T β R-2 eine wesentliche Rolle für die Integrität der intestinalen Muskulatur. Dafür sprechen auch die Entwicklung schwerwiegender Fehlbildungen im Gefäßsystem bei genetischer Aberration von T β R-2 (Li et al., 2014).

Auf Grund der auffälligen Diskrepanz zwischen fehlender immunhistochemischer Reaktivität für TGF- β 2 und T β R2 im humanen Gewebe und einer nachweisbaren mRNA-Expression (für T β R2 sogar deutlichen Expression) in der Muskelzellkultur erfolgte eine immunhistochemische Kontrolle der Muskelzellkulturen. Dabei konnte in Übereinstimmung zum humanen Gewebe kein Nachweis für TGF- β 2 und T β R-2 gefunden werden.

Bezüglich TGF- β 2 ist ein denkbarer Erklärungsansatz – in Übereinstimmung mit den Daten von (McKaig et al., 2002) – eine allenfalls sehr geringe Expression in enterischen Muskelzellen. Die Hauptquelle könnte demnach der Plexus myentericus sein, welcher nachweislich TGF- β 2 exprimiert. Beachtet man den geringen Anteil der Ganglien zur Tunica muscularis im Vergleich zu den TGF- β 1 und TGF- β 3 exprimierenden Myozyten ist es plausibel, dass TGF- β 2 die niedrigsten mRNA-Level der Liganden zeigt. Für diese These sprechen weiterhin die fehlende immunhistochemische Reaktivität beim Humangewebe sowie die sehr niedrigen mRNA-Level und die fehlende Lokalisierung in der Ratten-Zellkultur.

Auffällig dagegen ist die fehlende Immunreaktivität von T β R2 bei Myozyten aus Mensch und Ratte bei gleichzeitig höchster mRNA-Expression in der Zellkultur.

Daher muss, wie bereits in Abschnitt 5.3 diskutiert, ein fehlerhafter Antikörper oder eine falsche Verdünnung für T β R2 – aber auch für TGF- β 2 – in Betracht gezogen werden. Eine unterschiedliche Expression zwischen Mensch und Ratte ist prinzipiell möglich, angesichts der diskutierten Ergebnisse allerdings weniger plausibel.

Für TGF- β 1, TGF- β 3 und T β R-1 konnte allerdings die im humanen Gewebe gefundene Reaktivität in der myozytären Zellkultur bestätigt werden. Interessanterweise zeigten TGF- β 1 und T β R1 dabei eine deutliche para- und intranukleäre Reaktivität, wohingegen TGF- β 3 eine homogene Lokalisierung im gesamten Soma bot.

5.4.5 Myoneurale Wechselwirkung

Die vorliegenden Daten mit mRNA- und Proteinnachweisen des TGF- β -Systems in glatten Muskelzellen (SMC's = smooth muscle cells) und dem Plexus myentericus lassen, wie bereits angesprochen, eine wechselseitige Einflussnahme dieser beiden Gewebe in der physiologischen Darmwand vermuten. Unsere These ist daher eine Einflussnahme des Plexus myentericus auf die Muskulatur durch TGF- β und einen Feed-Back-Mechanismus auf die Neurone ebenfalls via TGF- β . Bei durchgehend hoher Expression von TGF- β 1 in neuroglialem Gewebe und der Immunfluoreszenz-Lokalisierung an der Schnittstelle zwischen ENS-Nervenfasern und glatter Muskulatur wurde TGF- β 1 zur Stimulation der SMC's gewählt.

Glatte Muskelzellen entstehen aus Fibroblasten und können je nach Gewebetyp und Entwicklungsstadium zwischen einem kontraktilem und einem sekretorischen Phänotypus die Differenzierung wechseln (Rensen et al., 2007). Das TGF- β -System, insbesondere TGF- β 1, ist als einer der potentesten Induktoren bei jedem dieser Differenzierungsschritte maßgeblich beteiligt. So induziert TGF- β 1 die Differenzierung glatter Myozyten aus Stammzellen (Kurpinski et al., 2010, Sinha et al., 2004), aus Fibroblasten (Desmouliere et al., 1993) und wird im Allgemeinen als essentieller Induktor eines adulten, kontraktilem Phänotypus von Myozyten angesehen (Rensen et al., 2007). Auch im Darm erhöht TGF- β 1 in vitro die Kontraktilität der Myozyten (Akiho et al., 2007).

5.4.6 Einfluss auf den myozytären Phänotypus

Auch unsere Daten zeigen eine vermehrte Expression des zytoskelettalen Proteins α -SMA in den intestinalen SMC's nach Stimulation mit TGF- β 1. Bei nur knapp verfehlter Signifikanz

für Smmhc ($p = 0,18$) und Caldesmon ($p = 0,06$) sei hier auf den sich abzeichnenden Trend einer Zunahme der Expression unter Stimulation hingewiesen. α -SMA und SMMHC sind kontraktile Filamente und zusammen mit dem kontraktionsregulierenden Caldesmon handelt es sich bei den drei Proteinen um Marker für adulte Muskelzellen eines kontraktiven Phänotypus (Rensen et al., 2007).

Die Induktion eines kontraktiven Phänotypus durch TGF- β mit Expression dieser Marker wurde in diversen SMC-haltigen Organsystemen wie dem Gefäßsystem (Hautmann et al., 1997) und der Lunge (Shi et al., 2013) gezeigt und scheint auch im Darm zutreffend zu sein. Dem gegenüber zeigt sich in unserer Kultur keine Beeinflussung des Vitamin-A-bindenden Proteins Crbp1 und des Kollagenproteins Colla durch TGF- β 1, welche beide hinweisend auf den synthetischen Phänotyp oder aktive Proliferation wären (Rensen et al., 2007).

5.4.7 Modulation der Serotonin- und Acetylcholin-Transmitter-systeme

Wesentlich für die gastrointestinale Motilität und Kontraktilität der Darmwand sind, neben einem ausgereiften kontraktiven Phänotypus der Myozyten, die myoneurale Kommunikation und hier besonders die beiden Transmittersysteme von Serotonin und Acetylcholin (Tokita et al., 2015, Akiho et al., 2007). Rezeptoren beider Systeme wurden auf den glatten Muskelzellen des Darmes nachgewiesen (Böttner et al., 2013b, Harrington et al., 2010) und für TGF- β ist bekannt, dass es modulierend in diese Transmittersysteme eingreift und Rezeptoraffinitäten beeinflusst (Nazir et al., 2015, Akiho et al., 2007).

Im Einklang zu diesen Erkenntnissen zeigen unsere Daten einen positiven Trend trotz fehlender Signifikanz für die beiden untersuchten Serotoninrezeptoren HTR3A und HTR4 ($p = 0,34$ bzw. $p = 0,22$) sowie eine signifikante Überexpression der Acetylcholinrezeptoren M2R und M3R. Eine erhöhte Affinität der glatten Muskulatur für Serotonin und Acetylcholin und somit verbesserte Kontraktilitätsregulation durch eine TGF- β 1-stimulierte Erhöhung der Rezeptordichte ist somit ein plausibles Konzept. Dafür sprechen auch das neuronale Vorkommen von Acetylcholin-Rezeptoren auf ENS-Neuronen (Harrington et al., 2010) und eine cholinerg beeinflusste Sekretion von TGF- β 1 durch chromaffine Zellen (Kriegelstein and Unsicker, 1995).

5.4.8 Beeinflussung des neurotrophen GDNF-Systems

Neben der gezeigten Bedeutung von TGF- β für das enterische Nervensystem stellt GDNF einen essentiellen neurotrophen Faktor des ENS dar (Rodrigues et al., 2011). Gebildet in der glatten Muskulatur der Tunica muscularis in vitro (Rodrigues et al., 2011) und in vivo

(Barrenschee et al., 2013) fördert GDNF die Expression seiner Rezeptoren RET und GFR α 1 auf myenterischen Ganglien (Böttner et al., 2013a). Das zur selektiven Neuroprotektion des innervierenden Plexus myentericus produzierte GDNF der Myozyten (Böttner et al., 2013a) ist dabei in seiner neuroprotektiven Wirkung auf TGF- β angewiesen (Krieglstein et al., 1998). Auch die GDNF vermittelte neuronale Differenzierung wird durch TGF- β verstärkt (Zajzon et al., 2013). Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass TGF- β 1 in vitro die Expression von GDNF und des Rezeptors GFR α 2 aus der GDNF-Familie in glatten Muskelzellen erhöht. Wir schließen daraus, dass sowohl TGF- β 1 aus SMC's als auch dem ENS in der Lage ist, die Expression des neuroprotektiven GDNF in den glatten Muskelzellen des Darmes zusätzlich zu induzieren und so zum selektiven Erhalt der innervierenden Nerven beizutragen.

5.4.9 Autokrine Effekte des TGF- β -Zytokinsystems

Typisch für Peptid-Wachstumsfaktoren ist die Eigenschaft, ihre eigene Expression sowie die Expression weiterer, oft verwandter Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in diversen Zelltypen zu beeinflussen (Dignass and Sturm, 2001). Dabei können sie lokal auf benachbarte Zellen (parakrin oder juxtakrin) oder sogar auf die produzierende Zelle selbst (autokrin) wirken (Sporn and Roberts, 1992a, Sporn and Roberts, 1992b). Das TGF- β -Zytokinsystem zeigt ebenfalls diese Eigenschaften in verschiedenen Gewebearten. So vermittelt exogen zugeführtes TGF- β 1 eine vermehrte Expression von TGF- β 1-mRNA durch Astrozyten in vitro (Morganti-Kossmann et al., 1992) und epidermale Langerhanszellen sind in ihrer Entwicklung auf einen auto- und parakrinen Mechanismus von TGF- β 1 angewiesen (Kaplan et al., 2007). Auch die beiden Rezeptoren T β R-1 und T β R-2 sind dabei in der Lage, auf TGF- β 1 mit einer autokrinen Signaltransduktion zu reagieren (Deng et al., 1999).

Kongruent dazu zeigen auch unsere Daten nach exogener TGF- β 1-Stimulation eine signifikante Induktion von TGF- β 1, TGF- β 2 sowie des Rezeptors T β R-1 in Myozyten. Die auffällige Abnahme der Expression von T β R-3 verfehlte zwar knapp die Signifikanz ($p = 0,07$), steht aber in Einklang mit Daten, die eine Herunterregulation von T β R-3 bei der Ausdifferenzierung von Myoblasten zeigen (Ewton et al., 1988).

Aus diesen Daten können drei Erkenntnisse gezogen werden: (1) TGF- β 1 ist auch in intestinalen Myozyten in der Lage eine autokrine Induktion des TGF- β -Systems zu bewirken und somit abhängige Effekte zu potenzieren. (2) Über eine TGF- β 1 vermittelte Überexpression von TGF- β 2 in den Myozyten kommt es zu einer verstärkten neurotrophen Wirkung auf das ENS. (3) TGF- β 1 aus myenterischen Ganglien ist im Gegenzug in der Lage,

über eine Induktion der TGF- β -Rezeptorexpression die Sensitivität der Muskulatur zu erhöhen.

Zusammenfassend zeigte sich (1) eine komplette Expression des TGF- β -Systems durch intestinale Myozyten in vitro. (2) Wie schon am humanen Gewebe beobachtet, war eine Diskrepanz zwischen vorhandener mRNA-Expression und fehlender immunhistochemischer Reaktivität für TGF- β 2 und T β R-2 auffällig. (3) Darüber hinaus zeigte die Stimulation kultivierter SMC's durch TGF- β 1 eine Induktion eines kontraktiven Phänotypus sowie (4) die Beeinflussung der gastrointestinalen Motilität über Modulierung der myoneuralen Kommunikation und des cholinergen und serotonergen Transmittersystems. (5) Über eine Erhöhung der GDNF-Expression in den Muskelzellen wirkt TGF- β 1 neuroprotektiv. (6) Schlussendlich zeigt TGF- β 1 eine autokrine Induktion des TGF- β -Systems in SMC's und ist somit in der Lage TGF- β -vermittelte Effekte auf ENS und glatte Myozyten zu potenzieren.

5.5 Klinischer Ausblick

Alle in dieser Arbeit untersuchten humanen Gewebe stammen aus OP-Präparaten von Patienten mit Neoplasien. Zur Minimierung einer möglichen Kontamination mit Tumorzellen wurden die Proben aus dem Schnitttrand des OP-Präparates entnommen, sodass ein maximaler Sicherheitsabstand zum Tumor eingehalten wurde. Zusätzlich erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle. Dennoch ist eine Kompromittierung der Biopsien von Neoplasieeingriffen – beispielsweise durch Inflammation oder immunologische Veränderungen – nicht ganz auszuschließen. Eine Untersuchung an gesundem Gewebe von gesunden Probanden wäre aus Sicht der Forschung daher wünschenswert, ist medizinisch allerdings schwer vertretbar.

Zur Kontrolle der gewonnenen Erkenntnisse in dieser Arbeit wären weitere Versuchsreihen unter Zugabe eines TGF- β -Antikörpers wertvoll, um sicherzustellen, dass die gewonnenen Erkenntnisse auf einer Stimulation durch TGF- β beruhen. Ebenso wäre es hilfreich, Knockout-Versuchsreihen der TGF- β -Rezeptoren und des intrazellulären SMAD-Pathways zu etablieren, um Erkenntnisse auf verschiedenen Ebenen der Signalkette zu erhalten.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass GDNF bei Divertikulose eine veränderte Expression im Darm aufweist (Böttner et al., 2013a). Da wir zeigen konnten, dass TGF- β ein wichtiger neurotropher Faktor im ENS ist und zudem die Expression von GDNF beeinflusst, liegt die Vermutung nahe, dass die TGF- β -Expression ebenfalls bei Gastrointestinalopathien speziell die Motilität betreffend verändert ist. Zukünftige Studien mit entsprechender Fragestellung sind daher auch in Hinblick auf mögliche Therapieansätze wünschenswert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung von TGF- β 1, nicht jedoch von TGF- β 2, - β 3 sowie der Rezeptoren mittels Immunfluoreszenz in humanen Kolonschnitten untersucht. Eine Erhebung der fehlenden Daten ist folgerichtig und stellt ein künftiges Ziel für uns dar. Ebenso verhält es sich mit zukünftigen Studien zur Stimulation neuronaler Zielgene durch TGF- β in Primärkulturen des Plexus myentericus. Auch immunhistochemische Untersuchungen bezüglich des Vorkommens von TGF- β in diesen neuronalen Kulturen sind anzustreben.

6 Zusammenfassung

Das Transforming Growth Factor- β System (TGF- β -System) ist eine Familie aus pleiotropen Wachstumsfaktoren, die in zahlreichen Gewebearten die Genese, den Erhalt und die Funktion beeinflussen. In diversen Neuronen- und Gliazellpopulationen des zentralen aber auch des peripheren Nervensystems üben sie neurotrophe Funktionen aus und sind an zellulärer Kommunikation beteiligt. Glatte Muskelzellen, insbesondere des kardiorespiratorischen Gefäßsystems, unterliegen der differenzierenden Regulation durch diese Proteine.

Trotz dieses seit Jahrzehnten bekannten Wissens fehlen systematische Daten über das Vorkommen und die Funktion des TGF- β -Systems im enterischen Nervensystem und der intestinalen Muskulatur.

Hauptansatzpunkte bisheriger Studien waren dabei klinische Fragestellungen wie beispielsweise Inflammation bei chronischen Gastrointestinalopathien, Fibrose sowie maligne Neoplasien oder – im gesunden Gewebe – die Rolle von TGF- β bei der Kommunikation am Darmepithel als immunologische Grenzfläche.

Daher war das Ziel dieser Arbeit eine grundlegende Analyse des Expressionsmusters vom TGF- β -System im humanen und im Rattendarm. In einem zweiten Schritt sollte die Funktion der Liganden auf kultivierte enterische Neurone und glatte enterische Muskelzellen untersucht werden, um ein besseres Verständnis der Funktion und Kommunikation zwischen diesen beiden Geweben zu gewinnen.

Durch Studien an Darmwandschnitten und isolierten Ganglien des enterischen Nervensystems mittels Immunhistochemie und Polymerasekettenreaktion konnten wir in humanem Gewebe das ubiquitäre Vorkommen aller Liganden sowohl in myozytären als auch neuronalen Gewebe nachweisen.

Die weiterführende Analyse der Ratten-Zellkulturen zeigte einen neurotrophen Effekt von TGF- β ähnlich dem im zentralen und peripheren Nervensystem.

Parallel dazu zeigte die Stimulation von isolierten glatten enterischen Muskelzellen mit TGF- β 1 eine Beeinflussung von glattemuskulären Markern mit Induktion eines adulten, kontraktiven Phänotypus als Ausdruck einer gesunden Motilität.

Weiterhin konnten wir eine Induktion von Genen enterischer Transmittersysteme und neurotropher Faktoren in den Muskelzellen zeigen, was für eine wichtige Rolle für die neuromyozytäre Kommunikation und Neuroprotektion spricht. Daneben zeigt das TGF- β -System eine für Zytokinsysteme typische Selbstinduktion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen schlussfolgern, dass neben dem zentralen und peripheren Nervensystem auch eine vollständige Expression des TGF- β -Systems im humanen enterischen Nervensystem existiert. Das Vorkommen umfasst hierbei sowohl neurogliales als auch myozytäres sowie Bindegewebe.

Zusammen mit den Erkenntnissen aus Rattenzellkulturen über einen neurotrophen Effekt von TGF- β , der Induktion eines adulten Muskelzelltyps und der Modulation von Neurotransmittersystemen lässt sich schließen, dass das TGF- β -System eine essentielle Rolle in der Entwicklung und Funktion der Darmwand innehat.

Gestützt wird diese These durch Studien an Gastrointestinalopathien die Motilität und Immunfunktion betreffend, welche veränderte Aspekte des TGF- β -System gezeigt haben.

Mit dem besseren Verständnis über das Expressionsmuster im Darm und dessen Einfluss auf neuronales und myozytäres Gewebe sollten weitere Studien detailliertere Erkenntnisse in Bezug auf gastrointestinale Motilitätsstörungen und Pathologien inflammatorischer und neoplastischer Genese schaffen.

7 Literaturverzeichnis

- AIGNER, L. & BOGDACHN, U. 2008. TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res*, 331, 225-41.
- AKIHO, H., KHAN, W. I., AL-KAABI, A., BLENNERHASSETT, P., DENG, Y. & COLLINS, S. M. 2007. Cytokine modulation of muscarinic receptors in the murine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G250-5.
- ARGMANN, C. A., VAN DEN DIEPSTRATEN, C. H., SAWYEZ, C. G., EDWARDS, J. Y., HEGELE, R. A., WOLFE, B. M. & HUFF, M. W. 2001. Transforming growth factor-beta1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 2011-8.
- BARNARD, J. A., WARWICK, G. J. & GOLD, L. I. 1993. Localization of transforming growth factor beta isoforms in the normal murine small intestine and colon. *Gastroenterology*, 105, 67-73.
- BARRENSCHEE, M., BÖTTNER, M., HELLWIG, I., HARDE, J., EGBERTS, J. H., BECKER, T. & WEDEL, T. 2013. Site-specific gene expression and localization of growth factor ligand receptors RET, GFRalpha1 and GFRalpha2 in human adult colon. *Cell Tissue Res*, 354, 371-80.
- BATTAGLIA, G., CANNELLA, M., RIOZZI, B., OROBELLO, S., MAAT-SCHIEMAN, M. L., ARONICA, E., BUSCETI, C. L., CIARMIELLO, A., ALBERTI, S., AMICO, E., SASSONE, J., SIPIONE, S., BRUNO, V., FRATI, L., NICOLETTI, F. & SQUITIERI, F. 2011. Early defect of transforming growth factor beta1 formation in Huntington's disease. *J Cell Mol Med*, 15, 555-71.
- BENNINGHOFF, A. & DRENCKHAHN, D. 2008. *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie – Band 1*, München, Urban & Fischer.
- BIANCHERI, P., GIUFFRIDA, P., DOCENA, G. H., MACDONALD, T. T., CORAZZA, G. R. & DI SABATINO, A. 2014. The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25, 45-55.
- BÖTTNER, M., BARRENSCHEE, M., HELLWIG, I., HARDE, J., EGBERTS, J. H., BECKER, T., ZORENKOV, D., SCHAFFER, K. H. & WEDEL, T. 2013a. The GDNF System Is Altered in Diverticular Disease – Implications for Pathogenesis. *PLoS One*, 8, e66290.
- BÖTTNER, M., BARRENSCHEE, M., HELLWIG, I., HARDE, J., EGBERTS, J. H., BECKER, T., ZORENKOV, D. & WEDEL, T. 2013b. The enteric serotonergic system is altered in patients with diverticular disease. *Gut*, 62, 1753-62.
- BÖTTNER, M., KRIEGLSTEIN, K. & UNSICKER, K. 2000. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem*, 75, 2227-40.
- BÖTTNER, M., ZORENKOV, D., HELLWIG, I., BARRENSCHEE, M., HARDE, J., FRICKE, T., DEUSCHL, G., EGBERTS, J. H., BECKER, T., FRITSCHER-RAVENS, A., ARLT, A. & WEDEL, T. 2012. Expression pattern and localization of alpha-synuclein in the human enteric nervous system. *Neurobiol Dis*, 48, 474-80.
- BROWN, C. B., BOYER, A. S., RUNYAN, R. B. & BARNETT, J. V. 1999. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science*, 283, 2080-2.
- BUJAK, M. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2007. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*, 74, 184-95.

- BUSS, A., PECH, K., KAKULAS, B. A., MARTIN, D., SCHOENEN, J., NOTH, J. & BROOK, G. A. 2008. TGF-beta1 and TGF-beta2 expression after traumatic human spinal cord injury. *Spinal Cord*, 46, 364-71.
- BUTOVSKY, O., JEDRYCHOWSKI, M. P., MOORE, C. S., CIALIC, R., LANSEER, A. J., GABRIELY, G., KOEGLSPERGER, T., DAKE, B., WU, P. M., DOYKAN, C. E., FANEK, Z., LIU, L., CHEN, Z., ROTHSTEIN, J. D., RANSOHOFF, R. M., GYGI, S. P., ANTEL, J. P. & WEINER, H. L. 2014. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*, 17, 131-43.
- CHALAZONITIS, A., KALBERG, J., TWARDZIK, D. R., MORRISON, R. S. & KESSLER, J. A. 1992. Transforming growth factor beta has neurotrophic actions on sensory neurons in vitro and is synergistic with nerve growth factor. *Dev Biol*, 152, 121-32.
- CHALAZONITIS, A. & KESSLER, J. A. 2012. Pleiotropic effects of the bone morphogenetic proteins on development of the enteric nervous system. *Dev Neurobiol*, 72, 843-56.
- CHANG, K. H., WU, Y. R., CHEN, Y. C. & CHEN, C. M. 2015. Plasma inflammatory biomarkers for Huntington's disease patients and mouse model. *Brain Behav Immun*, 44, 121-7.
- CHETAILE, P., PREUSS, C., BURKHARD, S., COTE, J. M., HOUDE, C., CASTILLOUX, J., PICHE, J., GOSSET, N., LECLERC, S., WUNNEMANN, F., THIBEAULT, M., GAGNON, C., GALLI, A., TUCK, E., HICKSON, G. R., EL AMINE, N., BOUFAIED, I., LEMYRE, E., DE SANTA BARBARA, P., FAURE, S., JONZON, A., CAMERON, M., DIETZ, H. C., GALLO-MCFARLANE, E., BENSON, D. W., MOREAU, C., LABUDA, D., CONSORTIUM, F. C., ZHAN, S. H., SHEN, Y., JOMPHE, M., JONES, S. J., BAKKERS, J. & ANDELFINGER, G. 2014. Mutations in SGOL1 cause a novel cohesinopathy affecting heart and gut rhythm. *Nat Genet*, 46, 1245-9.
- CONSTAM, D. B., SCHMID, P., AGUZZI, A., SCHACHNER, M. & FONTANA, A. 1994. Transient production of TGF-beta 2 by postnatal cerebellar neurons and its effect on neuroblast proliferation. *Eur J Neurosci*, 6, 766-78.
- DAVIS, J. B. & STROOBANT, P. 1990. Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol*, 110, 1353-60.
- DAY, I. N. & THOMPSON, R. J. 2010. UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog Neurobiol*, 90, 327-62.
- DAY, W. A., KOISHI, K., NUKUDA, H. & MCLENNAN, I. S. 2005. Transforming growth factor-beta 2 causes an acute improvement in the motor performance of transgenic ALS mice. *Neurobiol Dis*, 19, 323-30.
- DENG, X., BELLIS, S., YAN, Z. & FRIEDMAN, E. 1999. Differential responsiveness to autocrine and exogenous transforming growth factor (TGF) beta1 in cells with nonfunctional TGF-beta receptor type III. *Cell Growth Differ*, 10, 11-8.
- DERYNCK, R., LINDQUIST, P. B., LEE, A., WEN, D., TAMM, J., GRAYCAR, J. L., RHEE, L., MASON, A. J., MILLER, D. A., COFFEY, R. J. & ET AL. 1988. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J*, 7, 3737-43.
- DERYNCK, R. & MIYAZONO, K. 2008. *The TGF-beta family*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- DERYNCK, R. & ZHANG, Y. E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425, 577-84.
- DESMOULIERE, A., GEINOZ, A., GABBIANI, F. & GABBIANI, G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin

- expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122, 103-11.
- DIGNASS, A. U. & STURM, A. 2001. Peptide growth factors in the intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13, 763-70.
- ECCLESTON, P. A., JESSEN, K. R. & MIRSKY, R. 1989. Transforming growth factor-beta and gamma-interferon have dual effects on growth of peripheral glia. *J Neurosci Res*, 24, 524-30.
- EWTON, D. Z., SPIZZ, G., OLSON, E. N. & FLORINI, J. R. 1988. Decrease in transforming growth factor-beta binding and action during differentiation in muscle cells. *J Biol Chem*, 263, 4029-32.
- FARKAS, L. M., DUNKER, N., ROUSSA, E., UNSICKER, K. & KRIEGLSTEIN, K. 2003. Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 23, 5178-86.
- FENG, Z. & KO, C. P. 2008. Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor-beta1. *J Neurosci*, 28, 9599-609.
- FLANDERS, K. C., LUDECKE, G., ENGELS, S., CISSEL, D. S., ROBERTS, A. B., KONDAIAH, P., LAFYATIS, R., SPORN, M. B. & UNSICKER, K. 1991. Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. *Development*, 113, 183-91.
- FURNESS, J. B. 2006a. *The enteric nervous system*, Oxford, Blackwell Publishing.
- FURNESS, J. B. 2006b. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Auton Neurosci*, 130, 1-5.
- GILLIS, E., VAN LAER, L. & LOEYS, B. L. 2013. Genetics of thoracic aortic aneurysm: at the crossroad of transforming growth factor-beta signaling and vascular smooth muscle cell contractility. *Circ Res*, 113, 327-40.
- GOMES, F. C., SOUSA VDE, O. & ROMAO, L. 2005. Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci*, 23, 413-24.
- GONZALEZ-APARICIO, R., FLORES, J. A. & FERNANDEZ-ESPEJO, E. 2010. Antiparkinsonian trophic action of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor beta1 is enhanced after co-infusion in rats. *Exp Neurol*, 226, 136-47.
- HAN, Q. J., GAO, N. N., GUO, Q., ZHANG, Z. N., YU, W. H., PAN, J., WANG, Q., ZHANG, X. & BAO, L. 2013. IPP5 inhibits neurite growth in primary sensory neurons by maintaining TGF-beta/Smad signaling. *J Cell Sci*, 126, 542-53.
- HARRINGTON, A. M., PECK, C. J., LIU, L., BURCHER, E., HUTSON, J. M. & SOUTHWELL, B. R. 2010. Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon. *Neurogastroenterol Motil*, 22, 999-1008, e262-3.
- HAUTMANN, M. B., MADSEN, C. S. & OWENS, G. K. 1997. A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *J Biol Chem*, 272, 10948-56.
- HEANUE, T. A. & PACHNIS, V. 2006. Expression profiling the developing mammalian enteric nervous system identifies marker and candidate Hirschsprung disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6919-24.
- ILZECKA, J., STELMASIAK, Z. & DOBOSZ, B. 2002. Transforming growth factor-Beta 1 (tgf-Beta 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine*, 20, 239-43.
- JIANG, Y., MCLENNAN, I. S., KOISHI, K. & HENDRY, I. A. 2000. Transforming growth factor-beta 2 is anterogradely and retrogradely transported in motoneurons and up-regulated after nerve injury. *Neuroscience*, 97, 735-42.

- KANG, Y., CHEN, C. R. & MASSAGUE, J. 2003. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell*, 11, 915-26.
- KAPLAN, D. H., LI, M. O., JENISON, M. C., SHLOMCHIK, W. D., FLAVELL, R. A. & SHLOMCHIK, M. J. 2007. Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, 204, 2545-52.
- KINGSLEY, D. M. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, 8, 133-46.
- KONKEL, J. E. & CHEN, W. 2011. Balancing acts: the role of TGF-beta in the mucosal immune system. *Trends Mol Med*, 17, 668-76.
- KRAMMER, H. J., KARAHAN, S. T., RUMPEL, E., KLINGER, M. & KUHNEL, W. 1993. Immunohistochemical visualization of the enteric nervous system using antibodies against protein gene product (PGP) 9.5. *Ann Anat*, 175, 321-5.
- KRIEGLSTEIN, K. 2006. Cell death in the nervous system. *Adv Exp Med Biol*, 557, 1-10.
- KRIEGLSTEIN, K., HENHEIK, P., FARKAS, L., JASZAI, J., GALTER, D., KROHN, K. & UNSICKER, K. 1998. Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *J Neurosci*, 18, 9822-34.
- KRIEGLSTEIN, K. & UNSICKER, K. 1994. Transforming growth factor-beta promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neuroscience*, 63, 1189-96.
- KRIEGLSTEIN, K. & UNSICKER, K. 1995. Bovine chromaffin cells release a transforming growth factor-beta-like molecule contained within chromaffin granules. *J Neurochem*, 65, 1423-6.
- KRIEGLSTEIN, K., ZHENG, F., UNSICKER, K. & ALZHEIMER, C. 2011. More than being protective: functional roles for TGF-beta/activin signaling pathways at central synapses. *Trends Neurosci*, 34, 421-9.
- KURPINSKI, K., LAM, H., CHU, J., WANG, A., KIM, A., TSAY, E., AGRAWAL, S., SCHAFFER, D. V. & LI, S. 2010. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells*, 28, 734-42.
- LACMANN, A., HESS, D., GOHLA, G., ROUSSA, E. & KRIEGLSTEIN, K. 2007. Activity-dependent release of transforming growth factor-beta in a neuronal network in vitro. *Neuroscience*, 150, 647-57.
- LI, W., LI, Q., JIAO, Y., QIN, L., ALI, R., ZHOU, J., FERRUZZI, J., KIM, R. W., GEIRSSON, A., DIETZ, H. C., OFFERMANN, S., HUMPHREY, J. D. & TELLIDES, G. 2014. Tgfbr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *J Clin Invest*, 124, 755-67.
- LINDHOLM, D., CASTREN, E., KIEFER, R., ZAFRA, F. & THOENEN, H. 1992. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol*, 117, 395-400.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart, Thieme.
- MADISEN, L., WEBB, N. R., ROSE, T. M., MARQUARDT, H., IKEDA, T., TWARDZIK, D., SEYEDIN, S. & PURCHIO, A. F. 1988. Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA*, 7, 1-8.
- MANNING, G., WHYTE, D. B., MARTINEZ, R., HUNTER, T. & SUDARSANAM, S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 1912-34.

- MARTINO, J. C., LE VAN THAI, A., VALETTE, A. & WEBER, M. J. 1990. Transforming growth factor beta 1 is a potent survival factor for rat embryo motoneurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res*, 52, 175-81.
- MASSAGUE, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 597-641.
- MASSAGUE, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67, 753-91.
- MATTEOLI, G., GOMEZ-PINILLA, P. J., NEMETHOVA, A., DI GIOVANGIULIO, M., CAILOTTO, C., VAN BREE, S. H., MICHEL, K., TRACEY, K. J., SCHEMANN, M., BOESMANS, W., VANDEN BERGHE, P. & BOECKXSTAENS, G. E. 2014. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut*, 63, 938-48.
- MCDONALD, N. Q. & HENDRICKSON, W. A. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, 73, 421-4.
- MCKAIG, B. C., HUGHES, K., TIGHE, P. J. & MAHIDA, Y. R. 2002. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282, C172-82.
- MIETTINEN, M. 2014. Immunohistochemistry of soft tissue tumours – review with emphasis on 10 markers. *Histopathology*, 64, 101-18.
- MOGI, M., HARADA, M., KONDO, T., NARABAYASHI, H., RIEDERER, P. & NAGATSU, T. 1995. Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 193, 129-32.
- MOORE, M. W., KLEIN, R. D., FARINAS, I., SAUER, H., ARMANINI, M., PHILLIPS, H., REICHARDT, L. F., RYAN, A. M., CARVER-MOORE, K. & ROSENTHAL, A. 1996. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, 382, 76-9.
- MORGANTI-KOSSMANN, M. C., KOSSMANN, T., BRANDES, M. E., MERGENHAGEN, S. E. & WAHL, S. M. 1992. Autocrine and paracrine regulation of astrocyte function by transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol*, 39, 163-73.
- MULLER, P. A., KOSCSO, B., RAJANI, G. M., STEVANOVIC, K., BERRES, M. L., HASHIMOTO, D., MORTHA, A., LEBOEUF, M., LI, X. M., MUCIDA, D., STANLEY, E. R., DAHAN, S., MARGOLIS, K. G., GERSHON, M. D., MERAD, M. & BOGUNOVIC, M. 2014. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell*, 158, 300-313.
- NATHAN, C. & SPORN, M. 1991. Cytokines in context. *J Cell Biol*, 113, 981-6.
- NAZIR, S., KUMAR, A., CHATTERJEE, I., ANBAZHAGAN, A. N., GUJRAL, T., PRIYAMVADA, S., SAKSENA, S., ALREFAI, W. A., DUDEJA, P. K. & GILL, R. K. 2015. Mechanisms of Intestinal Serotonin Transporter (SERT) Upregulation by TGF-beta1 Induced Non-Smad Pathways. *PLoS One*, 10, e0120447.
- NEUNLIST, M., AUBERT, P., BONNAUD, S., VAN LANDEGHEM, L., CORON, E., WEDEL, T., NAVEILHAN, P., RUHL, A., LARDEUX, B., SAVIDGE, T., PARIS, F. & GALMICHE, J. P. 2007. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G231-41.
- OENEMA, T. A., SMIT, M., SMEDINGA, L., RACKE, K., HALAYKO, A. J., MEURS, H. & GOSENS, R. 2012. Muscarinic receptor stimulation augments TGF-beta1-induced contractile protein expression by airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303, L589-97.

- OHTA, M., GREENBERGER, J. S., ANKLESARIA, P., BASSOLS, A. & MASSAGUE, J. 1987. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature*, 329, 539-41.
- PACKARD, M., MATHEW, D. & BUDNIK, V. 2003. Wnts and TGF beta in synaptogenesis: old friends signalling at new places. *Nat Rev Neurosci*, 4, 113-20.
- PELTON, R. W., SAXENA, B., JONES, M., MOSES, H. L. & GOLD, L. I. 1991. Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol*, 115, 1091-105.
- PLATEROTI, M., RUBIN, D. C., DULUC, I., SINGH, R., FOLTZER-JOURDAINNE, C., FREUND, J. N. & KEDINGER, M. 1998. Subepithelial fibroblast cell lines from different levels of gut axis display regional characteristics. *Am J Physiol*, 274, G945-54.
- R-CORE-TEAM 2012. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.
- RENSSEN, S. S., DOEVENDANS, P. A. & VAN EYS, G. J. 2007. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*, 15, 100-8.
- RIDLEY, A. J., DAVIS, J. B., STROOBANT, P. & LAND, H. 1989. Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol*, 109, 3419-24.
- ROBERTS, A. B., LAMB, L. C., NEWTON, D. L., SPORN, M. B., DE LARCO, J. E. & TODARO, G. J. 1980. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 3494-8.
- ROBERTS, A. B., MCCUNE, B. K. & SPORN, M. B. 1992. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int*, 41, 557-9.
- RODRIGUES, D. M., LI, A. Y., NAIR, D. G. & BLENNERHASSETT, M. G. 2011. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, 23, e44-56.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, G. & VELASCO, I. 2012. Activin and TGF-beta effects on brain development and neural stem cells. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11, 844-55.
- SANFORD, L. P., ORMSBY, I., GITTENBERGER-DE GROOT, A. C., SARIOLA, H., FRIEDMAN, R., BOIVIN, G. P., CARDELL, E. L. & DOETSCHMAN, T. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*, 124, 2659-70.
- SCHEMANN, M. & NEUNLIST, M. 2004. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, 16 Suppl 1, 55-9.
- SCHERER, S. S., KAMHOLZ, J. & JAKOWLEW, S. B. 1993. Axons modulate the expression of transforming growth factor-betas in Schwann cells. *Glia*, 8, 265-76.
- SEDDA, S., MARAFINI, I., DINALLO, V., DI FUSCO, D. & MONTELEONE, G. 2015. The TGF-beta/Smad System in IBD Pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*, 21, 2921-5.
- SHANGJIE, X., XIAOCHUN, Z., WENYI, Y., WUPING, G., YING, Z., QIUMING, H. & HUIMIN, X. 2015. TGF-beta1, Ghrelin, Neurexin, and Neuroligin are predictive biomarkers for postoperative prognosis of laparoscopic surgery in children with Hirschsprung disease. *Cell Biochem Biophys*, 71, 1249-54.

- SHARKEY, K. A. 2015. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J Clin Invest*, 125, 918-25.
- SHEN, Z. J., HU, J., ESNAULT, S., DOZMOROV, I. & MALTER, J. S. 2015. RNA Seq profiling reveals a novel expression pattern of TGF-beta target genes in human blood eosinophils. *Immunol Lett*, 167, 1-10.
- SHI, X., GUO, L. W., SEEDIAL, S. M., SI, Y., WANG, B., TAKAYAMA, T., SUWANABOL, P. A., GHOSH, S., DIRENZO, D., LIU, B. & KENT, K. C. 2014. TGF-beta/Smad3 inhibit vascular smooth muscle cell apoptosis through an autocrine signaling mechanism involving VEGF-A. *Cell Death Dis*, 5, e1317.
- SHI, Y., DONG, Y., DUAN, Y., JIANG, X., CHEN, C. & DENG, L. 2013. Substrate stiffness influences TGF-beta1-induced differentiation of bronchial fibroblasts into myofibroblasts in airway remodeling. *Mol Med Rep*, 7, 419-24.
- SHI, Y. & MASSAGUE, J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113, 685-700.
- SI, Y., KIM, S., CUI, X., ZHENG, L., OH, S. J., ANDERSON, T., ALSHARABATI, M., KAZAMEL, M., VOLPICELLI-DALEY, L., BAMMAN, M. M., YU, S. & KING, P. H. 2015. Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta) Is a Muscle Biomarker of Disease Progression in ALS and Correlates with Smad Expression. *PLoS One*, 10, e0138425.
- SINHA, S., HOOFNAGLE, M. H., KINGSTON, P. A., MCCANNA, M. E. & OWENS, G. K. 2004. Transforming growth factor-beta1 signaling contributes to development of smooth muscle cells from embryonic stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C1560-8.
- SPECHT, H., PETERZIEL, H., BAJOHRS, M., GERDES, H. H., KRIEGLSTEIN, K. & UNSICKER, K. 2003. Transforming growth factor beta2 is released from PC12 cells via the regulated pathway of secretion. *Mol Cell Neurosci*, 22, 75-86.
- SPORN, M. B. & ROBERTS, A. B. 1992a. Autocrine secretion – 10 years later. *Ann Intern Med*, 117, 408-14.
- SPORN, M. B. & ROBERTS, A. B. 1992b. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol*, 119, 1017-21.
- TEN DIJKE, P. & ARTHUR, H. M. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 857-69.
- TEN DIJKE, P. & HILL, C. S. 2004. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*, 29, 265-73.
- TOKITA, Y., AKIHO, H., NAKAMURA, K., IHARA, E. & YAMAMOTO, M. 2015. Contraction of gut smooth muscle cells assessed by fluorescence imaging. *J Pharmacol Sci*, 127, 344-51.
- UNSICKER, K., FLANDERS, K. C., CISSEL, D. S., LAFYATIS, R. & SPORN, M. B. 1991. Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience*, 44, 613-25.
- UNSICKER, K. & KRIEGLSTEIN, K. 2002. TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival. *Adv Exp Med Biol*, 513, 353-74.
- UNSICKER, K., MEIER, C., KRIEGLSTEIN, K., SARTOR, B. M. & FLANDERS, K. C. 1996. Expression, localization, and function of transforming growth factor-beta s in embryonic chick spinal cord, hindbrain, and dorsal root ganglia. *J Neurobiol*, 29, 262-76.
- VAWTER, M. P., DILLON-CARTER, O., TOURTELLOTTE, W. W., CARVEY, P. & FREED, W. J. 1996. TGFbeta1 and TGFbeta2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid. *Exp Neurol*, 142, 313-22.

- VERHEIJDEN, S., DE SCHEPPER, S. & BOECKXSTAENS, G. E. 2015. Neuron-macrophage crosstalk in the intestine: a "microglia" perspective. *Front Cell Neurosci*, 9, 403.
- VOGEL, T., AHRENS, S., BUTTNER, N. & KRIEGLSTEIN, K. 2010. Transforming growth factor beta promotes neuronal cell fate of mouse cortical and hippocampal progenitors in vitro and in vivo: identification of Nedd9 as an essential signaling component. *Cereb Cortex*, 20, 661-71.
- WEDEL, T., ROBLICK, U., GLEISS, J., SCHIEDECK, T., BRUCH, H. P., KUHNEL, W. & KRAMMER, H. J. 1999. Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann Anat*, 181, 327-37.
- WOLF, N., KROHN, K., BIEGER, S., FRODIN, M., GAMMELTOFT, S., KRIEGLSTEIN, K. & UNSICKER, K. 1999. Transforming growth factor-beta, but not ciliary neurotrophic factor, inhibits DNA synthesis of adrenal medullary cells in vitro. *Neuroscience*, 90, 629-41.
- YAMASHITA, H., TEN DIJKE, P., FRANZEN, P., MIYAZONO, K. & HELDIN, C. H. 1994. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 269, 20172-8.
- ZAJZON, K., PROLS, F. & HEERMANN, S. 2013. Concerted interaction of TGF-beta and GDNF mediates neuronal differentiation. *Neuroreport*, 24, 704-11.
- ZHANG, F., ENDO, S., CLEARY, L. J., ESKIN, A. & BYRNE, J. H. 1997. Role of transforming growth factor-beta in long-term synaptic facilitation in Aplysia. *Science*, 275, 1318-20.
- ZHANG, F. & JIANG, L. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 11, 243-56.

8 Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. rer. nat. Martina Böttner. Neben der Möglichkeit, eine aussichtsreiche und strukturierte Dissertation anzufertigen hat sie darüber hinaus mit viel Geduld, Verständnis und bewundernswertem persönlichem Engagement mir einen sehr wertvollen Einblick in die Welt der Forschung gegeben, die Faszination am wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt und mir eine fundierte Ausbildung für die Zukunft an die Hand gegeben. Dafür danke ich Dir, liebe Martina, von Herzen!

Besonderer Dank gilt hier auch Professor Dr. med. Thilo Wedel, der durch seine klare Struktur, hervorragende Didaktik und stets konstruktiv-kritische Einschätzung einen wesentlichen Teil an der Entstehung dieser Arbeit möglich gemacht hat.

Ein außergewöhnlicher Dank geht an meine wissenschaftlichen Betreuerin und Kollegin Frau Dr. rer. nat. Martina Barrenschee, die in schweren Stunden mit Rat und Tat stets zur Stelle war, mich unermüdlich motiviert hat und trotz aller Umstände immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und etwas Milchpulver für meinen Kaffee hatte. Liebe Martina, fachlich wie auch privat bist Du mir eine gute Freundin geworden. Auch Dr. rer. nat. Christina Lange, Dr. rer. nat. François Cossais und Dr. rer. nat. Andrea Preuße-Prange haben zu jeder noch so unmöglichen Uhrzeit mit Geduld und Erfahrung meine Fragen unermüdlich ertragen, mir ihren Keks geschenkt und mir viel wertvolle Unterstützung entgegengebracht. Ganz explizit sei hier auf unsere menschlich wie fachlich unersetzbaren nichtwissenschaftlichen Mitarbeiter hingewiesen und hierbei insbesondere Miriam Lemmer, Inka Geurink, Karin Stengel, Merle Winkler, Arndt Gundlach, Bettina Facompré, Ottfried Frandsen, Thomas Benecke und Marlies Gezeck. Sie verdienen meinen großen Dank und Respekt, denn ohne ihre Arbeit könnte kein einziges Projekt durchgeführt werden. Natürlich trägt auch meine Familie einen wesentlichen Teil zu der Vollendung dieser Arbeit bei.

Der wichtigste Mensch ist meine geliebte Frau Juli, die ich für ihre Klugheit, Ausdauer und ihren unerschütterlichen Optimismus jeden Tag bewundere und liebe.

Auch meine liebe Mama hat als einer der stärksten Menschen, die ich kenne, mit ihrem Herz am rechten Fleck dafür gesorgt, dass ich heute dort stehe, wo ich bin. In tiefer Freundschaft sei hier auch insbesondere Lisa und Achim dafür gedankt, dass sie stets an mich geglaubt und mich aufgebaut haben. Auch meiner lieben Familie Neitzel und Familie Mittag sei hier ein Dank ausgesprochen. Lieber Achim aus Berlin: Ohne Deinen Freundschaftsdienst, wäre diese Arbeit unvollständig. Danke dafür!

Schlussendlich widme ich diese Dissertation in lieber Erinnerung meiner Oma, die immer so stolz auf ihren Arzt-Enkel war und die ich sehr vermisse.

9 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Poster:

Porschek, S., Wedel, T., Barrenschee, M., Lange, C., Egberts, J., Becker, T., Böttner, M. TGF- β System in enteric nerves and muscles: expression of ligands and receptors and effects on differentiation of smooth muscle cells. 109th annual meeting der Anatomischen Gesellschaft, Salzburg, 24.09.–27.09.2014

Originalarbeit:

Hagl, C., Schäfer, KH., Hellwig, I., Barrenschee, M., Harde, J., Holtmann, M., Porschek, S., Egberts, JH., Becker, T., Wedel, T., Böttner, M. (2013). Expression and function of the Transforming Growth Factor- β system in the human and rat enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility*, 25 (7): 601 – e464.
(Impact-Faktor: 3,4)