

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner)
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Charakterisierung des Protease-aktivierten Rezeptors Typ 4 (PAR4) und
Cathepsins G in der Ösophagismukosa von Patienten mit gastroösophagealer
Refluxerkrankung (GERD) und funktionellem Sodbrennen (FH)**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Daniela Sudau
aus Salzwedel
Magdeburg 2017

Bibliographische Beschreibung:

Sudau, Daniela:

Charakterisierung des Protease-aktivierten Rezeptors Typ 4 (PAR4) und Cathepsins G in der Ösophaguskosa von Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung (GERD) und funktionellem Sodbrennen (FH). 2017 – 88 Bl., 21 Abb., 6 Tab., 3 Anhänge

Kurzreferat

Der Protease aktivierte Rezeptor Typ 4 (PAR4) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert wird. PAR4 wird durch Cathepsin G oder andere Proteasen in der extrazellulären Domäne proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert. Die intrazellulären Vorgänge sind bisher weitgehend unbekannt. Die Aktivierung von PAR4 führt zu inflammatorischer Veränderung und ist an der Modulation viszeraler Hypersensitivität beteiligt. Für die Dissertationsarbeit wurden Patienten mit erosiver und nicht erosiver Refluxerkrankung, funktionellem Sodbrennen und gesunde Kontrollen prospektiv eingeschlossen und endoskopisch, histologisch und mittels multikanaler Impedanzanalyse (MII-pH) klinisch charakterisiert. In dieser Arbeit konnte erstmals eine Expression von PAR4 in der humanen Ösophaguskosa nachgewiesen werden. Es findet sich eine verstärkte Expression von PAR4 bei Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung (GERD und NERD) und funktionellem Sodbrennen (FH) im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Des Weiteren wurde die mukosale Expression von Cathepsin G sowie die des neuronenspezifischen Oberflächenmarkers PGP9.5 untersucht. Cathepsin G ist bei Patienten mit GERD nicht verstärkt in der Ösophagusschleimhaut nachweisbar. In dem untersuchten Kollektiv findet sich eine verstärkte Expression von PGP9.5 in der Mukosa von Patienten mit GERD und FH, was als Korrelat für eine verstärkte Innervation der Mukosa und Vermittlung ösophagealer Hypersensitivität diskutiert werden kann. Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die molekulare Charakterisierung der Ösophaguskosa von Patienten mit GERD und von FH, sowie Hinweise zur Symptomenentstehung. Es ergeben sich aus der klinischen Charakterisierung neue Erkenntnisse über die optimale Diagnostik für Patienten mit Refluxsymptomen.

Schlüsselwörter

Gastroösophageale Refluxerkrankung, Funktionelles Sodbrennen, Protease aktivierter Rezeptor Typ 4

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	9
1 Einleitung.....	10
1.1 Die Gastroösophageale Refluxerkrankung.....	10
1.1.1 <i>Definition und Epidemiologie</i>	10
1.1.2 <i>Pathophysiologische Aspekte der gastroösophagealen Refluxerkrankung</i>	11
1.1.3 <i>Diagnostik und endoskopische Kategorisierung der GERD</i>	14
1.1.4 <i>Therapie</i>	21
1.1.5 <i>Veränderungen der ösophagealen Mukosa bei GERD</i>	23
1.2 Protease aktivierte Rezeptoren und Cathepsin G	24
1.2.1 <i>Charakterisierung Protease aktivierter Rezeptoren</i>	24
1.2.2 <i>Protease aktivierte Rezeptoren PAR1 – PAR3</i>	26
1.2.3 <i>Protease aktivierter Rezeptor Typ 4</i>	27
1.2.4 <i>Cathepsin G und seine Interaktion mit PAR4</i>	29
1.3 Neuronaler Marker PGP9.5.....	30
1.4 Fragestellungen und Aufgaben der Promotionsarbeit.....	30
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Studiendesign und Patientencharakterisierung	32
2.2 Symptomevaluation mittels standardisiertem Fragebogen (RDQ).....	33
2.3 Ösophagogastroduodenoskopie und Biopsieentnahme.....	34
2.4 Histopathologische Analyse der Ösophagusschleimhaut.....	34
2.5 Kombinierte Multikanalimpedanz- und pH-Metrie (MII-pH).....	35
2.6 Analyse der Genexpression von PAR4, Cathepsin G und PGP9.5	35
2.6.1 <i>RNA-Extraktion aus Mukosabiopsien</i>	35
2.6.2 <i>Photospektrometrische Bestimmung der RNA-Konzentration</i>	36
2.6.3 <i>Agarosegelelektrophorese von RNA</i>	37

2.6.4	<i>Reverse Transkription und cDNA-Synthese</i>	38
2.6.5	<i>quantitative RT-PCR (Real Time-Polymerasekettenreaktion)</i>	39
2.6.6	<i>Etablierung eines quantitativen Taqman-Assays zur Bestimmung der PAR4 Genexpression</i>	40
2.6.7	<i>Agarosegelelektrophorese von cDNA-Produkten</i>	42
2.6.8	<i>Die Delta-Delta-Ct-Methode zur Berechnung der relativen Transkriptmenge eines Gens</i>	42
2.7	PAR4 Genexpression in plattenepithelialen Zelllinien KYSE150 und KYSE450	43
2.8	PAR4-Genexpression in mononukleären Zellen (PBMC)	44
2.9	Cathepsin G Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	45
2.10	Statistische Analysen	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Patientenkollektiv und Charakterisierung der Symptome.....	47
3.2	Histopathologische Charakterisierung der Ösophagasmukosa von Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung, funktionellem Sodbrennen und Kontrollen	49
3.3	Analyse der Genexpression von β -Aktin und GAPDH zur Etablierung des Referenzgens für mukosale Genexpressionsanalysen	52
3.4	Analyse der PAR4 Expression in der ösophagealen Mukosa.....	53
3.5	Analyse der Cathepsin G Expression in der ösophagealen Mukosa	55
3.6	Analyse der PGP 9.5 Genexpression in der ösophagealen Mukosa bei Patienten mit GERD, FH und gesunden Kontrollen	56
4	Diskussion.....	57
4.1	Klinische Charakterisierung von Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung (ERD und NERD) im Vergleich mit Patienten mit funktionellem Sodbrennen	57
4.2	Morphologische Veränderungen der Ösophagusschleimhaut bei Patienten mit GERD im Vergleich zu Patienten mit FH	58
4.3	Methodische Herausforderungen bei der Quantifizierung der PAR4 Expression.	59
4.4	Etablierung von GAPDH und β -Aktin als Referenzgene	60

4.5 Erhöhte PAR4 Expression in der Ösophagismukosa von Patienten mit GERD und FH	61
4.6 Geringe Cathepsin G Gen- und Proteinexpression in der Ösophagismukosa von Patienten mit GERD und FH	62
4.7 Hinweise für eine gesteigerte Innervation der ösophagealen Mukosa von Patienten mit GERD und FH	63
4.8 Konzept der viszeralen Hypersensitivität bei Patienten mit GERD und FH.....	64
4.9 Ausblick	65
5 Zusammenfassung	66
Literaturverzeichnis	68
Danksagung	78
Ehrenerklärung.....	79
Lebenslauf.....	80
Anhang.....	81

Abkürzungsverzeichnis

ACG	American College of Gastroenterology
AET	Acid exposure time
a.u.	arbitrary units, beliebige Einheiten
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary Deoxy-Ribonucleoid-Acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DNA	Deoxy-Ribonucleoid-Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxy-Nucleotid-Triphosphate, Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERD	erosive Reflux Disease, erosive Refluxerkrankung
FCS	Fetales Kälberserum
FH	functional heartburn, Funktionelles Sodbrennen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GERD	Gastroesophageal Reflux Disease, gastroösophageale Refluxerkrankung
Ham's F12	Zellkulturmedium der Firma HAM (Biotech)
HE	Hämatoxylin Eosin
H. pylori	Helicobacter pylori
LES	lower esophageal sphinkter, unterer Ösophagussphinkter
MII-pH	Combined multichannel intraluminal impedance-pH, kombinierte multikanale intraluminale Impedanz- und pH-Metrie
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mRNA	messenger Ribonucleotid acid, Messenger Ribonukleinsäure
NERD	non erosive Reflux Disease, nicht erosive Refluxerkrankung
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
ÖH	Ösophageale Hypersensitivität
PAR	Proteinase aktivierter Rezeptor

PBMC	peripheral blood monocytes, periphere Blutmonozyten
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PGP9.5	Protein Gene Product 9.5
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RDQ	Reflux Disease Questionnaire, Refluxkrankheit Fragebogen
RPMI-1640	Nährmedium für Zellkulturen benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonucleotid Acid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SI	Symptomindex
SAP	symptom association propability, Symptomassoziationswahrscheinlichkeit
SSRI	selective Serotonin Reuptake Inhibitoren
TAE-Puffer	Tris-Aqua-Essigsäure-Puffer
TLESR	transient lower esophageal sphinkter relaxations, transiente Relaxationen des unteren Ösophagussphinkters
W	Watt
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Montreal Definition der Gastroösophagealen Refluxerkrankung.....	10
Abbildung 2:	Ätiologische Faktoren der GERD (nach Kharilas 2003).....	12
Abbildung 3:	Schematische Darstellung von TLESRs (nach Kharilas 2003).....	13
Abbildung 4:	Position des unteren Ösophagussphinkters in Lagebeziehung zum Diaphragma bei normaler Anatomie und bei einem Patienten mit axialer Hiatushernie (nach Kharilas 2003).....	14
Abbildung 5:	Los Angeles Klassifikation der erosiven Ösophagitis nach Lundell et al. 1999.....	15
Abbildung 6:	Definition der Entitäten der GERD entsprechend der Rome III Kriterien (nach Galmiche 2006).....	18
Abbildung 7:	MII-pH.....	20
Abbildung 8:	histologische Darstellung der Ösophagusschleimhaut.....	24
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der molekularen Struktur PAR4.....	25
Abbildung 10:	Agarosegelelektrophorese der extrahierten mRNA.....	37
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Funktionsweise des TaqMan® Assay.....	41
Abbildung 12:	Evaluation der klinischen Symptomatik mittels Reflux Disease Questionnaire (RDQ).....	48
Abbildung 13:	Histomorphologische Analyse der Schleimhautveränderungen von Patienten mit GERD, FH und Kontrollen.....	51
Abbildung 14:	Summenscore der histologischen Veränderungen.....	52
Abbildung 15:	Vergleichende Darstellung der Expression von β -Aktin und GAPDH.....	53
Abbildung 16:	Analyse der PAR4 Genexpression bei Patienten mit GERD (ERD, NERD), FH und Kontrollen.....	54
Abbildung 17:	Expressionsniveaus von PAR4 in den Zelllinien KYSE 150 und KYSE 450 sowie in peripheren Blutmonozyten (PBMC).....	55
Abbildung 18:	Cathepsin G Genexpression in der Ösophagusschleimhaut von Patienten mit GERD, FH und Kontrollen.....	55
Abbildung 19:	PGP 9.5 Genexpression in der Ösophagusschleimhaut von Patienten mit GERD, FH und Kontrollen.....	56
Abbildung 20:	Funktionsweise Intron-übergreifender Primer.....	60
Abbildung 21:	Konzept der ösophagealen Hypersensitivität für Patienten mit FH.....	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kontingenztafel für SAP	17
Tabelle 2:	Übersicht über die Expression und Funktionen von PAR4 in unterschiedlichen Geweben	28
Tabelle 3:	Reflux Disease Questionnaire, RDQ (nach Zavala-Gonzales et al.2014, Shaw et. al 2008)	33
Tabelle 4:	Klinische Charakterisierung des Studienkollektivs	47
Tabelle 5:	Mittelwerte und Standardabweichung der histopathologischen Charakteristika in Relation zur Diagnose	50
Tabelle 6:	Histopathologischen Charakteristika im Vergleich zwischen Patienten mit GERD (ERD und NERD), FH und Kontrollen	50

1 Einleitung

1.1 Die Gastroösophageale Refluxerkrankung

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die gastroösophageale Refluxerkrankung (GERD = gastroesophageal reflux disease) ist definiert als Zurückfließen von Mageninhalt in die Speiseröhre und den daraus resultierenden, die Lebensqualität einschränkenden Beschwerden (Montreal-Definition, *Vakil et al. 2006*). Sodbrennen (Heartburn), Regurgitation und der nicht-kardiale Thoraxschmerzen (non cardiac chest pain) wurden von einer Arbeitsgruppe um Lundell als typische Symptome der GERD beschrieben und definiert (*Lundell et al. 1999*). Eine internationale Konsensusgruppe um Vakil definierte in diesem Zusammenhang im Jahr 2006 typische ösophageale und extraösophageale Symptome der GERD (Abbildung 1).

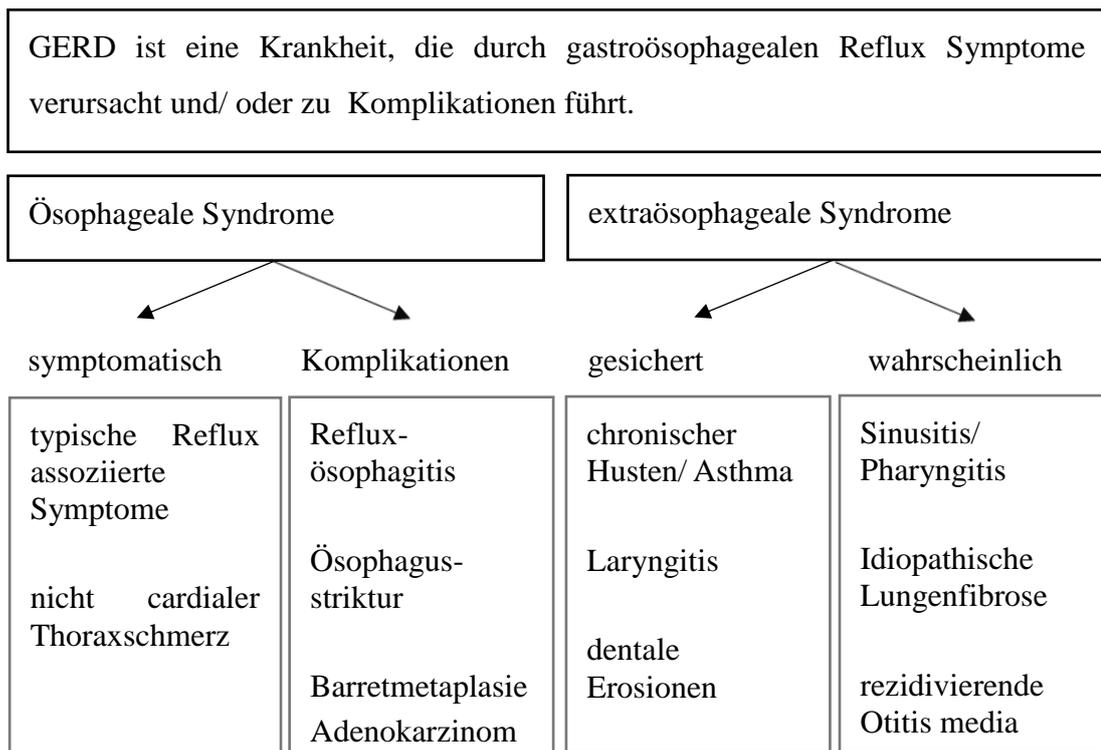


Abbildung 1: Montreal Definition der Gastroösophagealen Refluxerkrankung

In dieser Abbildung sind die Definition und Syndrome und Symptome der GERD dargestellt (nach *Lundell et al. 1999* und *Vakil et al. 2006*)

Sodbrennen ist in der westlichen Welt mit 25 – 33% eine der häufigsten Erkrankungen (*Pehl & Schepp 2002*). Sharma et al. geben die Prävalenz von GERD mit 10 - 20% in den Industrienationen an. In ihrer Arbeit beschrieben die Autoren außerdem ein europäisches Nord-Süd-Gefälle. Die Patienten wurden nach typischen, mindestens wöchentlich auftretenden Symptomen wie Aufstoßen und Sodbrennen befragt. Die Spanne der Prävalenz dieser Symptome reichte von 26% in Schweden bis 7% in Italien. Die höchste Prävalenz zeigt sich in den USA mit 30% betroffener Bevölkerung (*Sharma et al. 2008*). Eine deutlich niedrigere Prävalenz von Refluxsymptomen publizieren Wong und Kinoshita für Ostasien. In einer Übersichtsarbeit werteten sie 13 Studien aus und berechneten für Ostasien eine Prävalenz von 2,5 – 6,7% (*Wong & Kinoshita 2006*). Es findet sich neben dem Nord-Süd-Gefälle in Europa auch ein globales West-Ost-Gefälle der Prävalenz.

Typische Refluxsymptome wie Sodbrennen und saures Aufstoßen führen zu einer Einschränkung der Lebensqualität (*Wiglund 2004, Kulig et al. 2003*) und die hohe Anzahl der Betroffenen mit entsprechenden Arztbesuchen, Krankschreibungen mit Arbeitsausfall sowie Inanspruchnahme von Untersuchungen und Medikamenteneinnahme führen zu einer Belastung der Gesundheitssysteme (*Koelz et al. 2003*).

Schwierigkeiten ergeben sich in der Diagnostik, da nur ungefähr die Hälfte der Patienten mit nachgewiesener GERD an typischen Symptomen leidet. Es treten bis zu 70% funktionelle Störungen auf und bei einem nicht unerheblichen Teil der Patienten können andere Symptome wie nicht-kardialer Brustschmerz und chronischer Husten die einzigen Symptome sein (*Savarino et al. 2007, Locke et al. 1997, Neumann et al. 2008*).

Die Prävalenz von GERD ist außerdem abhängig vom Geschlecht. So haben Männer ein erhöhtes Risiko eine erosive Refluxerkrankung (ERD) zu entwickeln. Sie stellen 60% der ERD-Patienten. Die weitaus häufigere Manifestation der GERD bildet die nicht-erosive Refluxerkrankung. Sie betrifft 50-70% der Patienten mit GERD-Symptomen und tritt mit 55-70% häufiger beim weiblichen Geschlecht auf (*Endlicher et al. 2009*).

1.1.2 Pathophysiologische Aspekte der gastroösophagealen Refluxerkrankung

Als ursächlich für die GERD gilt das Zurückfließen von Mageninhalt in den distalen Ösophagus und die Exposition desselben (*Vakil et al. 2006*). Die pathophysiologische Grundlage für diesen Mechanismus sind die sogenannten TLESRs (transient lower

ösophageal sphinkter relaxations = transiente Relaxationen des unteren Ösophagussphinkters). In Abbildung 3 sind TLESRs schematisch dargestellt (orientierend nach *Sifrim and Holloway 2001*). Weiter gibt es physiologische Reinigungs- und Schutzmechanismen der Ösophagusschleimhaut, die bei Patienten mit GERD reduziert sind. Dazu gehören die Mukusschicht der ösophagealen Schleimhaut, sowie basischer Speichel und die aborale gerichtete Peristaltik (*Kahrilas 2003*). Diese Vorgänge werden als ösophageale Clearance bezeichnet.

Bei Patienten mit GERD liegt eine erhöhte Anzahl von TLESRs als bei Gesunden vor. Außerdem erhöhen das Vorhandensein einer axialen Hiatushernie (Abbildung 4), Übergewicht (*Crowell et al. 2009*), hohes Lebensalter, verminderte Salivation, verminderte ösophageale Clearance oder Medikamente, die zur Beeinträchtigung der Funktion der glatten Muskulatur führen, das Risiko der Entstehung einer GERD (*Kharilas 2003*, Abbildung 2). Das Vorhandensein einer Hiatushernie ist nicht nur mit einer erhöhten Prävalenz von GERD assoziiert, sondern korreliert auch mit einem fortgeschrittenen Stadium der ösophagealen Schädigung (*Cameron et al. 1999*).

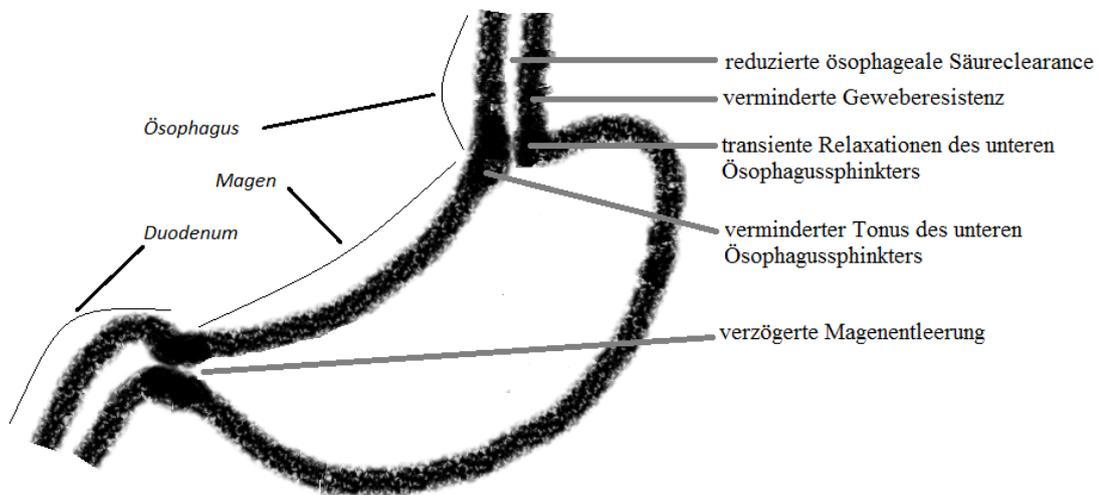


Abbildung 2: Ätiologische Faktoren der GERD (nach Kharilas 2003)

Diese Abbildung fasst die ätiologischen Faktoren der gastroösophagealen Refluxerkrankung zusammen.

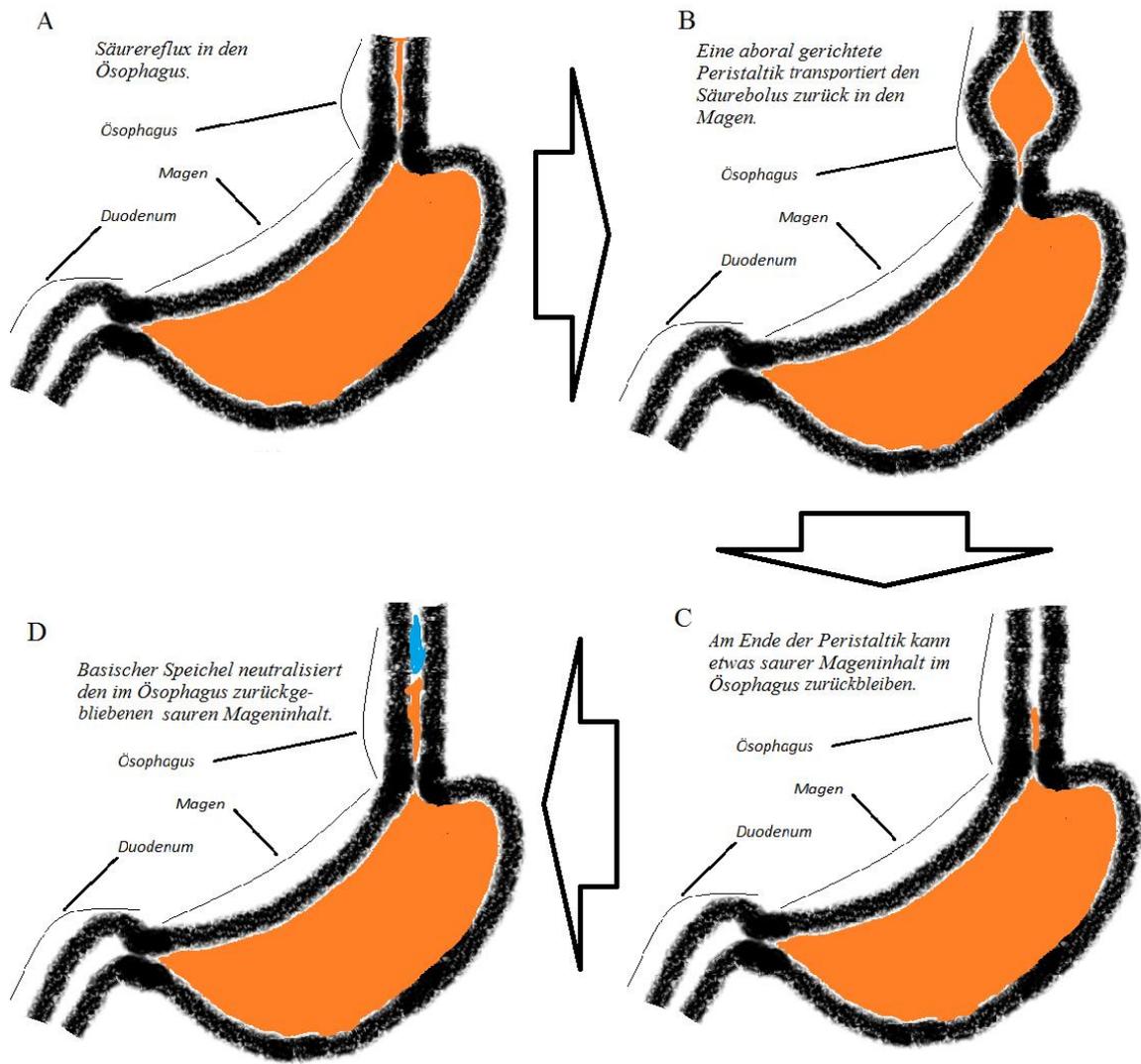


Abbildung 3: Schematische Darstellung von TLESRs (nach Kharilas 2003)

Eine vorübergehende Relaxation des unteren Ösophagussphinkters (TLESR, transient lower esophageal sphincter relaxation) führt zu Reflux von Mageninhalt in den Ösophagus (A). Eine aboral gerichtete Peristaltik der ösophagealen Muskulatur führt dann zum Transport des Speisebreis zurück in den Magen (B). Es kann ein saurer Rest in der Speiseröhre verbleiben (C), der jedoch schnell durch das Abschlucken basischen Speichels neutralisiert wird (D).

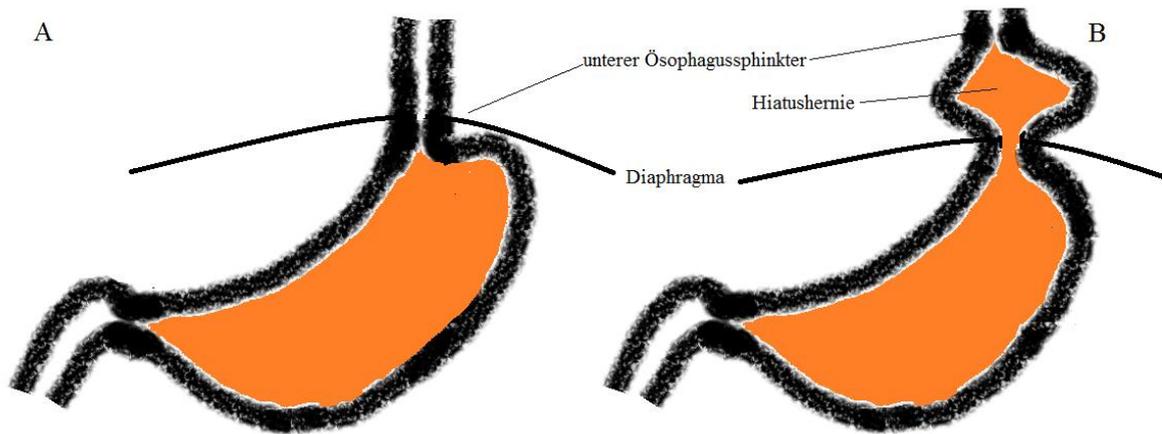


Abbildung 4: Position des unteren Ösophagussphinkters in Lagebeziehung zum Diaphragma bei normaler Anatomie und bei einem Patienten mit axialer Hiatushernie (nach Kharilas 2003)

Die Abbildung A zeigt einen unteren Ösophagussphinkter (lower esophageal sphinkter, LES) auf Höhe des Diaphragmas. Sein Verschluss wird durch das Zwerchfell verstärkt. Abbildung B stellt schematisch eine Hiatushernie mit Verlagerung des proximalen Magens in den Thorax dar. Dadurch fehlt dem LES die Unterstützung des Zwerchfells beim Schluss. Außerdem kann der Druck im thorakal gelegenen Magenanteil durch die diaphragmale Enge ansteigen und weiter den Schluss des LES beeinträchtigen.

1.1.3 Diagnostik und endoskopische Kategorisierung der GERD

Die gastroösophageale Refluxerkrankung wird nach der Montreal Klassifikation (Vakil et al 2006) in definierte Subtypen kategorisiert. Endoskopisch wird die erosive (ERD) von der nicht erosiven (NERD) Refluxerkrankung unterschieden. ERD ist durch makroskopische Veränderungen mit Erosionen der ösophagealen Schleimhaut im distalen Ösophagus gekennzeichnet. In der Endoskopie zeigen sich Schleimhauterosionen im Sinne einer Refluxösophagitis, die wie in Abbildung 5 dargestellt nach der Los Angeles Klassifikation eingeteilt wird (Lundell et al. 1999).

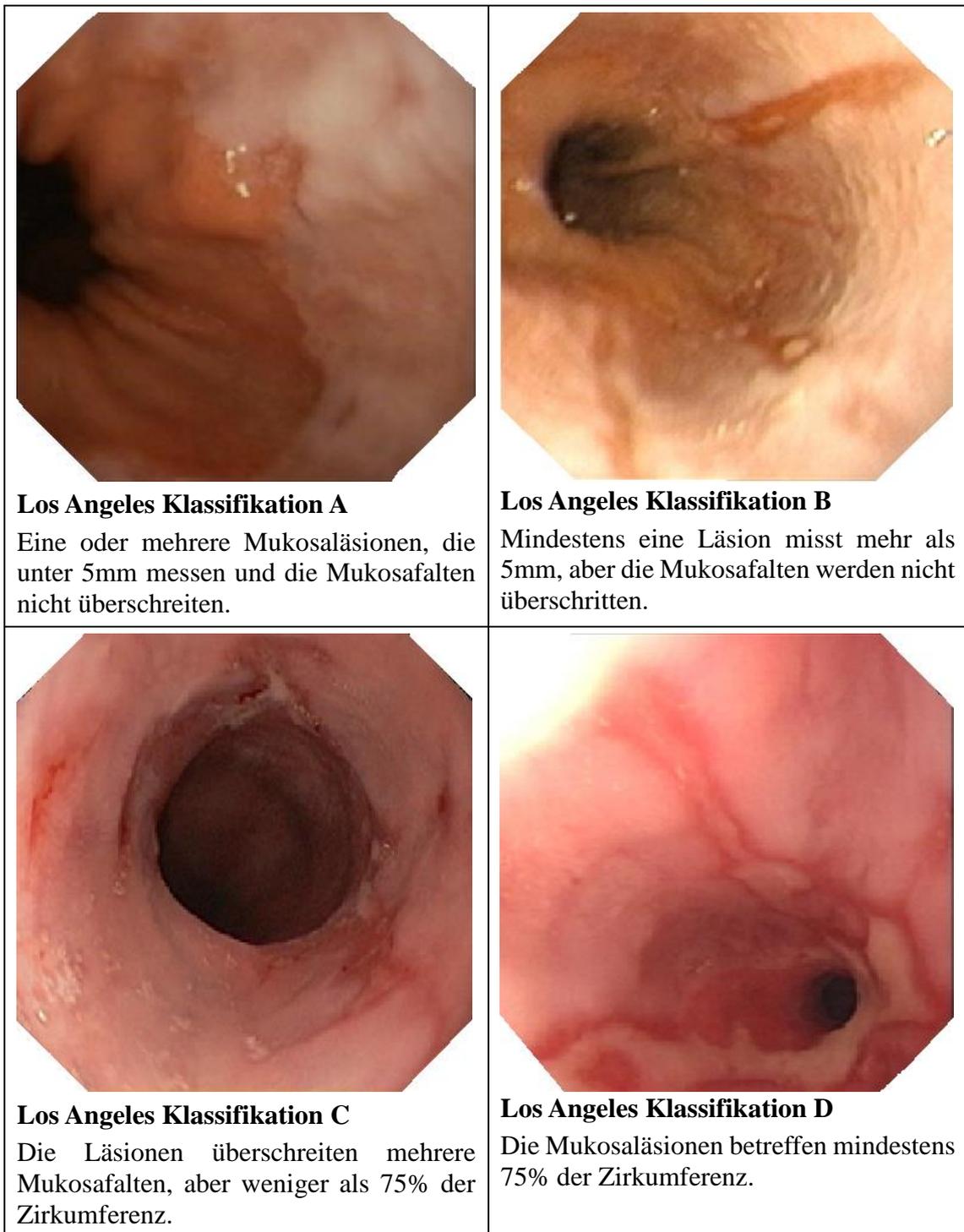


Abbildung 5: Los Angeles Klassifikation der erosiven Ösophagitis nach Lundell et al. 1999

Bei der Refluxösophagitis Grad A nach der Los Angeles Klassifikation treten kleine, die Mukosafalten nicht überschreitende, maximal 5mm messende Läsionen auf. Bei Los Angeles B ist mindestens eine Läsion größer als 5mm, aber die Mukosafalten werden ebenfalls nicht überschritten. Kommt es zum Überschreiten der Mukosafalten und es sind weniger als drei Viertel der Zirkumferenz betroffen, handelt es sich um Los Angeles C. Bei mehr als 75% der Zirkumferenz betroffener Mukosa wird Los Angeles D diagnostiziert.

Die nicht-erosive Refluxerkrankung (NERD, non erosive reflux disease) zeigt eine endoskopisch unauffällige Schleimhaut des gastroösophagealen Überganges. Eine makroskopisch nicht affizierte Schleimhaut findet sich ebenso bei Patienten mit ösophagealer Hypersensitivität (ÖH) und funktionellem Sodbrennen (FH), die entsprechend endoskopisch nicht von Patienten mit NERD zu unterscheiden sind. Um bei Patienten mit typischen Symptomen, aber normalem Schleimhautbefund in der Endoskopie entsprechend der Rom III Kriterien (*Galmiche et al 2006*) zwischen NERD, ÖH und FH zu differenzieren, ist eine pH-Metrie oder kombinierte pH-Impedanzanalyse (MII-pH) notwendig. In der pH-Metrie können verschiedene Parameter bestimmt oder berechnet werden, von denen sich für den klinischen Alltag die Säureexpositionszeit (Acid exposure time, AET), der DeMeester-Score, sowie Symptomindex (SI) und Symptomassoziationswahrscheinlichkeit (SAP) etabliert haben.

Die AET gilt als pathologisch, wenn in der 24h-pH-Metrie mindestens 4,2% der Zeit ein pH-Wert kleiner 4 im Ösophagus gemessen wurde (*Richter et al. 1992*). In liegender Position ist eine größere AET von 8,2% zulässig als in aufrechter Position (3,5%), wobei eine Gesamtzahl von 46 Refluxepisoden in 24 Stunden nicht überschritten werden sollte. Als in der Norm gelten Refluxepisoden bis maximal 5 Minuten Dauer. Der DeMeester Score errechnet sich aus den Werten für pH-Wert < 4 gesamt, liegend, aufrecht, sowie Gesamtzahl der Refluxepisoden, Dauer der längsten und Anzahl der Refluxepisoden über 5 Minuten Dauer (*Johnson and DeMeester 1986*). Der Score gilt als pathologisch bei einem Wert > 14,72, ist allerdings nicht spezifischer oder aussagekräftiger als die AET allein (*Jamieson et al. 1992*).

Zur Beurteilung des Verhältnisses zwischen registrierten Refluxepisoden in Assoziation mit den Symptomen wird der Symptom Index (SI) bestimmt. Für den SI werden die Anzahl der Refluxepisoden, nach denen innerhalb von 2 Minuten ein Symptom auftrat, zu der Gesamtzahl aller Refluxepisoden ins Verhältnis gesetzt. Er gilt als wichtiger klinischer Parameter bei der 24h pH-Metrie (*Wiener et al. 1988*). Der SI größer 50% gilt als positiv. Er wird für jedes Symptom einzeln bestimmt. Eine gute Sensitivität und Spezifität zeigt der SI für Sodbrennen. Für nicht kardialen Brustschmerz ist der SI weniger geeignet (*Swarnjit Singh et al. 1993, Dekel et al. 2004*). Der Symptomsensitivitätsindex (SSI) setzt den Prozentsatz der symptomassoziierten Refluxepisoden ins Verhältnis zu der Gesamtzahl der Refluxepisoden und gilt als positiv, wenn er größer 10% ist (*Breumelhof et al. 1991*). Die Symptomassoziationswahrscheinlichkeit (Symptom Association Propability, SAP)

berechnet die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Zusammenhang zwischen Symptom und den Refluxereignissen besteht. Dazu wird das Ergebnis der pH-Metrie in 2-Minuten-Episoden zerlegt und eine Kontingenztafel, mit den Anzahlen der Episoden mit Reflux und Symptom (a), Reflux ohne Symptom (c), Symptom ohne Reflux (b) und weder Symptom noch Reflux (d), aufgestellt (Tabelle 1). Mittels Fisher's Exact Test wird dann kontrolliert, ob das Zusammentreffen von Symptom und Reflux zufällig ist. Bei einer SAP von 95% besteht eine Wahrscheinlichkeit von < 5%, dass das Zusammentreffen von Reflux und Symptom zufällig ist (Weusten et al. 1994).

Tabelle 1: Kontingenztafel für SAP

	Reflux	kein Reflux	Summe
Symptom	a	b	a+b
kein Symptom	c	d	c+d
Summe	a+c	b+d	n

Wenn bei unauffälligem endoskopischen Befund des gastroösophagealen Überganges in der pH-Metrie eine erhöhte Säureexposition des Ösophagus (AET, DeMeester Score) registriert wird, wird die Diagnose NERD gestellt. Liegt eine normale AET vor, muss zwischen ösophagealer Hypersensitivität (ÖH) und funktionellem Sodbrennen (FH) unterschieden werden (Martinez et al. 2003). Weisen die Patienten eine positive Symptomassoziation (SI, SAP) auf, wird die Diagnose ösophageale Hypersensitivität gestellt. Lässt sich keine positive Symptomassoziation feststellen, wird funktionelles Sodbrennen diagnostiziert (Galmiche et al. 2006).

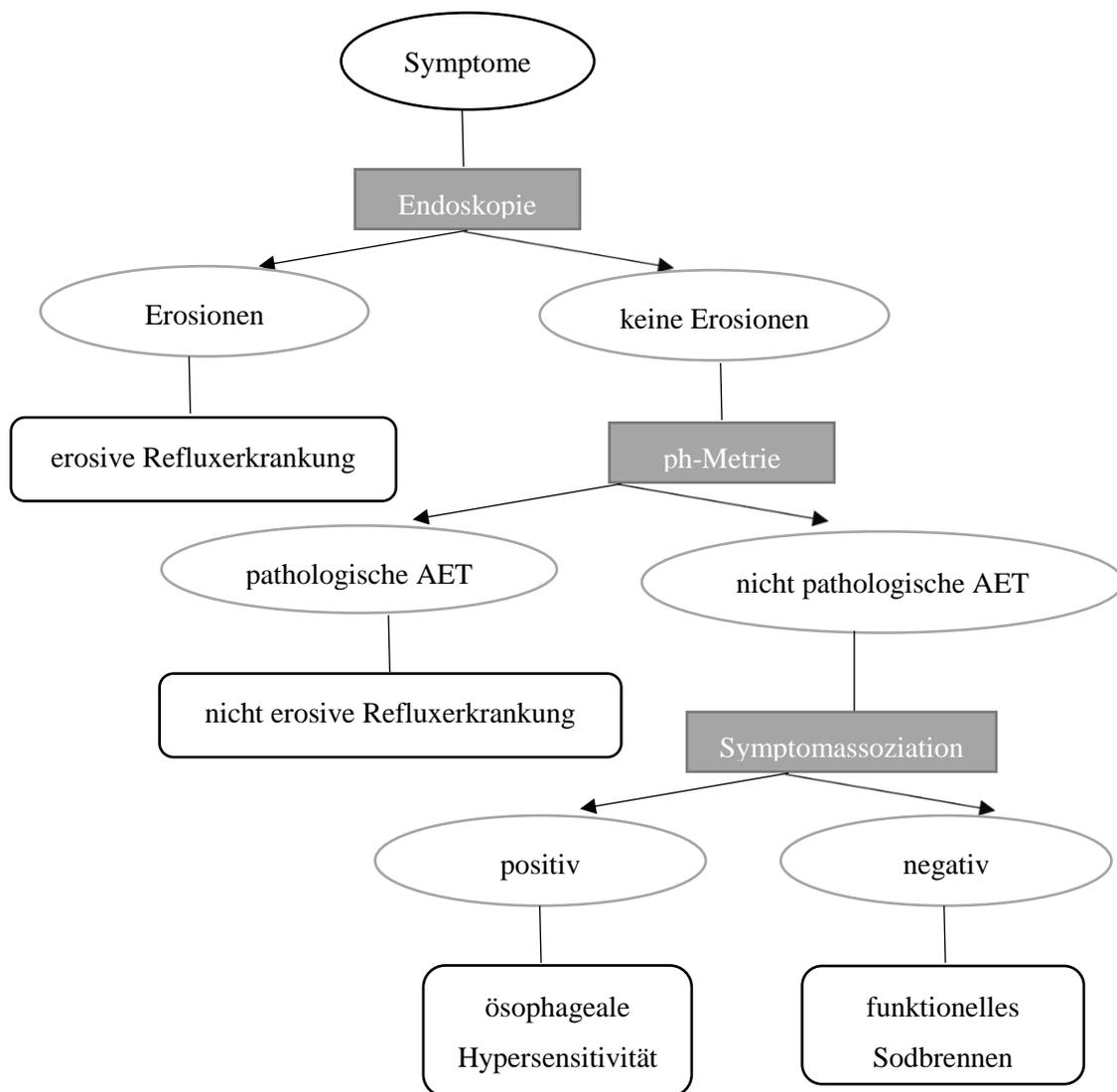


Abbildung 6: Definition der Entitäten der GERD entsprechend der Rome III Kriterien (nach Galliche 2006)

Patienten mit typischen Symptomen einer GERD werden mittels ÖGD untersucht. Haben sie eine Refluxösophagitis wird die Diagnose ERD gestellt. Bei makroskopisch unauffälliger Schleimhaut sollte eine Funktionsdiagnostik (ph-Metrie, MII-pH) erfolgen. Ist diese auffällig wird die Diagnose NERD gestellt. Bei unauffälliger Funktionsdiagnostik wird eine Symptomassoziation durchgeführt. Ist diese positiv, wird die Diagnose ÖH gestellt, ist sie negativ ergibt sich die Diagnose FH.

Zur Diagnostik der gastroösophagealen Refluxkrankheit veröffentlichte das American College of Gastroenterology (ACG) 2005 eine Leitlinie (DeVault et al. 2005), welche 2014 in der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten in ähnlicher Weise herausgegeben wurden. Darin empfehlen die Autoren für Patienten, die unter typischen GERD Symptomen (Sodbrennen, Regurgitation, nicht kardialer

Thoraxschmerz) leiden, eine probatorische Therapie mit einer säuresuppressiven Medikation. Es kommen in erster Linie Protonenpumpeninhibitoren (PPI) für 4-8 Wochen zum Einsatz. Kommt es darunter zu einer subjektiven Besserung, wird die Diagnose der GERD als bestätigt gesehen. Im Verlauf wird dann eine Dosisreduktion bis hin zu bedarfsadaptierter Medikation empfohlen.

Ohne Besserung der Symptome sollte eine ÖGD (Ösophagogastroduodenoskopie) ohne PPI Medikation durchgeführt werden. Dabei ist eine makroskopische Beurteilung und somit Einteilung in NERD oder ERD gemäß der Los Angeles Klassifikation möglich. Eine Arbeitsgruppe um Armstrong zeigte bereits 1996, dass die Endoskopie die sensitivste Methode zur Diagnose einer ERD ist (*Armstrong et al. 1996*). Eine routinemäßige Entnahme von Schleimhautbiopsien aus dem distalen Ösophagus in den Leitlinien nicht empfohlen.

Wenn endoskopisch keine Erosionen nachweisbar sind, sollte eine pH-Metrie als kontinuierliche 24h pH-Messung erfolgen. In der aktuellen deutschen Leitlinie wird die Durchführung einer multikanalen intraluminalen Impedanzmessung (MII-pH) empfohlen, falls diese verfügbar ist. Die MII-pH weist im Vergleich zur klassischen pH-Metrie eine höhere diagnostische Sensitivität auf (*Savarino et al. 2011*). Die Methode der MII-pH ermöglicht die Detektion von Refluxepisoden als retrograde Bolusbewegungen (*Sifrim 2006*). Diese werden nach dem pH-Wert in saure ($\text{pH} < 4$), schwach saure ($\text{pH} 4 - 7$) und alkalische Refluxepisoden ($\text{pH} > 7$) weiter unterschieden. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch schwach saurer und basischer Reflux in nicht unerheblichem Maße auftreten, wobei manche Patienten sogar ausschließlich schwach saure oder alkalische Refluxepisoden aufweisen (*Sifrim et al. 2001*).

Bei der MII-pH wird eine Sonde mit 7 Impedanzsensoren und 1-2 pH-Elektroden nasoösophagogastral eingeführt. Anhand der Impedanzunterschiede an den einzelnen Messpunkten, lässt sich ein Reflux, welcher zunächst Impedanzunterschiede an den distalen Messpunkten auslöst, von einem geschluckten Bolus, der zuerst die proximalen Messpunkte passiert, unterscheiden. Außerdem sind die Bestimmung von ösophagealer Verweildauer und pH-Wert des Refluxats möglich. Der Patient soll während der Untersuchungsdauer über einen Rekorder Start und Ende von Nahrungsaufnahmen sowie seine Symptome eingeben. Dadurch wird ersichtlich, ob der Patient eher unter postprandialen oder von der Nahrungsaufnahmen unabhängigen Reflux leidet. Außerdem soll der Untersuchte zeitlich genau das Auftreten von Symptomen dokumentieren, damit im Anschluss an die Untersuchung mittels SI und SAP die Symptomassoziation ermittelt werden kann.

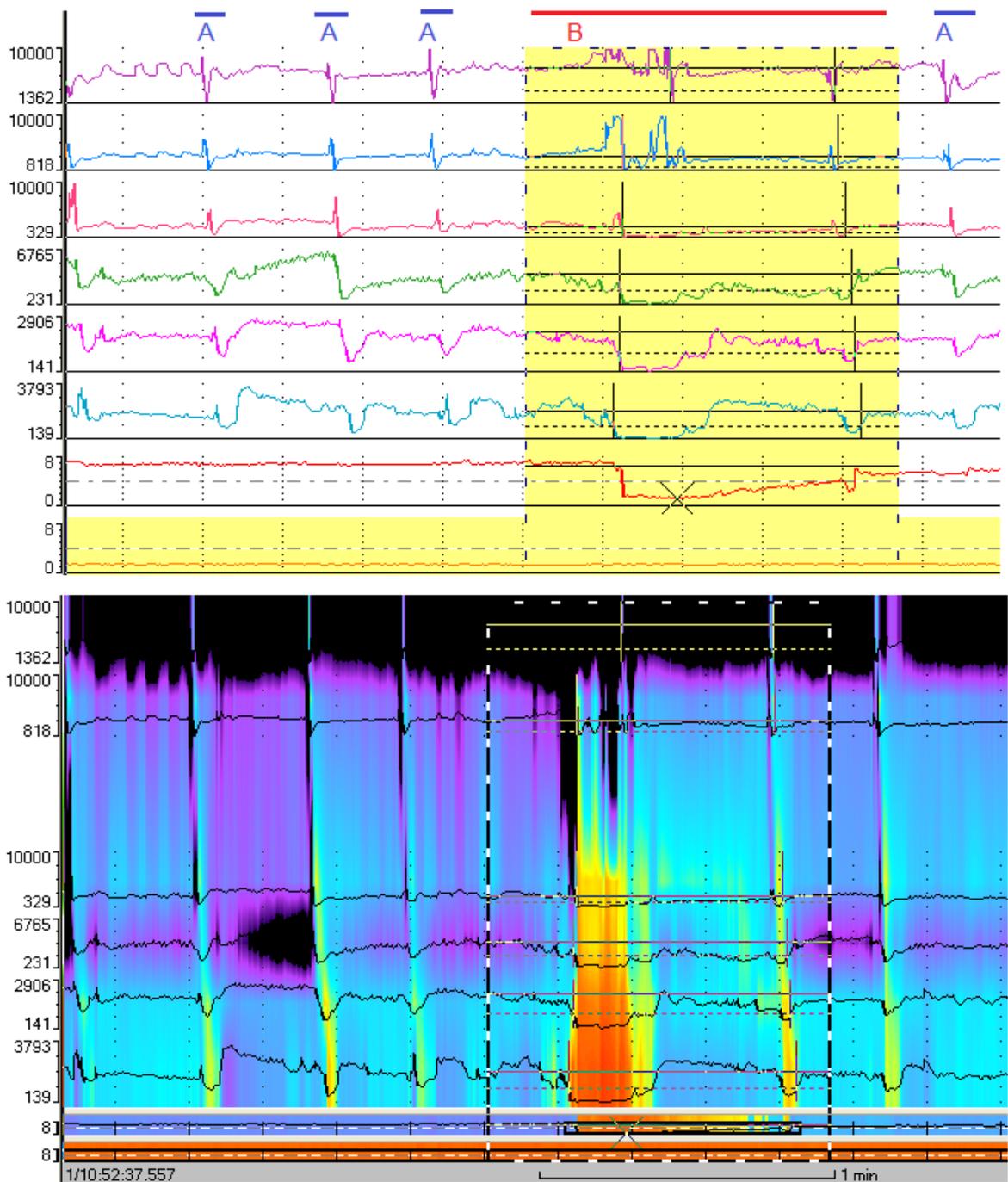


Abbildung 7: MII-pH

Diese Abbildung zeigt eine Refluxepisode, wie sie typischerweise in der MII-pH aufgezeichnet wird (B). Anhand der zeitlichen Abfolge des Abfalls des Impedanzniveaus um $<50\%$ des Ausgangswertes wird eine Refluxepisode als oral gerichtete Bolusbewegung definiert. Die Refluxepisode endet mit einer aboral gerichteten Bolusbewegung. Die mit A gekennzeichneten Impedanzschwankungen zeigen Schluckreflexe. Die Darstellung erfolgt mit linearem Impedanzverlauf jeder einzelnen Messsonde und im zweiten Bild farblich kodiert für eine optisch schnellere Erkennbarkeit.

Vor allem durch die diagnostische Möglichkeit der MII-pH konnte gezeigt werden, dass auch nicht saurer Reflux mit $\text{pH} > 4$ zu typischen GERD-Symptomen führen kann (*Sifrim et al. 2004, Agrawal et al. 2009, Vela et al. 2001, Sifrim et al. 2001, Bredenoord et al. 2006*). Bis zu 40% der Patienten leiden auch unter adäquater säuresuppressiver Therapie unter Refluxbeschwerden (*Dean et al. 2004*).

Im gastroösophagealen Refluxat können außerdem andere Inhalte des Magens, wie die Peptidase Pepsin, enthalten sein (*Sifrim et al. 2007*). Als duodenogastroösophagealer Reflux können duodenale Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin oder Elastase, die ihre größte Aktivität bei neutralen pH-Werten entfalten (*Sifrim et al. 2007*), vorkommen und in Kontakt mit der Ösophagusschleimhaut treten. Dieser duodenogastroösophageale Reflux ist als so genannter schwach saurer Reflux mit einem pH-Wert von 4-7 gekennzeichnet und kann pathophysiologisch ebenfalls bei der Entstehung sowohl der mukosalen Veränderungen bei GERD-Patienten als auch für die Symptomenentstehung von Bedeutung sein (*Castell 2008*).

Bei ausbleibender Besserung der Symptome unter PPI Therapie kann also ein nicht- oder schwach-saurer Reflux die pathophysiologische Ursache sein. Unter PPI Therapie über 8 Wochen klagen noch zwischen 26 und 39% der Patienten über persistierende Symptome (*Katz et al. 2006*) und die Frage nach diesem Pathomechanismus ist weitgehend ungeklärt. Als weitere Ursachen für therapierefraktäre Beschwerden werden eine inadäquate Säuresuppression des Magens (*Furuta et al. 2002, Furuta et al. 2009*) sowie eine eingeschränkte Compliance der Patienten herangezogen (*Fass et al. 2005*).

Während für säureexponierte Schleimhaut ein klares pathogenetisches Konzept in der Literatur vorliegt, bleibt die Frage, auf welchem Wege nicht-saurer Reflux die Symptome verursacht, bisher unbeantwortet.

1.1.4 Therapie

Die Therapie der GERD ist abhängig von der klinischen Ausprägung. Für die Therapie der Patienten mit NERD einigten sich Experten der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten in ihrer Leitlinie von 2005 auf das therapeutische Ziel der Symptomfreiheit. Abgesehen von Allgemeinmaßnahmen wie zum Beispiel die Erhöhung des Bettkopfes, diätetische Maßnahmen bei Nahrungsmittelunverträglichkeit und Gewichtsreduktion bei übergewichtigen Patienten stehen die Protonenpumpeninhibitoren

als primäre medikamentöse Therapieoption im Vordergrund. In der Akuttherapie der ERD steht ebenfalls die Symptomlinderung im Vordergrund. Es kommen die gleichen Maßnahmen wie bei NERD zum Einsatz. Bei der ERD wird als Sekundärziel der Abheilung der Läsionen formuliert. Eine probatorische Protonenpumpen hemmende Therapie empfiehlt sich ebenfalls bei Verdacht auf extraösophageale Beschwerden wie z.B. Husten, Laryngitis oder nicht-kardialen Thoraxschmerz (*Koop et al. 2005*).

Die Therapie sollte bis zum vollständigen Abklingen der Symptome beibehalten werden und kann dann reduziert oder als Bedarfsmedikation fortgeführt werden. Bei Nicht-Ansprechen ist eine Erhöhung der Dosis und gegebenenfalls eine abendliche Dosis zu erwägen (*Tytgat 2006*).

Die operative Therapie im Sinne einer Fundoplikatio sollte bei Vorliegen einer Hiatushernie, bei ausgeprägter Regurgitation oder bei Ablehnung einer medikamentösen Therapie in Erwägung gezogen werden. In diesem Fall verspricht sie eine bessere Erfolgsquote als die konservative Therapie (*Elakkary et al. 2008*).

In der im Jahr 2014 aktualisierten Leitlinie der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) zur gastroösophagealen Refluxerkrankung wird der oben genannte therapeutische Weg erneut empfohlen.

Zusammenfassend steht bei eindeutiger Klinik, das heißt bei typischen Refluxsymptomen, die empirische PPI-Therapie an erster Stelle. Bei nicht eindeutiger Klinik oder Alarmsymptomen wie Globusgefühl, respiratorischen Symptomen, retrosternalen Beschwerden oder mehrjähriger Symptomatik wird eine primäre endoskopische Diagnostik empfohlen. Bei Therapieversagen sollte in jedem Fall eine erweiterte Diagnostik inklusive Endoskopie und Funktionsdiagnostik (pH-Metrie oder MII-pH) erfolgen.

Langzeitziel der Therapie bei NERD und ERD LA A und B bleibt die Symptomkontrolle. Bei ERD wird die Abheilung von Läsionen und bei höhergradigen Erosionen die Prophylaxe von Komplikationen angestrebt.

Der therapeutische Algorithmus bei funktionellem Sodbrennen (FH, funktional Heartburn) konnte bisher nicht evidenzbasiert in Leitlinien festgelegt werden. Trizyklische Antidepressiva und Serotoninwiederaufnahmehemmer (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI) werden in der klinischen Praxis zusammen mit PPI bei Patienten mit FH verschrieben. Atluri et al. konnten in einem Review aus dem Jahr 2015 keine signifikante Überlegenheit von SSRI gegenüber Placebo bei der Therapie des nicht-kardialen Thoraxschmerzes (non cardiac chest pain) zeigen (*Atluri et al. 2015*). Kharilas,

Boeckxstaens und Smout schlagen bei therapierefraktären Patienten eine exakte Reevaluation der Symptome vor. Es sollen andere Differentialdiagnosen, wie eosinophile Ösophagitis oder eine infektiöse Genese, sicher ausgeschlossen werden. Wenn die Diagnose FH bestätigt wird, sollte eine Therapie mit niedrig dosierten Antidepressiva erfolgen (Kahrilas, Boeckxstaens, Smout 2013), da bei diesen Patienten von einer peripheren, viszeralen Hypersensitivität für die Pathogenese ausgegangen wird, die durch diese Medikamente positiv moduliert wird. Die Wirksamkeit der Hypnosetherapie bei FH konnte nachgewiesen werden und könnte eine additive Therapieoption vor allem für lange Zeit therapierefraktäre Patienten sein (Riehl und Keefer 2015).

1.1.5 Veränderungen der ösophagealen Mukosa bei GERD

In Biopsien der Ösophagusschleimhaut von NERD-Patienten können mikroskopische Auffälligkeiten, wie dilatierte Interzellularspalten, Basalzellhyperplasie und Papillanelongation, nachgewiesen werden (Fiocca et al. 2010, Yerian et al. 2011, Weigt et al. 2007).

Es kommt zur Papillanelongation und Basalzellhyperplasie, die bereits 1970 von Ismail-Beigi beschrieben wurden. Die Papillen dienen der Verzahnung des Epithels im Bindegewebe und ihre Länge beträgt in gesunder Lamina propria rund 20-30% der Gesamtdicke, das entspricht 150-200 µm. Bei GERD Patienten kann die Länge der Papillen auf bis zu 60% der Epitheldicke ansteigen (Bove et al. 2005).

In gesunder Mukosa beträgt die Dicke der Basalzellschicht 5% des gesamten Epithels und bei GERD Patienten steigt sie auf bis zu 20% der Epitheldicke an (Bove et al. 2005 und Vieth et al. 2004). Diese Veränderungen nehmen mit dem Grad der Refluxerkrankung zu, das heißt, sie finden sich nicht bei Gesunden, in geringem Maß bei NERD Patienten und in steigendem Ausmaß bei ERD Patienten mit zunehmendem Grad nach der Los Angeles Klassifikation (Vieth et al. 2004).

Bei Patienten mit GERD kommt es charakteristischerweise zu einer Erweiterung der Interzellularspalten. Diese Veränderung sind bei Patienten mit funktionellem Sodbrennen nicht nachzuweisen (Kandulski et al. 2007).

In der Schleimhaut von Patienten mit GERD lassen sich intraepitheliale Entzündungszellen nachweisen. Neben neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Zentilin et al. 2005) treten

auch Lymphozyten und Plasmazellen (Vieth *et al.* 2005) auf. Diese Immunzellen finden sich nicht oder kaum in gesunder ösophagealer Mukosa.

Diese Veränderungen sind durch eine Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren zum Teil reversibel (Vieth *et al.* 2006, Bove *et al.* 2005 und Calabrese *et al.* 2005).

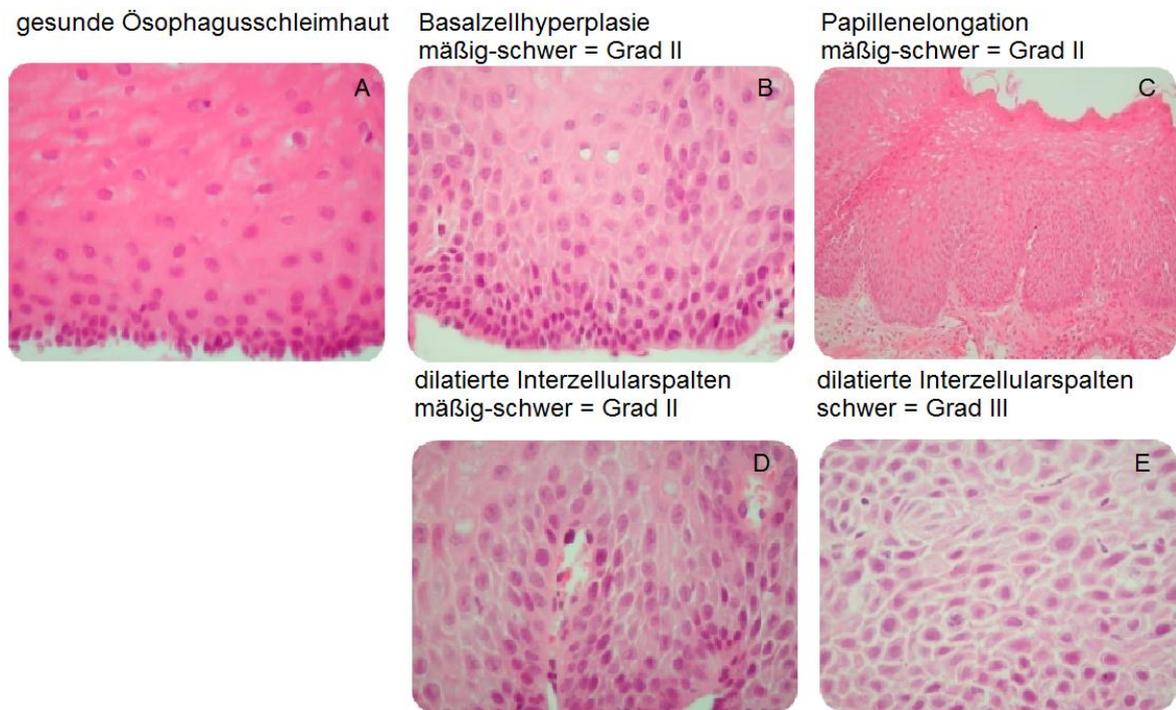


Abbildung 8: histologische Darstellung der Ösophagusschleimhaut

Diese Abbildung zeigt Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte der Ösophagusschleimhaut zur exemplarischen Demonstration der Papillanelongation (C), Basalzellhyperplasie (B), sowie dilatierte Interzellulargaps (D, E) im Vergleich zu gesunder Ösophagusschleimhaut (A).

1.2 Protease aktivierte Rezeptoren und Cathepsin G

1.2.1 Charakterisierung Protease aktivierter Rezeptoren

Die Protease aktivierten Rezeptoren (PAR) gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Adams *et al.* 2011). Sie bestehen aus 7 Transmembrandomänen, einem intrazellulären C-Terminus und einem extrazellulären N-Terminus.



Abbildung 9: Schematische Darstellung der molekularen Struktur PAR4

Die Abbildung zeigt schematisch einen 7-Transmembrandomänenrezeptor. Die römischen Zahlen I-VII beziffern die Transmembrandomänen. Intrazellulär liegt der C-Terminus der Aminosäurekette und extrazellulär befindet sich der N-Terminus mit dem gebundenen Liganden.

Durch Proteolyse der extrazellulären, N-terminalen Aminosäuresequenz kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass die freigelegte Aminosäuresequenz als gebundener Ligand ("tethered Ligand", Vu et al. 1991) zur Rezeptoraktivierung führt. Unterschiedliche Proteinasen führen an definierten Sequenzen zu proteolytischer Spaltung und Aktivierung unterschiedlicher PARs. Bevorzugt können Serinproteasen die Rezeptoren der PAR-Familie aktivieren (Déry et al. 1998). Dazu gehören beispielsweise Trypsin, Chymotrypsin, Cathepsine oder Thrombin. Aber auch andere Proteasen können den extrazellulären Aminosäurerest des PAR spalten und somit zur Rezeptoraktivierung führen. Erstmals beschrieben wurden die Protease aktivierten Rezeptoren im Rahmen der Gerinnungskaskade. Eine vaskuläre Expression von PAR4 führt durch eine Thrombin vermittelte Aktivierung zur Steigerung der Plättchenaggregation.

1.2.2 Protease aktivierte Rezeptoren PAR1 – PAR3

Es konnten vier unterschiedliche Protease aktivierte Rezeptoren geklont und charakterisiert werden. Nach der Reihenfolge ihrer Sequenzierung und Klonierung wurden sie PAR1 bis PAR4 genannt. Da eine vollständige Darstellung aller bisher bekannten Daten über alle Protease aktivierten Rezeptoren den Umfang der Dissertationsarbeit überschreitet, werden im Folgenden exemplarisch wichtige und themenbezogene Kernaussagen aufgegriffen.

Die Expression von PAR1 und PAR2 konnte in unterschiedlichen Malignomen nachgewiesen werden. Sie werden häufig koexprimiert und scheinen eine Rolle in der Tumorgenese zu spielen, können ebenso aber auch Angriffspunkt für zukünftige Therapien sein (*Elste & Petersen 2010, Fujimoto 2010, Zhang et al. 2011*).

Für PAR1 und vor allem für PAR2 sind immunmodulatorische Effekte beschrieben worden. PAR2 wird in unterschiedlichen Zelltypen der Haut exprimiert (*Steinhoff et al. 1999*) und seine Aktivierung führt zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege (*Buddenkotte et al. 2005*).

Eine Aktivierung von PAR2 unterhält die chronische Entzündung bei Arthritis durch die Freisetzung entzündlicher Mediatoren (*Ferrell et al. 2003*). Eine ähnliche Funktion wurde auch für PAR1 nachgewiesen. PAR1 defiziente Mäuse hatten weniger schwere Arthritisverläufe als Wildtypmäuse (*Yang et al. 2005*).

PAR2 wird im Plattenepithel der ösophagealen Schleimhaut exprimiert und kann durch Trypsin, das in duodenogastroösophagelem Reflux enthalten ist, aktiviert werden. Daher vermutete eine Arbeitsgruppe um Inci eine Funktion in der Pathogenese von GERD (*Inci et al. 2009*). Die Rolle von PAR2 bei GERD untersuchten Kandulski et al. in einer 123 Patienten umfassenden Studie und durch weiterführende in-vitro Versuche. Hierbei konnte eine deutlich gesteigerte PAR2 Expression bei GERD Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Die Expression von PAR2 stieg in den in-vitro Untersuchungen mit fallendem pH-Wert (*Kandulski et al. 2010*). Souza postuliert sogar, dass PAR2 in Zukunft ein molekularer Angriffspunkt in der Therapie der Refluxbeschwerden vor allem bei PPI refraktären Patienten darstellen kann (*Souza 2010*).

Über PAR3 ist bekannt, dass er nicht als eigenständiger Rezeptor agiert, sondern mit PAR1 oder PAR4 koexprimiert wird und mit diesen auf der Zelloberfläche dimerisiert. PAR3 bildet einen Kofaktor für die Thrombin vermittelte PAR4 Aktivierung (*Nakanishi-Matsui et al. 2000*) und gemeinsam mit PAR1 bildet PAR3 ein Heterodimer, das eine stärkere PAR1 Funktion zur Folge hat (*Mc Laughlin et al. 2007*).

1.2.3 Protease aktivierter Rezeptor Typ 4

Die funktionelle Bedeutung von PAR4 wurde in verschiedenen Organ- und Zellsystemen untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die PAR4 abhängige Mechanismen sich entsprechend des exprimierenden Zelltyps unterscheiden. Diese Mechanismen können je nach Zelltyp sogar gegensätzlich sein. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die bisher untersuchte zelluläre Expression und Funktion von PAR4.

Bezogen auf den Gastrointestinaltrakt wurde PAR4 bisher vor allen in Malignomen untersucht. Die PAR4-Expression ist bei Patienten mit Magenkarzinom im Vergleich zu gesunder Mukosa vermindert (*Zhang et al. 2011*). Die Arbeitsgruppe um Gratio et al. konnte die Expression von PAR4 beim Kolonkarzinom nachweisen. Ein Vergleich mit gesunden Kontrollen erfolgte nicht (*Gratio et al. 2009*). Die Expression in gesunder Kolonschleimhaut wurde 2004 in einem Rattenmodell nachgewiesen. Hier führte eine PAR 4 Aktivierung zur Kontraktion longitudinaler Muskulatur (*Mulé et al. 2004*). Eine verstärkte Koexpression von PAR 4 und Cathepsin G fand sich bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (*Debak et al. 2009*). Die Freisetzung von Cathepsin G mit nachfolgender PAR4 Aktivierung wird in diesem Zusammenhang mit der Induktion und Aufrechterhaltung der mukosalen Entzündung diskutiert.

In vitro führt eine PAR4 Aktivierung in maligne entarteter Kolonmukosa zur Internalisierung und intrazellulären Phosphorylierung des Wachstumsfaktors ErB-2 (*Gratio et al. 2009*). Arachiche et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass die Aktivierung von PAR4 in Thrombozyten zur Kalziummobilisation über einen Gq-Signalweg führt (*Arachiche et al. 2013*). Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) dienen zur intrazellulären Signaltransduktion. PAR4 aktiviert den Gq-Signalweg mit nachfolgender Aktivierung der Phospholipase C. Die daraus resultierende Kalziummobilisation publizierte die Arbeitsgruppe um Nakanishi-Matsui im Jahr 2000 als eine mögliche Folge der PAR4-Aktivierung (*Nakanishi-Matsui et al. 2000*). In einem Zellmodell mit Neuronen aus Spinalganglien fanden sich Hinweise für die Aktivierung des cAMP/PKA Signalweges durch PAR4-Aktivierung (*Chen et al. 2013*). Weitere Untersuchungen zur intrazellulären Signalkaskade nach PAR4-Aktivierung wurden bisher nicht veröffentlicht.

Tabelle 2: Übersicht über die Expression und Funktionen von PAR4 in unterschiedlichen Geweben

Organ-system	Zelltyp	Funktion	Quelle
kardio-vaskulär	koronare Endothelzellen	konstitutionell nicht exprimiert, Induktion der PAR4 Expression durch entzündliche Prozesse. Gefäßrelaxation durch PAR4 Aktivierung	<i>Hamilton et al. 2001</i>
	vaskuläre Endothelzellen	konstitutionelle Expression von PAR4, Steigerung der Plättchenaggregation durch Thrombin vermittelte Aktivierung	<i>Kahn et al. 1999</i>
respiratorisches System	Epithelzellen	konstitutionell exprimiert, profibrotische Mechanismen durch verstärkte Transformation von Epithel- in Mesenchymzellen	<i>Ando et al. 2007</i>
	Fibroblasten	konstitutionell exprimiert, Hemmung der PAR1 vermittelten Fibrosierung	<i>Ramachandran et al. 2007</i>
zentrales und peripheres Nervensystem	Astrozyten, Neurone, Mikroglia	Ubiquitäre Koexpression mit Serinproteasen. Aktivierung führt zur Verstärkung der Neuroinflammation (TNF α , Substanz P, Calcitonin Gene Related Peptide)	<i>Ramachandran et al. 2012; Suo et al. 2003</i>
	Neuronen in Spinalganglien	Koexpression mit Calcitonin Gene Related Peptide und Substanz P, die PAR 4 Aktivierung führt zu einer Erhöhung der Schmerzschwelle durch Hemmung der Kalziummobilisation, in normalem wie inflammatorischem Setting	<i>Asfaha et al. 2007</i>
	Rattenmodell, Spinalganglien	gesteigerte PAR4 und PAR2 Expression in Spinalganglien bei unter Knochentumorschmerzen leidenden Tieren	<i>Bao et al. 2005</i>
	Mausmodell, Kolon	PAR4 Aktivierung hat antinozizeptive Effekte bei kolorektaler Dehnung	<i>Annaházi et al. 2012</i>
Gastro-intestinal-trakt	Gastrale Mukosa	die PAR4 Expression im Magenkarzinom ist im Vergleich zur gesunden Mukosa vermindert	<i>Zhang et al. 2011</i>
	Kolonmukosa	PAR4 und Cathepsin G Überexpression bei Colitis ulcerosa	<i>Dabek et al. 2009</i>

	Kolonmukosa	Patienten mit Reizdarmsyndrom haben eine verminderte PAR4 Expression im Vergleich zu Gesunden	<i>Zhao et al. 2011</i>
	Kolonkarzinomzellen	PAR4 Aktivierung trägt zu ErbB-2 Phosphorylierung und Tumorprogression bei	<i>Gratio et al. 2009</i>
	Rattenmodell, Mukosa und Submukosa	PAR4 ist konstitutionell im Rattenkolon exprimiert, seine Aktivierung führt zu Kontraktion longitudinaler Muskulatur	<i>Mulé et al. 2004</i>
Immunsystem	Mausmodell, neutrophilen Granulozyten	Inhibition des PAR4 Signalweges auf neutrophilen Granulozyten senkt die Rate an Multiorganversagen bei SIRS	<i>Slofstra et al. 2007</i>
	Mausmodell	PAR4 defiziente Mäuse fehlt die Tissue Factor induzierte Inflammation	<i>Busso et al. 2008</i>

1.2.4 Cathepsin G und seine Interaktion mit PAR4

Cathepsin G ist eine Serinprotease mit Funktionen ähnlich dem Trypsin und Chymotrypsin (*Conus and Simon 2008*).

Cathepsin G wird bei der Degranulation von neutrophilen Granulozyten freigesetzt, welche entscheidend an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (*Korkmaz et al. 2007*).

Den verschiedenen Cathepsinen werden unterschiedliche Funktionen im menschlichen Organismus zugeschrieben und sie werden durch unterschiedliche Zelltypen freigesetzt. Sie spielen eine bedeutende Rolle während der Immunantwort und damit bei der Genese verschiedener inflammatorischer Erkrankungen (*Conus & Simon 2008*). Für Cathepsin G ist eine Beteiligung in der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, bei Morbus Crohn, der rheumatoiden Arthritis sowie der zystischen Fibrose nachgewiesen worden.

Für die inflammatorische Veränderung der Mukosa bei GERD liegen für Cathepsin G keine Daten vor. Aus anderen entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes ist eine Beteiligung von PAR4 bekannt (Überexpression bei Colitis ulcerosa, *Debak et al. 2009*). Die PAR4-Aktivierung in Kolonmukosa durch Cathepsin G trägt zur Inflammation bei Colitis

ulcerosa bei. Für die Bedeutung von PAR4 für entzündliche Prozesse der Mukosa bei der gastroösophagealen Refluxerkrankung ist bisher jedoch nur wenig bekannt.

1.3 Neuronaler Marker PGP9.5

Bei PGP 9.5 (Protein gene product 9.5, auch UCHL1 (Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1 (Ubiquitin Thiolesterase))) handelt es sich um ein Protein kodierendes Gen, wobei dieses ausschließlich in Neuronen exprimiert wird. PGP9.5 wird somit als Marker für neuronale Zellpopulationen eingesetzt.

Außerdem wird PGP9.5 in Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems exprimiert. Fehlfunktionen sind assoziiert mit neurologischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Formen der progressiven Neurodegeneration.

Über die Expression von PGP9.5 in der Ösophagusschleimhaut sind bisher wenige Daten publiziert. Patienten mit GERD scheinen eine verstärkte Expression aufzuweisen, was als verstärkte nervale Innervation der Mukosa interpretiert wird (*Bhat und Bielefeldt 2006*).

1.4 Fragestellungen und Aufgaben der Promotionsarbeit

Bereits durchgeführte Untersuchungen zu PAR4 im Zusammenhang mit Inflammation und vor allem den im Kolon beschriebenen Zusammenhängen zwischen PAR4 und Cathepsin G (*Dabek et al. 2009*) zeigen, dass PAR4 bei entzündlichen Erkrankungen im Gastrointestinaltrakt regulatorisch beteiligt ist.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse ergaben sich die Fragen, die in dieser Promotionsarbeit bearbeitet werden sollten:

- Wird PAR4 in der humanen Ösophagusschleimhaut exprimiert?
- Unterscheidet sich die Expression in der Schleimhaut von Patienten mit GERD von Patienten mit FH?
- Findet sich bei Patienten mit GERD oder FH gleichzeitig eine gesteigerte Expression von Cathepsin G?

- Zeigen Patienten mit GERD eine vermehrte Innervation der Ösophagusk Mukosa, die zu viszeraler Hypersensitivität und zur Symptomenentstehung beitragen kann?
- Gibt es Unterschiede der PAR4, Cathepsin G und PGP9.5 Expression zwischen Patienten mit erosiver und nicht erosiver Refluxösophagitis auf der einen und Patienten mit funktionellem Sodbrennen auf der anderen Seite?

Diese Fragen sollten mithilfe folgender Untersuchungen beantwortet werden:

- Analyse der Expression von PAR4 in Biopsien ösophagealer Mukosa von an GERD erkrankten Patienten und an gesunden Kontrollen.
- Analyse der PAR4 Genexpression in unterschiedlichen humanen Zellmodellen (Ösophagusepithelzelllinien KYSE150, -450, PBMCs).
- Analyse der Expression von Cathepsin G in Biopsien ösophagealer Mukosa von an GERD erkrankten Patienten und an gesunden Kontrollen.
- Analyse der Expression von PGP9.5 als neuronaler Marker in Biopsien ösophagealer Mukosa von an GERD erkrankten Patienten und an gesunden Kontrollen.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign und Patientencharakterisierung

Für diese Studie liegt ein positives Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Otto von Guericke Universität entsprechend der Deklaration von Helsinki und den Richtlinien für „Good Clinical Practice“ (Numer 30/08) vor.

Prospektiv wurden Patienten mit typischen GERD Symptomen entsprechend der Montreal Klassifikation eingeschlossen. Der Einschluss erfolgte nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis durch die Patienten. Es wurden grundsätzlich nur volljährige Patienten eingeschlossen.

Als Ausschlusskriterien galten das Vorhandensein eines Malignoms oder eines Barrett-Ösophagus. Außerdem wurden Patienten, die bereits im ösophagogastralen Bereich operiert wurden oder die an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden, nicht eingeschlossen. Die Probanden wurden gebeten, eine gegebenenfalls bestehende säuresuppressive Medikation mindestens 2 Wochen vor der Untersuchung abzusetzen.

Die Symptome der Patienten wurden mittels Reflux Disease Questionnaire (RDQ, siehe 2.2) erfasst und so objektiviert. Alle Patienten wurden endoskopisch mittels Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD, siehe 2.3) untersucht, bei der Schleimhautbiopsien 3-5cm oberhalb des gastroösophagealen Überganges entnommen wurden. Diese wurden in der Pathologie durch Frau Prof. Dr. Dörthe Jechorek histologisch aufgearbeitet und untersucht. Außerdem wurde bei jedem Patienten eine MII-pH (siehe 2.5) im Anschluss an die ÖGD durchgeführt.

Entsprechend der Ergebnisse der Endoskopie und MII-pH wurden sie in drei Gruppe eingeteilt:

- i. ERD: Sichtbare Erosionen in der ÖGD, Einteilung nach Los Angeles Klassifikation
- ii. NERD: bei unauffälliger ÖGD aber pathologischem gastroösophagealem Reflux in der MII-pH (einschließlich ÖH)
- iii. FH: bei unauffälliger ÖGD und unauffälliger MII-pH (Ausschluss eines pathologischen gastroösophagealen Refluxes und fehlende Symptomassoziation)

Zusätzlich wurden Patienten ohne GERD-Symptome, ohne Pathologien oder Affektionen im oberen Gastrointestinaltrakt und ohne säuresuppressive Medikation als Kontrollgruppe eingeschlossen.

2.2 Symptomevaluation mittels standardisiertem Fragebogen (RDQ)

Die Symptome wurden mittels standardisiertem Fragebogen erfasst. Der Reflux Disease Questionnaire (RDQ) ist ein zur Charakterisierung der Refluxkrankheit evaluierter Fragebogen (Shaw et al. 2008). Er wurde von einer Arbeitsgruppe um Shaw entwickelt und besteht aus 12 Fragen zu Häufigkeit und Schweregrad der Symptome (Shaw et al. 2001).

Tabelle 3: *Reflux Disease Questionnaire, RDQ (nach Zavala-Gonzales et al.2014, Shaw et. al 2008)*

Fragen	Symptomhäufigkeit in Tage/ Woche			
	0	1	2 - 3	4 - 7
Wie oft fühlen Sie ein Brennen hinter dem Brustbein (Sodbrennen)?	0	1	2	3
Wie oft spüren Sie den Rückfluss flüssiger/ fester Nahrung in den Rachen/ Mund?	0	1	2	3
Wie oft haben Sie Schmerzen im Oberbauch?	3	2	1	0
Wie oft leiden Sie unter Erbrechen?	3	2	1	0
Wie oft leiden Sie wegen Sodbrennen oder Regurgitation unter Schlafstörungen?	0	1	2	3
Wie oft nehmen Sie zusätzlich zu den vom Arzt verordneten Medikamenten welche wegen Sodbrennen/ Regurgitation ein?	0	1	2	3

2.3 Ösophagogastrroduodenoskopie und Biopsieentnahme

Die ÖGD wurde nach mindestens 12 stündiger Nahrungskarenz unter Sedierung mit Midazolam (Dormicum V® 5 mg/ml; Roche Deutschland Holding GmbH, Penzberg, Germany) und/ oder 1%igem Propofol (PropofolLipuro® 10 mg/ml; Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) mit einem Standardvideogastroskop (GIFQ180, Olympus Optical Europe, Hamburg, Germany) durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte durch Videoaufnahme und digitale Fotodokumentation der Bildbefunde. Es wurden jeweils 2 Biopsien für molekulare Analysen und für die histologische Untersuchung 3 bis 5 cm proximal der Z-Linie außerhalb sichtbarer Läsionen mittels einer Biopsiezange entnommen. Die Proben wurden sofort nach Entnahme in einem Kryoröhrchen trocken in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Biopsien zur histologischen Auswertung wurden in Formalin für die weitere histopathologische Analyse an das Institut für Pathologie (Frau Prof. Dr. Dörthe Jechorek) versandt.

2.4 Histopathologische Analyse der Ösophagusschleimhaut

Die histologische Untersuchung erfolgte im Rahmen der klinischen Diagnostik und wurde durch Frau Prof. Dr. Dörthe Jechorek des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg verblindet durchgeführt.

Die Biopsien wurden nach Transfer in das Institut für Pathologie in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die histologische Auswertung erfolgte entsprechend der Ismail-Beigi-Kriterien. Es wurde das Vorhandensein von erweiterten Interzellularspalten (DIS), Basalzellhyperplasie (BCH) und Papillenelongation (PE) semiquantitativ mit jeweils 0 (keine), 1 (leicht), 2 (mittel) oder 3 (schwer) Punkten beurteilt. Außerdem wurde die Entzündung als Dichte von neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und intraepithelialen Lymphozyten ebenso bewertet. Dann wurden die Punkte der 4 Merkmale addiert, sodass sich eine Summe von 0-12 Punkten ergibt (Summenscore).

Summenscore = Punkte für Basalzellhyperplasie + Punkte für Papillenelongtion + Punkte für dilatierte Interzellularspalten + Punkte für Grad der Inflammation

2.5 Kombinierte Multikanalimpedanz- und pH-Metrie (MII-pH)

Im Anschluss an die ÖGD wurde der MII-pH-Katheter (Sandhill Scientific, Highland Ranch, CO, USA) transnasal eingeführt und platziert, sodass die ösophageale pH-Elektrode 5cm oberhalb des unteren Ösophagussphinkters (LES) lokalisiert war. Die Impedanzelektroden sind so 3, 5, 7, 9, 15 und 17cm oberhalb des LES lokalisiert. Die Patienten wurden aufgeklärt, während des Untersuchungszeitraumes 3 Mahlzeiten zu sich zu nehmen und repräsentativen Tätigkeiten nachzugehen. Für die Einnahme der Mahlzeiten, Körperposition und spezifische Symptome wurden Eventmarker gesetzt. Nach einer Software gestützten automatischen Analyse erfolgte die Kontrolle und Auswertung durch einen erfahrenen Arzt (PD Dr. med. Arne Kandulski).

Ein Abfall des Impedanzniveaus um mindestens 50% mit retrograder Bolusbewegung von distal nach proximal wurde als Refluxepisode definiert. Diese wird durch den pH-Wert als sauer, schwach sauer oder schwach alkalisch charakterisiert. Die Höhe und Änderung des Impedanzniveaus liefert weitere Informationen über die physikalische Beschaffenheit der Refluxepisoden (flüssig, gasförmig, gemischt).

Ein pathologisches Ergebnis der MII-pH-Metrie liegt vor, wenn die Säureexpositionszeit im distalen Ösophagus (acid exposure time, AET, $\text{pH} < 4$) mehr als 4,2% über die gesamte Analysedauer ist. Die Symptomassoziationswahrscheinlichkeit (SAP) und der Symptomindex (SI) wurden für sauren, schwach sauren und schwach alkalischen Reflux erhoben. Danach konnte die Diagnosestellung von NERD und FH erfolgen. Zusätzlich wurde die Anzahl der sauren und nicht-sauren Refluxepisoden erfasst.

2.6 Analyse der Genexpression von PAR4, Cathepsin G und PGP9.5

2.6.1 RNA-Extraktion aus Mukosabiopsien

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mittels des RNeasy-Mini Kit 250 (QIAGEN, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Eliminierung von Verunreinigung durch DNA wurde das RNase free DNase Set 50 (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die bei -80°C auf flüssigem Stickstoff gefrorenen Biopsien wurden auf Eis in 0,5ml TRIZOL-ReagenzTM (Invitrogen) langsam aufgetaut und anschließend mit dem Tissue Ruptor (QIAGEN Instruments AG) homogenisiert. Nach Zugabe von 0,2ml

Chloroform (Fluka Analytical) wurden die Proben über 30 Sekunden „gevortext“ (MS1 Minishaker, IKA Works do Brazil Ltda, IP 21 Laboratory Instruments) und danach über 10 Minuten bei 13000U/min und 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco Heraeus, Kendro Laboratory Products). Der klare Überstand wurde in ein neues RNase-freies Eppendorfgefäß (Multi®-Safe Seal®Tubes, Carl Roth GmbH & Co. KG) überführt und um exakt dasselbe Volumen Isopropanol zur Ausfällung der RNA ergänzt. Nach kurzem Mischen erfolgte die Inkubation für 10 Minuten im Eisbad und ein weiterer Zentrifugationsschritt (13000 x g für 10 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde entfernt und der die Gesamt-RNA enthaltende Bodensatz in 100µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die gereinigte Gesamt-RNA wurde mit RNase freiem Wasser im Verhältnis 1:14 verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C auf flüssigem Stickstoff gefroren. Es erfolgte die photospektrometrische Konzentrationsmessung sowie eine Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Reinheit der RNA.

Material: *TRIZOL®Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 14,3M β-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland), 70%iger Ethanol, Chloroform (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Deutschland), RNeasy-Mini Kit 250 (QIAGEN, Hilden, Deutschland), RNase free DNase Set 50 (QIAGEN, Hilden, Deutschland)*

2.6.2 Photospektrometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Im RNA/ DNA Calculator GeneQuant™ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) erfolgte die photospektrometrische RNA-Messung zur Quantifizierung des RNA-Menge. Jeweils 5µl der hergestellten RNA-Lösung wurden zur RNA-Messung eingesetzt. Es wurde mit RNase-freien Pipetten und Spitzen gearbeitet. Der Nullabgleich erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Mittels Extinktionskoeffizienten und Absorption berechnet der RNA/ DNA Calculator die RNA-Konzentration. Der Reinheitsgrad der RNA lässt sich durch den OD260nm/ OD280nm Koeffizienten beurteilen. Er berechnet sich aus der optischen Dichte des Analysats bei 260nm geteilt durch die optische Dichte des Eluats bei 280nm. Ein Koeffizient zwischen 1,8 und 2,1 spricht für eine qualitativ reine RNA.

Material: *RNA/ DNA Calculator GeneQuant™ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)*

2.6.3 Agarosegelelektrophorese von RNA

Die qualitative Kontrolle der gereinigten RNA erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Dazu wurden 1,8g Agarose in 100ml TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer, siehe Protokoll am Kapitelende) gelöst und in der Mikrowelle (Sharp R2V18) aufgeköcht. Nach kurzem Abkühlen wurden 10µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das noch flüssige Gel in den Gelschlitten gegossen. Nach zirka 30 Minuten und vollständigem Erkalten und Härten des Gels wurde 1x TBE-Puffer zur Überschichtung des Gels in die Elektrophoresekammer gegeben. Anschließend wurden je 5µl der isolierten RNA mit je 1µl Loadingpuffer (5x Loading Dye, Fermentas) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte für zirka 1h bei 100V in der Elektrophoresis Power Supply Kammer (Consort E863, Bio-Rad). Das Ergebnis wurde mit der UV Licht Kamera (E.A.S.Y. RH, Herolap) sichtbar gemacht und fotografiert sowie gedruckt (Mitsubishi CP770DW).

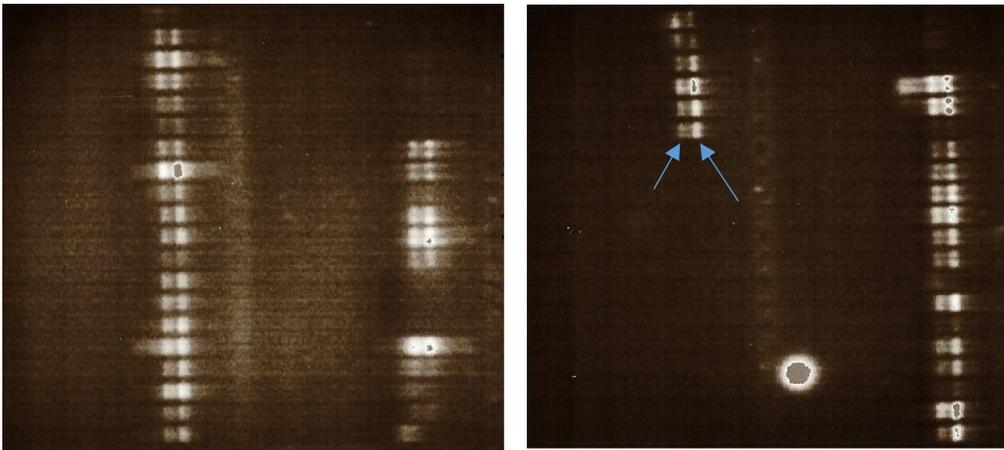


Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese der extrahierten mRNA

Zu sehen sind die Originalbilder, die nach Durchführung der Agarosegelelektrophorese mittels UV Licht Kamera aufgenommen wurden. Die Doppelsonde (markiert mit Pfeilen) stellt die 18S- und 28S-rRNA Banden dar.

TBE-Puffer: 0,09M TRIS/HCL

0,09M Borsäure

2 mM EDTA (Titrierkomplex III 99% 372,24 g/mol, Roth)

Material: Agarose (Bio-Rad, Deutschland), TBE-Puffer, % Ethidiumbromid (10 mg/ml), Loading Puffer (5x Loading Dye, Fermentas), Elektrophoresis Power Supply (Consort E863, Bio-Rad)

2.6.4 Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA aus der Gesamt-RNA der Proben wurde ein standardisiertes Protokoll für die AMV-Reverse Transkriptase (Promega, inklusive AMV-RT 5x Puffer) angewendet. Die AMV-Reverse Transkriptase benötigt zum Start der reversen Transkription einen Universalprimer. Dieser setzt an beliebigen Stellen nach dem Zufallsprinzip an den vorliegenden RNA-Fragmenten an, sodass letztlich aus der Gesamt-RNA cDNA synthetisiert wird. Es wurden 250ng der zuvor isolierten RNA eingesetzt. Je Probe wurde entsprechend der zuvor berechneten Konzentration ein unterschiedliches Volumen verwendet, welches durch RNase freies Wasser auf 25,4µl aufgefüllt wurde. Je Ansatz kamen nun 14,6µl eines Reaktionsgemisches hinzu, das aus folgenden Komponenten hergestellt wurde:

- 8µl Promega-Puffer AMV-RT 5x (Promega)
- 2µl AMV Reverse Transkriptase (10 U/µl) (Promega)
- 1,6µl dNTP-Set (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), je 10mM (peqLab Biotechnologie)
- 2µl Primer Random Primer p(dN)₆ (Roche Diagnostics)
- 1µl Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl (Promega)

Die Reverse Transkription erfolgte während 45 Minuten bei 42°C (Wärmeschrank Heraeus, Thermo Electron Corporation). Durch 5-minütige Inkubation bei 95°C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die cDNA bei -80°C gelagert.

Material: *AMV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim, Deutschland), Promega-Puffer AMV-RT 5x (Promega, Mannheim, Detuschland), dNTP-Set (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), je 10 mM (peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland), Primer Random p(dN)₆ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl (Promega, Mannheim, Deutschland)*

2.6.5 quantitative RT-PCR (*Real Time-Polymerasekettenreaktion*)

Die quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion wurde mit Hilfe des C1000TM Thermal Cycler (BioRad) und dem CFX96TM Real-Time System durchgeführt. Jedes Well der Low-96-Well Clear Multiplate® (PCR PlatesTM, BioRad) enthielt ein Reaktionsvolumen von 30µl, welches sich wie folgt zusammensetzte:

13,4µl RNase freies Wasser

15µl SYBR®Green (PCR Kit, Quanti Tect®, Qiagen)

0,2µl forward Primer

0,2µl reverse Primer

1,2µl cDNA

Für die RT-PCR wurden folgende Primer verwendet:

PAR4 (204bp): fw: 5'GAG-CAG-CCT-GAG-TGC-AGT-CAT-G3'

rev: 5'TCC-AGG-GTG-TCA-CTG-TCA-TTG-G3'

Cathepsin G (374bp): fw: 5'TCT-GCT-GGC-CTT-TCT-CCT-ACC-C3'

rev: 5'TAG-GCA-GAG-CCA-CTG-GGT-TCA-C3'

PGP9.5 (284bp): fw: 5'CCA-TAC-AGG-CAG-CCC-ATG-ATG3'

rev: 5'CAG-CAA-AGT-CCC-TCC-CAC-AGA-G3'

GAPDH (600bp): fw: 5'TCC-AAA-ATC-AAG-TGG-GGC-GAT-GCT3'

rev: 5'ACC-ACC-TGG-TGC-TCA-GTG-TGA-CCC3'

β-Aktin (400bp): fw: 5'CAT-GCC-ATC-CTG-CGT-CTG-GAC-C3'

rev: 5'ACA-TGG-TGG-TGC-CGC-CAG-ACA-G3'

Das Reaktionsprotokoll begann mit einer 15-minütigen Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen jeweils bestehend aus 35 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei 57°C und 1 Minute Elongation bei 72°C. Danach wurde die Reaktion durch 5 Minuten bei 72°C beendet. Für die zu analysierenden Gene wurden identische Reaktionsprotokolle verwendet. Lediglich bei der PCR für β-Aktin wurde das Protokoll leicht abgewandelt: Die Annealingtemperatur betrug hier 60°C und die Elongation dauerte 30 Sekunden.

1. 15 Minuten 95°C
 2. 35 Sekunden 95°C (Aktivierung)
 3. 30 Sekunden 57°C (Denaturierung)
 4. 60 Sekunden 72°C (Annealing und Elongation)
 5. 5 Minuten 72°C (Ende)
- } 40 Zyklen

Zur Synthese der komplementären DNA-Stränge wurde die Taq-Polymerase, eine DNA-Polymerase hitzestabiler Bakterien, verwendet. Der dem Reaktionsgemisch beigelegte Farbstoff SYBR-Green bindet an doppelsträngige DNA. Nach Anregung durch Laserlicht entsteht Fluoreszenz, die am Ende eines jeden Reaktionszyklus gemessen wurde.

Material: *SYBR®Green (PCR Kit, Quanti Tect®, Qiagen), CatG-, β-Aktin- GAPDH-, PAR4-Primer (Eurofins MWG Operon)*

2.6.6 Etablierung eines quantitativen Taqman-Assays zur Bestimmung der PAR4 Genexpression

Beim TaqMan® Assay wird zusätzlich zur Polymeraseaktivität auch die 5'3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase verwendet. Der Ansatz entspricht dem der qualitativen RT-PCR, doch zusätzlich wird eine Sonde, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, eingesetzt. Dieser Quencher verhindert in der Nähe des Fluoreszenzfarbstoffes dessen Nachweis. Erst durch die Hydrolyse der Sonde durch die 5'3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase während der Amplifikation wird der Fluoreszenzfarbstoff von Quencher entfernt und damit nachweisbar. Es wird die Fluoreszenz gemessen.

Das Reaktionsgemisch für TaqMan® Assay setzte sich wie folgt zusammen:

8µl RNase freies Wasser

10µl 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan® Gene Expression Master Mix System, Applied Biosystems)

1µl 20x PAR4 FAM (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems)

1µl cDNA

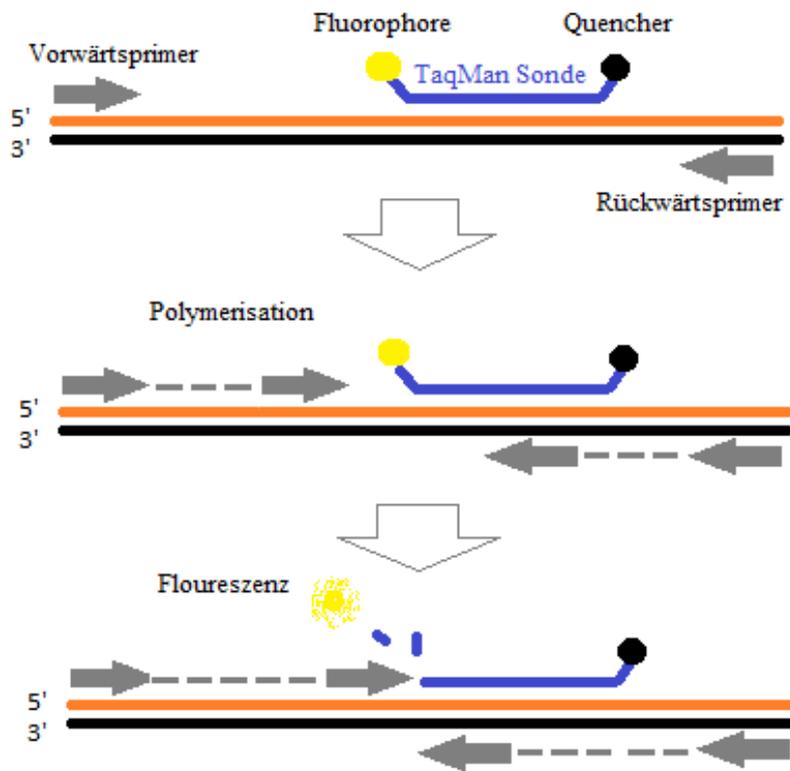


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Funktionsweise des TaqMan[®] Assay

Die TaqMan[®] Sonde mit Fluorophore und Quencher bindet an eine spezifische Sequenz der cDNA. Nach Bindung der Primer beginnt die Polymerisation. Bei Erreichen der TaqMan[®] Sonde wird diese mittels der 5'3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert, das Fluorophore wird freigesetzt und kann sich vom Quencher entfernen, sodass seine Fluoreszenz nachweisbar wird.

Analog zur qRT-PCR wurde folgendes Protokoll im C1000[™] Thermal Cycler (BioRad) und dem CFX96[™] Real-Time System verwendet:

1. 2 Minuten 50°C
 2. 10 Minuten 95°C (Aktivierung)
 3. 15 Sekunden 94°C (Denaturierung)
 4. 1 Minute 60°C (Anneal and Plate read)
 5. 4°C (Ende)
- } 40 Zyklen

Material: TaqMan Universal PCR Master Mix (TaqMan[®] Gene Expression Master Mix System, Applied Biosystems), PAR4 FAM (TaqMan[®] Gene Expression Assays, Applied Biosystems)

2.6.7 Agarosegelelektrophorese von cDNA-Produkten

Die qualitative Darstellung der PCR-Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Es wurden 1,8g Agarose in 100ml TAE-Puffer (Tris-Aqua-Essigsäure-Puffer, siehe Protokoll am Kapitelende) gelöst und mit der Mikrowelle (Sharp R2V18) aufgekocht, bis eine klare Flüssigkeit entstand. Das noch flüssige Gel wurde in den Gelschlitten gegossen und war nach zirka 30 Minuten ausgehärtet.

30µl jedes PCR-Produktes wurden mit 3µl Loading Puffer (5x Loading Dye, Fermentas) vermischt und dann je 10µl in die Geltaschen aufgetragen. Als Referenz kam ein 50bp-Marker (Gene Ruler 50bp Ladder, Fermentas) zum Einsatz. Bei 100V wurden die PCR Produkte nun zirka eine Stunde lang in der Elektrophoresis Power Supply Kammer (Consort E863) aufgetrennt. Das Ergebnis konnte mit Hilfe der UV Licht Kamera (E.A.S.Y. RH, Herolap) sichtbar gemacht und fotografiert sowie gedruckt (Mitsubishi CP770DW) werden.

TAE-Puffer: 2M Tris Puffer 99,9% 121,14 g/mol (Roth) = 242 g in 300 ml Aqua dest.
57,1 ml 99%ige Essigsäure 60,05 g/mol (J.T. Baker)
100 ml EDTA 0,5 M (Titrierkomplex III 99% 372,24 g/mol, Roth)
auf 1l mit Aqua dest. auffüllen

Material: Agarose (*Bio-Rad, Deutschland*), TAE-Puffer (*Protokoll oben*), Loading Puffer (*5x Loading Dye, Fermentas*), 50 bp-Marker (*Gene Ruler 50bp Ladder, Fermentas*)

2.6.8 Die Delta-Delta-Ct-Methode zur Berechnung der relativen Transkriptmenge eines Gens

Die Auswertung erfolgte durch Normierung der Daten auf ein Referenzgen. Die Normierung erfolgte nach der Delta-Delta-Ct-Methode:

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t \text{ Patienten} - \Delta C_t \text{ Kontrollen}$$

$$\text{Relative Genexpression: } 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

Der C_t -Wert (Cycle of threshold) beschreibt den Zyklus der PCR, in dem sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Je mehr Transkripte eines Gens in der Probe enthalten sind, desto früher wird das Signal detektiert und desto kleiner ist der C_t -Wert. Um methodische Störfaktoren zu reduzieren, wurden zwei Referenzgene β -Aktin und GAPDH etabliert.

Durch Berechnung nach oben genannter Formel kann die relative Genexpression des Zielgens in Verhältnis zum Referenzgen ermittelt werden.

Die durchgängig nicht-parametrischen Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert und für Korrelationsanalysen kam der Spearman Test zur Anwendung. Es wurde mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gearbeitet.

2.7 PAR4 Genexpression in plattenepithelialen Zelllinien KYSE 150 und KYSE 450

Es wurden die ösophagealen Plattenepithelzelllinien KYSE150 und KYSE450 auf die Expression von PAR4 untersucht. Die Zelllinie KYSE150 ist eine plattenepitheliale Ösophaguszelllinie. Der Spender der Primärzellen war eine 49-jährige Japanerin. Bei KYSE450 handelt es sich um Zellen eines gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus eines 59-jährigen Japaners.

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 75cm² großen Zellkulturflaschen und die verwendeten Nährmedien setzten sich wie folgt zusammen:

Medium KYSE450:

45% Ham's F12

45% RPMI-1640 Medium

10% FCS

1% Penicillin/ Streptomycin 100X

1% Gentamicin 10mg/ml

Medium KYSE150:

49% Ham's F12

49% RPMI-1640 Medium

2% FCS

1% Penicillin/ Streptomycin 100 µg/ml

1% Gentamicin 100 µg/ml

Es wurden 10^6 Zellen pro 10ml Medium ausgesät und bis zum Erreichen eines homogenen, konfluierenden Monolayers bei 37°C und 5% CO₂ im Zellinkubator kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in der Zellkulturflasche dreimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS, pH 7,4) gewaschen, um tote Zellen und Zellfragmente zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Cell-Scraper und PBS geerntet. Das durch Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in RLT-Puffer resuspendiert und die RNA-Präparation, wie unter 2.6.1 beschrieben, durchgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter 2.6.4 beschrieben.

Material: *KYSE 150, KYSE 450 (American Type Collection), Manassas, VA), Zellkulturflaschen (NUNC GmbH, Wiesbaden, Deutschland), Ham's F12, RPMI-1640 Medium, FCS, Penicillin/ Streptomycin, Gentamicin (Colbe, Germany)*

2.8 PAR4-Genexpression in mononukleären Zellen (PBMC)

Zusätzlich zu epithelialen Zellen wurde die PAR4 Genexpression in monoklonalen peripheren Blutzellen (PBMCs) untersucht. PBMCs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque® Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) nach einem modifizierten Protokoll aus EDTA-Spenderblut isoliert. Bei Ficoll® handelt es sich um ein synthetisches polysaccharidähnliches Polymer, das durch Umsetzen von Saccharose mit Epichlorhydrin entsteht. Es ist wasserlöslich mit einem Molekulargewicht um 400kDa. Während der Zentrifugation zeigen Zellen unterschiedlicher Dichte eine unterschiedliche Migration, wodurch Schichten gebildet werden.

Zum Einsatz kamen 30ml Spenderblut, 6ml EDTA und 2ml PBS (Phosphat gepufferte Saline). Es wurden 10ml Ficoll-Paque[®] Plus in einem neuen Röhrchen vorgelegt und mit 25ml der Blut/PBS-Mischung vorsichtig überschichtet. Nach einem ersten Zentrifugationsschritt (1300U/min für 25 Minuten) wurde die oberste Schicht, die dem Plasma entspricht, verworfen. Die darunterliegende Schicht der „weißen“ Blutbestandteile wurde mittels Pasteur-Pipette in ein neues Flacon überführt und mit vereistem PBS auf 50ml aufgefüllt. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (1300U/min, 20min) wurde der Überstand verworfen und es folgte ein Waschschrift durch Resuspension in 10ml Eis-PBS und erneute Zentrifugation (1300U/min, 10min). Eine erneute Aufnahme in 10ml PBS und 10-minütige Zentrifugation führten zur Plättchenreduktion. Anschließend wurde der zuvor beschriebene Waschschrift wiederholt. Die nun isolierten PBMCs wurden in 10ml RPMI+FCS 10% aufgenommen. Die Isolierung der mRNA und weitere Verarbeitung erfolgt ebenfalls nach den unter 2.6 beschriebenen Methoden.

Material: *Ficoll-Paque[®] Plus, Spenderblut, PBS (1,5mM Kaliumhydrogenphosphat (KH₂O₄), 2,7mM Kaliumchlorid (KCl), 8,1mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), 137mM Natriumchlorid (NaCl))*

2.9 Cathepsin G Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Cathepsin G kam ein ELISA Kit von USCNK zum Einsatz (E93993Hu 96 Tests). Auf einer 96 Wellplatte wurden zur Bestimmung einer Standardkurve 7 Verdünnungen der Standardlösung eingesetzt. Standard Diluent 1x fungierte als Leerwert. Je Well wurden 100µl Standard-Lösung, Leerwert oder Probe eingesetzt und nach dem Verschließen mit einer Abdeckfolie bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. In dieser Zeit sollten die zu untersuchenden Proteine an die für Cathepsin G spezifischen, monoklonalen Antikörper am Boden der Mikrotiterplatte binden. Nach Verwerfen des Überstandes kamen je 100µl Detection Reagent A working hinzu. Dafür wurden vorher 5ml destilliertes Wasser und 5ml Assay Diluent A gemischt, anschließend 100µl der Lösung verworfen und 100µl Detection Reagent A hinzugegeben. Es entstand eine 1:100 Verdünnung des Detection Reagent A working. Dieses Detection Reagent A working enthält einen polyklonalen Antikörper gegen Cathepsin G, der mit Biotin konjugiert ist. Dieser bindet folglich nur in solchen Wells, in denen vorher Cathepsin G gebunden hat. Nach

einer Stunde Inkubationszeit bei 37°C im Wärmeschrank folgten 4 Waschschriffe, wobei jeweils 100µl Waschlösung 2 Minuten einwirkten. Die Waschlösung wurde aus 20ml Waschpuffer und 580ml destilliertem Wasser gemischt. Nach demselben Schema wie Detection Reagent A working wurde auch Detection Reagent B working angesetzt und jeweils 100µl davon in jedes Well gegeben. Detection Reagent B enthält Avidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase, welches an den zweiten Antikörper binden kann. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde fünfmal wie oben beschrieben gewaschen. Nach Zugabe von 90µl TMB Substrat, färbte sich die Lösung nur in den Wells, die Cathepsin G, Biotin konjugierte Antikörper und Enzym konjugiertes Avidin enthalten, blau. Es wurde für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Einsatz von 50µl Stopsolution, die Sulfursäure enthält, führte zu einem Farbumschlag nach gelb und einer pH Änderung, sodass die Reaktion zum Erliegen kam. Die Cathepsin G Konzentration wurde mit dem ELISA Reader Sunrise von TECAN bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Material: *ELISA Kit (USCNK, E93993Hu 96 Tests)*

2.10 Statistische Analysen

Alle gesammelten Daten wurden in Excel Tabellen (Microsoft Corporation Redmont, Redmont, WA, USA) überführt. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 5 für Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Die Daten wurden grafisch als Boxplots mit Mittelwert und Standardabweichung oder 95% Konfidenzintervall dargestellt. Für parametrische Daten (z. B. histologische Auswertung) wurde der One-way Anova Test für den Mittelwertvergleich zwischen den Gruppen (Kontrollen, FH, NERD und ERD) verwendet. Wenn signifikante Unterschiede gefunden wurden, dann kam der Bonferroni`s Test zur post-hoc-Analyse zum Einsatz. Für nicht parametrische Datensätze (z.B. Expressionsanalysen) wurde der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Die post-hoc-Analysen erfolgten hier mit Dunn`s Multiple Comparison Test. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert < 0,05 angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv und Charakterisierung der Symptome

In die Studie wurden prospektiv 65 Patienten (27 männlich, 38 weiblich, Alter 57 ± 15 Jahre) und 25 gesunde Kontrollen ohne Sodbrennen (10 männlich, 15 weiblich, Alter 55 ± 11 Jahre) eingeschlossen.

Bei Patienten mit erosiver Refluxerkrankung (n=25) lag bei 14 Patienten eine Refluxösophagitis LA A (Los Angeles Klassifikation, 6 männlich, 8 weiblich), bei 14 Patienten LA B (6 männlich, 8 weiblich) und bei 10 Patienten LA C (8 männlich, 2 weiblich) vor. Patienten im Stadium LA D wurden im Untersuchungszeitraum nicht eingeschlossen. Es wurden deutlich mehr Frauen als Männer mit NERD (10 weiblich, 3 männlich) eingeschlossen. Bei den Patienten mit funktionellem Sodbrennen finden sich 4 Männer und 10 Frauen. Tabelle 4 zeigt einen Überblick der klinischen Charakterisierung des Studienkollektivs.

Die Patienten und gesunden Kontrollen wurden in die folgenden Gruppen eingeteilt:

- i. Kontrollen: n = 25 (55 ± 11 Jahre, 22-79)
- ii. Patienten mit erosiver Refluxerkrankung: n = 38 (57 ± 15 Jahre, 24-79)
- iii. Patienten mit nicht erosiver Refluxerkrankung: n = 13 (58 ± 11 Jahre, 43-74)
- iv. Patienten mit funktionellem Sodbrennen (FH): n = 14 (56 ± 18 Jahre, 27-78)

Tabelle 4: *Klinische Charakterisierung des Studienkollektivs*

		männlich	weiblich
i. Kontrollen		11	14
ii. Patienten mit erosiver Refluxerkrankung	Los Angeles Grad A	6	8
	Los Angeles Grad B	6	8
	Los Angeles Grad C	8	2
	Los Angeles Grad D	0	0
iii. Patienten mit nicht erosiver Refluxerkrankung		3	10
iv. Patienten mit funktionellem Sodbrennen		4	10

Der Schweregrad der Symptome der Patienten wurde mittels des validierten Fragebogens (RDQ) analysiert. Zwischen Patienten mit GERD (ERD und NERD) und Patienten mit FH bestehen keine Unterschiede in der Symptomatik für die Kategorien „Sodbrennen“, Dyspepsie“ und „Regurgitation“. Die Ergebnisse des RDQ sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

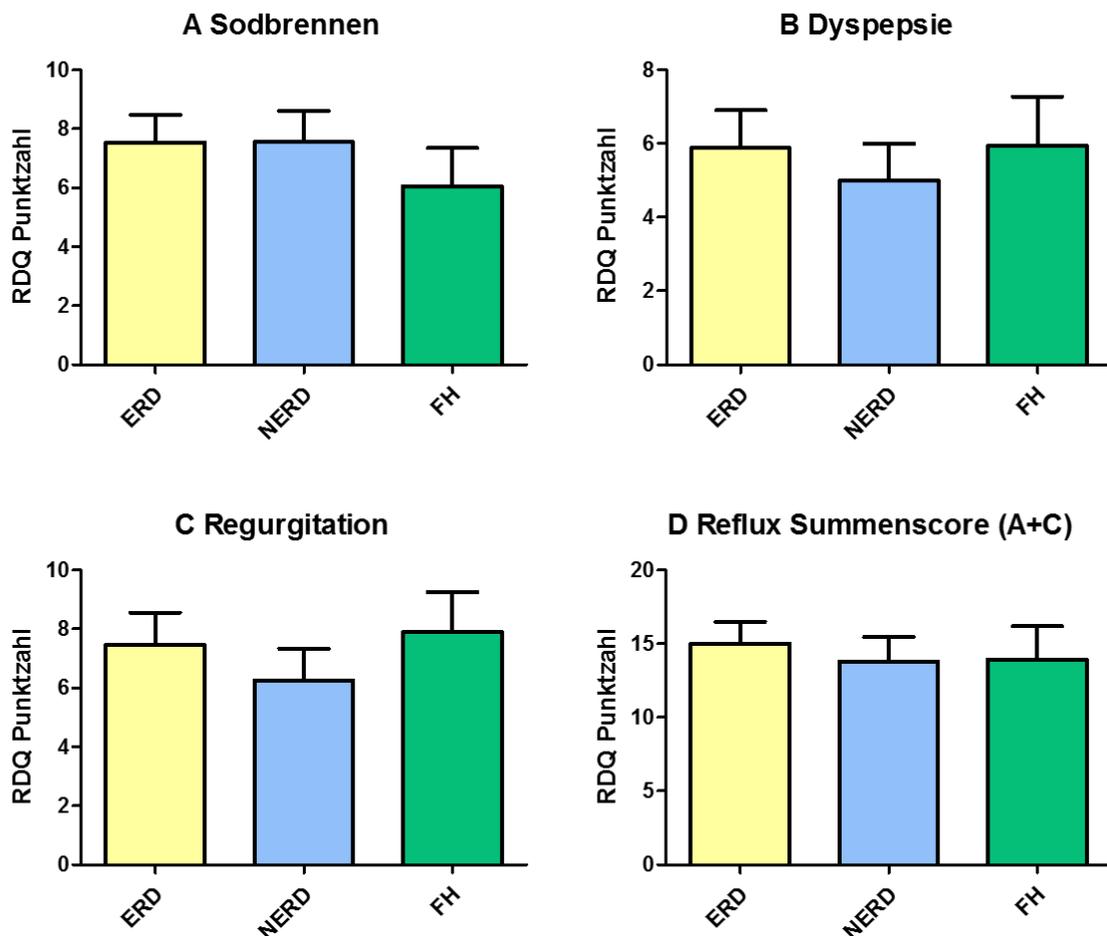


Abbildung 12: *Evaluation der klinischen Symptomatik mittels Reflux Disease Questionnaire (RDQ)*

Die Abbildung stellt die Ergebnisse der Patientenbefragung mittels Reflux Disease Questionnaire (RDQ) graphisch dar. Die Auswertung der Subkategorien des Fragebogens für „Sodbrennen“ (A), „Dyspepsie“ (B), „Regurgitation“ (C) und des Gesamt-Scores (D) zeigt eine vergleichbare klinische Symptomatik zwischen Patienten mit GERD und FH.

3.2 Histopathologische Charakterisierung der Ösophagismukosa von Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung, funktionellem Sodbrennen und Kontrollen

In den Mukosaproben der Patienten und Kontrollen konnten in der histologischen Untersuchung signifikante Unterschiede hinsichtlich der Merkmale dilatierte Interzellularspalten, Basalzellhyperplasie und Infiltration mit Immunzellen gefunden werden. Abbildung 13 und Abbildung 14 stellen diese Unterschiede graphisch dar.

Die Biopsien der Patienten mit GERD (ERD und NERD) weisen charakteristische Veränderungen wie Erweiterung der Interzellularspalten (DIS), Papillanelongation, Basalzellhyperplasie und Infiltration mit Entzündungszellen auf. Diese Veränderungen sind bei Patienten mit FH und den Kontrollen nicht nachweisbar.

Patienten mit GERD (ERD und NERD) weisen eine Dilatation der Interzellularspalten auf. Diese ist bei Patienten mit FH und den gesunden Kontrollen nicht nachweisbar ($p < 0,001$, Abbildung 13 B).

Eine Basalzellhyperplasie findet sich in den Proben der Patienten mit ERD und NERD, nicht jedoch bei den Patienten mit FH. Diese Ergebnisse sind ebenfalls hoch signifikant ($p < 0,001$) in Bezug auf die Kontrollgruppe (Abbildung 13 A).

Die mukosale Inflammation wurde durch Infiltration der Mukosa mit Entzündungszellen (Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen) definiert und findet sich bei Patienten mit ERD und NERD, nicht jedoch bei den Kontrollen ($p < 0,001$). Die mukosale Inflammation ist bei Patienten ERD und NERD signifikant stärker nachweisbar als bei Patienten mit FH, deren Werte für Inflammation annähernd der Kontrollgruppe entspricht (Abbildung 13 D).

In den Proben der Patienten mit ERD und NERD ist eine signifikante Papillanelongation im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar (NERD $p < 0,01$, ERD $p < 0,001$). Diese Papillanelongation findet sich nicht bei Patienten mit FH, die vergleichbare Papillenenlängen wie die Patienten in der Kontrollgruppe aufweisen (Abbildung 13 C).

Werden die Ergebnisse dieser vier histopathologischen Merkmale in einem Summenscore zusammengefasst (Abbildung 14), ist der Grad der mukosalen Entzündung bei Patienten mit ERD vergleichbar dem der Patienten mit NERD, während die mukosale Entzündung der Patienten mit FH vergleichbar mit der der Kontrollgruppe ist. Patienten mit GERD, insbesondere auch die mit NERD, unterscheiden sich histologisch signifikant von Patienten mit FH und Kontrollen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen histopathologischen Merkmale sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die Signifikanzniveaus aus der statistischen Analyse zwischen den Subgruppen mittels Bonferroni`s Test fasst Tabelle 6 zusammen.

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichung der histopathologischen Charakteristika in Relation zur Diagnose

	Kontrollen	FH	NERD	ERD	p-Wert (ANOVA)
Papillanelongation	1,32 ± 0,16	1,5 ± 0,17	2,05 ± 0,17	2,39 ± 0,14	< 0,0001
Basalzell- hyperplasie	0,52 ± 0,12	1,05 ± 0,11	1,65 ± 0,15	1,7 ± 0,13	< 0,0001
Dilatierte Interzellulärspalten	0,72 ± 0,14	0,75 ± 0,14	1,75 ± 0,18	1,91 ± 0,19	< 0,0001
Inflammation	0,72 ± 0,11	0,80 ± 0,12	1,45 ± 0,15	1,57 ± 0,14	< 0,0001
Summenscore	3,28 ± 0,37	3,84 ± 0,35	6,7 ± 0,45	7,57 ± 0,37	< 0,0001

Tabelle 6: Histopathologische Charakteristika im Vergleich zwischen Patienten mit GERD (ERD und NERD), FH und Kontrollen

	Papillen- elongation	Basalzell- hyperplasie	Dilatierte Interzellulär- spalten	Inflammation
NERD vs ERD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NERD vs FH	n.s.	P<0,05	P<0,001	P<0,01
NERD vs Kontrollen	P<0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,001
ERD vs FH	P<0,01	P<0,01	P<0,001	P<0,001
ERD vs Kontrollen	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
FH vs Kontrollen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

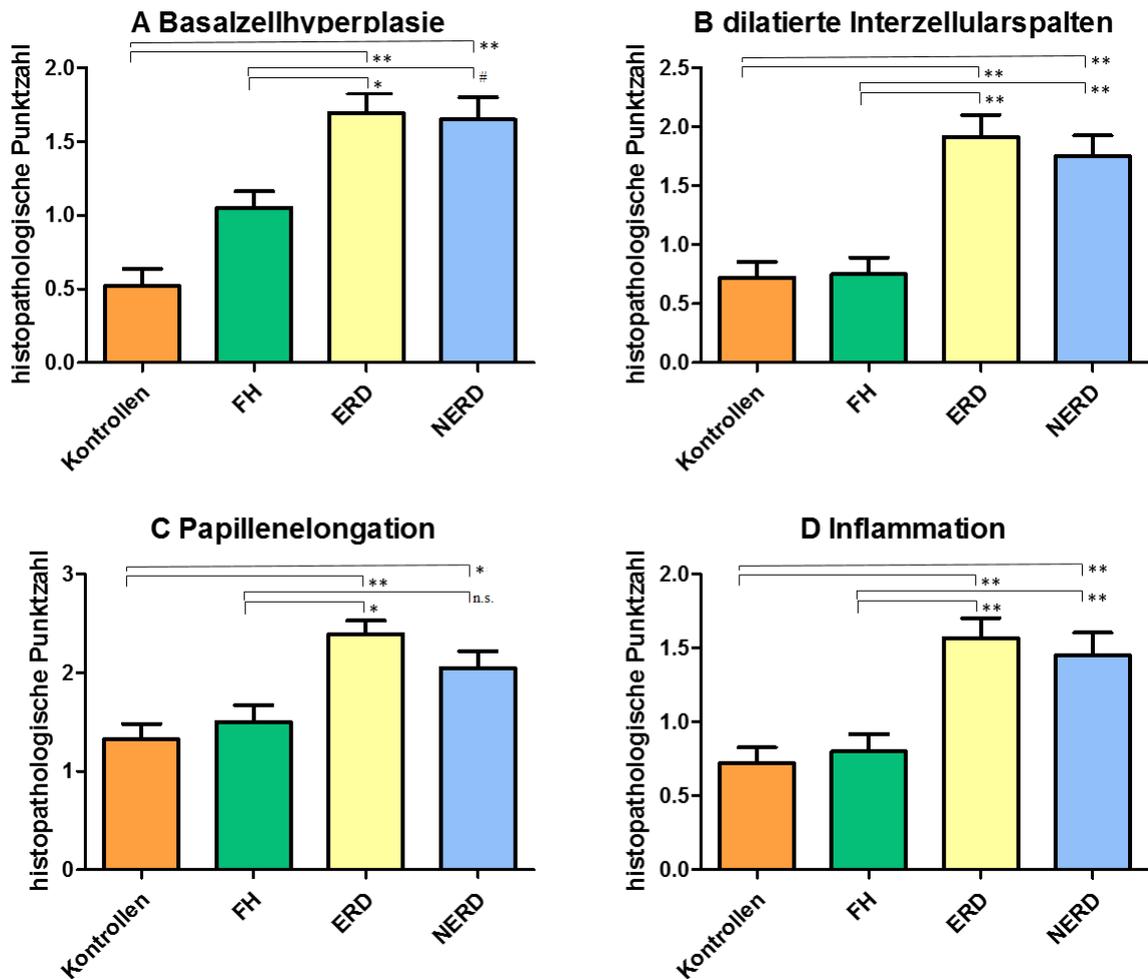


Abbildung 13: *Histomorphologische Analyse der Schleimhautveränderungen von Patienten mit GERD, FH und Kontrollen*

Abbildung A zeigt die Basalzellhyperplasie, die in den Patienten mit ERD und NERD jeweils gegenüber den Kontrollen und den Patienten mit FH statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$) ausgeprägt ist. Abbildung B zeigt die Relation des Vorhandenseins erweiterter Interzellularspalten zwischen den einzelnen Gruppen (hoch signifikant für NERD und ERD, $p < 0,001$). Bei Patienten mit ERD ($p < 0,001$) und NERD ($p < 0,01$) findet sich im Vergleich zur den Kontrollen eine signifikante Papillanelongation (C). Auch der Grad der Inflammation (D) ist bei NERD und ERD hoch signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht ($p < 0,001$), bei den Patienten mit FH jedoch nicht. ** = $p < 0,001$, * = $p < 0,01$, # = $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

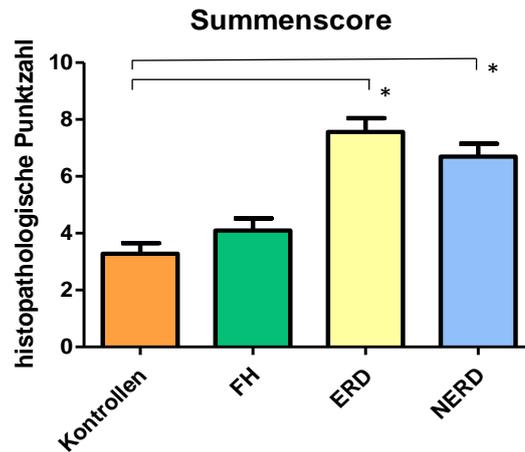


Abbildung 14: Summenscore der histologischen Veränderungen

Diese Abbildung zeigt den Summenscore der semiquantitativen Auswertung der histologischen Untersuchung (siehe 2.4). Patienten mit NERD und ERD weisen im Summenscore eine hoch signifikant ($p < 0,001$) veränderte Histologie im Vergleich zu den Kontrollen auf.

3.3 Analyse der Genexpression von β -Aktin und GAPDH zur Etablierung des Referenzgens für mukosale Genexpressionsanalysen

Bei der Messung der Genexpression von β -Aktin in den Ösophagusschleimhautbiopsien des Kollektivs konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten gefunden werden. Gleiche Ergebnisse zeigten sich auch für GAPDH, wobei das Expressionsniveau hier insgesamt etwas niedriger lag als bei β -Aktin. Bei der Messung der β -Aktin Genexpression in unserem Kollektiv zeigten sich beim Vergleich der Rohdaten annähernd gleiche Expressionsniveaus in den Gruppen ERD (Ct = 21,79), NERD (Ct = 21,86) und FH (Ct = 21,13). In der Kontrollgruppe war das Expressionsniveau im Vergleich etwas erniedrigt (Ct = 24,47). Beim Vergleich der Rohdaten für GAPDH zeigte sich eine ähnliche Verteilung wie für β -Aktin. Die Expressionsniveaus für GAPDH in den Gruppen ERD (Ct = 27,49), NERD (Ct = 27,44) und FH (Ct = 27,00) war annähernd identisch und in der Kontrollgruppe leicht erniedrigt (Ct = 29,57) (Abbildung 15A).

Bei der Korrelationsanalyse (Abbildung 15B) beider Referenzgene ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,8615 in einem 95% Konfidenzintervall von 0.7942 bis 0.9079 ($p < 0,001$).

Da β -Aktin insgesamt eine stärkere Expression aufwies, das heißt bereits bei früheren Zyklen detektierbar war (kleinere Ct-Werte), wurde für die nachfolgenden Analysen β -Aktin als Referenzgen eingesetzt.

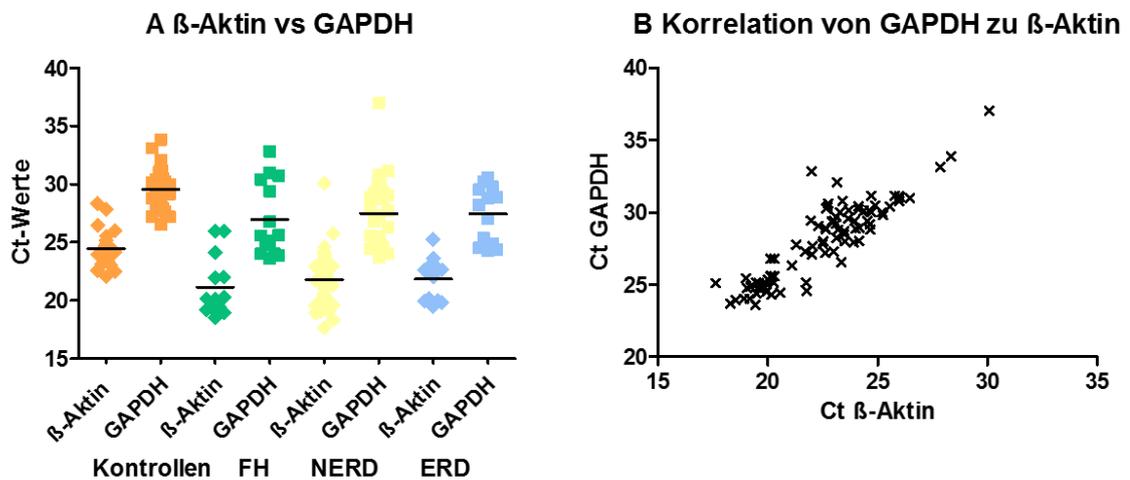


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der Expression von β -Aktin und GAPDH

Die Abbildung A zeigt vergleichend die Expression von β -Aktin und GAPDH. Hier zeigten sich gleiche Expressionsniveaus für β -Aktin in allen vier Gruppen. Die Expression von GAPDH war ebenfalls in allen vier Gruppen vergleichbar. Die rechte Abbildung B zeigt die Ct-Werte für β -Aktin und GAPDH. Es ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,8615 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0,7942 bis 0,9079 und damit eine hoch signifikante Korrelation von GAPDH und β -Aktin ($p < 0,001$).

3.4 Analyse der PAR4 Expression in der ösophagealen Mukosa

3.4.1 Analyse der PAR4 Genexpression in der ösophagealen Mukosa bei gesunden Kontrollen und Patienten mit GERD und FH

Die Messung der PAR4 Genexpression erfolgte mittels TaqMan[®] Assay. Im Vergleich mit den Kontrollen wiesen Patienten mit ERD, NERD und FH eine verstärkte PAR4 Expression auf ($p < 0,0001$). Im direkten Vergleich der drei Krankheitsgruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

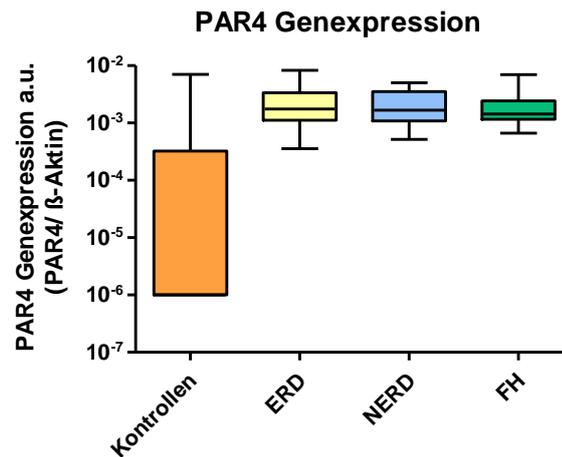


Abbildung 16: *Analyse der PAR4 Genexpression bei Patienten mit GERD (ERD, NERD), FH und Kontrollen*

Die Grafik zeigt die Genexpression von PAR4. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt, wobei die waagerechten Linien die 25., 50. und 75. Perzentile repräsentieren und die senkrechten Linien bis zu den Minimal- und Maximalwerten führen.

3.4.2 Analyse der PAR4 Genexpression in mononukleären Zellen (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) und plattenepithelialen Zelllinien

Um die konstitutionelle Expression von PAR4 in ösophagealen Keratinozyten im Vergleich zu Immunzellen beurteilen zu können, wurde die PAR4 Genexpression in zwei ösophagealen Keratinozytenzelllinien sowie in peripheren Blutmonozyten (PBMC) untersucht. Analog zu den Mukosaanalysen erfolgte die reverse Transkription und cDNA Synthese mit anschließender PAR4 Genexpressionsanalyse mittels TaqMan® Assay. Es konnte nachgewiesen werden, dass PAR4 sowohl durch ösophagealen Keratinozyten als auch von lymphozytären Immunzellen exprimiert wird. Das Expressionsniveau unterschied sich nicht zwischen den Zellpopulationen (Abbildung 17).

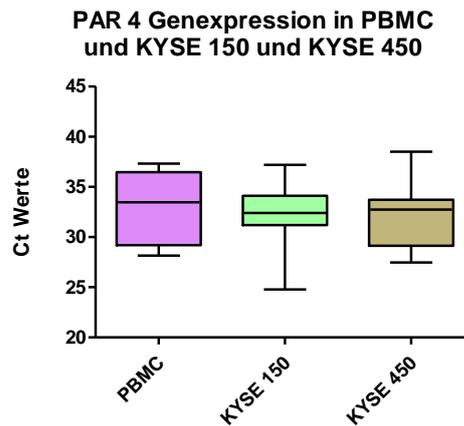


Abbildung 17: *Expressionsniveaus von PAR4 in den Zelllinien KYSE 150 und KYSE 450 sowie in peripheren Blutmonozyten (PBMC)*

Diese Grafik zeigt die Ct-Werte der PAR4 Genexpression aus dem TaqMan® Assay in den Proben der beiden KYSE Zelllinien und der PBMC.

3.5 Analyse der Cathepsin G Expression in der ösophagealen Mukosa

3.5.1 Analyse der Cathepsin G Genexpression in ösophagealer Mukosa bei Patienten mit GERD, FH und gesunden Kontrollen

Die Genexpression von Cathepsin G in der ösophagealen Mukosa unterscheidet sich in den vier untersuchten Gruppen nicht.

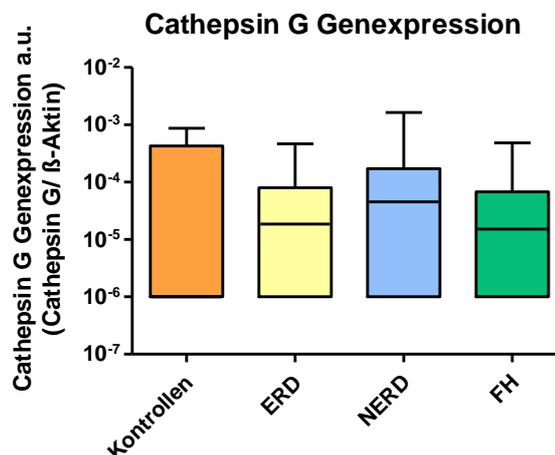


Abbildung 18: *Cathepsin G Genexpression in der Ösophagusschleimhaut von Patienten mit GERD, FH und Kontrollen*

Die Grafik zeigt die Cathepsin G Genexpression. Die Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt, wobei die waagerechten Linien die 25., 50. und 75. Perzentile repräsentieren und die senkrechten Linien bis zu den jeweiligen Minimal- und Maximalwerten führen.

3.5.2 Analyse des mukosalen Cathepsin G Proteingehaltes bei Patienten mit GERD, FH und Kontrollen

Die Analyse des mukosalen Cathepsin G Gehaltes erfolgte mittels ELISA. Die Extinktionswerte der Proben lagen ausnahmslos unterhalb der Nachweisgrenzen, sodass eine Aussage zur Proteinquantität nicht möglich war. Dahingegen ergab sich eine plausible Standardkurve und die Positivkontrolle war positiv, so wie die Negativkontrolle negativ blieb. Eine Analyse des mukosalen Cathepsin G Proteingehaltes ist entweder mittels ELISA technisch nicht möglich oder der Proteingehalt ist tatsächlich sehr gering.

3.6 Analyse der PGP 9.5 Genexpression in der ösophagealen Mukosa bei Patienten mit GERD, FH und gesunden Kontrollen

Bei der Messung der PGP9.5 Genexpression ergaben sich Hinweise auf eine verstärkte Innervation ösophagealer Schleimhaut von Patienten mit GERD und FH. Die Expression des neuronalen Markers PGP9.5 ist in allen 3 Krankheitsgruppen (ERD, NERD und FH) leicht erhöht im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($p=0,0651$, Abbildung 19). Diese erhöhte Expression verfehlte das Signifikanzniveau knapp.

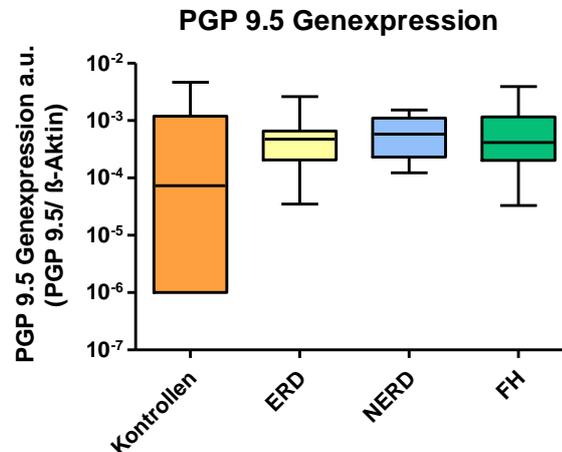


Abbildung 19: *PGP 9.5 Genexpression in der Ösophagusschleimhaut von Patienten mit GERD, FH und Kontrollen*

Die Grafik zeigt die PGP 9.5 Genexpression gemessen mittels qualitativer RT-PCR. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt, wobei die waagerechten Linien die 25., 50. und 75. Perzentile repräsentieren und die senkrechten Linien bis zu den Minimal- und Maximalwerten führen.

4 Diskussion

4.1 Klinische Charakterisierung von Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung (ERD und NERD) im Vergleich mit Patienten mit funktionellem Sodbrennen

Das Geschlechterverhältnis von Patienten mit ERD in unserem Studienkollektiv ist ausgeglichen (20 Männer, 18 Frauen), während bei den Patienten mit NERD mehr weibliche Patienten eingeschlossen wurden (3 Männer, 10 Frauen). Bei den Patienten mit funktionellem Sodbrennen fand sich ebenfalls ein höherer Anteil des weiblichen Geschlechts (4 Männer, 10 Frauen). Dieses Geschlechterverhältnis entspricht den Daten aus epidemiologischen Studien, (*Endlicher et al. 2009*), so dass das Kollektiv diesbezüglich als repräsentativ betrachtet werden kann.

Die Ergebnisse der Befragung mittels des standardisierten Fragebogens lassen keine Unterscheidung zwischen den Entitäten der GERD und FH zu. Die Patienten der unterschiedlichen Entitäten leiden unter vergleichbarem Schweregrad der Symptomatik. Es ist damit nicht möglich, Patienten mit FH sicher durch die klinisch-symptomatische Diagnose von Patienten mit nachgewiesener Refluxerkrankung zu unterscheiden.

Dies macht deutlich, dass eine Symptom-basierte Diagnose der Refluxerkrankung in Abgrenzung zu Patienten mit FH im klinischen Alltag schwierig ist.

Dieses Ergebnis erklärt auch die Tatsache, dass vor allem für die Patienten mit einer NERD ein schlechtes therapeutisches Ansprechen auf eine säuresuppressive Therapie mit PPI in Studien, die nicht zwischen NERD und FH differenzieren, beschrieben ist. Daten aus randomisierten, plazebo-kontrollierten Studien legen nahe, dass für Patienten mit NERD eine Symptompersistenz in 40-50% der Fälle nach einer Therapie mit PPI nach 6-8 Wochen besteht (*Weijenborg et al. 2012*). Diese Daten sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren, da die Diagnose der Refluxerkrankung in den meisten Studien lediglich auf der klinischen Symptomatik und einer endoskopischen Untersuchung gestellt wurde. Wird eine ÖGD durchgeführt, lässt sich bei Vorhandensein von Erosionen am gastroösophagealen Übergang sicher eine erosive Refluxerkrankung diagnostizieren. Bei einem endoskopisch unauffälligen gastroösophagealen Übergang sollte jedoch eine pH-Metrie bzw. eine MII-pH erfolgen, um eine NERD zu diagnostizieren und diese Patienten von Patienten mit FH zu unterscheiden (*Tamura et al. 2015*). Weijenborg et al. fassten 2012 in einer Metaanalyse 22 Studien aus den Jahren 1966 bis 2010 zusammen. Insgesamt wurde die Diagnose der

Refluxerkrankung nur in 3 Studien endoskopisch und mittels einer pH-Metrie gestellt. Diese Studien konnten zeigen, dass das therapeutische Ansprechen auf eine PPI Therapie bei Patienten mit NERD vergleichbar gut mit dem symptomatischen Ansprechen von Patienten mit ERD war, wenn die Diagnose der NERD sowohl endoskopisch als auch mit dem Nachweis eines pathologischen gastroösophagealen Refluxes in der pH-Metrie gestellt wurde. Wurde die Diagnose NERD basierend auf typischen Reflux-Symptomen und eines endoskopisch unauffälligen gastroösophagealen Übergangs gestellt, so lag das Ansprechen auf PPI bei nur rund 50% (*Weijenborg et al. 2012*). Man kann spekulieren, dass viele dieser Patienten nicht unter einer NERD litten, sondern vielmehr unter funktionellem Sodbrennen. Eine frühzeitige Durchführung einer gastroösophagealen Funktionsdiagnostik zur Diagnosesicherung wird jedoch in internationalen und auch in den deutschen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) ausdrücklich nicht empfohlen (*Koop et al. 2005*). Der diagnostische und therapeutische Algorithmus der Refluxerkrankung sieht bei Patienten mit typischen Refluxsymptomen zunächst die empirische Therapie mit einem PPI für 8 Wochen vor. Bei unzureichendem Ansprechen sollte die Dosierung auf die doppelte Standarddosierung erhöht werden. Eine weiterführende Diagnostik wird erst bei unzureichendem Ansprechen auf diese maximale PPI-Therapie empfohlen.

Patienten mit FH werden in diesem Algorithmus über lange Zeit mit PPI behandelt, die in einem Großteil der Fälle keine Linderung bringen (*Herregods et al. 2015*). Eine frühzeitige Diagnostik und Differenzierung mittels pH-Metrie beziehungsweise MII-pH würde helfen, diese Patienten einer spezifischen Therapie zuzuführen beziehungsweise eine über langen Zeitraum unnötige PPI Therapie zu vermeiden. Im Vergleich mit der pH-Metrie erlaubt die MII-pH die Detektion aller Refluxepisoden auch der nicht-sauren Qualität und ist hervorragend geeignet, um Patienten mit NERD zuverlässig von Patienten mit FH zu unterscheiden.

4.2 Morphologische Veränderungen der Ösophagusschleimhaut bei Patienten mit GERD im Vergleich zu Patienten mit FH

Bereits die Arbeitsgruppe um Ismail-Beigi konnte zeigen (*Ismail-Beigi et al. 1970*), dass Patienten mit NERD spezifische histomorphologische Veränderungen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen aufweisen. Ismail-Beigi beschrieb bei Patienten mit einer

nachgewiesenen NERD erweiterte Interzellularspalten (dilatierte Interzellularspalten, DIS), eine Basalzellhyperplasie, Elongation der Mukosapapillen sowie eine mukosale Infiltration von Entzündungszellen (siehe 3.2 Histopathologische Charakterisierung der Ösophagismukosa von Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung, funktionellem Sodbrennen und Kontrollen). Diese charakteristischen Merkmale werden auch als mikroskopische Ösophagitis bezeichnet (*Savarino et al. 2012*).

Funktionell besteht eine enge Korrelation zwischen dem Grad der Interzellularspaltendilatation und der transepithelialen Permeabilität (*Tobey et al. 1996*). Farré et al. konnte eine elektronenmikroskopisch messbare Interzellularspaltendilatation und gesteigerte Permeabilität von ösophagealer Schleimhaut durch Säureexposition (Rattenmodell) induzieren. In einem Perfusionsmodell wurde Rattenösophagusschleimhaut kurzzeitig Gallensäuren verschiedener pH-Werte ausgesetzt und DIS sowie gesteigerte Permeabilität bei pH=2,0 und pH=5,0, nicht jedoch bei pH=7,4 nachgewiesen (*Farré et al. 2008*).

Bei Patienten mit GERD finden sich analog zum Tiermodell diese charakteristischen Veränderungen im Sinne einer mikroskopischen Ösophagitis. So ist es möglich, auch bei unauffälligem endoskopischen Befund, Patienten mit NERD von Patienten ohne Refluxerkrankung oder funktionellem Sodbrennen zu unterscheiden (*Savarino et al. 2012*).

Dilatierte Interzellularspalten sind wahrscheinlich kein spezifisches Merkmal von Patienten mit GERD, sondern sie finden sich auch bei Patienten mit eosinophiler Ösophagitis (*Ravelli et al. 2014*). Diese charakteristischen mikroskopischen Veränderungen können als Marker für eine entzündliche Veränderung im Allgemeinen betrachtet werden.

Obwohl die Entnahme ösophagealer Proben und die histologische Aufarbeitung und Beurteilung selbiger (*Kandulski et al. 2013*) eine sichere Möglichkeit ist, um Patienten mit FH von Patienten mit NERD abzugrenzen, ist sie in der klinischen Routine und im diagnostischen Prozedere der GERD durch nationale und internationale Leitlinien nicht empfohlen.

4.3 Methodische Herausforderungen bei der Quantifizierung der PAR4 Expression

Die Primer für die quantitative RT-PCR wurden so ausgewählt, dass mindestens eine Intron-Exon-Grenze im Transkript enthalten ist (Abbildung 20). Auf diese Weise können die Primer

nur an cDNA nicht jedoch an Reste genomischer DNA binden und nur diese gewünschte cDNA wird amplifiziert.

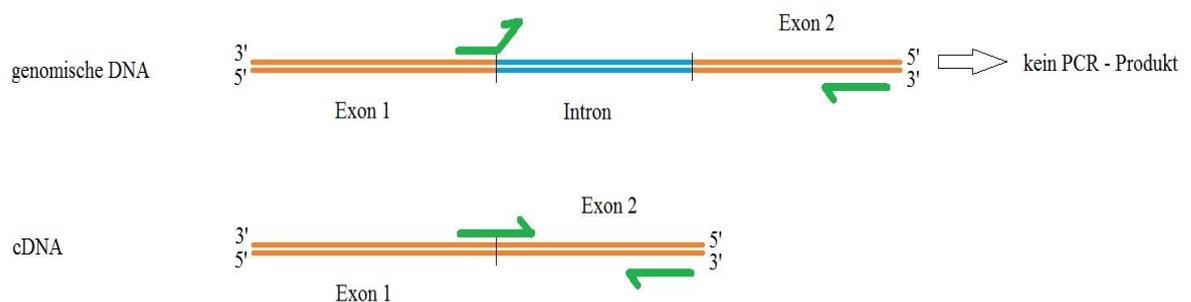


Abbildung 20: Funktionsweise Intron-übergreifender Primer

Um in der PCR ausschließlich die cDNA zu amplifizieren, ist es notwendig, dass die Primer spezifisch nur an diese binden können. Dazu wählt man Intron-übergreifende Primer aus. damit wird sichergestellt, dass die Primer nicht an Reste genomischer DNA binden können, sondern nur an die cDNA.

Schwierigkeiten ergaben sich bei der qPCR für PAR4. Trotz eines Intron-überspannenden Primers zeigten sich in der Agarosegelelektrophorese auch nach Wiederholung Mehrfachbanden, sodass eine quantifizierte Analyse der RT-qPCR unmöglich war.

Wir entschieden uns für die Quantifizierung der PAR4 Expression für den TaqMan® Assay (siehe Material und Methoden unter 2.6.6), bei dem zusätzlich zu den spezifischen Primern eine mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonde zum Einsatz kommt. Diese bindet an eine für die cDNA spezifische Sequenz und wird durch die Taq-Polymerase hydrolysiert, wodurch der Farbstoff freigesetzt und messbar wird. Sollten die Primer an ein ungewünschtes DNA-Fragment binden, dann wird dieses zwar amplifiziert, aber nicht detektiert, da die Sonde dort nicht bindet.

4.4 Etablierung von GAPDH und β -Aktin als Referenzgene

Zur quantitativen Beurteilung und Berechnung der relativen Genexpression von Zielgenen dienen sogenannte Referenzgene (=House Keeping Genes). Dabei handelt es sich idealerweise um konstitutionell in jeder Zelle gleichermaßen, unabhängig von äußeren Einflüssen, Zelltyp und Zellstadium exprimierte Gene. Im Gegensatz dazu werden die sogenannten regulierten Gene abhängig von den genannten Einflüssen in unterschiedlichem

Ausmaß exprimiert. Man geht davon aus, dass der Transkriptgehalt der Referenzgene linear abhängig von der Anzahl der Zellen in einer untersuchten Probe ist. Diese Referenzgene kodieren meist für Strukturmoleküle oder Proteine des Grundstoffwechsels. So ist GAPDH ein Enzym im Kohlenhydratstoffwechsel und β -Aktin ein Protein des Zytoskeletts.

Lin und Redies haben 2012 β -Aktin und GAPDH in verschiedenen Geweben untersucht und konnten feststellen, dass die Expression von Referenzgenen abhängig vom Gewebe unterschiedlich ist und sogar Unterschiede in der Expressionshöhe, teilweise gegensätzliche Niveaus, zwischen beiden bestehen. Sie empfehlen daher diese Unterschiede bei der Verwendung von GAPDH und β -Aktin als Referenzgene zu beachten (*Lin und Redies 2012*). Wir konnten in unserer Studie für β -Aktin und GAPDH stabile, vergleichbare Transkriptmengen in der humanen Ösophagusschleimhaut nachweisen.

Aufgrund des etwas höheren Expressionsniveaus mit früheren Ct-Werten entschieden wir uns die qRT-PCR-Analysen mit β -Aktin als Referenzgen durchzuführen.

4.5 Erhöhte PAR4 Expression in der Ösophagusk Mukosa von Patienten mit GERD und FH

Makroskopisch und mikroskopisch ist die Ösophagusk Mukosa von Patienten mit FH nicht von der Schleimhaut gesunder Kontrollen zu unterscheiden. Die Ösophagusschleimhaut von Patienten mit FH weist jedoch ein erhöhtes PAR4-Expressionsniveau auf. Dies ist vergleichbar mit der PAR4-Expression in der Ösophagusschleimhaut von Patienten mit GERD. Im Gegensatz zum Expressionsniveau von PAR4 bei den gesunden Kontrollen ohne Sodbrennen ist die PAR4-Expression bei allen drei Krankheitsentitäten signifikant erhöht, eben auch bei Patienten mit FH.

Wir konnten zeigen, dass PAR4 in den humanen, ösophagomukosalen Zelllinien KYSE150 und KYSE450 exprimiert wird, mit der relativen Einschränkung, dass es sich um Zelllinien mit malignem Hintergrund handelt. Eine PAR4-Expression auf peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) ließ sich ebenfalls nachweisen. Das entzündliche Infiltrat bei Patienten mit GERD besteht aus T-Zellen, Mastzellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Plasmazellen (*Moons et al. 2005*). Insgesamt findet sich in Biopsien aus dem Ösophagus sehr wenig submukosales Gewebe, in dem in der Regel ein Großteil des Infiltrates nachzuweisen ist. Im Vergleich zu Patienten mit GERD finden sich in der Mukosa von Patienten mit FH in unserer histologischen Untersuchung nur sehr wenige Immunzellen.

Bei den Patienten mit FH ist der zelluläre Ursprung der erhöhten PAR4-Expression somit nicht auf eine Überexpression auf infiltrierende Immunzellen, sondern auf eine PAR4-Expression auf Keratinozyten zurückzuführen. Eine immunhistochemische Färbung des PAR4 könnte Aufschluss über die Lokalisation der gesteigerten PAR4-Expression bringen. Leider gibt es keinen validen Antikörper, sodass eine immunhistochemische Färbung und Beurteilung nicht möglich war.

Es gibt verschiedene Arbeiten in Tiermodellen, die die neuronale Expression und schmerzmodulierende Wirkung von PAR4 zeigen konnten. Beispielsweise fanden Bao et al. in einem Rattenmodell eine gesteigerte Expression von PAR4 und PAR2 in Spinalganglien von Ratten, die unter tumorbedingten Knochenschmerzen litten im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (*Bao et al 2015*). Das Schmerzverhalten der Tiere wurde mittels Messung der Pfotenrückzugsschwelle auf thermische und mechanische Reize bestimmt. Die Tiere mit gesteigerter PAR4 und PAR2 Genexpression reagierten empfindlicher auf Schmerzreize.

Die Aktivierung von TRPV-1, ein vor allem in sensiblen, afferenten Neuronen exprimierter Rezeptor, führt zu einer gesteigerten PAR4-Genexpression (Zellmodell von Spinalganglienneuronen von Ratten, *Chen et al. 2013*).

Es gibt Untersuchungen, die auf synergistische Effekte von PAR4 und Bradikinin zur Schmerzentstehung beitragen. In einem Rattenmodell zeigten Russel et al. eine Sensibilisierung für mechanische Manipulation (Bewegung des Kniegelenks) durch PAR4-Aktivierung mittels eines spezifischen Agonisten, der in das Gelenk injiziert wurde. Diese Sensibilisierung blieb aus, wenn gleichzeitig ein Bradikinin B2 Rezeptor Antagonist verabreicht wurde (*Russel et al. 2010*).

Diese Modelle zeigen, dass PAR4-Expression und PAR4-Aktivierung bedeutend in der Schmerzmodulation beteiligt sind. Welche Effekte genau durch die PAR4-Aktivierung in der ösophagealen Schleimhaut ausgelöst werden, konnten wir in dieser Arbeit mit deskriptivem nicht zeigen.

4.6 Geringe Cathepsin G Gen- und Proteinexpression in der Ösophagasmukosa von Patienten mit GERD und FH

Es sind verschiedene Proteasen charakterisiert, die durch spezifische Proteolyse des extrazellulären N-Terminus zu einer PAR4-Aktivierung führen (*Déry et al.1998*). Die

Serinprotease Cathepsin G wird von neutrophilen Granulozyten während inflammatorischer Vorgänge vermehrt freigesetzt.

Debak et. al. konnten eine Überexpression von Cathepsin G bei Colitis ulcerosa nachweisen. Dabei besteht eine lineare Überexpression von PAR4 und Cathepsin G in der Kolonmukosa bei an Colitis ulcerosa erkrankten Patienten (*Debak et al. 2009*).

Die Cathepsin G Genexpression in der in dieser Arbeit untersuchten humanen Ösophagasmukosa ist sehr gering. Es fanden sich keine Unterschiede der ösophagomukosalen Expression zwischen Patienten mit GERD, mit FH und gesunden Kontrollen. Es besteht keine lineare Korrelation zwischen der Cathepsin G und PAR4 Genexpression, so wie sie bei Colitis ulcerosa (*Debak et al. 2009*) beschrieben wurde. Der Proteingehalt von Cathepsin G in humaner Ösophagasmukosa in der Messung mittels ELISA blieb unterhalb der Nachweisgrenze.

Da in Biopsien der Ösophagasmukosa, wie bereits oben diskutiert, quantitativ nur wenige infiltrierende Immunzellen zu finden sind, insbesondere bei Patienten mit FH gibt es kaum entzündliches Infiltrat, spielt eine Cathepsin G -abhängige PAR4-Aktivierung vermutlich eine untergeordnete Rolle.

4.7 Hinweise für eine gesteigerte Innervation der ösophagealen Mukosa von Patienten mit GERD und FH

Bhat und Bielefeldt haben 2006 die Innervation der ösophagealen Mukosa mittels PGP9.5 Genexpressionsbestimmung untersucht. Es wurden Patienten eingeschlossen, die makroskopisch keine Veränderungen der Mukosa aufwiesen, aber eine auffällige pH-Metrie hatten. Bath und Bielefeldt zeigten eine umso stärkere PGP9.5 Genexpression, umso höher die Säureexpositionszeit (AET) des Ösophagus war. Diese veränderte, dichtere Innervation der Ösophagusschleimhaut wird für die Symptomenentstehung insbesondere bei Patienten mit NERD diskutiert (*Bhat und Bielefeldt 2006*).

Woodland et al. untersuchten die Lokalisation der afferenten Nervenfasern in Abhängigkeit der Symptome. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Patienten mit mehr superfizial in der Mukosa gelegenen Nervenendigungen empfindlicher mit Symptomen reagieren als Patienten mit tiefer liegenden Nervenenden (*Woodland et al. 2015*). In unserem Studienkollektiv konnten wir eine verstärkte PGP9.5 Genexpression nicht nur bei Patienten mit NERD und ERD nachweisen, sondern auch Patienten mit FH weisen ein deutlich

stärkeres PGP9.5 Expressionsniveau als die gesunden Kontrollen ($p=0,06$) auf. Eine gesteigerte Innervation der Ösophagasmukosa von Patienten mit FH ist möglicherweise Ursache für eine periphere, viszerale Hypersensitivität dieser Patienten. Die verstärkte Genexpression dieses neuronalen Markers lässt eine verstärkte mukosale Innervation der Mukosa dieser Patienten vermuten.

4.8 Konzept der viszeralen Hypersensitivität bei Patienten mit GERD und FH

Das Konzept der viszeralen Hypersensitivität scheint insbesondere für Patienten mit FH in der Pathogenese bedeutsam zu sein. Sie weisen im Vergleich zu Patienten mit GERD kaum entzündliche Veränderungen der Mukosa auf, unterscheiden sich jedoch nicht bezüglich der Häufigkeit und Schwere der Symptome (Abbildung 21). Diese Hypersensitivität kann einerseits durch eine verstärkte Innervation und andererseits durch molekulare Veränderungen auf mukosalen Zellen verursacht werden. TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid Typ 1), PAR2, ASICs (Acid Sensing Ion Channels), Cannabinoid-Rezeptoren und Serotoninrezeptoren (5HT-Rezeptoren = 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren) gelten als potentielle therapeutische Angriffspunkte, da sie an der viszeralen Nozizeption maßgeblich beteiligt sind (*Akbar et al. 2009, de Carvalho Rocha et al. 2014*).

Statt PPI kann eine Therapie mit Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI) oder trizyklischen Antidepressiva bei Patienten mit funktionellen gastrointestinalen Beschwerden symptomlindernd wirken. Diese beiden Medikamentengruppen führen durch Blockade von Rezeptoren zu einer Veränderung der viszeralen Sensibilität. Es konnte nachgewiesen werden, dass oben genannte Medikamentengruppen einen positiven Effekt auf die Symptomatik bei Patienten mit FH haben (*Ostovaneh et al. 2014*). Eine Arbeitsgruppe um Dickman fasste bezüglich der Wirksamkeit von Antidepressiva bei funktionellen gastrointestinalen Beschwerden in einer Metaanalyse zusammen, dass der genaue Mechanismus bisher ungeklärt ist, aber eine signifikante Symptombesserung besteht (*Dickman et al. 2014*). 2002 forderten Fass und Tougas, dass eine weiterführende Untersuchungen zur Evaluation von Therapiemöglichkeiten, die über Säuresuppression hinausgehen, dringend notwendig ist (*Fass und Tougas 2002*).

Neben peripheren Mechanismen der Hypersensitivität scheinen zentrale Mechanismen für die Pathogenese der Symptomwahrnehmung eine Rolle zu spielen. Yang et al. ermittelten

durch Patientenbefragung die Lebensqualität sowie Symptome von Angst und Depression bei Patienten mit ERD, NERD und Gesunden. Sie fanden eine signifikant erhöhte Häufigkeit von Angst und Depression bei Patienten mit GERD im Vergleich zu den Gesunden sowie eine eingeschränkte Lebensqualität bei Patienten mit GERD (Yang *et al.* 2015). Patienten mit NERD gaben dabei eine signifikant schlechtere Lebensqualität an als die Patienten mit ERD.

Für einen psychischen Faktor und als Hinweis auf einen zentralnervösen Mechanismus spricht die Wirksamkeit der Hypnosetherapie. Riehl und Keefer konnten für Hypnosetherapie die Fähigkeit nachweisen, die psychische Komponente der Symptomwahrnehmung zu beeinflussen (Riehl und Keefer 2015).

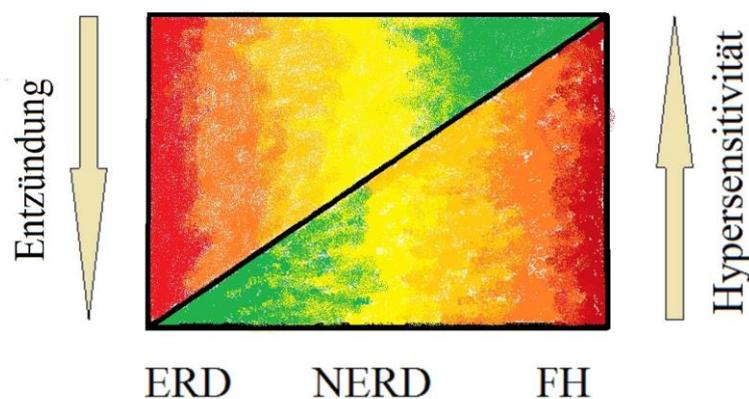


Abbildung 21: *Konzept der ösophagealen Hypersensitivität für Patienten mit FH*

Bei Patienten mit funktionellem Sodbrennen nimmt das Konzept der viszeralen Hypersensitivität für die Symptomentstehung eine bedeutende Funktion ein.

4.9 Ausblick

PAR4 wird von epithelialen Zellen in der Mukosa von Patienten mit GERD und FH verstärkt exprimiert. Die verstärkte Expression bei Patienten mit FH liefert einen möglichen Ansatzpunkt, die Pathogenese bei diesen Patienten genauer zu untersuchen.

Eine PAR4-Aktivierung durch Cathepsin G beispielsweise durch infiltrierende Granulozyten scheint bei Patienten mit GERD und FH keine Rolle zu spielen.

Es finden sich Hinweise für eine gesteigerte nervale Versorgung der Ösophagalmukosa von Patienten mit GERD und FH im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Sowohl die gesteigerte PAR4-Expression als auch die verstärkte Innervation bieten in Zukunft neue therapeutische Ansatzpunkte in der Behandlung der GERD und von FH.

5 Zusammenfassung

In den westlichen Industrienationen leidet jeder dritte bis vierte Einwohner unter Sodbrennen oder anderen Reflux assoziierten Symptomen. Für Patienten, die unter einer erosiven oder nicht-erosiven Refluxerkrankung (ERD und NERD) leiden, steht mit Protonenpumpeninhibitoren eine wirksame Therapie zur Verfügung, wenn ein pathologischer gastroösophagealer Säurereflux besteht. Nicht alle Patienten, die unter Reflux-assoziierten Symptomen leiden, werden routinemäßig eindeutig mittels pH-Metrie diagnostiziert, so dass ein nicht geringer Anteil von Patienten mit funktionellem Sodbrennen (FH) mit PPI behandelt wird, ohne dass eine Symptomlinderung erzielt wird.

Patienten mit ERD sind gekennzeichnet durch endoskopisch-makroskopische Veränderungen der ösophagealen Schleimhaut und eine auffällige Funktionsdiagnostik (MII-pH). Bei NERD finden sich mikroskopische Schleimhautläsionen im Sinne einer mikroskopischen Ösophagitis bei unauffälligem Befund des gastroösophagealen Überganges während der Endoskopie bei nachgewiesener pathologischer Säureexposition in der MII-pH. Patienten mit FH weisen weder makro- noch mikroskopische Schleimhautveränderungen auf. Ein pathologischer gastroösophagealer Reflux kann durch die Funktionsdiagnostik ausgeschlossen werden.

Die Aufgabe dieser Arbeit war einerseits ein Kollektiv von Patienten mit Reflux assoziierten Symptomen einwandfrei und sicher mittels klinischer Analyse, Funktionsdiagnostik und histologischer Untersuchung zu charakterisieren. Andererseits sollte die molekulare Charakterisierung der Expression von PAR4, der aktivierenden Protease Cathepsin G, sowie der mukosalen Innervation durch Analyse der PGP9.5 Expression erfolgen.

Für den Protease-aktivierten Rezeptor Typ 4 (PAR4) konnte eine Funktion in der Symptomgenese bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen werden.

Es fand sich eine hoch signifikante Überexpression ($p < 0,001$) von PAR 4 in den Gruppen ERD, NERD und FH im Vergleich mit den gesunden Kontrollen. Molekular unterscheiden sich Patienten mit FH damit von den gesunden Kontrollen. Die PAR4 Genexpression lässt sich qualitativ außerdem in Proben ösophagealer Zelllinien (KYSE150 und KYSE450) und in peripheren Blutmonozyten (PBMC) messen. Für PAR4 wird eine Rolle bei der Symptomgenese diskutiert. Für Cathepsin G konnten keine Unterschiede auf Ebene der Genexpression und Proteinsekretion gefunden werden. Andere Proteasen müssen diskutiert werden, um die verstärkte PAR4-Aktivierung zu erklären. Für eine Cathepsin G vermittelte Aktivierung durch infiltrierende Granulozyten findet sich in dieser Arbeit kein Hinweis.

PGP9.5 wird in der Ösophagusschleimhaut von Patienten mit GERD und FH verstärkt exprimiert, was eine stärkere Innervation der Mukosa nachweist. Dieser Befund spricht für einen bedeutenden Anteil der viszeralen Hypersensitivität in der Symptomenentstehung insbesondere für Patienten mit FH.

Insgesamt konnten wir in dieser Arbeit erstmals Veränderungen in der Ösophagusmukosa von Patienten mit FH nachweisen, die eine Rolle für die Symptomenentstehung spielen. Die erhöhte PAR4-Genexpression und verstärkte neuronale Innervation könnte in Zukunft vor allem für Patienten mit FH zur Entwicklung molekularer Targets führen.

Literaturverzeichnis

- (1) **Adams MN**, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, Hooper JD: *Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors*. Pharmacol Ther. 130.(3) 248-282 (2011)
- (2) **Agrawal A**, Roberts J, Sharma N, Tutuian R, Vela M, Castell DO: *Symptoms with acid and nonacid reflux may be produced by different mechanisms*. Dis. Esophagus. 22.(5) 467-470 (2009)
- (3) **Akbar A**, Walters JR, Ghosh S. Review article: visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: molecular mechanisms and therapeutic agents. Aliment Pharmacol Ther. 30. 423-435. (2009)
- (4) **Ando S**, Otani H, Yagi Y, Kawai K, Araki H, Fukuhara S, Inagaki C: *Proteinase-activated receptor 4 stimulation-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells* Respir Res. 8. 31 (2007)
- (5) **Annaházi A**, Dabek M, Gecse K, Salvador-Cartier C, Polizzi A, Rosztóczy A, Róka R, Theodorou V, Wittmann T, Bueno L, Eutamene H: *Proteinase-activated receptor-4 evoked colorectal analgesia in mice: an endogenously activated feed-back loop in visceral inflammatory pain* Neurogastroenterol Motil. 24.(1) 76-85 (2012)
- (6) **Arachiche A**, de la Fuente M, Nieman MT: *Calcium mobilization and protein kinase C activation downstream of protease activated receptor 4 (PAR4) is negatively regulated by PAR3 in mouse platelets*. PLoS One. 8.(2) 55740 (2013)
- (7) **Armstrong D**, Bennett JR, Blum AL, Dent J, De Dombal FT, Galmiche JP, Lundell L, Margulies M, Richter JE, Spechler SJ, Tytgat GN, Wallin L: *The endoscopic assessment of esophagitis: a progress report on observer agreement* Gastroenterology. 111.(1) 85-92 (1996)
- (8) **Asfaha S**, Cenac N, Houle S, Altier C, Papez MD, Nguyen C, Steinhoff M, Chapman K, Zamponi GW, Vergnolle N: *Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation* Br J Pharmacol. 150.(2) 176-185 (2007)
- (9) **Bao Y**, Hou W, Yang L, Liu R, Gao Y, Kong X, Shi Z, Li W, Zheng H, Jiang S, Hua B: *Increased expression of protease-activated receptor 2 and 4 within dorsal root ganglia in a rat model of bone cancer pain*. J Mol Neurosci. 55.(3) 706-714 (2015)
- (10) **Bhat YM**, **Bielefeldt K**: *Capsaicin receptor (TRPV1) and non-erosive reflux disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol. 18.(3) 263-270 (2006)
- (11) **Bollschweiler E**, Knoppe K, Wolfgarten E, Hölscher AH: *[Prevalence of reflux symptoms in the general population of Cologne]*. Z Gastroenterol. 45.(2) 177-181 (2007)
- (12) **Bove M**, Vieth M, Dombrowski F, Ny L, Ruth M, Lundell L *Acid challenge to the human esophageal mucosa: effects on epithelial architecture in health and disease*. Dig Dis Sci. 50.(8) 1488-1496 (2005)

- (13) **Bredenoord** AJ, Weusten BL, Curvers WL, Timmer R, Smout AJ: *Determinants of perception of heartburn and regurgitation*. Gut 55.(3) 313-318 (2006)
- (14) **Bremholm** L, Funch-Jensen P, Eriksen J, Hendel L, Havelund T, Matzen P: *Barrett's esophagus. Diagnosis, follow-up and treatment*. Danish Society for Gastroenterology and Hepatology. Dan Med J. 59.(8) C4499 (2012)
- (15) **Breumelhof** R, Smout AJ: *The symptom sensitivity index: a valuable additional parameter in 24-hour esophageal pH recording*. Am J Gastroenterol. 86.(2) 160-164 (1991)
- (16) **Brillantino** A, Monaco L, Schettino M, Torelli F, Izzo G, Cosenza A, Marano L, Di Martino N: *Prevalence of pathological duodenogastric reflux and the relationship between duodenogastric and duodenogastroesophageal reflux in chronic gastroesophageal reflux disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol. 20.(12) 1136-1143 (2008)
- (17) **Buddenkotte** J, Stroh C, Engels IH, Moormann C, Shpacovitch VM, Seeliger S, Vergnolle N, Vestweber D, Luger TA, Schulze-Osthoff K, Steinhoff M: *Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B*. J Invest Dermatol. 124.(1) 38-45 (2005)
- (18) **Busso** N, Chobaz-Péclat V, Hamilton J, Spee P, Wagtmann N, So A: *Essential role of platelet activation via protease activated receptor 4 in tissue factor-initiated inflammation* Arthritis Res Ther. 10.(2) R42 (2008)
- (19) **Calabrese** C, Bortolotti M, Fabbri A, Areni A, Cenacchi G, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G.: *Reversibility of GERD ultrastructural alterations and relief of symptoms after omeprazole treatment*. Am J Gastroenterol. 100.(3) 537-542 (2005)
- (20) **Cameron AJ**: *Barrett's esophagus: prevalence and size of hiatal hernia*. Am J Gastroenterol. 94.(8) 2054-2059(1999)
- (21) **Castell** DO: *Reflux testing in the 21st century: is there a role for pH only?* Clin Gastroenterol Hepatol. 6.(8) 840-841 (2008)
- (22) **Chen** D, Wang Z, Zhang Z, Zhang R, Yu L: *Capsaicin up-regulates protease-activated receptor-4 mRNA and protein in primary cultured dorsal root ganglion neurons*. Cell Mol Neurobiol. 33.(3) 337-346 (2013)
- (23) **Conus** S & **Simon** HU: *Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses*. Biochem. Pharmacol. 76.(11) 1374-1382 (2008)
- (24) **Cossentino** MJ, Wong RK: *Barrett's esophagus and risk of esophageal adenocarcinoma*. Semin Gastrointest Dis. 14.(3) 128-135 (2003)
- (25) **Cottrell** GS, Amadesi S, Grady EF, Bunnett NW: *Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4*. J Biol Chem. 279.(14) 13532-13539 (2004)

- (26) **Crowell MD**, Bradley A, Hansel S, Dionisio P, Kim HJ, Decker GA, DiBaise JK, Sharma VK: *Obesity is associated with increased 48-h esophageal acid exposure in patients with symptomatic gastroesophageal reflux*. Am J Gastroenterol. 104.(3) 553-559 (2009)
- (27) **Dabek M**, Ferrier L, Roka R, Gecse K, Annahazi A, Moreau J, Escourrou J, Cartier C, Chaumaz G, Leveque M, Ait-Belgnaoui A, Wittmann T, Theodorou V, Bueno L: *Luminal cathepsin g and protease-activated receptor 4: a duet involved in alterations of the colonic epithelial barrier in ulcerative colitis* Am J Pathol. 175.(1) 207-214 (2009)
- (28) **Dean BB**, Gano AD Jr, Knight K, Ofman JJ, Fass R: *Effectiveness of proton pump inhibitors in nonerosive reflux disease*. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2. 656-664 (2004)
- (29) **de Carvalho Rocha HA**, Dantas BP, Rolim TL, Costa BA, de Medeiros AC: *Main ion channels and receptors associated with visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome*. Ann Gastroenterol. 27.(3) 200-206 (2014)
- (30) **Dekel R**, Martinez-Hawthorne SD, Guillen RJ, Fass R: *Evaluation of symptom index in identifying gastroesophageal reflux disease-related noncardiac chest pain*. J Clin Gastroenterol. 38.(1) 24-9 (2004)
- (31) **Déry O**, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW: *Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases*. Am J Physiol. 274.(6Pt1) C1429-C1452 (1998)
- (32) **DeVault KR**, Castell DO; American College of Gastroenterology: *Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease*. Am J Gastroenterol. 100.(1) 190-200 (2005)
- (33) **Dickman R**, Maradey-Romero C, Fass R: *The role of pain modulators in esophageal disorders - no pain no gain*. Neurogastroenterol Motil. 26.(5) 603-10 (2014)
- (34) **Ebeling C**, Lam T, Gordon JR, Hollenberg MD, Vliagoftis H: *Proteinase-activated receptor-2 promotes allergic sensitization to an inhaled antigen through a TNF-mediated pathway*. J Immunol. 179.(5) 2910-2917 (2007)
- (35) **Elakkary E**, Duffy A, Roberts K, Bell R. *Recent advances in the surgical treatment of achalasia and gastroesophageal reflux disease*. J Clin Gastroenterol. 42.(5) 603-609 (2008)
- (36) **Elste AP**, **Petersen I**: *Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR₁₋₄) in human cancer*. J Mol Histol. 41.(2-3) 89-99 (2010)
- (37) **Endlicher E**, Gelbmann CM, Messmann H. *Reflux disease and Barrett's oesophagus - are there gender-specific differences?* Z Gastroenterol. 47.(10) 1065-8 (2009)
- (38) **Farré R**, van Malenstein H, De Vos R, Geboes K, Depoortere I, Vanden Berghe P, Fornari F, Blondeau K, Mertens V, Tack J, Sifrim D: *Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces*. Gut. 57.(10) 1366-74 (2008)

- (39) Fass R, Shapiro M, Dekel R, Sewell J: *Systematic review: proton-pump inhibitor failure in gastro-oesophageal reflux disease--where next?* Aliment.Pharmacol.Ther. 22. 79-94 (2005)
- (40) Fass R, Tougas G: *Functional heartburn: the stimulus, the pain, and the brain.* Gut. 51.(6) 885-92 (2002)
- (41) Ferrell WR, Lockhart JC, Kelso EB, Dunning L, Plevin R, Meek SE, Smith AJ, Hunter GD, McLean JS, McGarry F, Ramage R, Jiang L, Kanke T, Kawagoe J: *Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis.* J Clin Invest. 111.(1) 35-41 (2003)
- (42) Fiocca R, Mastracci L, Riddell R, Takubo K, Vieth M, Yerian L, Sharma P, Fernström P, Ruth M: *Development of consensus guidelines for the histologic recognition of microscopic esophagitis in patients with gastroesophageal reflux disease: the Esohisto project* Hum Pathol. 41.(2) 223-31 (2010)
- (43) Fujimoto D, Hirono Y, Goi T, Katayama K, Matsukawa S, Yamaguchi A: *The activation of Proteinase-Activated Receptor-1 (PAR1) mediates gastric cancer cell proliferation and invasion.* BMC Cancer. 10. 443 (2010)
- (44) Furuta T, Shirai N, Watanabe F, Honda S, Takeuchi K, Iida T, Sato Y, Kajimura M, Futami H, Takayanagi S, Yamada M, Ohashi K, Ishizaki T, Hanai H: *Effect of cytochrome P450C19 genotypic differences on cure rates for gastroesophageal reflux disease by lansoprazole.* Clin. Pharmacol. Ther. 72. 453-460 (2002)
- (45) Furuta T, Sugimoto M, Kodaira C, Nishino M, Yamada M, Ikuma M, Shirai N, Watanabe H, Umemura K, Kimura M, Hishida A: *CYP2C19 genotype is associated with symptomatic recurrence of GERD during maintenance therapy with low-dose lansoprazole.* Eur J Clin. Pharmacol. 65. 693-698 (2009)
- (46) Galmiche JP, Clouse RE, Bálint A, Cook IJ, Kahrilas PJ, Paterson WG, Smout AJ: *Functional esophageal disorders* Gastroenterology. 130.(5) 1459-1465 (2006)
- (47) Gratio V, Walker F, Lehy T, Laburthe M, Darmoul D: *Aberrant expression of proteinase-activated receptor 4 promotes colon cancer cell proliferation through a persistent signaling that involves Src and ErbB-2 kinase.* Int J Cancer. 124.(7) 1517-1525 (2009)
- (48) Hamilton JR, Frauman AG, Cocks TM: *Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists* Circ Res. 89.(1) 92-98(2001)
- (49) Herregods TV, Troelstra M, Weijenborg PW, Bredenoord AJ, Smout AJ: *Patients with refractory reflux symptoms often do not have GERD.* Neurogastroenterol Motil. 27.(9) 1267-1273 (2015)
- (50) Inci K, Edebo A, Olbe L, Casselbrant A: *Expression of protease-activated-receptor 2 (PAR-2) in human esophageal mucosa.* Scand J Gastroenterol. 44.(6) 664-671 (2009)

- (51) **Ishimura N**, Amano Y, Kinoshita Y: *Endoscopic definition of esophagogastric junction for diagnosis of Barrett's esophagus: importance of systematic education and training*. *Dig Endosc.* 21.(4) 213-218 (2009)
- (52) **Ismail-Beigi F**, Horton PF, Pope CE 2nd.: *Histological consequences of gastroesophageal reflux in man*. *Gastroenterology.* 58.(2) 163-74 (1970)
- (53) **Jamieson JR**, Stein HJ, DeMeester TR, Bonavina L, Schwizer W, Hinder RA, Albertucci M. *Ambulatory 24-h esophageal pH monitoring: normal values, optimal thresholds, specificity, sensitivity, and reproducibility*. *Am J Gastroenterol.* 87.(9) 1102-1111 (1992)
- (54) **Johnson LF**, DeMeester TR: *Development of the 24-hour intraesophageal pH monitoring composite scoring system*. *J Clin Gastroenterol.* 8(Suppl 1) 52-58 (1986)
- (55) **Jones R1**, Junghard O, Dent J, Vakil N, Halling K, Wernersson B, Lind T: *Development of the GerdQ, a tool for the diagnosis and management of gastro-oesophageal reflux disease in primary care*. *Aliment Pharmacol Ther* 30. 1030-1038 (2009)
- (56) **Kahn ML**, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR: *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin* *J Clin Invest.* 103.(6) 879-87 (1999)
- (57) **Kahrilas PJ**: *GERD pathogenesis, pathophysiology, and clinical manifestations* *Cleve Clin J Med.* 70.(Suppl 5) 4-19 (2003)
- (58) **Kahrilas PJ, Boeckxstaens G, Smout AJ**: *Management of the patient with incomplete response to PPI therapy*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 27.(3) 401-414 (2013)
- (59) **Kahrilas PJ, Smout AJ**: *Esophageal Disorders* *Am J Gastroenterol.* 105.(4) 747-756 (2010)
- (60) **Kandulski A**, Jechorek D, Caro C, Weigt J, Wex T, Mönkemüller K, Malfertheiner P. *Histomorphological differentiation of non-erosive reflux disease and functional heartburn in patients with PPI-refractory heartburn*. *Aliment Pharmacol Ther.* 38.(6) 643-651 (2013)
- (61) **Kandulski A**, Kuester D, Mönkemüller K, Fry L, Malfertheiner P, Wex T: *Protease-activated receptor-2 (PAR2) in human gastric mucosa as mediator of proinflammatory effects in Helicobacter pylori infection*. *Helicobacter.* 16.(6) 452-458 (2011)
- (62) **Katz PO**, Scheiman JM, Barkun AN: *Review article: acid-related disease--what are the unmet clinical needs?* *Aliment Pharmacol Ther.* 23.(Suppl 2) 9-22 (2006)
- (63) **Koelz HR**, Blum AL, Modlin IM: *Costs of gerd: facts and fiction*. *Gastroenterology* 125. 981-982 (2003)
- (64) **Koop H**, Schepp W, Müller-Lissner S, Madisch A, Micklefield G, Messmann H, Fuchs KH, Hotz J: *[Consensus conference of the DGVS on gastroesophageal reflux]* *Z Gastroenterol.* 43.(2) 163-164 (2005)

- (65) **Korkmaz B1**, Moreau T, Gauthier F: *Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions*. *Biochimie*. 90.(2) 227-242 (2008)
- (66) **Kulig M**, Leodolter A, Vieth M, Schulte E, Jaspersen D, Labenz J, Lind T, Meyer-Sabellek W, Malfertheiner P, Stolte M, Willich SN: *Quality of life in relation to symptoms in patients with gastro-oesophageal reflux disease-- an analysis based on the ProGERD initiative*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18. 767-776 (2003)
- (67) **Locke GR**, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ: *Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota*. *Gastroenterology* 112. 1448-1456 (1997)
- (68) **Lundell, L.R.**, Dent, J., Bennett, J.R., Blum, A.L., Armstrong, D., Galimiche, J.P., Johnson, F., Hongo, M., Richter, J.E., Spechler, S.J., Tytgat, G.N., Wallin, L.: *Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification*. *Gut*. 45.(2) 172-180 (1999)
- (69) **Martinez SD**, Malagon IB, Garewal HS, Cui H, Fass R: *Non-erosive reflux disease (NERD)--acid reflux and symptom patterns*. *Aliment Pharmacol Ther.* 17.(4) 537-545 (2003)
- (70) **McLaughlin JN**, Patterson MM, Malik AB: *Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization* *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104.(13) 5662-5667 (2007)
- (71) **Moons LM**, Kusters JG, Bultman E, Kuipers EJ, van Dekken H, Tra WM, Kleinjan A, Kwekkeboom J, van Vliet AH, Siersema PD: *Barrett's oesophagus is characterized by a predominantly humoral inflammatory response*. *J Pathol.* 207.(3) 269-76 (2005)
- (72) **Mulè F**, Pizzuti R, Capparelli A, Vergnolle N: *Evidence for the presence of functional protease activated receptor 4 (PAR4) in the rat colon*. *Gut*. 53.(2) 229-234 (2004)
- (73) **Nakanishi-Matsui M**, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR: *PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin* *Nature*. 404.(6778) 609-613 (2000)
- (74) **Neumann H**, Monkemuller K, Kandulski A, Malfertheiner P: *Dyspepsia and IBS symptoms in patients with NERD, ERD and Barrett's esophagus*. *Dig.Dis.* 26. 243-247 (2008)
- (75) **Ostovaneh MR**, Saeidi B, Hajifathalian K, Farrokhi-Khajeh-Pasha Y, Fotouhi A, Mirbagheri SS, Emami H, Barzin G, Mirbagheri SA: *Comparing omeprazole with fluoxetine for treatment of patients with heartburn and normal endoscopy who failed once daily proton pump inhibitors: double-blind placebo-controlled trial*. *Neurogastroenterol Motil.* 26.(5) 670-678 (2014)
- (76) **Pehl, C**; Schepp, W: *Wie entsteht Sodbrennen? Pathomechanismen und Einflussfaktoren* *Dtsch Arztebl* 99.(44) A-2941/B-2495/C-2339 (2002)

- (77) **Ramachandran R**, Sadofsky LR, Xiao Y, Botham A, Cowen M, Morice AH, Compton SJ: *Inflammatory mediators modulate thrombin and cathepsin-G signaling in human bronchial fibroblasts by inducing expression of proteinase-activated receptor-4* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 292.(3) L788-798 (2007)
- (78) **Ravelli A**, Villanacci V, Cadei M, Fuoti M, Gennati G, Salemme M: *Dilated intercellular spaces in eosinophilic esophagitis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 59.(5) 589-593 (2014)
- (79) **Reimer C**, Søndergaard B, Hilsted L, Bytzer P: *Proton-pump inhibitor therapy induces acid-related symptoms in healthy volunteers after withdrawal of therapy*. Gastroenterology. 137.(1) 80-87 (2009)
- (80) **Richter JE**, Bradley LA, DeMeester TR, Wu WC: *Normal 24-hr ambulatory esophageal pH values. Influence of study center, pH electrode, age, and gender*. Dig Dis Sci. 37.(6) 849-856 (1992)
- (81) **Riehl ME & Keefer L**: *Hypnotherapy for Esophageal Disorders*. Am J Clin Hypn. 58.(1) 22-33 (2015)
- (82) **Ronkainen J**, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E, Graffner H, Vieth M, Stolte M, Engstrand L, Talley NJ, Agréus L: *High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms and esophagitis with or without symptoms in the general adult Swedish population: a Kalixanda study report* Scand J Gastroenterol. 40.(3) 275-285 (2005)
- (83) **Ronkainen J**, Talley NJ, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Vieth M, Agréus L, Aro P: *Erosive esophagitis is a risk factor for Barrett's esophagus: a community-based endoscopic follow-up study* Am J Gastroenterol. 106.(11) 1946-1952 (2011)
- (84) **Russell FA**, Veldhoen VE, Tchitchkan D, McDougall JJ: *Proteinase-activated receptor-4 (PAR4) activation leads to sensitization of rat joint primary afferents via a bradykinin B2 receptor-dependent mechanism*. J Neurophysiol. 103. 155–163 (2010)
- (85) **Savarino V**, Savarino E, Parodi A, Dulbecco P: *Functional heartburn and non-erosive reflux disease*. Dig.Dis. 25. 172-174 (2007)
- (86) **Savarino E**, Zentilin P, Mastracci L, Dulbecco P, Marabotto E, Gemignani L, Bruzzone L, de Bortoli N, Frigo AC, Fiocca R, Savarino V: *Microscopic esophagitis distinguishes patients with non-erosive reflux disease from those with functional heartburn*. J Gastroenterol. 48.(4) 473-482 (2013)
- (87) **Savarino E**, Zentilin P, Tutuian R, Pohl D, Gemignani L, Malesci A, Savarino V: *Impedance-pH reflux patterns can differentiate non-erosive reflux disease from functional heartburn patients*. J Gastroenterol. 47.(2) 159-168 (2012)
- (88) **Sharma P**, Wani S, Romero Y, Johnson D, Hamilton F: *Racial and geographic issues in gastroesophageal reflux disease*. Am J Gastroenterol. 103.(11) 2669-2680 (2008)

- (89) **Shaw M**, Dent J, Beebe T, Junghard O, Wiklund I, Lind T, Johnsson F: *The Reflux Disease Questionnaire: a measure for assessment of treatment response in clinical trials*. Health Qual Life Outcomes. 6. 31 (2008)
- (90) **Shaw MJ**, Talley NJ, Beebe TJ, Rockwood T, Carlsson R, Adlis S, Fendrick AM, Jones R, Dent J, Bytzer P: *Initial validation of a diagnostic questionnaire for gastroesophageal reflux disease* Am J Gastroenterol. 96.(1). 52-57 (2001)
- (91) **Sifrim D**: *Esophageal impedance monitoring and pathophysiology of gastroesophageal reflux disease* Verh K Acad Geneesk Belg. 68.(3) 151-178 (2006)
- (92) **Sifrim D**, Castell D, Dent J, Kahrilas PJ: *Gastro-oesophageal reflux monitoring: review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux*. Gut 53. 1024-1031 (2004)
- (93) **Sifrim D**, **Holloway R**: *Transient lower esophageal sphincter relaxations: how many or how harmful?* Am. J. Gastroenterol. 96. 2529-2532 (2001)
- (94) **Sifrim D**, Holloway R, Silny J, Xin Z, Tack J, Lerut A, Janssens J: *Acid, nonacid, and gas reflux in patients with gastroesophageal reflux disease during ambulatory 24-hour pH-impedance recordings* Gastroenterology. 120.(7) 1588-1598 (2001)
- (95) **Sifrim D**, Mittal R, Fass R, Smout A, Castell D, Tack J, Gregersen H.: *Review article: acidity and volume of the refluxate in the genesis of gastro-oesophageal reflux disease symptoms*. Aliment Pharmacol Ther. 25.(9) 1003-1017 (2007)
- (96) **Slofstra SH**, Bijlsma MF, Groot AP, Reitsma PH, Lindhout T, ten Cate H, Spek CA: *Protease-activated receptor-4 inhibition protects from multiorgan failure in a murine model of systemic inflammation* Blood. 110.(9) 3176-3182 (2007)
- (97) **Souza RF**: *Bringing GERD Management up to PAR-2*. Am J Gastroenterol. 105.(9) 1944-1946 (2010)
- (98) **Steinhoff M**, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW. *Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase*. Exp Dermatol. 8.(4) 282-294 (1999)
- (99) **Suo Z**, Wu M, Citron BA, Gao C, Festoff BW: *Persistent protease-activated receptor 4 signaling mediates thrombin-induced microglial activation* J Biol Chem. 278.(33) 31177-31183 (2003)
- (100) **Suo Z**, Wu M, Citron BA, Palazzo RE, Festoff BW: *Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling* J Biol Chem. 278.(39) 37681-37689 (2003)
- (101) **Swarnjit Singh MD**, Dr. Joel E. Richter MD, Laurence A. Bradley PhD, Julie M. Haile BA *The symptom index* Digestive Diseases and Sciences 38.(8) 1402-1408 (1993)

- (102) Tamura Y, Funaki Y, Izawa S, Iida A, Yamaguchi Y, Adachi K, Ogasawara N, Sasaki M, Kaneko H, Kasugai K. *Pathophysiology of functional heartburn based on Rome III criteria in Japanese patients*. World J Gastroenterol. 21.(16) 5009-5016 (2015)
- (103) Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC: *Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux--damaged human esophageal epithelium*. Gastroenterology. 111.(5) 1200-1205 (1996)
- (104) Tytgat G. *Long-term GERD management: the individualized approach*. Drugs Today (Barc). 42.(Suppl B) 23-29 (2006)
- (105) Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R; Global Consensus Group: *The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus* Am J Gastroenterol. 101.(8) 1900-1920 (2006)
- (106) Vela MF, Camacho-Lobato L, Srinivasan R, Tutuian R, Katz PO, Castell DO: *Simultaneous intraesophageal impedance and pH measurement of acid and nonacid gastroesophageal reflux: effect of omeprazole*. Gastroenterology 120. 1599-1606 (2001)
- (107) van Kerkhoven LA, Laheij RJ, Aparicio N, De Boer WA, Van den Hazel S, Tan AC, Witteman BJ, Jansen JB: *Effect of the antidepressant venlafaxine in functional dyspepsia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Clin Gastroenterol Hepato. 16.(7) 746-752 quiz 718 (2008)
- (108) Vieth M, Kulig M, Leodolter A, Naucler E, Jaspersen D, Labenz J, Meyer-Sabellek W, Lind T, Willich S, Malfertheiner P, Stolte M: *Histological effects of esomeprazole therapy on the squamous epithelium of the distal oesophagus*. Aliment Pharmacol Ther. 23.(2) 313-319 (2006)
- (109) Vieth M, Peitz U, Labenz J, Kulig M, Naucler E, Jaspersen D, Meyer-Sabellek W, Willich S, Lind T, Malfertheiner P, Stolte M: *What parameters are relevant for the histological diagnosis of gastroesophageal reflux disease without Barrett's mucosa?* Dig Dis. 22.(2) 196-201 (2004)
- (110) Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR: *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation* Cell. 64.(6) 1057-1068 (1991)
- (111) Weigt J, Mönkemüller K, Kolfenbach S, Malfertheiner P. *[Standards and innovations in the diagnosis of gastroesophageal reflux disease]*. Z Gastroenterol. 45.(11) 1141-1149 (2007)
- (112) Weijenborg PW, Cremonini F, Smout AJ, Bredenoord AJ: *PPI therapy is equally effective in well-defined non-erosive reflux disease and in reflux esophagitis: a meta-analysis*. Neurogastroenterol Motil. 24.(8) 747-757 (2012)
- (113) Weusten BL, Roelofs JM, Akkermans LM, Van Berge-Henegouwen GP, Smout AJ. *The symptom-association probability: an improved method for symptom analysis of 24-hour esophageal pH data*. Gastroenterology. 107.(6) 1741-1745 (1994)

- (114)Wiener GJ1, Richter JE, Copper JB, Wu WC, Castell DO: *The symptom index: a clinically important parameter of ambulatory 24-hour esophageal pH monitoring*. Am J Gastroenterol. 83.(4) 358-361 (1988)
- (115)Wiklund I: *Review of the quality of life and burden of illness in gastroesophageal reflux disease*. Dig.Dis. 22. 108-114(2004)
- (116)Wong BC, Kinoshita Y: *Systematic review on epidemiology of gastroesophageal reflux disease in Asia*. Clin Gastroenterol Hepatol. 4.(4) 398-407 (2006)
- (117)Woodland P, Aktar R, Mthunzi E, Lee C, Peiris M, Preston SL, Blackshaw LA, Sifrim D: *Distinct afferent innervation patterns within the human proximal and distal esophageal mucosa..* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 308.(6) G525-G531 (2015)
- (118)Yang YH, Hall P, Little CB, Fosang AJ, Milenkovski G, Santos L, Xue J, Tipping P, Morand EF: *Reduction of arthritis severity in protease-activated receptor-deficient mice*. Arthritis Rheum. 52.(4) 1325-1332 (2005)
- (119)Yang XJ, Jiang HM, Hou XH, Song J: *Anxiety and depression in patients with gastroesophageal reflux disease and their effect on quality of life*. World J Gastroenterol. 21.(14) 4302-4309 (2015)
- (120)Yerian L, Fiocca R, Mastracci L, Riddell R, Vieth M, Sharma P, Franzen S, Fernstrom P, Ruth M: *Refinement and reproducibility of histologic criteria for the assessment of microscopic lesions in patients with gastroesophageal reflux disease: the Esohisto Project* Dig Dis Sci. 56.(9) 2656-2665 (2011)
- (121)Zavala-Gonzales MA1, Azamar-Jacome AA1, Meixueiro-Daza A1, Ramos A2, J JR1, Roesch-Dietlen F1, Remes-Troche JM1: *Validation and diagnostic usefulness of gastroesophageal reflux disease questionnaire in a primary care level in Mexico*. J Neurogastroenterol Motil. 20.(4) 475-482 (2014)
- (122)Zentilin P, Savarino V, Mastracci L, Spaggiari P, Dulbecco P, Ceppa P, Savarino E, Parodi A, Mansi C, Fiocca R.: *Reassessment of the diagnostic value of histology in patients with GERD, using multiple biopsy sites and an appropriate control group*. Am J Gastroenterol. 100.(10) 2299-2306 (2005)
- (123)Zhang Y, Yu G, Jiang P, Xiang Y, Li W, Lee W, Zhang Y: *Decreased expression of protease-activated receptor 4 in human gastric cancer* Int J Biochem Cell Biol. 43.(9) 1277-1283 (2011)
- (124)Zhang Y, Zhan H, Xu W, Yuan Z, Lu P, Zhan L, Li Q: *Upregulation of matrix metalloproteinase-1 and proteinase-activated receptor-1 promotes the progression of human gliomas*. Pathol Res Pract. 207.(1) 24-29 (2011)
- (125)Zhao JH, Dong L, Shi HT, Wang ZY, Shi HY, Ding H: *The expression of protease-activated receptor 2 and 4 in the colon of irritable bowel syndrome patients*. Dig Dis Sci. 57.(1) 58-64 (2012)

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner für die Überlassung des Themas und für die Gelegenheit in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik Magdeburg meine Promotionsarbeit durchzuführen.

Von Herzen möchte ich PD Dr. med. Arne Kandulski danken, der mir vom ersten bis zum letzten Tag mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch möchte ich dem Team vom gastroenterologischen Labor der Uniklinik danken. Die Medizinisch-technischen Assistentinnen haben mir mit Geduld und viel Engagement die wissenschaftlichen Methoden gelehrt und hatten stets ein wachsames Auge auf mein Schaffen im Labor.

Ein besonderes Wort des Dankes gilt Dr. rer. nat. Thomas Wex für die fachliche Unterstützung in besonders kniffligen Phasen der Doktorarbeit.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung des Protease aktivierten Rezeptors Typ 4 (PAR4) und Cathepsins G in der Ösophagasmukosa von Patienten mit Gastroösophagealer Refluxerkrankung (GERD) und Funktionellem Sodbrennen (FH)

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie

unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner

und Herrn PD Dr. med. habil. Arne Kandulski

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 22.02.2017

Lebenslauf

Daniela Sudau

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen in der digitalen Version entfernt.

Anhang

Ethikvotum 30/08

Patienteninformation und Einverständniserklärung für Studienpatienten

Reflux Disease Questionnaire

OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG

Ethik-Kommission

der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät
und am Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.

Vorsitzender: Prof. Dr. med. D. Krause



Universitätsklinikum • Leipziger Straße 44 • D-39120 Magdeburg

Herrn Prof. Dr. Malfertheiner, OA Dr. Mönkemüller, Dr. Kandulski
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.

Leipziger Straße 44
39120 Magdeburg

Tel.
(0391) 67/14314
67/14344

Fax
(0391) 67/14354
67/290185

eMail
norbert.beck@med.ovgu.de
ethikkommission@ovgu.de

Datum

21.07.2008

Unser Zeichen: 30/08

Beteiligung des Proteinase-aktivierten Rezeptors-2 an der Pathogenese der gastroösophagealen Refluxerkrankung

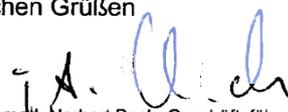
Sehr geehrter Herr Prof. Malfertheiner, sehr geehrter Herr OA Dr. Mönkemüller, sehr geehrter Herr Dr. Kandulski,

die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg hat die übergebenen Unterlagen zur o. g. Studie überprüft, in der letzten Kommissionssitzung eingehend erörtert und ist zu der Auffassung gekommen, dass gegen die Durchführung keine ethischen Bedenken bestehen. Diese **zustimmende Bewertung** ergeht unter dem Vorbehalt gleichbleibender Gegebenheiten.

Die Verantwortlichkeit des jeweiligen Prüfwissenschaftlers / behandelnden Prüfarztes bleibt in vollem Umfang erhalten und wird durch diese Entscheidung nicht berührt. Alle zivil- oder haftungsrechtlichen Folgen, die sich ergeben könnten, verbleiben uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.

Beim Monitoring sind die Bestimmungen des Bundes- und Landesdatenschutzgesetzes sowie die sich aus der ärztlichen Schweigepflicht ergebenden Einschränkungen zu beachten, was eine Aushändigung kompletter Patientenakten zum Monitoring ausschließt. Ein Monitoring personen- und studienbezogener Daten wird dadurch nicht beeinträchtigt.

Mit freundlichen Grüßen


(i. A. Dr. med. Norbert Beck, Geschäftsführer)
Prof. Dr. med. D. Krause
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Ethik-Kommission
der Otto-von-Guericke-Universität
an der Medizinischen Fakultät
Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. D. Krause
Leipziger Str. 44
D-39120 Magdeburg

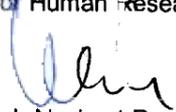
Anlage zum Votum der Studie 30/08 vom 21.07.2008

Zum Zeitpunkt der Bewertung der vorstehenden Studie waren folgende Damen und Herren Mitglied der Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg:

Herr Prof. Dr. Bannert	Medizinische Fakultät, Zentrum für Kinderheilkunde
Herr Prof. Dr. Behrens-Baumann	Medizinische Fakultät, Universitätsklinik für Augenheilkunde
Herr Prof. Dr. Huth	Medizinische Fakultät, Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Frau Prof. Dr. Kielstein	Medizinische Fakultät, Klinik für Innere Medizin
Herr Prof. Dr. Läuter	Medizinische Fakultät, Institut für Biometrie und Medizinische Informatik
Herr Prof. Dr. Lohmann	Fakultät Geistes-, Sozial- und Erziehungs- wissenschaften, Institut für Philosophie
Herr Prof. Dr. Meyer	Medizinische Fakultät, Institut für Klinische Pharmakologie
Herr Prof. Dr. Müller	Fakultät Naturwissenschaften, Institut für Experimentelle Physik
Herr Prof. Dr. Rose	Fakultät für Elektrotechnik und Informations- technik, Institut für Elektronik, Signalverarbeitung und Kommunikationstechnik
Herr Prof. Dr. Krause	Medizinische Fakultät, Institut für Rechtsmedizin

Mitglieder der Ethik-Kommission, die in eine Studie eingebunden sind, haben für die Votierung der betreffenden Studie kein Stimmrecht.

Die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg ist unter Beachtung entsprechender internationaler Richtlinien (ICH, GCP) tätig, nach Landesrecht (Hochschulgesetz des Landes Sachsen-Anhalt § 80, Abs. 3; Hochschulmedizingesetz des Landes Sachsen-Anhalt § 1 Abs. 4) legitimiert und beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte gemäß § 20 Abs. 8 des Medizinproduktegesetzes registriert. Weiterhin besteht eine Registrierung der Ethik-Kommission beim Bundesamt für Strahlenschutz nach § 28g Röntgenverordnung (EK-043/R) und § 92 Strahlenschutzverordnung (EK-046/S) sowie beim Office for Human Research Protections, reg. no. IRB00006099, Rockville, MD, U.S.A..


Dr. med. Norbert Beck
Geschäftsführer der Ethik-Kommission



• **Patienteninformation**

Gewinnung von Schleimhautproben und Magensaft für die Charakterisierung der gastroösophagealen Refluxerkrankung.

Sehr geehrte /r Frau / Herr _____ ,

Wir möchten Sie einladen, an einer Studie zur Charakterisierung der gastroösophagealen Refluxerkrankung, die derzeitig an unserer Klinik durchgeführt wird, teilzunehmen. Um sich für eine Teilnahme zu entscheiden, ist es wichtig, die Hintergründe zu verstehen, warum und mit welchem Aufwand die Datenerhebung für diese Studie durchgeführt wird. Bitte lesen Sie die folgenden Informationen sorgfältig und klären offene Fragen mit dem betreuenden Arzt.

Hintergründe und Ziele

Bei Ihnen wird eine sogenannte gastroösophageale Refluxerkrankung vermutet. Das Zurückfließen von Magensaft in die Speiseröhre verursacht bei dieser Erkrankung typische Symptome (Sodbrennen, Aufstoßen, Hustenreiz) und entzündliche Veränderungen in der Speiseröhre. Die medikamentöse Standardtherapie sind Präparate, die die Säureproduktion des Magens hemmen. Über den Einfluss einzelner Bestandteile im Magensaft für die Krankheitsentstehung ist bisher nur wenig bekannt und soll durch diese Studie analysiert werden.

In der klinischen Routine werden während der endoskopischen Untersuchungen (Magenspiegelung) Gewebeproben aus der Magen- und Ösophagusschleimhaut entnommen. In der geplanten Untersuchung sind zusätzliche Analysen einiger Proteine in der Schleimhaut, die an der Entzündung und der Schmerzverarbeitung beteiligt sind, vorgesehen. Im Sekret Ihres Magens sollen zusätzlich Bestandteile untersucht werden, die an der Speiseröhre für die Entzündung und für die typischen Symptome verantwortlich sein können.

Notwendigkeit der Teilnahme

Ihre Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können die Teilnahme verweigern oder sich auch jederzeit für eine Beendigung ohne Angabe von Gründen entscheiden. Dies wird den Behandlungsstandard in der Zukunft nicht beeinflussen. Sie werden mit oder ohne Teilnahme die bestmögliche Therapie erhalten. Wenn Sie sich für die Teilnahme entscheiden, bitten wir Sie, das anliegende Patienteneinverständnisformular zu unterschreiben.

Ablauf

- Im Rahmen der klinischen Routinediagnostik wird bei Ihnen eine **Magenspiegelung** durchgeführt. Zur Routinediagnostik gehört die Entnahme von kleinen Schleimhautproben (etwa 2-3 mm) aus dem Magen und der Speiseröhre. Zur Durchführung dieser Untersuchung sind je 2 zusätzliche Probeentnahmen aus 2 unterschiedlichen Lokalisationen im Magen und aus der Speiseröhre vorgesehen. Zusätzlich wird ein Teil des Sekrets, welches sich in Ihrem Magen befindet, abgesaugt und später analysiert.
- Zur genauen Diagnostik wird im Rahmen der klinischen Routinediagnostik bei Ihnen eine 24 Stunden dauernde **pH- / Impedanzanalyse** zur Charakterisierung des Refluats durchgeführt. Über die Messung von Veränderungen eine geringen elektrischen Widerstands (Impedanz) zwischen einzelnen Messpunkten des Katheters ist eine Aussage über die Konsistenz des Refluats (flüssig, gasförmig) über den pH-Wert hinaus möglich.
Für die exakte Platzierung der Messsonden ist es notwendig, mit einem so genannten Manometrie-Katheter den gastroösophagealen Übergang – das heißt den Übergang von der Speiseröhre in den Magen - genau zu lokalisieren. Dieser über die Nase eingeführte Katheter hat einen Durchmesser von 5 mm und misst die Druckverhältnisse und Beweglichkeit der Speiseröhre. Dieser Katheter verfügt über einen separaten Kanal, der das Absaugen von Magensaft ermöglicht.

Um möglichst genaue Vergleichswerte zu erzielen, möchten wir Sie bitten, zuletzt am Vorabend zu essen und zu trinken, und danach auch nicht mehr zu rauchen.

Mögliche Komplikationen

Die Magenspiegelung wie auch die pH- / Impedanzanalyse sind risikoarme Routineverfahren. Trotz größter Sorgfalt können in seltenen Fällen Komplikationen auftreten, über die in den spezifischen Aufklärungen zur Untersuchungen aufgeklärt werden.

Sollte während der Magenspiegelung ein sedierendes Medikament (Midazolam 5 mg) intravenös verabreicht werden, so ist die Teilnahme am Straßenverkehr für 24 Stunden untersagt.

Möglicher Nutzen

Die durchgeführten Untersuchungen ermöglichen eine möglichst genaue Charakterisierung und Diagnostik der gastroösophagealen Refluxerkrankung. Die regelmäßige Dokumentation ihrer Beschwerdesymptomatik sowie die Auswertung der klinischen Routinediagnostik im Rahmen der Untersuchung ermöglichen eine optimale Dosierung der Magensäureblocker.

Anonymität der erhobenen Daten

Die Daten werden zur weiteren statistischen Auswertung zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen herangezogen. Wir sichern Ihnen auch bei der Auswertung der Daten zu, dass keinerlei personenbezogene Daten weitergegeben werden und dass die Analyse vollständig anonym erfolgt. Das heißt, dass eine Zuordnung von Untersuchungsbefund und Person später nicht mehr möglich ist. Somit haben nur Ärzte und Schwestern unserer Abteilung Zugang zu Ihren persönlichen Daten, die selbstverständlich der Schweigepflicht unterliegen. Die Studienergebnisse werden in der medizinischen Literatur veröffentlicht, jedoch ohne dass die Identität der Studienteilnehmer zu erkennen sein wird.

Kosten

Es entstehen durch die Studie für Sie keine Kosten. Es sind keine zusätzlichen Visiten und Untersuchungen geplant, die für die Behandlung Ihrer Erkrankung notwendig sind.

Schadensersatz

Sollte bei der Studienteilnahme ein Schaden für Sie entstehen, was nicht zu erwarten ist, werden eventuelle Entschädigungsansprüche im Rahmen der gesetzlichen Haftpflichtversicherung des Klinikums reguliert.

Kontakt

Sollten im Zusammenhang mit der Untersuchung Nebenwirkungen oder Unwohlsein beobachtet werden, sollten Sie sich umgehend an den behandelnden Prüfarzt wenden.

Name: Dr. med. Arne Kandulski
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg
0391 – 6713115
0391 – 6713114

Vielen Dank, dass Sie sich diese Informationen sorgfältig durchgelesen haben. Sollten noch Fragen offen bleiben, wenden Sie sich bitte an Ihren Arzt.

Aus rechtlichen und ethischen Gründen benötigen wir für den Eingriff und für die Gewinnung und Analyse des Magensaftes sowie für die Entnahme zusätzlicher Schleimhautproben für wissenschaftliche Untersuchungen vor der Untersuchung Ihr schriftliches Einverständnis und eine Erklärung darüber, dass Sie alle Informationen verstanden und über die Durchführung der Studie vollständig aufgeklärt wurden.

Für die Einwilligung zur Studienteilnahme danken wir Ihnen.

Einverständniserklärung

Gewinnung von Magenschleimhautproben und Magensaft für die Charakterisierung der gastroösophagealen Refluxerkrankung.

- Ich habe die oben aufgeführten Informationen vollständig gelesen und verstanden.
- Über die Durchführung der Untersuchung und Studie hat mich Frau/Herr _____ ausführlich aufgeklärt und offene Fragen wurden zu meiner vollständigen Zufriedenheit beantwortet.
- Meine Teilnahme erfolgt freiwillig und ich kann mein Einverständnis jederzeit widerrufen, ohne dass meine medizinische Versorgung beeinträchtigt wird.

Ich willige ein, an der Studie teilzunehmen.

Name des Patienten (in Druckbuchstaben)

Unterschrift des Patienten

Datum

Name des aufklärenden Prüfarztes (in Druckbuchstaben)

Unterschrift des aufklärenden Prüfarztes

Datum

Reflux Disease Questionnaire

Name: _____
(Aufkleber)

Datum: _____

PPI? ja nein

Bitte beantworten Sie die Fragen, indem Sie pro Frage nur eine Antwort ankreuzen.

Wie häufig traten in der letzten Woche folgende Symptome auf?

	gar nicht aufgetreten	an einem Tag	an 2-3 Tagen	an 4-6 Tagen	täglich
a. ein brennendes Gefühl hinter dem Brustbein	<input type="checkbox"/>				
b. Schmerzen hinter dem Brustbein	<input type="checkbox"/>				
c. ein brennendes Gefühl im Zentrum des Oberbauchs	<input type="checkbox"/>				
d. Schmerzen im Zentrum des Oberbauchs	<input type="checkbox"/>				
c säuerlicher Geschmack im Mund	<input type="checkbox"/>				
d. Aufstoßen von Mageninhalt	<input type="checkbox"/>				

Wie bewerten Sie die Schwere der aufgetretenen Symptome in der letzten Woche?

	gar nicht aufgetreten	sehr leicht	leicht	mäßig	mäßig bis stark	stark
a. ein brennendes Gefühl hinter dem Brustbein	<input type="checkbox"/>					
b. Schmerzen hinter dem Brustbein	<input type="checkbox"/>					
c. ein brennendes Gefühl im Zentrum des Oberbauchs	<input type="checkbox"/>					
d. Schmerzen im Zentrum des Oberbauchs	<input type="checkbox"/>					
c säuerlicher Geschmack im Mund	<input type="checkbox"/>					
d. Aufstoßen von Mageninhalt	<input type="checkbox"/>					

