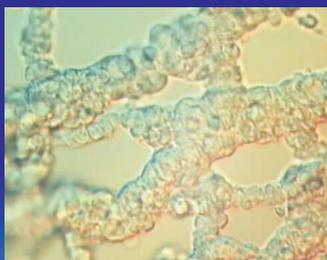
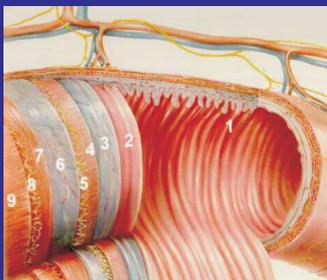
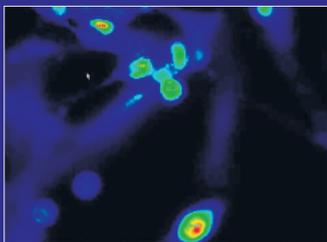


Mechanismus der Wirkung von Butyrat auf das Membranpotential von kultivierten Neuronen aus dem Plexus myentericus der Ratte



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

SALAH ALDIN HAMODEH

صلاح حمودة

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2004

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

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

**Mechanismus der Wirkung von Butyrat auf das
Membranpotential von kultivierten Neuronen aus dem
Plexus myentericus der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
Salah Aldin Hamodeh
Tierarzt aus Damaskus (Syrien)

Giessen 2004

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

Dekan: Prof. Dr. Dr.h.c. B. Hoffmann

1. Berichtserstatter: Prof. Dr. M. Diener

2. Berichtserstatter: Prof. Dr. K. Doll

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	1
I. EINLEITUNG	
1. Kurzkettige Fettsäuren im Kolon	2
1.1 Bildung und Resorption	2
1.2 Wirkungen auf den Elektrolyttransport	5
1.3 Wirkungen auf die Motilität	5
2. Bedeutung des enteralen Nervensystems für die Regulation des intestinalen Ionentransportes und der Motilität	6
3. Wirkung von kurzkettigen Fettsäuren auf das enterische Nervensystem	10
4. Fragestellung	11
II. MATERIAL UND METHODEN	
1. Versuchstiere	13
2. Die Präparation des Plexus myentericus der Ratte	13
3. Die Patch-Clamp-Technik	17
4. Die Lösungen	
4.1 Die Zellkultur und Präparationslösungen	20
4.2 Perfusionslösungen bei den Patch-Clamp-Versuchen	20
4.3 Pipettenlösungen	20
4.4 Lösungen für die Fura-2-Messungen	21
5. Der Patch-Clamp Messstand	
5.1 Mikroskop	21
5.2 Die optischen Komponenten	22
5.3 Messkammer und Perfusionssystem	23
5.4 Mechanische Abschirmung: Der Messtisch	23
5.5 Elektrische Abschirmung: Der Faraday-Käfig	23
5.6 Der Mikromanipulator	24
5.7 Elektrische Komponenten	25
5.8 Elektroden und Patchpipetten	26
6. Datenerfassung	27
7. Ablauf eines Patch-Clamp-Experimentes	27
8. Berechnungen	30
9. Messung der Intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration mit Fura-2	
9.1 Struktur von Fura-2	31
9.2 Fluoreszenzemission von Fura-2	31
9.3 Der Imaging-Messstand	
9.3.1 Fluoreszenzmikroskopie und elektronische Komponenten	34
9.3.2 Messkammern und Perfusionssystem	36
9.4 Versuchsdurchführung	37
9.5 Datenerfassung	38
10. Chemikalien	39
11. Auswertung	39

III. ERGEBNISSE

1. Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Butyrat auf das Membran	40
2. Charakterisierung der durch Butyrat stimulierten Kaliumleitfähigkeit	44
3. Intrazelluläre Vermittlung der Wirkung von Butyrat	47
4. Zusammenfassung der Inhibitor-Experimente	52
5. Fura-2-Messungen	
5.1 Ryanodinrezeptoren	53
5.2 Einfluss hoher Ryanodinkonzentration	55
5.3 Beeinflussen der Ca-Freisetzung durch Permeabilisation	57

IV. DISKUSSION	63
-----------------------	----

V. ZUSAMMENFASSUNG	73
---------------------------	----

VI. SUMMARY	74
--------------------	----

VII. LITERATURVERZEICHNIS	75
----------------------------------	----

VIII. DANKSAGUNG	85
-------------------------	----

IX. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	86
---	----

Liste der verwendeten Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration
CHTX	Charybdotoxin
CICR	Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (engl: Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ENS	Enterales Nervensystem
FKS	Fetales Kälberserum
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure)
IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K_D	Dissoziationskonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
PLC	Phospholipase C
RyR	Ryanodinrezeptor
SCFA	<u>S</u> h <u>o</u> r <u>t</u> - <u>c</u> h <u>a</u> i <u>n</u> <u>f</u> atty <u>a</u> cid (kurzkettige Fettsäure)
SEM	Standard error of of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Sarcoplasmatische-endoplasmatische-Retikulum Ca^{2+} -ATPase
TEA	Tetraethylammonium
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

I. EINLEITUNG

1. Kurzkettige Fettsäuren im Kolon

1.1. Bildung und Resorption

Kurzkettige Fettsäuren (englisch: Short Chain Fatty Acid: SCFA) sind schwache Säuren, die aus einer Kette von zwei bis fünf Kohlenstoffatomen bestehen. Sie entstehen hauptsächlich aus dem bakteriellen Metabolismus von Strukturkohlenhydraten und Proteinen (Engelhardt et al. 1994). Im Kolon kommen die Fettsäureanionen Azetat, Propionat und Butyrat im Verhältnis 60 : 25 : 15 vor (Bugaut 1987). Obwohl es Unterschiede bezüglich ihrer Rolle als Nährstoff und ihrer Metabolisierung gibt, haben die verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren ähnliche Effekte auf Transportvorgänge und Motilität im Dickdarm.

Kurzkettige Fettsäuren sind schwache Säuren. Deshalb gibt es ein Gleichgewicht zwischen der jeweiligen Säure (HA) und deren Anion (A^-). Bei physiologischen pH-Werten liegen die kurzkettigen Fettsäuren zu 99 % als Anion vor. Im Gegensatz zur undissoziierten Säure, die frei durch die Lipidschicht der Membran diffundieren kann, benötigt das Säureanion einen spezifischen Transporter für die Passage der Zellmembran. In vivo werden die Anionen der kurzkettigen Fettsäuren schnell im Verbund mit Na^+ -Ionen resorbiert, gleichzeitig wird die Sekretion von Bikarbonat angeregt (Umesaki et al. 1979, Dohgen et al. 1994).

In vitro-Untersuchungen zeigen, dass es mehrere unterschiedliche Möglichkeiten der Resorption von kurzkettigen Fettsäuren gibt (Abb. 1). Die Resorption dieser Substanzen erfolgt vor allem transzellulär, die parazelluläre Diffusion tritt im Vergleich dazu in den Hintergrund.

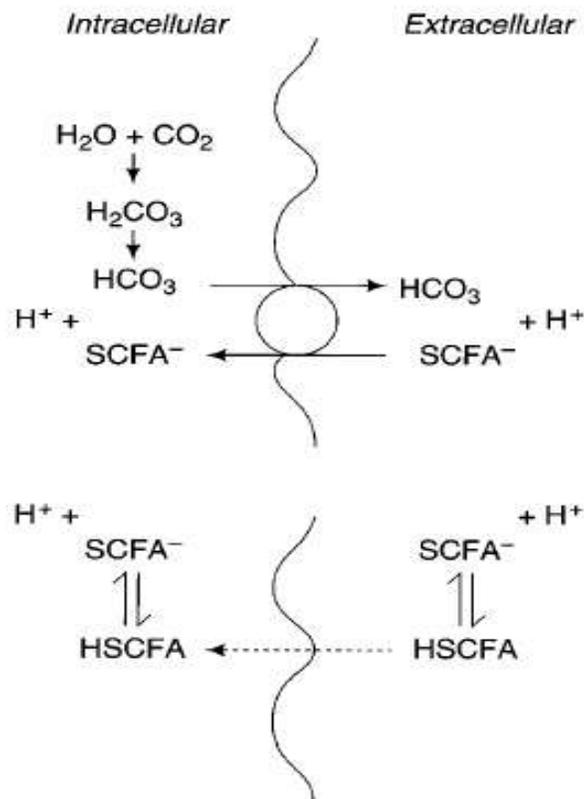


Abb. 1: Modell für den Transport kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) durch die apikale Membran. Es existieren zwei Möglichkeiten zur Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren in die Darmepithelzelle: ein Anionenaustauscher, der Fettsäureanionen im Austausch gegen HCO_3^- in die Zelle einschleust (oben), oder die Aufnahme von nichtdissoziierten kurzkettigen Fettsäuren durch nichtionische Diffusion (unten). Die letztere Form der Resorption ist von der Fähigkeit des Epithels, H^+ -Ionen zu sezernieren (z.B. über einen Na^+/H^+ -Austauscher (NHE)), abhängig. Bei beiden Formen der Resorption resultiert ein Abfall des intrazellulären pH (pH_i).

Die erste Form der Resorption kurzkettiger Fettsäuren erfolgt durch nichtionische Diffusion, die durch die hohe Lipophilie der ungeladenen, freien Fettsäuren möglich ist. Transporter, die Protonen in das Darmlumen gelangen lassen, regen dementsprechend die Resorption von kurzkettigen Fettsäuren an. Im proximalen Kolon erhöht die Stimulation des apikalen Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) die Resorption der kurzkettigen Fettsäuren (Sellin und DeSoignie 1990). Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers durch Amilorid oder Theophyllin hingegen verursacht eine Abnahme der Resorption kurzkettiger Fettsäuren. Im distalen Kolon besteht die gleiche Wechselbeziehung zwischen Tätigkeit der K^+/H^+ -ATPase und der Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren (Engelhardt 1994).

Eine Erhöhung des pH-Wertes direkt oberhalb der Mucosa durch HCO_3^- -Ionen führt zu einer erhöhten Bildung von Fettsäureanionen, da das Gleichgewicht durch Entfernen der Protonen zu Gunsten der Anionen verschoben wird (Sellin 1999). Die Diffusion kurzkettiger Fettsäuren durch die Membran erhöht sich mit Zunahme der Kettenlänge, weil deren Lipidlöslichkeit zunimmt (Sehested et al. 1999, Sellin 1999, Busche et al. 2002).

Untersuchungen der apikalen Membran von Dün- und Dickdarmepithelien zeigten, dass auch Fettsäureanionen durch die apikale Membran transportiert werden können, und zwar durch einen $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (Harig et al. 1991). Dieser Austauscher ist durch hohe Konzentrationen des Stilbens 4,4-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS) hemmbar. Dieser Transport lässt sich durch Mercaptopropionat, ein Strukturanalogon der physiologischen Substrate, d.h. der kurzkettigen Fettsäuren, am distalen Kolon der Ratte hemmen (Stein et al. 1995, Schroder et al. 2000).

Der Transport von Fettsäuren ist in zwei Teilschritte untergliedert: die apikale Aufnahme in die Zelle und die basolaterale Abgabe ins Blut. Die weitere Umwandlung von kurzkettigen Fettsäuren, einmal innerhalb der Zelle, ist komplex und nicht näher untersucht. Durch das Gleichgewicht, welches zwischen Lumen und Zelle besteht, kann die intrazelluläre Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren bis zu $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ betragen (Sellin 1999). Begrenzte apikale Permeabilität und zellulärer Abbau können ohne weiteres diese Konzentration verringern.

Ein möglicher basolateraler Transporter für die nachfolgende Ausschleusung von kurzkettigen Fettsäuren aus der Epithelzelle ist ein $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher ähnlich dem apikalen Anionenaustauscher. Voraussetzung dafür, dass er als SCFA -Exportmechanismus arbeitet, ist, dass die intrazelluläre Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren höher ist als diejenige im Blut (Reynolds et al. 1993, Tyagi et al. 2002).

1.2. Wirkungen auf den Elektrolyttransport

Kurzkettige Fettsäuren beeinflussen massiv den Transport anderer Ionen durch die Darmschleimhaut. Obgleich die meisten Studien belegen, dass kurzkettige Fettsäuren den elektroneutralen Transport von NaCl stimulieren, verringern mukosal applizierte kurzkettige Fettsäuren konzentrationsabhängig den Kurzschlussstrom (ein Maß für die Nettoionenbewegung) im Rattenkolon, was zeigt, dass auch elektrogene Transportprozesse durch diese Substanzen verändert werden (Diener et al. 1994). Dieser Effekt ist mit einer erhöhten NaCl-Resorption verbunden. Der Mechanismus besteht darin, dass die Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle über eine intrazelluläre Ansäuerung (siehe oben) zu einer Stimulation des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE) führt, der für die elektroneutrale Aufnahme von Na⁺ hauptverantwortlich ist. Die resultierende Zellschwellung führt zu einem Öffnen volumensensitiver basolateraler Cl⁻-Kanäle, wodurch der Cl⁻-Austritt aus der Zelle erleichtert wird (Diener et al. 1994). Außerdem scheint der Metabolismus der kurzkettigen Fettsäuren zu einer vermehrten intrazellulären Produktion von HCO₃⁻ zu führen, wodurch es zu einer Stimulation des apikalen Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers kommt, der für die elektroneutrale Aufnahme von Cl⁻ aus dem Darmlumen verantwortlich ist.

Außerdem können kurzkettige Fettsäuren über eine Stimulation von enterischen Neuronen (siehe weiter unten) eine transiente Chloridsekretion am Dickdarm (Yajima 1988) und am Ileum (Diener et al. 1996) der Ratte auslösen.

1.3. Wirkungen auf die Motilität

Kurzkettige Fettsäuren können in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies und der eingesetzten Konzentration die Darmmotilität stimulieren (Yajima 1985), verringern (Squires et al. 1992) oder unbeeinflusst lassen (Flourie et al. 1989).

Kurzkettige Fettsäuren können über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Kolonmotilität nehmen. Zum einen können sie chemosensitive Schleimhautsensoren erregen, die mit enterischen Neuronen oder dem Nervus vagus kommunizieren. Solch ein Modell wurde von Yajima (1985) vorgeschlagen. Die Erregung enterischer Neurone soll dabei für die Stimulation der Motilität durch kurzkettige Fettsäuren, beobachtet beispielsweise am Rattenkolon (Yajima 1985), verantwortlich sein, während die Hemmung der Motilität, die bei Wiederkäuern beobachtet wurde, über einen vago-vagalen Reflex vermittelt wer-

den soll. Zweitens können kurzkettige Fettsäuren direkt mit der glatten Muskulatur des Darmes interagieren, wie Cherbut et al. (1996, 1998) an isolierten Muskelstreifen des Ileums der Ratte zeigten. Schließlich können kurzkettige Fettsäuren auch gastrointestinale Polypeptide freisetzen, die die Darmmotilität beeinflussen können (Plaisancie et al. 1996). Solche Peptide hemmen zum Beispiel die Magenentleerung und Dünndarmbewegung bei Hunden, Ratten und Menschen.

2. Bedeutung des enteralen Nervensystems für die Regulation des intestinalen Ionentransportes und der Motilität

Viele Funktionen des Magen-Darmkanals werden durch autonome Steuerungen geregelt, die unabhängig vom Zentralnervensystem (ZNS) arbeiten. Das Zentrum der Steuerung des Darmes ist das so genannte enterische Nervensystem. Neurone kommen an verschiedenen Orten innerhalb der Darmwand vor. Diese Neurone sind als Plexen organisiert.

Dies sind im einzelnen:

1. Der Plexus myentericus, der sich zwischen der Ring- und der Längsschicht der Muscularis Propria befindet (Auerbach 1862).
2. Der Plexus submucosus, der innerhalb des Bindegewebes der Submukosa liegt (Meissner 1857).
3. Der Plexus mucosus, der direkt unterhalb der Epithelzellen in der Lamina propria der Mukosa lokalisiert ist (Drasch 1880).

Die Gesamtheit der Neurone in diesen Plexen wird als enterisches Nervensystem (auch „Darmgehirn“ genannt) bezeichnet. Eine modellhafte Darstellung zeigt die folgende Abbildung (Abb. 2).

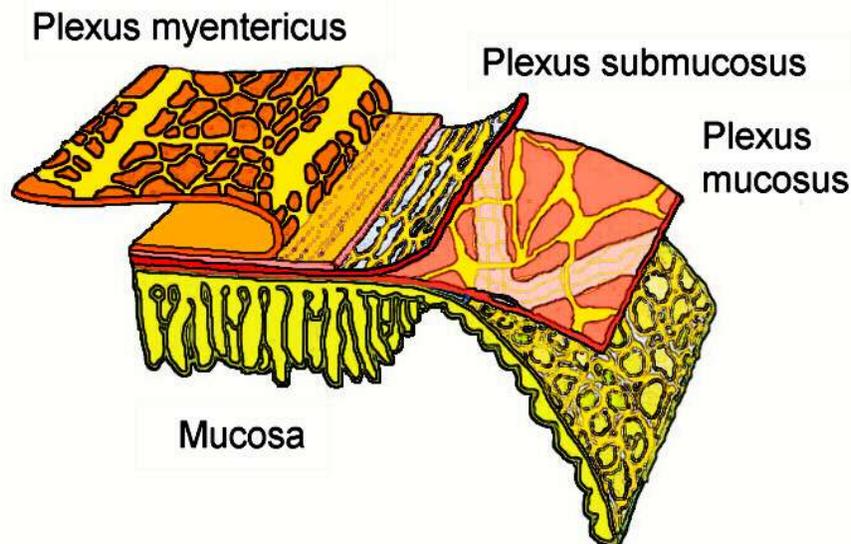


Abb. 2: Lokalisation der verschiedenen Anteile des enteralen Nervensystems (ENS).

Die Plexen bestehen aus Ganglien, das sind Gruppen von bis zu 50 Neuronen, die durch Dendriten und Axone miteinander und mit den Neuronen benachbarter Ganglien verbunden sind. In den meisten Teilen des Darms enthält der Plexus mucosus keine Nervenzellsomata, sondern besteht lediglich aus Nervenfasern, die von den Somata der Plexus submucosus Neurone entspringen, welche das Epithel innervieren. In einigen Teilen des Darms jedoch, zum Beispiel dem distalen Kolon der Ratte (Bridges et al. 1986) oder des Menschen (Langmann 1975), kann man auch Ganglien in der Mukosa mit einer speziellen Funktion (Hemmung der NaCl-Resorption) finden.

Die Zahl der Neurone innerhalb des Darms ist sehr hoch. Bei mittelgroßen Säugetieren, wie dem Mensch oder dem Schwein, wird die Gesamtzahl der einzelnen Nervenzellen innerhalb der Wand des Magen-Darm-Trakts auf 50 bis 100 Millionen geschätzt, das ist in etwa genauso viel wie die Anzahl der Neurone im Rückenmark.

Die enterischen Neurone sind für die Steuerung vieler Magen-Darm-Funktionen verantwortlich. Zum Beispiel vermittelt der Plexus myentericus den peristaltischen Reflex, der für die Weiterleitung des Darminhalts verantwortlich ist. Andere Funktionen, die durch das enterale Nervensystem kontrolliert werden, sind die Steuerung der Durchblutung der Mukosa oder die Steuerung des Ionentransportes durch das Darmepithel (Surprenant 1994, Wood 1994).

Histochemische Untersuchungen, die in den letzten drei Jahrzehnten durchgeführt wurden, zeigten, dass praktisch alle Neurotransmitter, die im Gehirn vorhanden sind, auch im enterischen Nervensystem gefunden werden können (Furness und Costa 1987). Die Abbildung 3 gibt einen Überblick der verschiedenen Transmitter im enterischen Nervensystem: Die klassischen Neurotransmitter wie Acetylcholin oder die Katecholamine Noradrenalin und Dopamin kommen im Darmnervensystem ebenso vor wie die Neuropeptide Bombesin, Cholezystokinin, Neuropeptid Y, Somatostatin, Substanz P oder das Vasoaktive Intestinale Peptid. Auch andere Substanzen wie ATP, NO oder Serotonin dienen hier als neuronale Überträgersubstanzen.

Transmitter im enterischen Nervensystem:

Klassische Transmitter:

Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin

Neuropeptide:

Bombesin, Cholezystokinin, Neuropeptid Y (NPY),
Somatostatin, Substanz P,
Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP)...

Andere:

ATP, NO, Serotonin (5-HT)

Abb. 3: Überblick der verschiedenen Transmitter im enterischen Nervensystem.

Auf Grund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften können enterische Neurone in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Wird ein Einwärtsstrom in Neurone injiziert und diese dadurch überschwellig erregt, so werden Aktionspotentiale mit unterschiedlicher Charakteristik ausgelöst. Einige Neurone antworten mit einer Salve von Aktionspotentialen (S-Neurone), während andere ein Aktionspotential mit einem hyperpolarisierten Nachpotential generieren (AH-Neurone) (Nishi und North 1973, Hirst et al. 1974). Physiologischerweise können Aktionspotentiale an den S-Neuronen durch Erregung der benachbarten Neurone erzeugt werden. Folglich müssen diese Zellen einen synaptischen Eingang besitzen, daher die Bezeichnung S-Neurone. Das Aktionspotential in den S-Neuronen wird durch schnelle spannungsabhängige Na⁺-

Kanäle, die durch den neuronalen Giftstoff des Kugelfischs (Tetrodotoxin) blockiert werden, getragen. AH-Neurone hingegen haben ihren Namen von der mehrere Sekunden andauernden Nachhyperpolarisation, die jedem Aktionspotential an diesen Zellen folgt (AH steht für afterhyperpolarization). Diese Neurone erzeugen Aktionspotentiale nicht über Na⁺-Kanäle, sondern verwenden eine phylogenetisch sehr alte Art der Form der Erregungsbildung, die beispielsweise auch im denervierten Muskel gefunden wird, nämlich durch einen Einstrom von Ca²⁺, der sich durch Tetrodotoxin nicht beeinflussen lässt (Wood 1994).

Die S-Neurone haben häufig eine Morphologie, die dem Typ I der Neurone ähnlich ist, die durch Dogiel Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben wurde (Dogiel 1899) mit ausgedehnten Dendriten und einem langen Axon. Demgegenüber ähneln AH-Neurone dem Typ II in der Dogiel-Nomenklatur mit mehreren langen Dendriten (Hodgkiss und Lees 1983). Vermutlich haben diese AH-Neurone sensorische Funktionen in der Darmwand.

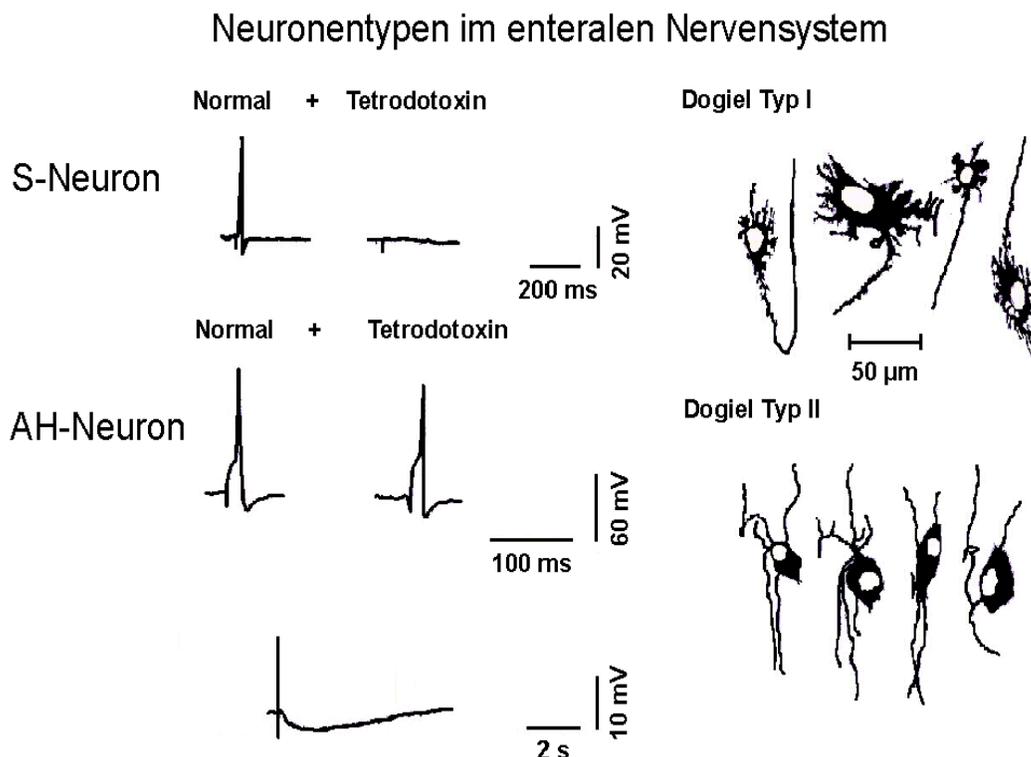


Abb. 4: Differenzierung der enterischen Neurone in S-Neurone (Typ I) und AH-Neurone (Typ II). Die Aktionspotentiale der S-Neurone sind vom Einstrom von Na⁺-Ionen abhängig, welcher sich durch Tetrodotoxin blockieren lässt. Die Aktionspotentiale der AH-Neurone sind dagegen Na⁺-unabhängig und zeigen eine lang andauernde Nachhyperpolarisation (Wood 1994).

3. Wirkung von kurzkettigen Fettsäuren auf das enterische Nervensystem

Kurzkettige Fettsäuren haben direkte Effekte auf das Membranpotential und die diesem zugrunde liegenden Ionenströme an enterischen Neuronen. Am Meerschweinchenileum ist gezeigt worden, dass das Aufbringen der kurzkettigen Fettsäure Azetat auf die Schleimhautoberfläche Aktionspotentiale an den Neuronen des Plexus myentericus induziert (Bertrand et al. 1997). Diese Erregungsphase ist nur transient; ihr folgt eine langandauernde Hyperpolarisation, d.h. eine Hemmung der Erregbarkeit (Neunlist et al. 1999).

Dieser zweite Effekt wurde von Haschke et al. (2002) an dissoziierten Plexus myentericus Neuronen der Ratte in Zellkultur näher charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden myenterische Plexen von neugeborenen Ratten durch enzymatische Behandlung mit Kollagenase und mechanische Dissoziation in Einzelzellen zerlegt und mit Hilfe der Whole-Cell Patch-Clamp Technik (siehe Material und Methoden) untersucht.

An diesen Zellen führte die Zugabe von Natriumbutyrat zu einer Hyperpolarisation der Membran um circa 10 mV. Dieser Effekt ließ sich durch einen intrazellulär applizierten K^+ Kanalblocker, das Cs^+ , hemmen, geht also auf das Öffnen von K^+ -Kanälen zurück. Cäsium ist ein unspezifischer K^+ -Kanalblocker. Eine genauere Bestimmung des durch kurzkettige Fettsäuren stimulierten K^+ -Kanals konnte nicht erfolgen, da die weiter verwendeten K^+ -Kanal-Blocker (4-Aminopyridin, Tetraethylammonium, Ba^{2+}) keine Effekte auf die Hyperpolarisation der Neurone zeigten (Haschke et al. 2002). Außerdem war eine leichte Hemmung des dem Aktionspotential zugrunde liegenden spannungsabhängigen Na^+ -Einwärtsstrom zu beobachten, der sich auf die Ansäuerung des Zytosols (siehe oben) nach Aufnahme der kurzkettigen Fettsäure in die Zelle zurückführen ließ.

Die Aktivierung dieser K^+ -Leitfähigkeit war mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verbunden, der sich messen ließ, wenn die Neurone mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff, dem Fura-2, aufgeladen wurden (Haschke et al. 2002). Dieser Anstieg war völlig unabhängig von der Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} . Wurden hingegen intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher durch Zugabe eines Blockers von SERCA-ATPase (SERCA = sarcoplasmatic endoplasmatic calcium ATPase), dem

Thapsigargin, entleert, war die Wirkung des Butyrats stark abgeschwächt, was zeigt, dass Butyrat eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern enterischer Neurone hervorruft. Der Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegt, ist völlig unbekannt.

Diese Beobachtungen, die die Grundlage für die von mir durchgeführten Experimente bilden, führten zu der Vermutung, dass die Ca^{2+} -Freisetzung zu einer Stimulation von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen an der Zellmembran führt.

4. Fragestellung

Ziel meiner Arbeit ist es, zum Verständnis der Wirkungsweise von kurzkettigen Fettsäuren, die aus pflanzlichen Faserstoffen in großen Mengen beim Menschen und bei Tieren insbesondere im Dickdarm produziert werden, auf das enterale Nervensystem am Modell des Plexus myentericus in Kultur mit Hilfe von elektrophysiologischen Methoden (Whole-Cell Patch-Clamp Ableitungen) und zellbiologischen Methoden (Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2) näher zu charakterisieren. Wie oben geschildert, scheint Butyrat eine Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Ca^{2+} auszulösen und darüber die Membraneigenschaften der Neurone zu verändern.

Prinzipiell kommen dazu mehrere Wege in Betracht. Eine Möglichkeit, intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher zu entleeren, besteht in der Stimulation der Bildung des second messengers Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) durch das Enzym Phospholipase C. IP_3 stimuliert spezifische IP_3 -Rezeptoren auf intrazellulären Speichern, die als Ca^{2+} -Freisetzungskanäle fungieren (Bultynck et al. 2003). Andererseits kann eine Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Ca^{2+} auch über so genannte Ryanodinrezeptoren erfolgen, die für das Phänomen der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung verantwortlich sind (Franzini-Amstrong und Protasi 1997). Diese Fragestellung ist insofern von Bedeutung, als vor kurzem gezeigt wurde, dass bestimmte G-Protein/Phospholipase C-gekoppelte Rezeptoren, nämlich GPR41 or GPR43, deren Funktion bisher völlig unbekannt war, durch kurzkettige Fettsäuren stimuliert werden (Brown et al. 2003, Le Poul et al. 2003).

Insgesamt sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Konzentrationsabhängigkeit hat die Wirkung von Butyrat auf das Membranpotential myenterischer Neurone ?
2. Welche Eigenschaften haben die durch Butyrat stimulierten K^+ -Kanäle ?
3. Welche Rezeptoren auf den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern werden durch Butyrat stimuliert und welche Signalwege sind daran beteiligt ?

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es handelte sich um neugeborene Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts. Futter und Wasser stand den Muttertieren ad libitum zur Verfügung. Die Haltung erfolgte in klimatisierten Räumen in zwölf-Stunden-hell und zwölf-Stunden-dunkel Zyklen.

2. Die Präparation des Plexus myentericus der Ratte

Für die Präparation des Plexus myentericus wurden junge Ratten im Alter von 4 bis 10 Tagen verwendet. Bei älteren Tieren ist die Isolierung des Plexus myentericus sehr schwierig. Die Tiere wurden durch cervikale Dislokation und anschließendes Entbluten getötet. Danach wurde der Körper mit der ventralen Seite nach oben auf einem Präparationsbrett mit Nadeln, die durch die Pfoten geführt wurden, fixiert. Der Abdominalraum wurde durch einen Bauchschnitt eröffnet und die Bauchdecke mit Präpariernadeln befestigt. Die dann folgende Präparation wurde unter einer Stereolupe (Olympus SZX9) bei mittlerer Vergrößerung durchgeführt. Zuerst wurde das Kolon vom Ende des Rektums abgetrennt und durch vorsichtiges Abpräparieren von Fett- und Bindegewebe sowie von Blutgefäßen soweit als möglich gesäubert. Ebenso wurde mit dem Ileum verfahren. Nachdem alle anhaftenden Gewebe entfernt wurden, konnte der gesamte Darm aus der Bauchhöhle entfernt werden. Das Kolon wurde zur Gewinnung des Plexus myentericus nicht verwendet. Der Dünndarm wurde nun vorsichtig mit einer feinen Uhrmacherpinzette (Dumont Nr. 5) fixiert und mit der anderen feinen Pinzette wurde versucht, die Serosa und die Lamina muscularis mit dem Auerbachschen Plexus (Plexus myentericus) von der Submukosa zu lösen. Einen schematischen Aufbau der Darmwand zeigt Abb. 5.

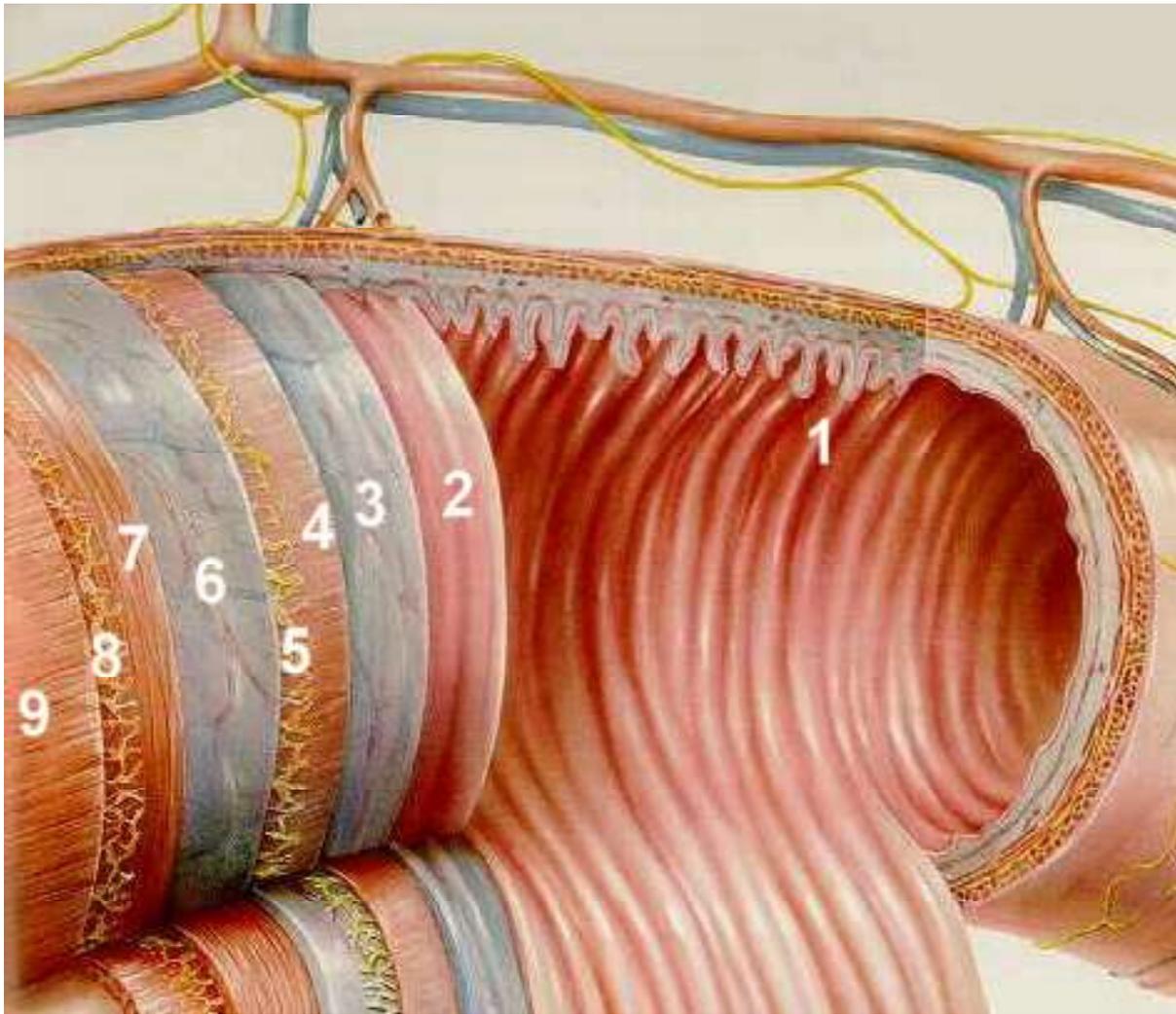


Abb. 5: Aufbau der Darmwand im Längs- und Querschnitt (schematisch). 1 Plicae circulares, 2 Lamina epithelialis mucosae, 3 Lamina propria mucosae, 4 Lamina muscularis mucosae, 5 Plexus submucosus, 6 Tela submucosa, 7 Stratum circulare, 8 Plexus myentericus, 9 Stratum longitudinale (verändert nach: Ottenjann R, Hammersen F, Bräuer H: Exempla gastroenterologica, Medical Service, München 1990).

Der so erhaltene Längsmuskelschlauch mit dem Plexus myentericus wurde in einem Nährmedium (DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium, s. Lösungen) zwischengelagert. Die einzelnen Plexenteile wurden dann in Eppendorfgefäßen jeweils für ca. 2 h bei 37°C in einer Kollagenase-Lösung (s. Lösungen) inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Eppendorfgefäße für ca. 30 s mit einem Vortex-Schüttler resuspendiert und in einer Petrischale unter der Stereolupe untersucht. Bei genügend langer Einwirkung der Kollagenase (2 - 4 maliges Wiederholen der Inkubation), lösten sich die Längsmuskelfasern vom Plexus myentericus ab, wodurch die Netzstruktur des Auerbach Plexus sichtbar wurde. Die so erhaltenen Neuronennetze wurden in einem

mit Medium (HEPES-gepuffertes DMEM) gefüllten Kunststoffschälchen auf Eis gesammelt. Danach wurden isolierte Stücke des Plexus myentericus (siehe Abb. 6) mit einer 200 µl Pipette aufgesammelt.

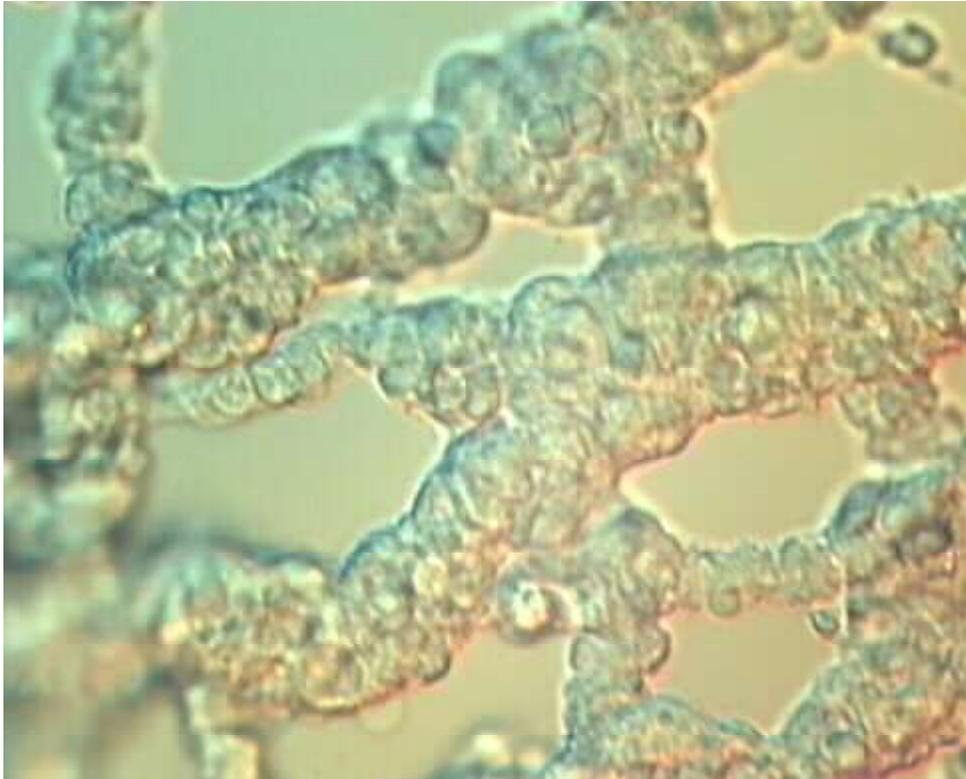


Abb. 6: Lichtmikroskopisches Bild eines frisch isolierten Plexus myentericus nach der enzymatischen Behandlung mit Kollagenase, bei dem die einzelnen Nervenzellen noch im Verband der Ganglien liegen (Stückchenkultur).

Alle Nervenetze kamen danach in ein steriles Eppendorfgefäß und wurden 10 min bei ca. 600 Umdrehungen min^{-1} zentrifugiert. Der Überstand aus dem Eppendorfgefäß wurde unter der Stereolupe auf eventuell enthaltene Neuronennetze untersucht.

Je nach Anzahl der Netze wurden ein oder zwei Kulturplatten (Abb. 7) mit je vier Einsätzen vorbereitet.

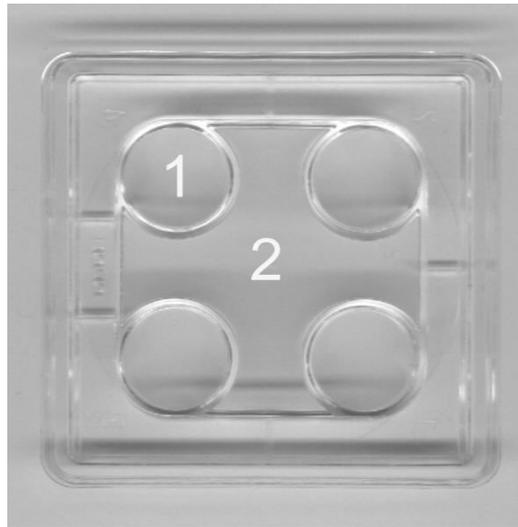


Abb. 7: Foto einer Kulturplatte zum Aussäen von Neuronen des Plexus myentericus. 1: Eigentliche Kulturschale zur Aufnahme von mit Poly-Lysin beschichteten Glasplättchen. 2: Reservoir für steriles Aqua bidest. zum Schutz vor dem Austrocknen der Neurone.

In je einen Einsatz wurde ein mit Polylysin beschichtetes Glasplättchen gelegt und der Raum zwischen den Einsätzen mit 3 ml sterilem Aqua bidest. beschickt. Für jeden Einsatz wurden 100 µl Start V-Zellkulturmedium (neuronspezifisches Medium, s. Lösungen) zu den Neuronen gegeben. Nach dem Aussäen der Neurone wurde die Kulturplatte für ca. 45 - 60 min in den Wärmeschrank gestellt, um den Nervenzellen ein Anheften zu ermöglichen. Nach diesem Schritt wurden unter der Lamina jeweils weitere 400 µl Start V zu den Einsätzen mit den Zellen gegeben. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die Deckel der Kulturplatten mit den Daten der Präparation (Datum, Alter der Ratte, Gewebeart) versehen. Nach drei Tagen im Inkubator wurden die Zellen zum ersten Mal mit frischem DMEM gefüttert. Weitere Fütterungen folgten im Abstand von jeweils zwei Tagen. Die Zellen konnten frühestens drei Tage nach Aussäen für die Patch-Clamp Ableitungen verwendet werden.

Polylysin-Beschichtung

Damit die Neurone sich auf Glas festheften konnten, mussten Glasplättchen (13 mm Durchmesser und 0,4 mm Dicke) mit Poly-L-Lysin beschichtet werden. Dazu wurden sie für mindestens 2 h in 70-%igen Alkohol gelegt. Danach wurden die Plättchen mit destilliertem Wasser viermal gespült. Polylysin (Biochrom KG, Berlin) wurde im Verhältnis 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnt. In diese Lösung wurden die

Plättchen gelegt und für mindestens 2 h auf einem Schüttler in Bewegung gehalten. Zum Trocknen kamen die runden Glasplättchen in eine große Petrischale, dessen Boden mit sterilem Filterpapier bedeckt war.

3. Die Patch-Clamp-Technik

Einzelkanalmessungen mit der so genannten "Membranfleckklemme" (Patch-Clamp) beschrieben Neher und Sakmann erstmals 1976. Ihre Methode wurde im Laufe der Zeit weiterentwickelt und die Auflösung wesentlich verbessert (Hamill et al. 1981). Die Methode basiert auf dem Prinzip der Spannungsklemme (Voltage-Clamp), die seit fast 50 Jahren bekannt ist (Marmont 1949, Cole 1949). Hodgkin und Huxley (1952 a,b,c), teilweise in Zusammenarbeit mit Katz (Hodgkin et al. 1949, 1952), führten damit elektrophysiologische Untersuchungen am Riesenaxon des Tintenfischs durch und konnten zum ersten Mal Natrium- und Kaliumströme getrennt voneinander darstellen.

Um Einzelkanäle zu messen, muss das Hintergrundrauschen so gering wie möglich sein. Diese Low-noise Ableitung wird durch eine stabile Verbindung der Pipette mit der Plasmamembran ermöglicht (Tight seal). Voraussetzung dafür sind Zellen mit absolut sauberer Oberfläche sowie eine staubfreie und glatt polierte Pipettenspitze. Entscheidend ist schließlich ein leichter Sog während der Ausbildung des Seals. Die Membran legt sich dabei Omega-förmig an die Glaspipette an und der Seal-Widerstand steigt sprunghaft auf mehrere Giga-Ohm an. Der Abstand zwischen Membran und Pipettenwand verringert sich dabei auf etwa 1 \AA (10^{-10} m). Durch dieses Gigaseal wird der Membranfleck elektrisch isoliert, so dass die Ströme durch die Membran in die Pipette und von dort zum Strommesskreis fließen. Da das Signalrauschen (Johnson Noise) umgekehrt proportional zum Widerstand ist, stellt der Seal-Widerstand die kritische Größe für das Hintergrundrauschen dar.

In der Patch-Clamp Technik bieten sich vier verschiedene Konfigurationen an, mit denen elektrophysiologische Ableitungen möglich sind (Abb. 8). Sofort nach Bildung des Gigaohm-seals durch Anlegen eines leichten Unterdruckes an die Pipette befindet man sich in der Cell-attached Konfiguration. Der elektrisch isolierte Membranfleck befindet sich weiterhin in der Zellmembran, intrazellulär bleiben second-messenger Systeme und die Ionenkonzentrationen unbeeinflusst. Außerdem bleibt über dem Großteil der Zytoplasmamembran das Ruhepotential unbeeinflusst, nur der elektrisch isolierte Bezirk wird von außen kontrolliert. Zieht man die Pipette aus der Cell-attached

Konfiguration langsam zurück, ist es aufgrund der mechanischen Stabilität des Gigaohmseal möglich, den isolierten Membranabschnitt aus der Zellmembran herauszulösen. Man erhält also einen zellfreien Membranfleck, dessen zytoplasmatische Seite der Badlösung zugekehrt ist. Diese Konfiguration wird als Inside-out Patch bezeichnet. Es ist möglich, dass sich beim Herausreißen des Membranfleckes aus der Zellmembran zunächst ein Vesikel bildet, welchen man durch kurzes Herausheben der Pipettenspitze aus der Badlösung zum Platzen bringt, um einen so genannten Inside-out patch zu erhalten. Durchbricht man hingegen nach Etablierung der Cell-attached Konfiguration durch Erhöhung des Unterdruckes in der Pipette oder durch einen kurzen Stromimpuls die Zellmembran, gelangt man in die Whole-cell Konfiguration, die in dieser Arbeit von mir genutzt wurde. In diesem Messmodus kann das Membranpotential (V) und der Stromfluss (I) über der gesamten Membran der Zelle gemessen werden. Die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran können durch Anlegen einer Spannungsklemme (Voltage-Clamp) oder durch Applikation von Strom (Current-Clamp) verändert werden. Diese Technik ist besonders für die basale Charakterisierung von elektrischen Membraneigenschaften geeignet. Da in der Whole-cell Konfiguration das Rauschen deutlich höher ist als in den Konfigurationen, die einen kleinen Membranfleck elektrisch isolieren, sind Einzelkanalregistrierung nahezu unmöglich. Die vierte Möglichkeit mit der Patch-Clamp-Technik Messungen von Strömen durch Ionenkanäle durchzuführen, besteht in der Outside-out Konfiguration. Einen Patch in dieser Anordnung erhält man, wenn die Pipette nach Bildung der Whole-cell Konfiguration vorsichtig von der Zelle zurückgezogen wird. Wie in der Inside-out Konfiguration erhält man auch hier einen zellfreien elektrisch isolierten Membranfleck, der die Registrierung von Einzelkanalaktivitäten ermöglicht. Allerdings ist die Außenseite der Zellmembran dem Bad und die Innenseite der Pipettenlösung zugewandt.

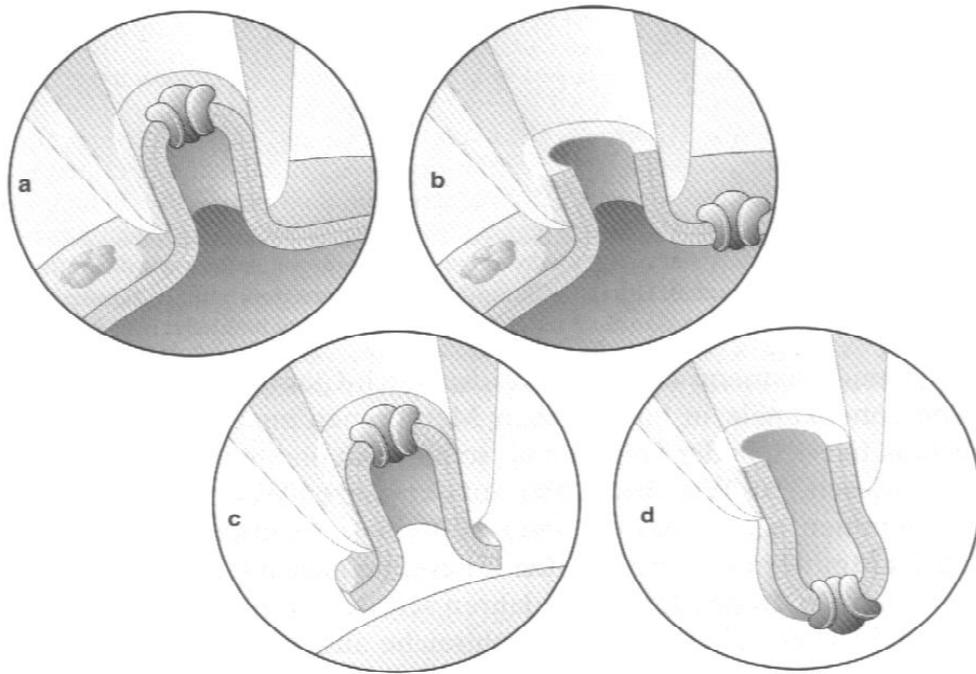


Abb. 8: Schema der verschiedenen Patch-Clamp Konfigurationen. Nach dem Aufsetzen der Patch-Pipette auf die Zellmembran kann man folgende Messanordnung erhalten: a) Cell-attached, b) Whole-Cell, c) Inside-out, d) Outside-out (aus: Numberger & Draguhn: Patch-Clamp-Technik; Spektrum, Akad. Verl., 1996, leicht verändert).

Kleine Ströme werden als Spannungsabfall an einem Widerstand gemessen. Die Schwierigkeit dabei ist, das Pipettenpotential auf dem vorgegebenen Wert zu halten, da der Spannungsfehler mit Zunahme des Widerstands ansteigt. Die Lösung für dieses Problem bringt ein Operationsverstärker, der direkt das Pipettenpotential misst, mit dem eingestellten Sollwert vergleicht und die Spannungsdifferenz durch Stromzufuhr ausgleicht. Dadurch wird das Membranpotential konstant gehalten (Voltage-Clamp). Der zugeführte Strom lässt sich über einen Differentialverstärker messen und darstellen. Dieser Klemmstrom repräsentiert die Leitfähigkeitsänderung der Membran, die durch das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen hervorgerufen werden.

4 Die Lösungen

4.1 Die Zellkultur und Präparationslösungen

Die Darmisolation bei den neugeborenen Ratten erfolgte in N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-(2-ethanolsulfonsäure) (HEPES, 25 mmol·l⁻¹) gepuffertem Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit den Antibiotika Gentamycin (40 µg·ml⁻¹) und Metronidazol (50 µg·ml⁻¹). Die Lamina muscularis wurde in dem vorher beschriebenen Medium mit Zusatz von Kollagenase Typ II (1mg·ml⁻¹, 255 units·mg⁻¹) inkubiert. Die aufgetrennten Neurone wurden für ein bis vier Tage in Medium (Start-V; Biochrom, Berlin, Deutschland) mit und ohne fetalem Kälberserum (FKS, 10 Vol %) unter Zusatz von Antibiotika Pencillin/Streptomycin (Life Technologies, Eggenstein, Deutschland; Penicillin: 10000 units·ml⁻¹, Streptomycin 10000 µg·ml⁻¹ in autoklaviertem destilliertem Wasser) inkubiert.

4.2 Perfusionslösungen bei den Patch-Clamp-Versuchen

Als Standardbadlösung wurde bei den Patch-Clamp und den Fura-2-Messungen eine HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung verwandt. Die Zusammensetzung der Standardtyrode ist (in mmol·l⁻¹): NaCl 140, KCl 5,4; HEPES 10, Glucose 12,2, CaCl₂ 1,25, MgCl₂ 1. Perfusionslösungen mit Butyrat enthielten (in mmol·l⁻¹): Na-Butyrat 50, NaCl 85, KCl 5,4, HEPES 10, Glucose 5, CaCl₂ 1,25, MgCl₂ 1.

Für die Konzentrations-Wirkungskurven-Versuche wurde ein Teil des NaCl in der Tyrode-Lösung äquimolar durch Na-Butyrat ersetzt. Der pH-Wert aller Lösungen wurde mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

4.3 Pipettenlösungen

Bei Patch-Clamp-Ableitungen im Whole-cell-Modus wird durch die Wahl der Pipettenlösung die Zusammensetzung der intrazellulären Flüssigkeit vorgegeben, denn es erfolgt ein rascher Austausch zwischen Zellinnerem und Pipettenlösung. Die Standard Pipettenlösung für die Patch-Clamp-Messung enthielt in (mmol·l⁻¹): Kaliumgluconat (KGluc) 100, KCl 30, NaCl 10, Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA) 0,1, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) 10, Adenosintriphosphat (ATP) 1, MgCl₂ 2. Die Lösung wurde mit Tris/HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

4.4 Lösungen für die Fura-2-Messungen

Fura-2-acetoxymethylester (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurde als $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt und bei -20°C aufbewahrt. Pluronic® F-127 (BASF, Weyandotte, USA), ein Detergenz zur Unterstützung der Löslichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes, wurde als 20 % (Gew/Vol)-ige Lösung in DMSO (maximale Endkonzentration $2,5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$) gelöst.

Die Nervenzellen wurden mit $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Fura-2 und 0,05 % (Gew/Vol) Pluronic® für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Neurone mit der Standard-Tyrode-Lösung gespült, um den überschüssigen, nicht in die Zellen aufgenommenen Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die aufgeladenen Neurone bis zur Messung unter Lichtschutz aufbewahrt. Die Standard-Perfusionslösung war NaCl-Tyrode (siehe oben).

In den Versuchen mit den Saponin-permeabilisierten Neuronen wurde eine intrazellulärartige Lösung als Superfusionsmedium verwendet. Diese Lösung enthielt (in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$): KGluc 100, KCl 30, NaCl 10, EGTA 0,1, Tris 10, ATP 1, MgCl_2 2. Weiterhin enthielt die Lösung Phosphocreatin ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) als ATP-Regenerationssystem und Creatin-Phosphokinase ($3000 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$) sowie Saponin ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Der pH-Wert wurde mit Tris/HCl auf 7,2 eingestellt.

5. Der Patch-Clamp-Messstand

5.1 Mikroskop

Bei dem verwendeten Mikroskop handelt es sich um ein inverses Mikroskop (IX-70 Olympus, Tokyo, Japan; Abb. 9). Ein ausreichender Abstand von Lichtquelle und Kondensor zur Messkammer ermöglicht genügend Platz für Perfusion, Messpipette, Elektroden und ähnliches. Bei einem Patch-Clamp-Experiment ist ein kontrolliertes Aufsetzen der Glaspipette auf die Zelloberfläche wichtig. Um eine dreidimensionale Darstellung der Neurone zu erhalten, wurde eine so genannte Normarski-Optik eingesetzt. Bei diesem kontrastverstärkenden Verfahren, einem differentiellen Interferenzkontrast (Übersicht bei Gerlach 1985), wird optisch eine dünne Schnitt durch das Untersuchungsobjekt gelegt, so dass Strukturen über und unter der Betrachtungsebene weniger stören. Durch abwechselndes Fokussieren auf Pipettenspitze und Zelle kann man sich gut orientieren und erfolgreich die Pipette an die Zelloberfläche führen.

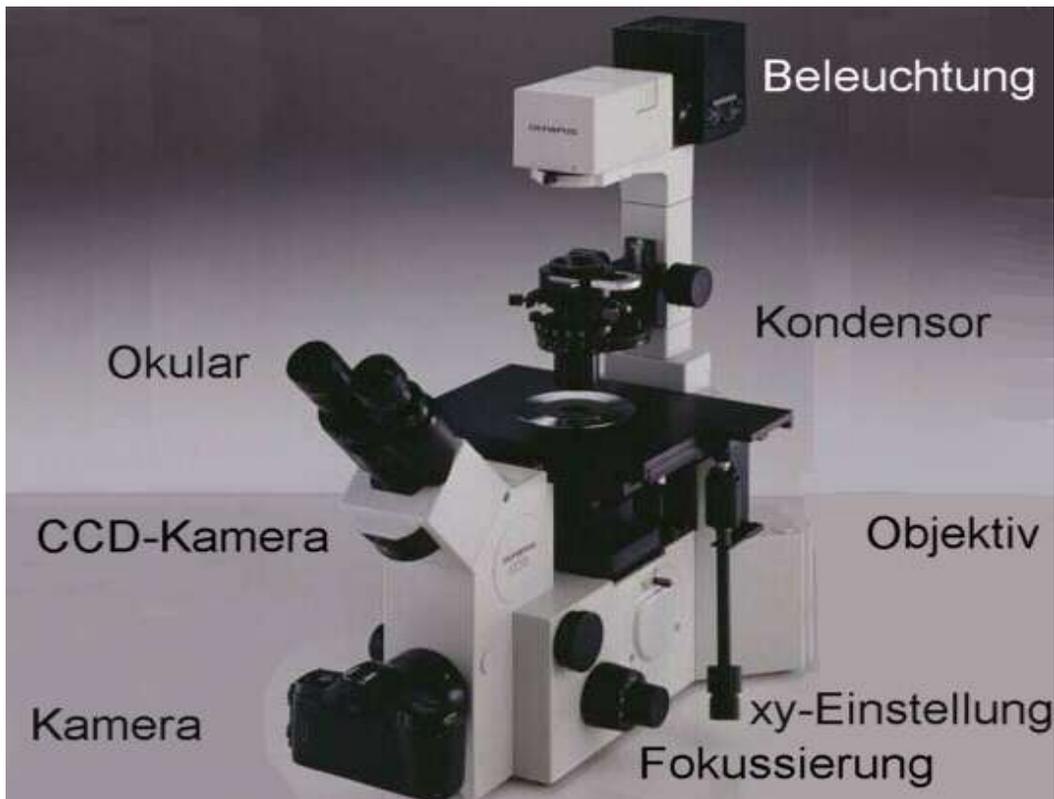


Abb. 9: Inverses Mikroskop vom Typ Olympus IX-70 mit seinen Komponenten. Die angekoppelte CCD-Kamera wird vom Fuß des Mikroskops verdeckt.

5.2 Die optischen Komponenten

Um das Patch-Präparat auf Dauer beobachten zu können, wurde das Bild vom Mikroskop gleichzeitig mit einer CCD-Videokamera (Soligor C-480, Soligor GmbH, Leinfelden, Deutschland) aufgenommen und auf einem Farbmonitor dargestellt. Im vorliegenden Fall konnte das Objektiv entfallen, da die Kamera direkt am Mikroskopfuß befestigt wurde. Mit dieser zusätzlichen optischen Darstellung wurden Erschütterungen, die durch Bedienen des Mikroskops entstehen können, vermieden. Gleichzeitig konnte so die Lage der Pipette bzw. Zelle beobachtet und ein Wegdriften der Zelle bzw. der Pipette erkannt werden.

5.3 Messkammer und Perfusionssystem

Eine spezielle Messkammer wurde auf einem modifizierten Objektisch des Mikroskops eingesetzt, der in X- und Y-Richtung bewegt werden konnte. Die Messkammer, hergestellt aus Plexiglas und ähnlich einem Objektträger aus Glas, zeigte in ihrer Mitte eine runde Vertiefung (Durchmesser 15 mm) für die Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen (Durchmesser 13 mm, Stärke 0,16 - 0,19 mm, Plannet, Wetzlar, Deutschland). Das Volumen der Vertiefung betrug 0,6 ml. Die Gefäße mit den Perfusionslösungen waren etwa 60 cm oberhalb der Versuchsanordnung angebracht und mit dieser über Infusionsbestecke (LDKS Oversan Industria Biomedica, Mailand, Italien) verbunden. Diese endeten in einem Verteiler, der in die Messkammer mündete. Der Zulauf in die Messkammer erfolgte kontinuierlich mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 1 ml·min⁻¹. Um ein konstantes Volumen von 0,6 ml in der Kammer zu erhalten, wurde auf der dem Zulauf gegenüber liegenden Seite der Messkammer ein Absaugstutzen einer unter dem Tisch stehenden Saugpumpe installiert. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

5.4 Mechanische Abschirmung: Der Messtisch

Beim Patchen sind auch die geringsten Erschütterungen mit ein Grund für den Abbruch eines geplanten Experiments. Daher musste auf eine ausreichende mechanische Dämpfung geachtet werden. Hierfür eignen sich besonders gut schwere Stein- oder Metallplatten, die über Luft-gefüllte Gummischläuche auf einem Untertisch ruhen.

5.5 Elektrische Abschirmung: Der Faraday-Käfig

Da beim Patchen sehr kleine Ströme gemessen werden sollen, stören elektrische und magnetische Einstreuungen aus dem Niederspannungsnetz (50 bzw. $16\frac{2}{3}$ Hz) stark. Hier konnte eine Abschirmung mit Eisenblechen Abhilfe bringen. Die elektrischen Geräte wie Computer, Monitor, Verstärker etc. wurden außerhalb des Faraday-Käfigs platziert und an einen gemeinsamen Massepunkt angeschlossen, um unnötige Einstreuungen von Störspannungen zu vermeiden. Die Lichtversorgung des Mikroskops geschah mit Gleichspannung. Alle elektrischen Verbindungen zum Verstärker, Oszilloskop etc. bestanden aus abgeschirmten BNC-Kabeln; die Geräte selbst waren mit ihren Metallgehäusen am Faraday-Käfig angeschlossen.

5.6 Der Mikromanipulator

Der hydraulische Mikromanipulator (MHV-103; Narishige International, London, England) erlaubte Bewegungen in alle Raumrichtungen, um die Patch-Pipette an die Zellen heranzuführen zu können. Die Patchpipetten wurden in einen Pipettenhalter eingesetzt (siehe Abb. 10), der direkt am Vorverstärker befestigt war. Durch eine Schlauchverbindung des Pipettenhalters konnte ein Unter- oder Überdruck angelegt werden. Ein Überdruck wurde beim Eintauchen der Pipette in der Badlösung appliziert, um eine Verschmutzung der Pipettenöffnung zu vermeiden. Ein Unterdruck wurde erzeugt, um ein Seal herzustellen. Die elektrische Verbindung zwischen der Pipette und dem Vorverstärker erfolgte über einen Silber/ Silberchlorid-Draht (Abb. 10).

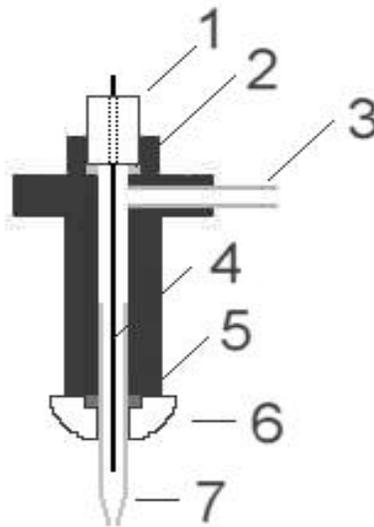


Abb 10: Skizze der Pipettenhalterung im Querschnitt: Es bedeuten: 1 elektrischer Anschluss, 2 obere Dichtung, 3 Unterdruck-Anschluss, 4 Silberdraht, 5 Untere Dichtung, 6 Arretierung der Patchpipette, 7 Patchpipette.

Die Hydraulik des Mikromanipulators (Abb. 11) hatte den Vorteil, dass die Einstellung am Stellrad ohne Verzögerung in eine eindimensionale Bewegung umgesetzt wurde und der Einstellradius mit 10 mm größer war als bei Mikromanipulatoren mit elektrischem Antrieb. Der Manipulator war auf einem drehbaren Halter montiert, so dass eine gewechselte Patch-Pipette wieder umgehend in die gewünschte Ausgangsposition geschwenkt werden konnte, da die Position der Pipette auf den Drehtisch durch Stellschrauben fest vorgegeben war.

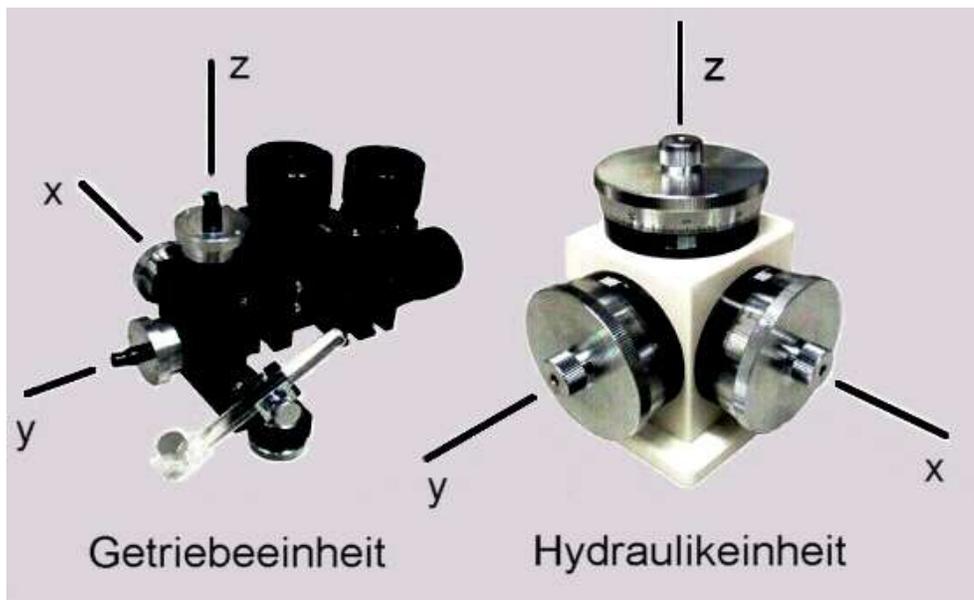


Abb. 11: Der gesamte Mikromanipulator besteht aus der Hydraulikeinheit mit den drei Raumachsen (x-y-z) und der Getriebe-Einheit. Wird am Stellrad die x-Komponente verändert, erfährt die Getriebeeinheit die gleiche Änderung der Raumachse.

5.7 Elektronische Komponenten

Die Messung der Membranströme und des Membranpotentials erfolgte mit einem Patch-Clamp-Verstärker (RK 400; Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich). Auf dem Mikromanipulator wurde ein Vorverstärker (HK409; Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) mit einem Pipettenhalter befestigt. Dieser Vorverstärker misst den Strom, der durch die Membran unter der Pipette fließt, wandelt ihn in eine Spannung um, verstärkt das Signal und schickt es in das Hauptgerät (siehe Abb.12). Das verstärkte Signal wurde in den Patch-Clamp-Verstärker übertragen, nochmals verstärkt und gefiltert (3 kHz Low-Pass Filter). Der Verstärker kann mit Hilfe von einem speziellen Programm (CED Patch und Voltage Clamp Software; Cambridge Electronics Design, Cambridge, England) gesteuert werden. Zur Verbindung zwischen dem Verstärker und dem Computer diente ein DA/AD-Wandler (CED 1401; Cambridge Electronics Design Cambridge, England). Dieser Wandler wandelt digitale Signale in analoge um und umgekehrt.

Bei der Seal-Bildung und dem Aufbrechen der Zellmembran zum Erstellen des Whole-cell-Modus war ein Oszilloskop (HM-205-3; Hameg Instruments, Frankfurt, Deutschland) an den Verstärker angeschlossen.

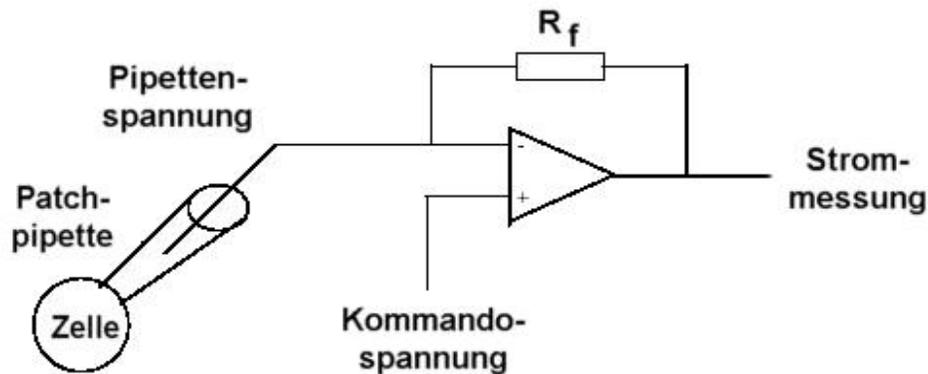


Abb 12: Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers

5.8 Elektroden und Patchpipetten

Die Elektroden sind die Badreferenz- und Messelektrode (Pipettenelektrode). Die Referenzelektrode wurde über eine Agarbrücke ($3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KCl}$ in 3 % (Gew./Vol.) Agar) in die Badlösung eingetaucht. Die Pipettenelektrode verband den Vorverstärker mit der Pipettenlösung und befand sich in einer Glaspipette, die vorher mit einer Standard-Pipettenlösung gefüllt wurde. Sie wurde mit dem Vorverstärker über den Pipettenhalter verbunden. Die beiden Elektroden wurden aus einem Silber/Silberchlorid-Draht hergestellt. Um eine Beschädigung der Silberchloridschicht der Messelektrode und des Dichtungsgummis im Pipettenhalter beim Einsetzen der Pipette in den Pipettenhalter zu vermeiden, wurde das hintere Ende der Pipette mit einem Bunsenbrenner rundgeschmolzen. Die verwendeten Glaspipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Jencons Scientific, Bedfordshire, England) hergestellt. Die Glaspipetten wurden mit Hilfe eines Vertikalpullers (Typ PC 95, Hans Ochozki Feinmechanik, Homburg/Saar, Deutschland) in zwei Arbeitsgängen zu gleichgeformten Glaspipetten ausgezogen. Das Ausziehen der Pipetten erfolgte durch Erhitzen innerhalb einer Heizspule, wobei die erste Erwärmung eine Streckung der Glaskapillare zur Folge hatte und die nachfolgende zweite Erhitzung den Bruch der Kapillare bewirkte. Das Ziel war eine Pipettenspitze mit einer Öffnung von ca. $1 \text{ } \mu\text{m}$ Durchmesser und einem Pipettenwiderstand von 5 - 10 Mega Ohm.

6. Datenerfassung

Am Hauptverstärker wurden verschiedene Geräte (DAT-Rekorder, Schreiber, Computer) angeschlossen, um die gemessenen Daten zu erfassen. Der Papierschreiber (L250E; Phywe, Düsseldorf, Deutschland) zeichnete während des Versuchsablaufs entweder Membranstrom oder Membranspotential auf. Die durch den DA/AD-Wandler in Digitalform umgewandelten Daten wurden auf einer Festplatte des Computers sowie auf einem DAT-Rekorder (DTR 1204; Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) gespeichert. Die Datenauswertung erfolgte mit einer speziellen Patch Software (Cambridge Electronics Design, Cambridge, England).

7. Ablauf eines Patch-Clamp-Experimentes

Am Anfang wurde mit Hilfe des Mikroskops eine geeignete Nervenzelle ausgesucht und unter dem Mikroskop in die Mitte des Gesichtsfeldes platziert. Dann wurde eine frisch gezogene Patchpipette mit der Pipettenlösung luftblasenfrei aufgefüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Ein leichter Überdruck wurde im Pipetteninneren angelegt, um das Verstopfen der Pipettenspitze beim Eintauchen in die Badlösung zu vermeiden und ein besseres Aufsetzen (durch Abspülen eventuell vorhandener Verunreinigungen auf der Zelloberfläche) auf der Neuronzelloberfläche zu erhalten. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Pipettenöffnung in die Badlösung eingetaucht. Dadurch entsteht in der Messkette Silberdraht–Pipettenlösung–Badlösung–Referenzelektrode ein Messartefakt, "Liquid Junction Potential" oder "Offsetpotential" genannt. Am Verstärker wurde das Offsetpotential auf Null korrigiert. Um den Pipettenwiderstand zu berechnen, applizierte man eine definierte Spannung (50 mV für 30 ms, alle 1 s wiederholt). Aus dem daraus resultierenden Strom lässt sich der Pipettenwiderstand nach dem Ohmschen Gesetz ($R = U / I$) berechnen. Die Werte des Widerstandes der Pipetten lagen bei 5 - 9 Mega Ohm. Nun wurde die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators nahe an die Zelloberfläche herangeführt und die Pipettenöffnung vorsichtig auf die Zelle gesetzt. Sofort danach wurde der Überdruck an der Glaspipette abgelassen (siehe Abb. 13).



Abb. 13: Das lichtmikroskopische Bild von dissoziierten Plexus myentericus Neuronen in Kultur zeigt eine aufgesetzte Glaspipette auf einem Neuron in der Kultur.

Durch das Aufsetzen entsteht eine Zell-Glaspipetten-Verbindung. Dabei kam es selten zu einer spontanen Sealbildung. Häufiger musste man einen leichten Unterdruck in der Pipette erzeugen, um ein hochohmiges Seal zu erhalten. Die Sealbildung konnte man am Oszilloskop verfolgen, da die Stromantwort auf den Kommandospaltungspuls sehr klein wird (Abb. 14).

Die dabei gemessenen Ströme zeigen zwei kapazitative Artefakte am Anfang und Ende des Kommandospaltungspulses. Die kapazitiven Artefakte entstehen durch Umladeprozesse an Pipette und Zellmembran. Die Artefakte wurde am Hauptverstärker vor Beginn der Messung kompensiert. Durch den angelegten Unterdruck wurde ein Teil der Zellmembran in die Pipette gesaugt, so dass eine weitere Abdichtung erfolgte. Dadurch bilden sich nun kapazitative Antworten im Stromverlauf (Abb. 14c). Nach Einstellung der Zellmembran auf ein negatives Haltepotential wurde vorsichtig die Membran unter der Patchpipette durch ruckartiges Saugen am Pipettenschlauch durchbrochen. Dadurch wurde eine elektrischer Zugang zur Zelle (Whole-Cell-Modus) hergestellt (Abb. 14d).

Nach Aufbrechen der Membran änderte sich die Stromantwort am Oszilloskop. Die kapazitiven Ströme nahmen sehr stark durch die Vergrößerung der Messfläche zu (Abb. 14d). Gleichzeitig verringerte sich der Widerstand unterhalb der Pipette, so dass ein Stromfluss auf dem Oszilloskop sichtbar wurde. Nach der Kompensation der Kapazität kann man bei Stromklemmung (Current-Clamp-Modus) einen definierten Strompuls in die Zelle applizieren und das resultierende Membranpotential der Zelle ablesen. Wird kein Strom appliziert, kann man in diesem Modus das Ruhemembranpotential der Zelle erfassen.

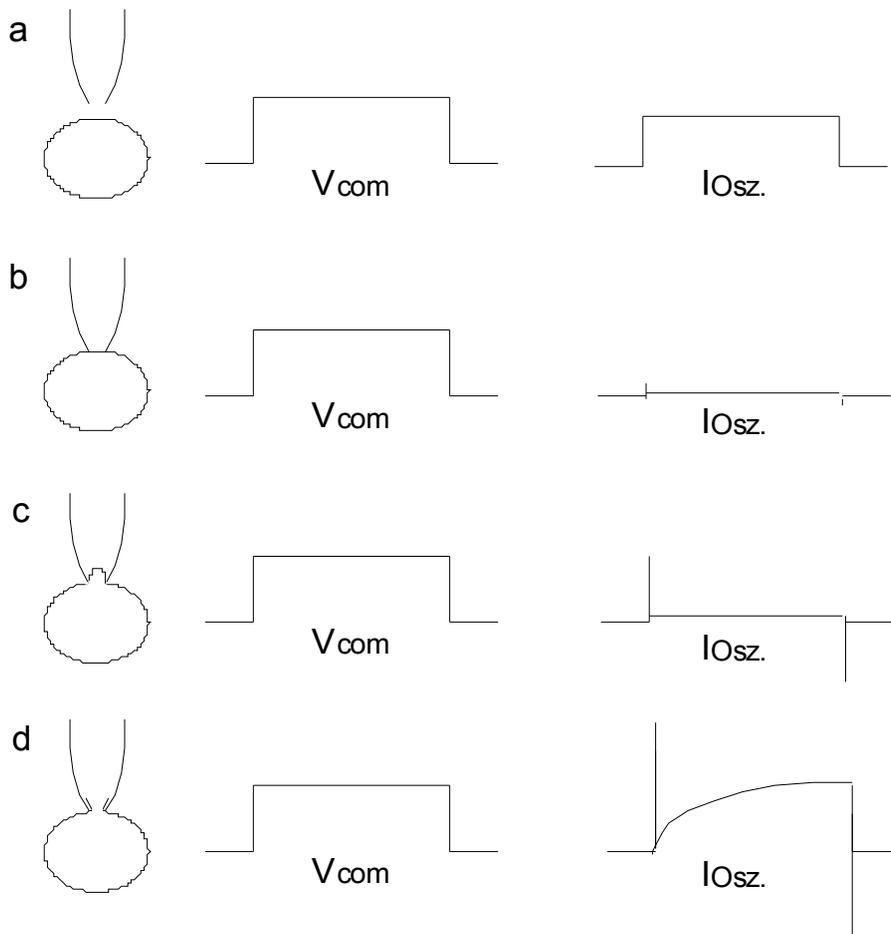


Abb. 14: Stromantworten in Abhängigkeit des Sealzustandes einer Ganzzelleableitung. **a)** Stromantwort nach erfolgtem Kommandospannungspuls. **b)** Stromregistrierung nach Ausbildung der Cell-attached-Konfiguration. **c)** Stromregistrierung und kapazitative Antworten nach angesaugten Membranabschnitten. **d)** Stromregistrierung nach Durchbrechen der Membran.
 V_{com} : Kommandospannungspuls, I_{osz} : am Oszilloskop gemessene Stromantwort.

8. Berechnungen

Umkehrpotential und Nernst-Gleichung

An der Zellmembran liegt ein elektrochemischer Gradient für jedes vorhandene Ion an. Der Strom des entsprechenden Ions kommt zum Stillstand, wenn sich elektrischer und chemischer Gradient im Gleichgewicht befinden. In diesem Gleichgewichtszustand ist der Nettostrom des jeweiligen Ions durch die Membran null. Das Nernstpotential oder Umkehrpotential hängt von den ionalen Bedingungen auf beiden Seiten der Membran ab. Wenn die Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran bekannt sind, lässt sich das Gleichgewichtspotential für jedes Ion mit Hilfe der Nernst-Gleichung (Abb. 15) berechnen.

Nernst Gleichung

$$E = \frac{R T}{z F} \cdot \ln \frac{[\text{Ion}]_a}{[\text{Ion}]_i}$$

Abb. 15: Nernst-Gleichung zur Bestimmung des Gleichgewichtspotentials eines bestimmten Ions an der Zellmembran.

Es bedeuten:

E = Gleichgewichtspotential in Volt (V)

R = Gaskonstante (8,3143 J • K⁻¹ • mol⁻¹)

T = Absolute Temperatur (K)

z = Ladung des Ions

F = Faraday-Konstante (96478 C • mol⁻¹)

[Ion]_a = Ionenkonzentrationen extrazellulär

[Ion]_i = Ionenkonzentrationen intrazellulär

ln = natürlicher Logarithmus

9. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2

9.1 Struktur von Fura-2:

Fura-2 ist ein Ca^{2+} -Chelator, der Ca^{2+} über vier Carboxylgruppen bindet (Abb. 16). Die Stilbengruppe ist das Chromophor des Moleküls. Diese Substanz ist sehr selektiv für Ca^{2+} und fast unempfindlich für pH-Schwankungen im physiologischen Bereich. Die Ca^{2+} -Affinität ist sehr günstig für physiologische Messungen: Die Dissoziationskonstante beträgt etwa $0,25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, liegt also genau in dem Bereich zellulärer Ca^{2+} -Signale ($0,01 - 1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Das veresterte Fura-2 ist ungeladen und damit membranpermeabel. In der Zelle wird es durch Esterasen von den fünf Estergruppen gespalten. In diesem Zustand ist Fura-2 geladen und kann die Zelle nicht mehr verlassen.

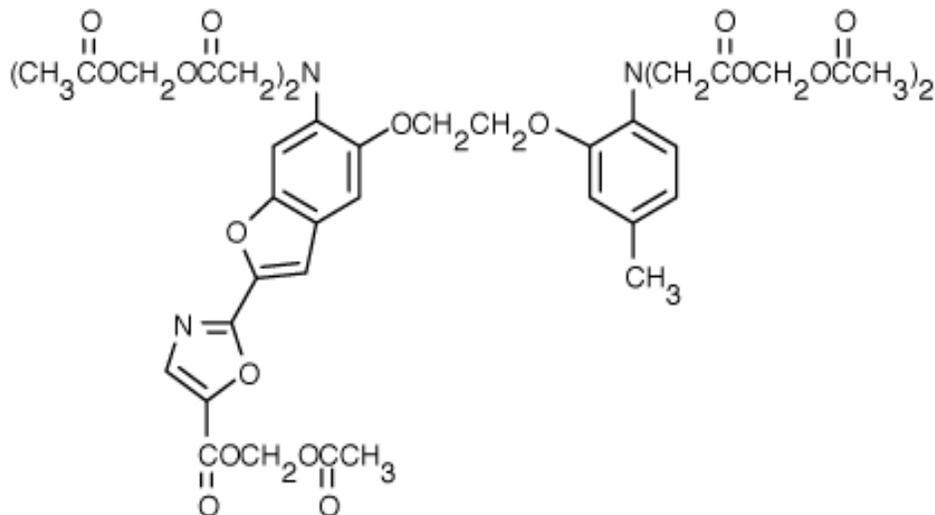


Abb.16: Fura-2 als membrangängiger Acetoxymethylester. Die Estergruppen werden durch unspezifische Esterasen abgespalten (aus: www.sigma-aldrich.com).

9.2 Fluoreszenzemission von Fura-2

Im folgendem Schema (Abb. 17) wird die Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei Anregung mit ultraviolettem Licht dargestellt. Die Fluoreszenz ändert sich sowohl mit der Ca^{2+} -Konzentration als auch mit der Wellenlänge des Anregungslichts. Das Spektrum wird in Ca^{2+} -freier Lösung mit einem Maximum bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm gemessen. Erhöht sich die Ca^{2+} -Konzentration, verschiebt sich das Maximum der Anregung auf 340 nm. Unabhängig vom Ca^{2+} -Gehalt ist dagegen die Fluoreszenz

nur bei einer Anregung von 360 nm, dem isoemissiven Punkt. Bei Zugabe von Ca^{2+} zu einer Fura-2-Lösung ergeben sich also zwei gegenläufige Änderungen der emittierten Fluoreszenzintensität: Eine Zunahme bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und eine Abnahme bei einer Anregungswellenlänge 380 nm. Dieser Effekt wird bei der Messung der Ca^{2+} -Konzentration ausgenutzt (siehe unten).

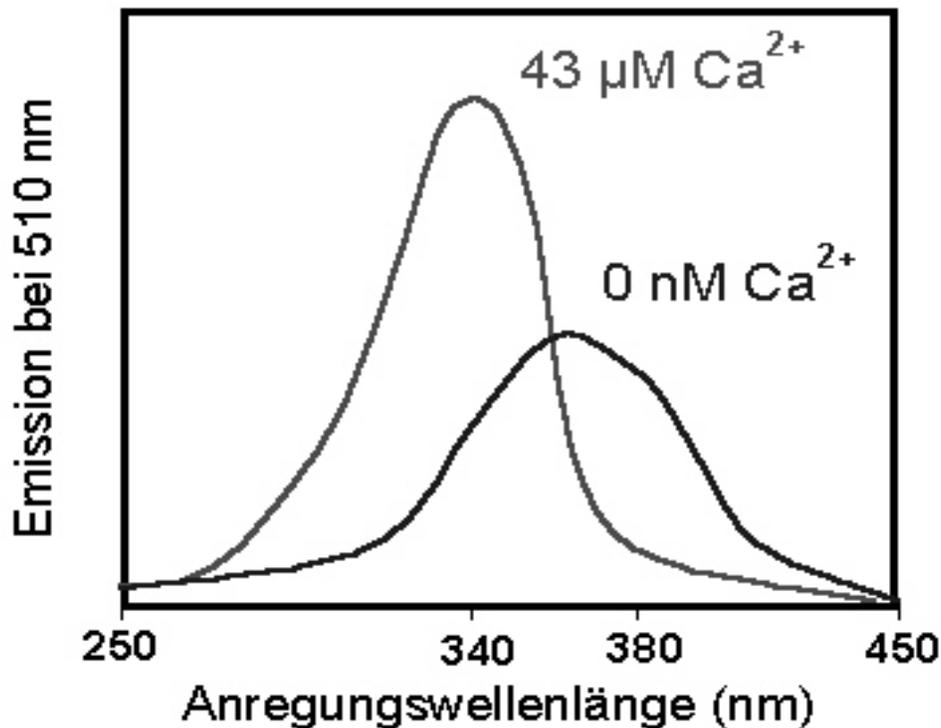


Abb. 17: Fluoreszenzanregungsspektrum von Fura-2 in Lösungen mit unterschiedlichen freien Ca^{2+} -Konzentrationen. Auffallend ist die gegenläufige Verschiebung der Anregungsmaxima. Der Schnittpunkt der beiden Linien ist der isoemissive Punkt (aus: www.probes.com/handbook/figures/2001.htm; leicht verändert).

Die Intensität des Fluoreszenzlichtes bei 340 nm Anregung (F_{340}) wird bestimmt durch die Konzentration des Farbstoffs (C), die Dicke der Zelle (d), eine Konstante (K), welche die optischen Eigenschaften der Messapparatur zusammenfasst, und sie ist natürlich auch eine Funktion der Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$):

$$F_{340} = C * d * K * f([\text{Ca}^{2+}])$$

Da mehrere dieser Parameter unbekannt sind, kann über die Intensität F_{340} alleine nicht die Ca^{2+} -Konzentration berechnet werden. Man nutzt nun die gegenläufige Spektrenverschiebung von Fura-2 bei Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration aus. Führt man zwei Fluoreszenzmessungen kurz hintereinander durch, und zwar zuerst mit einem Anregungslicht von 340 nm und dann bei 380 nm, kann man annehmen, dass sich weder C noch d oder K zwischen den beiden Messungen ändern. Wenn man dann die beiden gemessenen Fluoreszenzintensitäten F_{340} und F_{380} in Relation zueinander setzt, entfallen die drei unbekanntes Größen c, d und K:

$$F_{340} = C * d * K * f([\text{Ca}^{2+}])$$

$$F_{380} = C * d * K * f([\text{Ca}^{2+}])$$

Durch diese mathematische Operation erhält man eine experimentell bestimmbare Messgröße (den Quotienten F_{340}/F_{380}), die *nur* von der Ca^{2+} -Konzentration abhängt. Der Quotient F_{340}/F_{380} wird oft mit R (englisch: ratio) bezeichnet. Er ermöglicht die Messung absoluter Ca^{2+} -Konzentrationen in lebenden Zellen, weil er unabhängig von der Farbstoffkonzentration und der Zellform ist. Um von einem gemessenen R-Wert auf die Ca^{2+} -Konzentrationen schließen zu können, muss man die Ca^{2+} -Abhängigkeit von R experimentell ermitteln. Man misst dazu R bei einer Reihe von bekannten Ca^{2+} -Konzentrationen und erhält eine Eichkurve (Abb. 18).

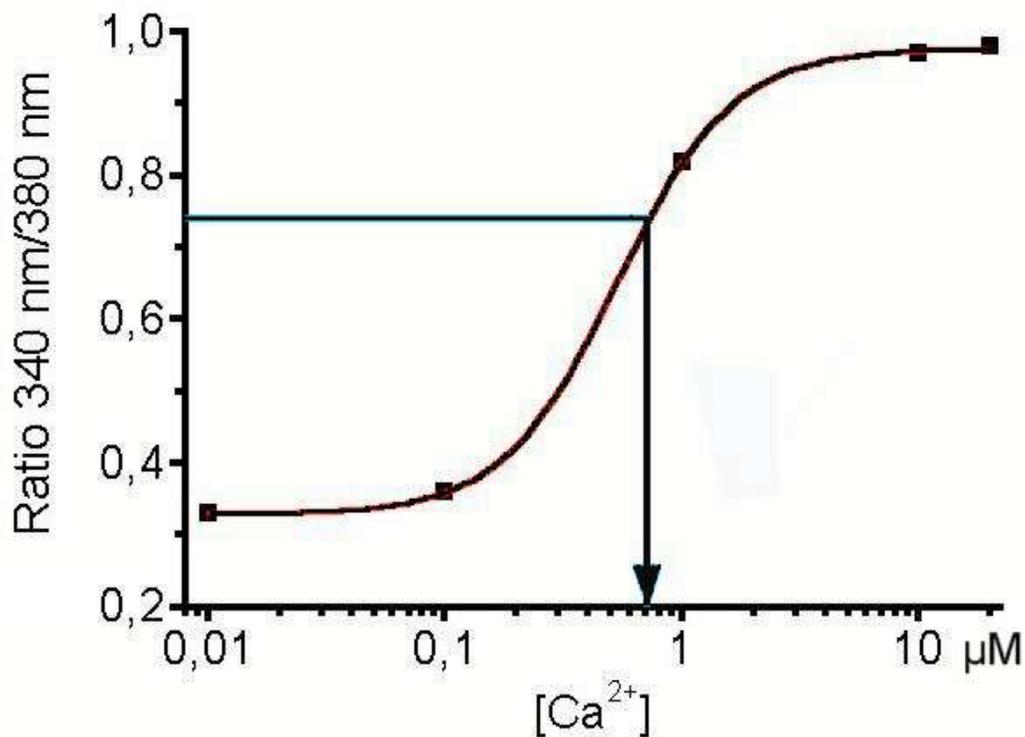


Abb. 18: Eichkurve von Fura-2 zur Bestimmung von freien Ca^{2+} -Konzentrationen aus den Ratio-Daten. Mit Hilfe dieser Kurve kann man für jeden in der Zelle gemessenen R-Wert die entsprechende Ca^{2+} -Konzentration ermitteln.

9.3 Der Imaging-Messstand

9.3.1 Fluoreszenzmikroskopie und elektronische Komponenten

Es wurde auch für diese Messungen, wie bei den Patch-Clamp-Experimenten, ein inverses Lichtmikroskop (Olympus IX-50; Olympus optical, Japan) verwendet. Bei diesen wirkt das Objektiv zugleich auch als Kondensor. Das Kernstück der Auflichtmikroskopie ist eine Konstruktion im Strahlengang zwischen Objektiv und Okular, über die die anregende Strahlung zugeführt wird, und die aus Erregerfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter besteht (Abb. 19).

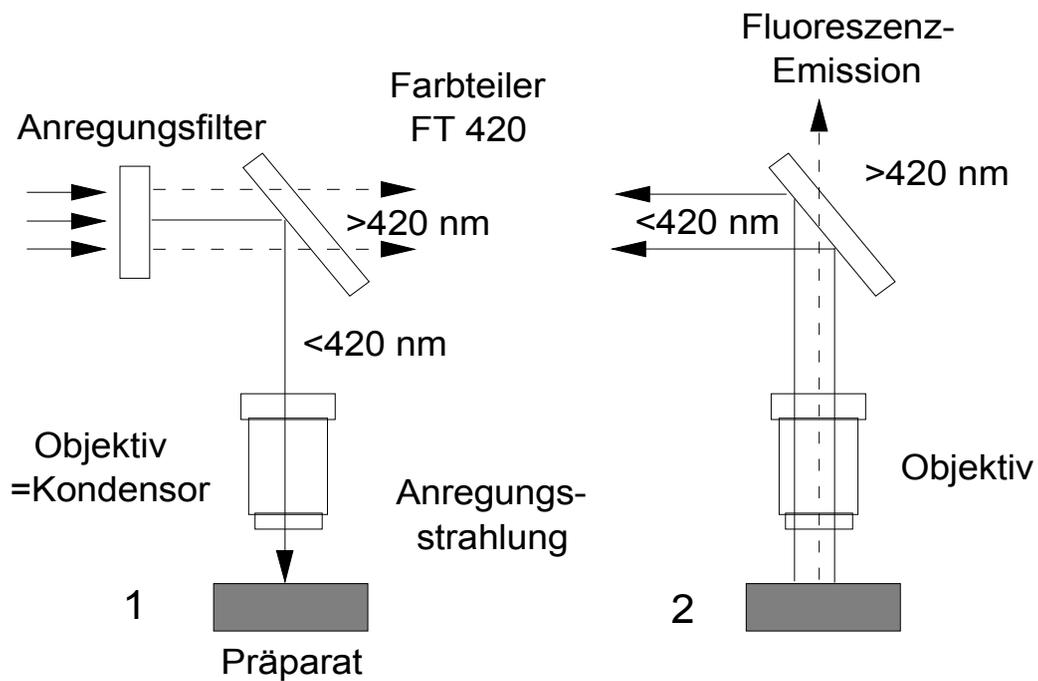


Abb. 19: Strahlengang in einem Fluoreszenzmikroskop. 1. anregende Strahlung. 2. emittierte Strahlung (Fluoreszenz). Die angegebenen Nanometerwerte beziehen sich auf einen der möglichen Fälle. Durch Wahl anderer Filtersysteme kann auch Licht anderer Wellenlängen verwendet werden (nach einem Werkphoto von Carl Zeiss, Wetzlar, Deutschland).

Das Mikroskop war mit einer CCD-Kamera und einem Controller verbunden, die beide zum Fura-2 Data Acquisition System (Till Photonics, Martinried, Deutschland) gehörten. Abb. 20 gibt einen Überblick über die Geräte.

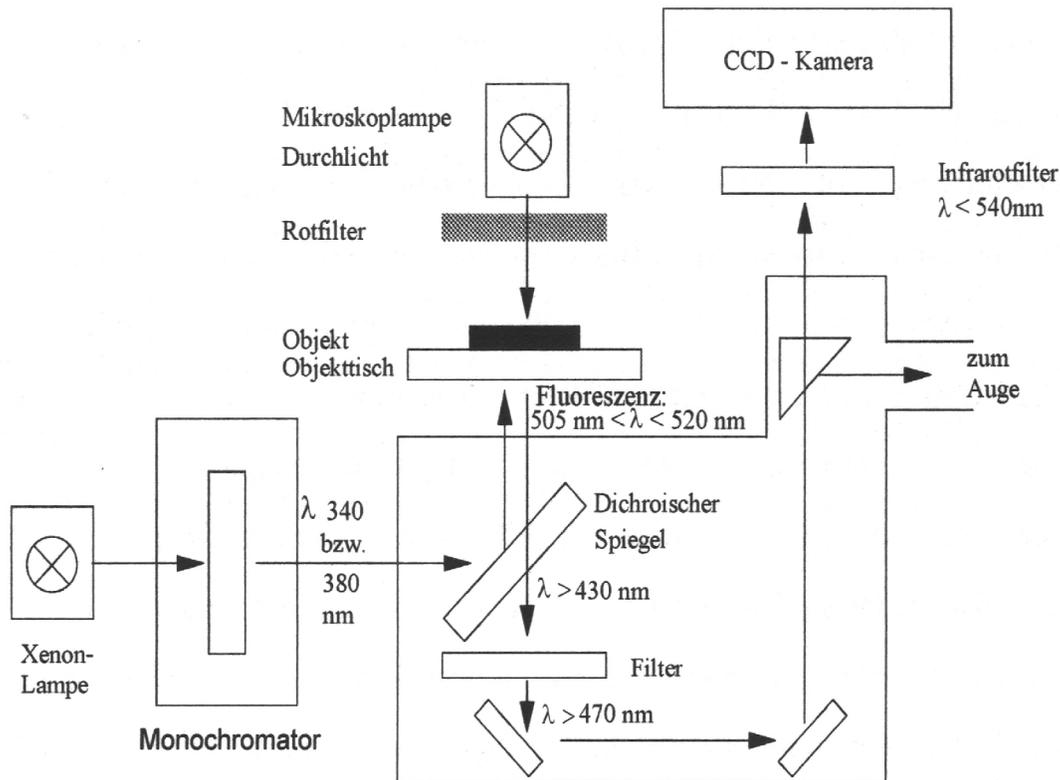


Abb. 20: Bestandteile des optischen Systems zur Fluoreszenzmessung.

9.3 Messkammern und Perfusionssystem

Es wurde als Messkammer eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 35 mm (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) verwendet. In diese Schale wurde in der Mitte des Bodens ein Loch von 10 mm Durchmesser gebohrt. Die Neurone des Plexus myentericus, die auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen auf einer Kulturplatte wuchsen, wurden aus dem Brutschrank gebracht und in der gleichen Zellkulturplatte (siehe Abb. 7) für eine Stunde mit $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Fura-2-AM und Pluronic® ($1 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ Tyrodelösung) bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde der nicht resorbierte Farbstoff mit Tyrodelösung abgespült. Die Deckgläschen mit den Neuronen wurden mit Hilfe von Silikonpaste (Baysilone, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) unter die gebohrten Öffnungen der Zellkulturschalen geklebt. Diese Schalen wurden in einer Halterung auf dem Objektisch des Mikroskops

eingesetzt und konnten dort kontinuierlich perfundiert werden (ähnlich wie beim Patch-Clamp-Messstand beschrieben). Der Perfusionsschlauch und die Absaugung waren mittels Magneten am Objektisch des Mikroskops befestigt. Der Zulauf erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Ein Absaugschlauch war gegenüber dem Perfusionsschlauch befestigt, um das Flüssigkeitsvolumens innerhalb der Messkammern (ungefähr bei 3 ml) konstant zu halten.

9.4 Versuchsdurchführung

Es wurden mehrere Neurone im Sichtfeld des Mikroskops justiert. Mit Hilfe der Imaging-Software (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) konnten die Zellen auf dem Monitor des Computers dargestellt werden. An dem zu untersuchenden Präparat wurden mehrere Neurone als Messregion markiert (regions of interest = ROI; Abb. 21). Im Verlauf des Experiments wurden die Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen im Bereich der Messregionen aufgezeichnet. Am Anfang eines jeden Experimentes wurde das Präparat mit einer $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl Tyrode-Lösung superfundiert, so dass eine Messung der Grundlinie (basale Ca^{2+} -Konzentration unter Kontrollbedingungen) bis zu ihrer Stabilisierung über mehrere Minuten stattfand. Danach wurde ein Lösungswechsel bzw. eine Substanzapplikation vorgenommen.

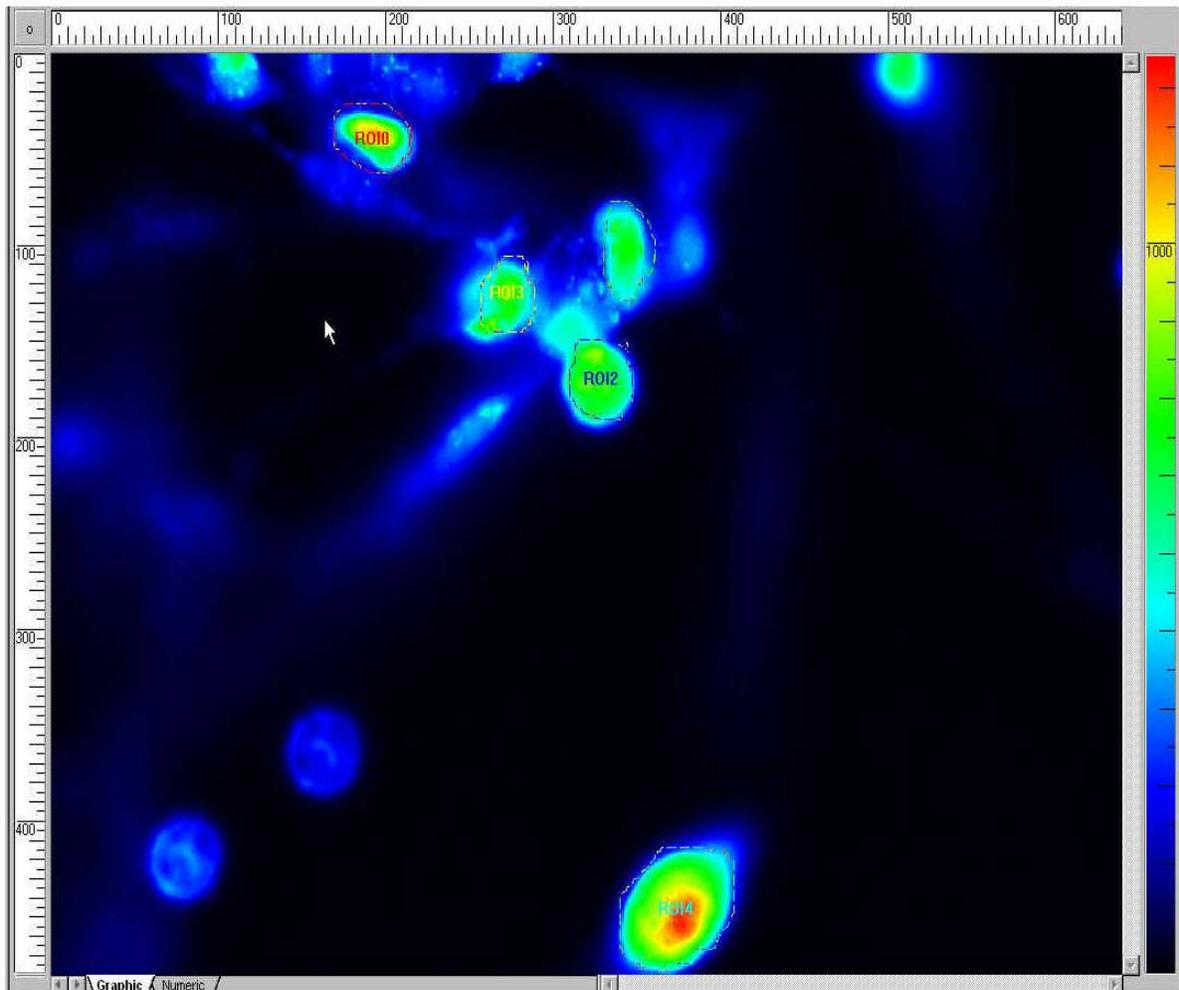


Abb 21: Falschfarbendarstellung von mit Fura-2 aufgeladenen Neuronen. Im Bildausschnitt sind fünf Messbereiche (regions of interest, ROI) definiert.

9.5 Datenerfassung

Gemessen wurde die Fluoreszenz von Fura-2 bei zwei Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm). Die Lichtpulse hatten eine Dauer von 20 ms, die festgelegte Sammelrate lag bei 0,2 Hz, d.h. es wurde alle 5 s ein Bildpaar registriert. Eine Emission über 470 nm wurde über einen Filter, der Wellenlängen unter 540 nm passieren ließ, zu einer CCD-Kamera geleitet und in digitale Bilder umgesetzt. Mit Hilfe der Image-Analyse-Software (Tillvision; Till Photonics, Martinsried, Deutschland) wurden die erfassten Emissionen in Zahlenwerte (Ratio-Werte) umgesetzt und auf dem Monitor in Form einer Grafik dargestellt. Gleichzeitig wurden diese Daten für die Auswertung des Versuchs auf der Festplatte gespeichert.

10. Chemikalien

Heparin (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) und Ruthenium Rot (Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland) wurden in wässrigen Stammlösungen angesetzt. U-73122 (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) wurde in DMSO gelöst (DMSO-Endkonzentration $0,2 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$), ebenso Fura und Fura-2-AM (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Charybdotoxin wurde in Aqua dest. mit Rinderserumalbumin (BSA, $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) gelöst. Ryanodin stammte von Calbiochem (Bad Soden, Deutschland). Andere Chemikalien für die Tyrode Lösungen und die Patch-Pipettenlösungen wurden überwiegend von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-(2-ethanolsulfonsäure) (HEPES), Poly-L-Lysin (Molekulargewicht 70 000 – 150 000 D), Kollagenase Typ II ($255 \text{ units} \cdot \text{ml}^{-1}$), Pencillin ($10000 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$), Streptomycin ($10000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), Fetales Kälberserum (FKS) und Start-V® -Medium stammten von Biochrom (Berlin, Deutschland). Metronidazol (Flagyl®, $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) war von Bayer, Leverkusen, Deutschland.

11. Auswertung

Alle Messwerte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM = standard error of the mean) angegeben. Vergleiche zwischen mehreren Gruppen wurden mittels Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey's Test statistisch ausgewertet, der Vergleich von zwei Gruppen wurde mit einem gepaarten bzw. einem ungepaartem Student's T-Test durchgeführt. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Für die Durchführung der Berechnungen wurden die Software-Programme Staroffice und Origin® (Microcal, Northampton, USA) benutzt.

III. ERGEBNISSE

1. Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Butyrat auf das Membranpotential

Butyrat ist ein bekannter sensorischer Stimulus des enteralen Nervensystems (Haschke et al. 2002). Diese kurzkettige Fettsäure führt zu einer Hyperpolarisation der Membran enterischer Neurone. In der hier beschriebenen Arbeit wurde der Einfluss des Butyrats auf das Membranpotential von isolierten Neuronen des Plexus myentericus gemessen und versucht näher zu charakterisieren. Als Substrat wurde Natrium-Butyrat (Abb. 22) verwendet.



Abb. 22: Strukturformel von Natriumbutytrat.

Bislang unbekannt ist die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Butyrat auf das Membranpotential. Daher wurden myenterische Neurone mit Na-Butyrat in unterschiedlichen Konzentrationen ($10 - 100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) superfundiert. Um die Osmolarität des Superfusionmediums konstant zu halten, wurde NaCl in der Tyrode-Lösung isoosmolar gegen Na-Butyrat ausgetauscht, der pH-Wert wurde konstant bei 7,4 gehalten.

Das basale Membranpotential der Neurone in Abwesenheit von Na-Butyrat betrug $-35,8 \pm 3,8 \text{ mV}$ ($n = 5$). Butyrat verursachte eine Hyperpolarisation der Membran aller untersuchten Neurone (Abb. 23). Die Amplitude der Hyperpolarisation erwies sich als abhängig von der eingesetzten Konzentration.

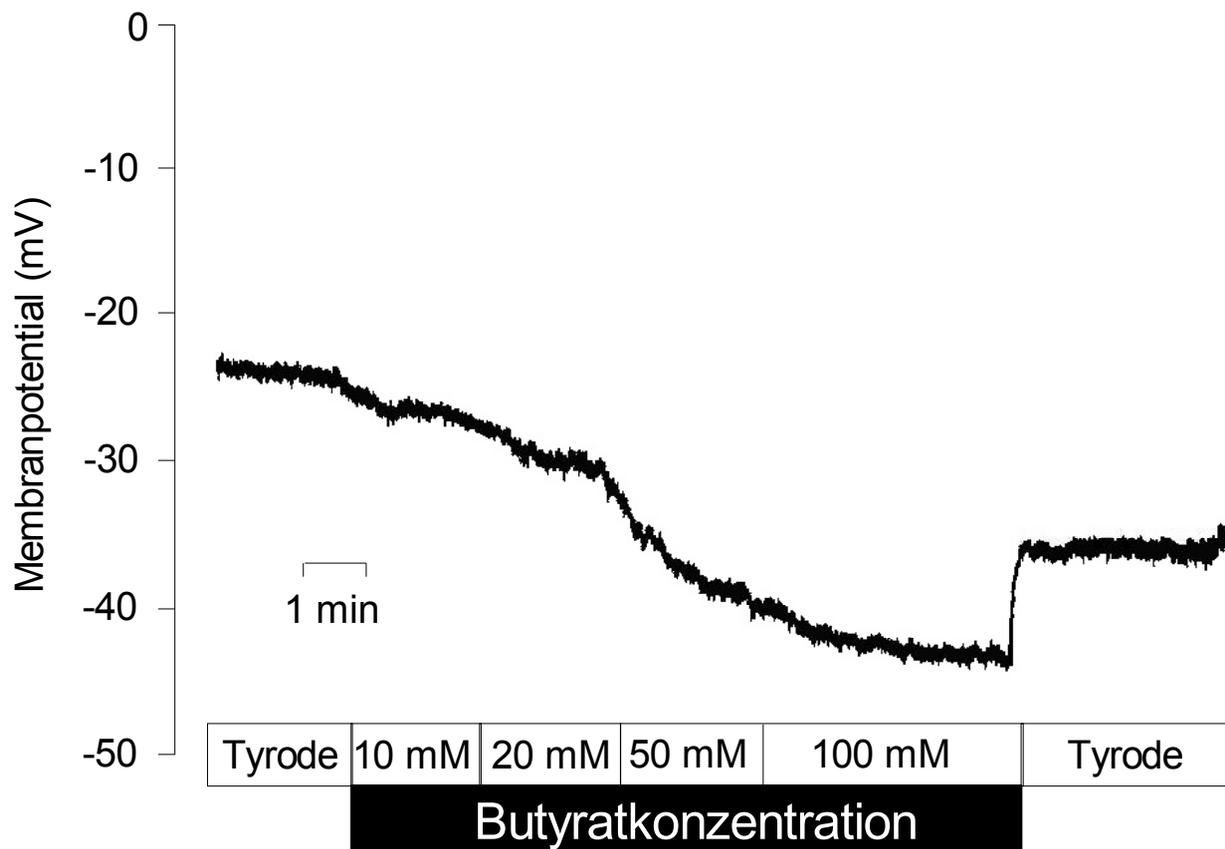


Abb. 23: Durch die Gabe ansteigender Butyratkonzentrationen wird die Zellmembran hyperpolarisiert. Die Originalaufzeichnung ist typisch für $n = 5$ Versuche mit ähnlichem Ergebnis. Statistik siehe Abb. 24.

Die Wirkung des Butyrats war reversibel nach Auswaschen. Rückkehr zur Tyrode-Lösung ließ die Membran wieder depolarisieren. Aus diesen Versuchen ließ sich die Konzentrationsabhängigkeit berechnen (Abb. 24).

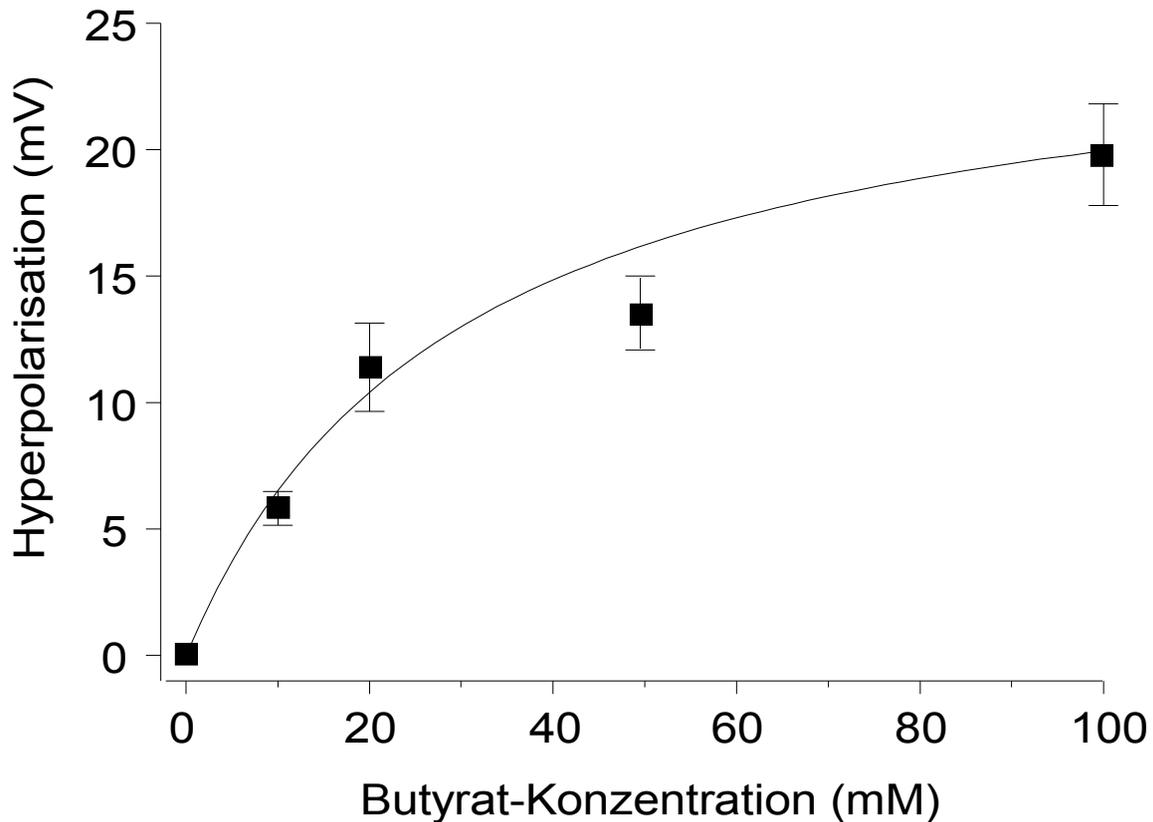


Abb. 24: Konzentrationsabhängige Hyperpolarisation der Membran myenterischer Neurone durch Butyrat. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 5$. Bei $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Butyrat erhält man fast maximale Hyperpolarisation. Die Kurve zeigt den Fit auf eine Michaelis-Menten-Kinetik mit V_{max} (maximale Hyperpolarisation) = $25,9 \pm 2,4$ mV und K_m (halbmaximale Konzentration) = $29,7 \pm 7,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Die Konzentrationswirkungsbeziehung ließ sich mit einer Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben mit folgenden Parametern und der Variablen [S] für die Substratkonzentration:

$$V = \frac{V_{\text{max}} \cdot [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

Dadurch erhielt man für die maximale Hyperpolarisation (V_{max}) einen Wert von $25,9 \pm 2,4$ mV bzw. für die halbmaximale Konzentration (K_m) einen Wert von $29,7 \pm 7,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($n = 5$). Bei $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Butyrat wurde eine fast maximale Hyperpolarisation beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Experimente mit einer Butyratkonzentration von $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ durchgeführt.

Wenn diese Konzentration alleine, d.h. ohne vorherige Applikation von niedrigeren Butyratkonzentrationen angeboten wurde, hyperpolarisierte die Zellmembran nach circa 30 Sekunden um $11,6 \pm 1,0$ mV ($n = 7$; Abb. 25). Auch dieser Effekt war vollkommen reversibel nach Auswaschen der kurzkettigen Fettsäure und war an allen getesteten Neuronen zu beobachten.

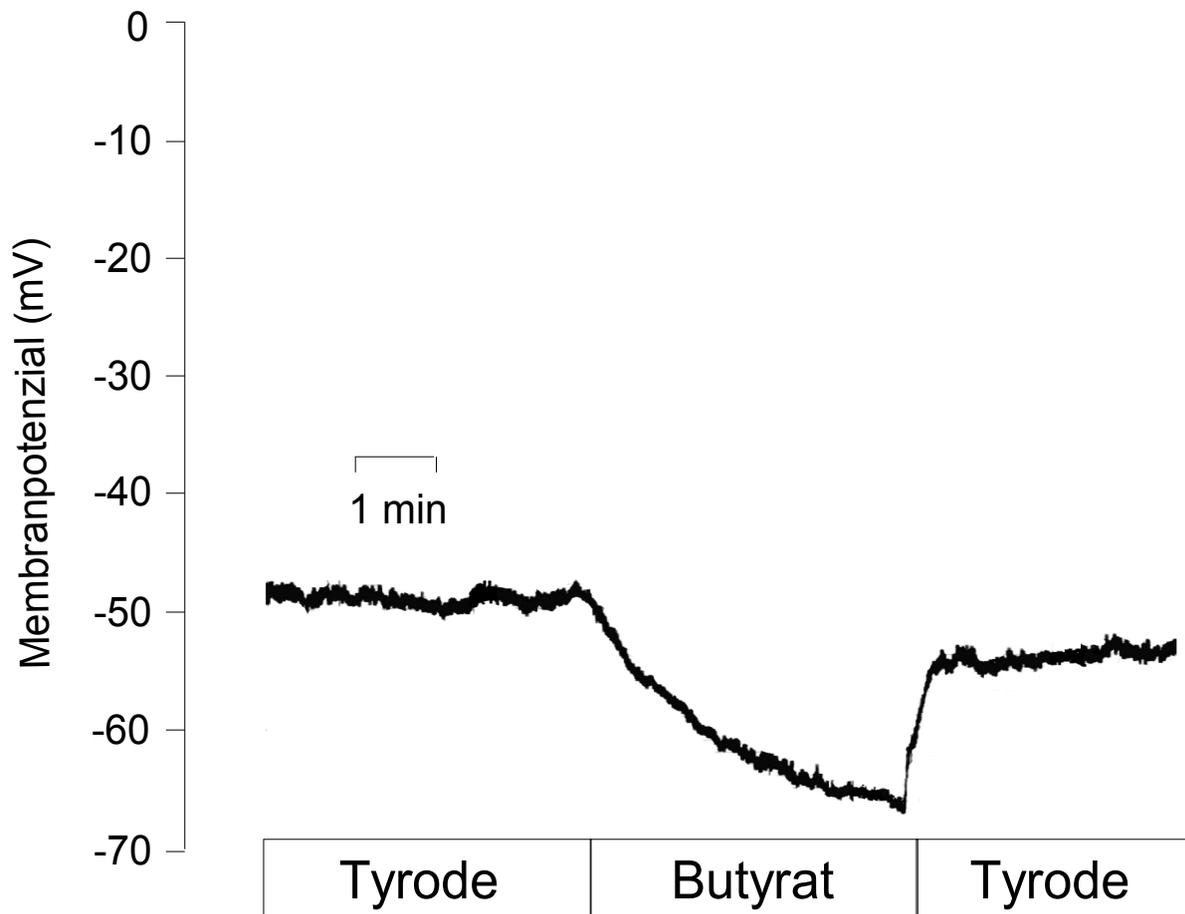


Abb. 25: Wirkung von Natrium-Butyrat ($90 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl/ $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na-Butyrat) auf das Membranpotential eines myenterischen Neurons. Butyrat induziert eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Dieser Effekt kann durch Auswaschen mit Tyrode-Lösung ($140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) rückgängig gemacht werden. Typisches Ergebnis von $n = 7$ Versuchen; Statistik siehe Text.

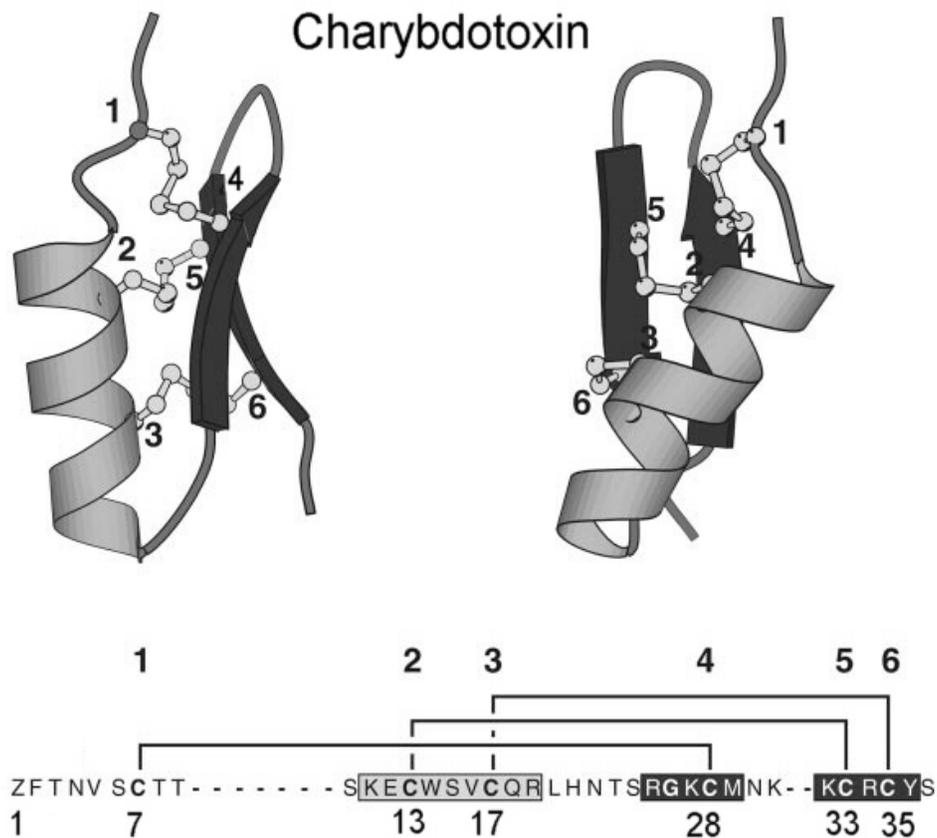


Abb. 27: Dreidimensionale Darstellung der Struktur von Charybdotoxin. Die für die räumliche Anordnung verantwortlichen sechs Cysteine sind in ihrer Reihenfolge mit 1 bis 6 gekennzeichnet (obere Zahlenreihe). Die untere Zahlenreihe zeigt die Position der Cysteine im Peptid. Helikale Strukturen sind hellgrau gekennzeichnet, planare schwarz (nach Kellenberger et al. 1999; leicht verändert). Die Aminosäurendarstellung erfolgt nach internationaler Ein-Buchstabencodierung; Z steht für Pyroglutamin.

Charybdotoxin wurde durch Perfusion von außen appliziert. Um eine Adsorption des Peptids an das Perfusionssystem zu verhindern, enthielt die Superfusionslösung bovines Serumalbumin (BSA; Konzentration $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Die Wirkung von Butyrat auf das Membranpotential wurde an insgesamt 11 Zellen in Gegenwart von Charybdotoxin getestet. Bei allen war der Zeitverlauf des Butyrateffekts massiv verändert (Abb. 28). In allen getesteten Zellen induzierte Butyrat nur noch eine transiente Hyperpolarisation von $11,9 \pm 2,3 \text{ mV}$. Diese ging bei 9 von 11 getesteten Zellen nach kurzer Zeit ($3,0 \pm 0,6 \text{ min}$; $n = 9$) in eine deutliche Depolarisation über. Die Membran depolarisierte dabei signifikant ($p < 0,05$) um $19,8 \pm 1,4 \text{ mV}$ auf $-24,3 \pm 4,3 \text{ mV}$ gegenüber dem Ausgangswert von $-43,3 \pm 3,9 \text{ mV}$ ($n = 9$) vor der Applikation von

Butyrat. Bei 2 von 11 Zellen war diese sekundäre Depolarisation nur schwach ausgeprägt und das Membranpotential stellte sich auf das Ausgangspotential vor der Butyratzugabe ein. Auch in Gegenwart von Charybdotoxin erwies sich die Butyratantwort als reversibel, wenn die kurzkettige Fettsäure wieder ausgewaschen wurde.

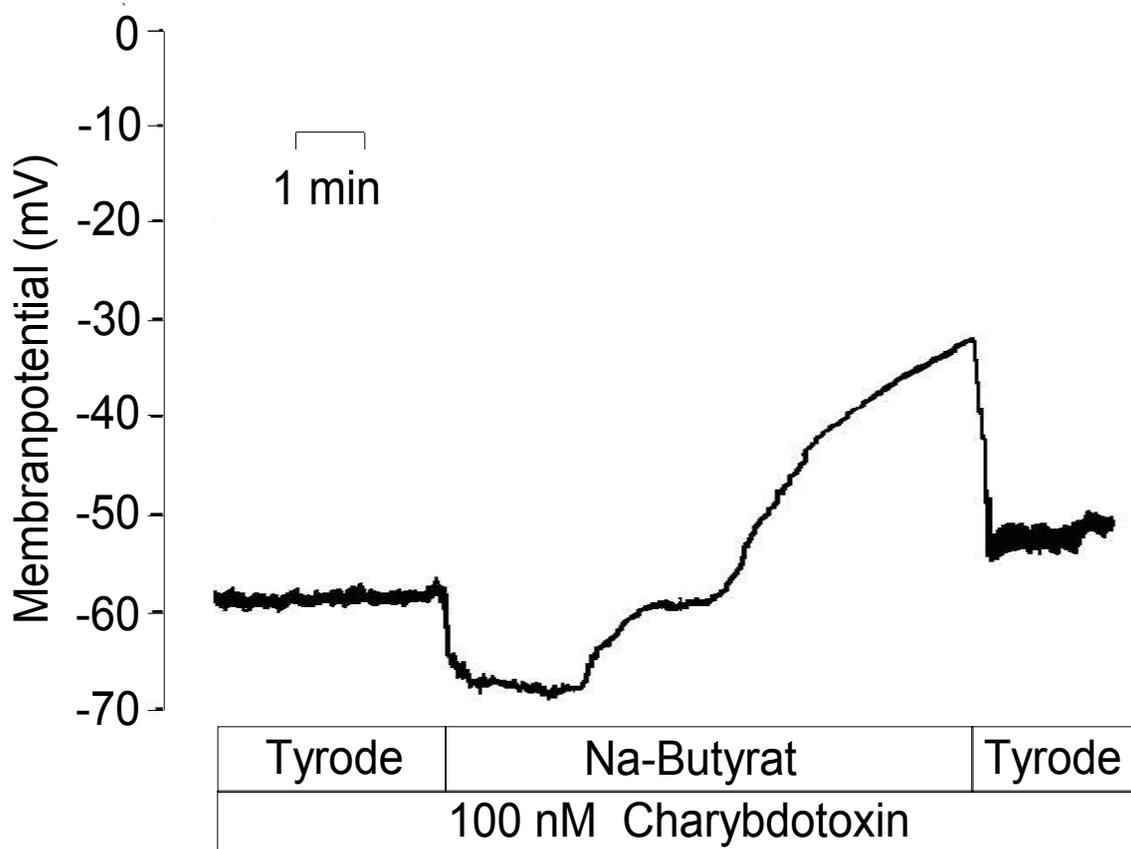


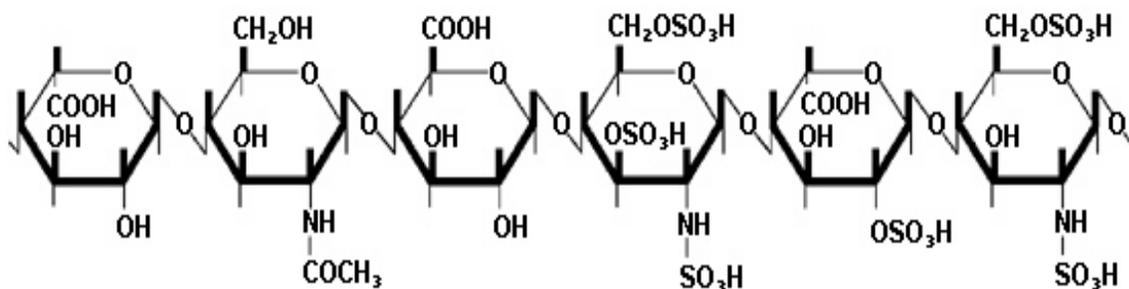
Abb. 28: Wirkung von Butyrat ($90 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na-Butyrat}$) auf das Membranpotential in Gegenwart von Charybdotoxin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Originalaufzeichnung ist typisch für 9 von 11 Experimenten, in denen Butyrat nach transients Hyperpolarisation eine massive Depolarisation auslöste. In 2 von 11 Zellen war diese zweite Phase nur schwach ausgeprägt, so dass das Membranpotential auf den Grundwert vor Butyratapplikation zurückging. Statistik siehe Text.

3. Intrazelluläre Vermittlung der Wirkung von Butyrat

Die Hemmung der Butyrat-induzierten Hyperpolarisation durch Charybdotoxin weist darauf hin, dass es in Gegenwart der kurzkettigen Fettsäure zu einer Stimulation von Ca^{2+} -aktivierbaren K^+ -Kanälen kommt. Zu dieser Vermutung passt auch die Beobachtung, dass Exposition gegenüber Butyrat zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, wie sich in entsprechenden Versuchen an mit Fura-2 aufgeladenen myenterischen Neuronen zeigte (Haschke et al. 2002). Der Ca^{2+} -Anstieg geht dabei auf eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Thapsigargin-sensitiven Speichern zurück.

Daher sollte im Folgenden der Mechanismus, über den Butyrat zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, untersucht werden. Eine Möglichkeit, intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher zu entleeren, besteht in der Stimulation der Bildung des second messengers Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) (Berridge und Irvine 1984, 1989). Der Rezeptor für IP_3 kann durch Heparin blockiert werden, wodurch der Botenstoff seine Wirksamkeit verliert (Broad et al. 2001).

Bei Heparin handelt es sich um eine hochmolekulare Substanz (Abb. 29), die nicht nach Superfusion in die Zellen aufgenommen wird. Daher musste der Inhibitor bei den Whole-Cell Patch-Clamp-Ableitungen über die Pipettenlösung, die das Zytosol bei dieser Art von Messung ersetzt, appliziert werden.



Heparin-Kette (Ausschnitt)

Abb. 29: Teil der Polysacharidkette, aus der Heparin besteht.

In Gegenwart von Heparin ($6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in der Patch-Pipette betrug das basale Membranpotential $-40,0 \pm 6,1 \text{ mV}$ ($n = 6$). Unter diesen Bedingungen induzierte Butyrat ($90 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}/50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na-Butyrat}$) immer noch eine Hyperpolarisation, die mit $12,0 \pm 1,4 \text{ mV}$ ($n = 6$) nicht signifikant von der Butyratantwort unter Kontrollbedingungen verschieden war (Abb. 30).

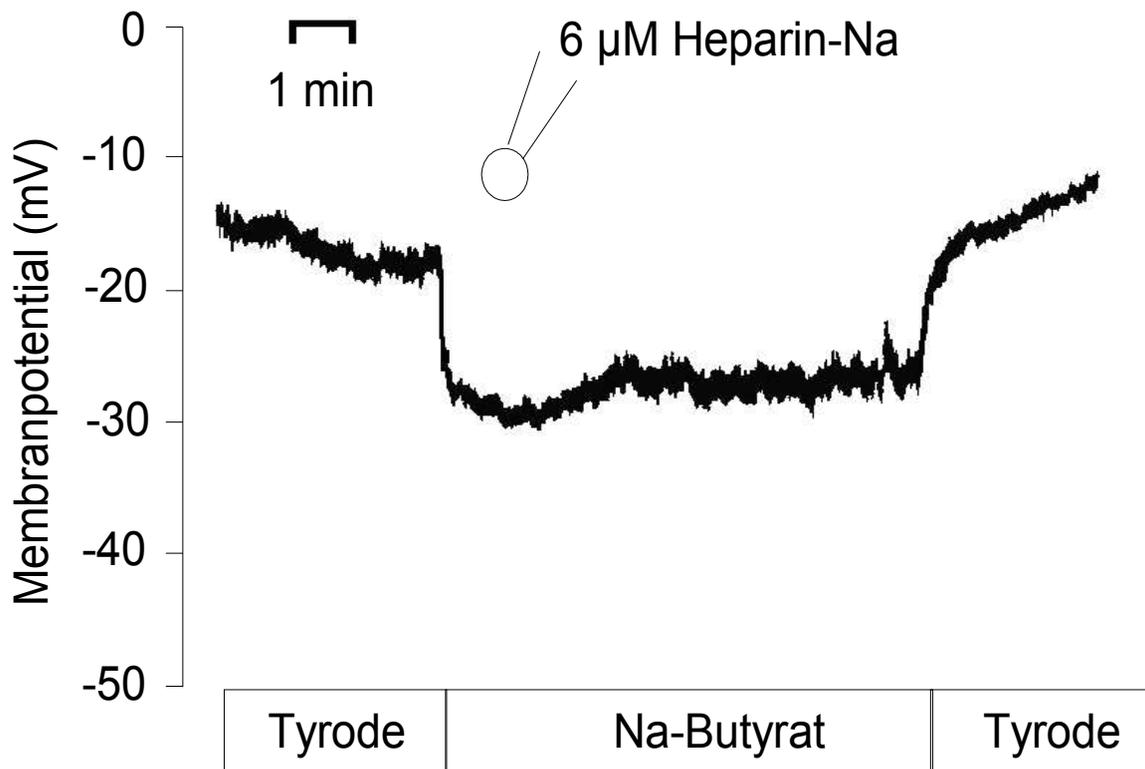


Abb. 30: Butyratantwort in Gegenwart von Heparin ($6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Heparin wurde mit Patch-Pipette appliziert. Die Originalaufzeichnung ist typisch für 6 Versuche mit ähnlichem Ergebnis; Statistik siehe Abb. 35.

Ebenso erwies sich die Butyrat-Antwort als resistent gegenüber der Blockade der Phospholipase C. Dieses Enzym, das die Bildung von IP_3 katalysiert, lässt sich durch U-73122 (Abb. 31) spezifisch hemmen (Leis et al. 2000, Broad et al. 2001, Wang et al. 2001, Kettunen et al. 2002, Vogt et al. 2003).

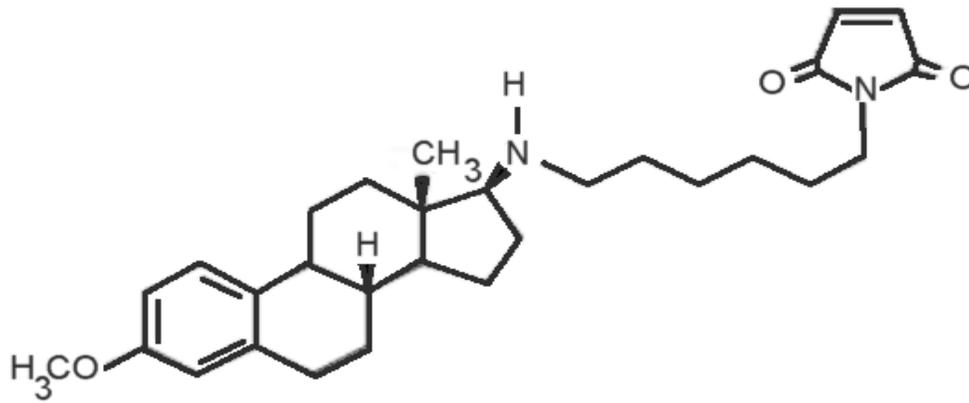


Abb. 31: Molekulare Struktur des Phospholipase C-Blockers U-73122.

In Gegenwart von U-73122 ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; mit der Patch-Pipette appliziert), betrug das basale Membranpotential $-30,8 \pm 5,2 \text{ mV}$ ($n = 6$). In Gegenwart des Inhibitors induzierte Butyrat immer noch eine Hyperpolarisation von $13,7 \pm 2,4 \text{ mV}$ ($n = 6$, Abb. 32).

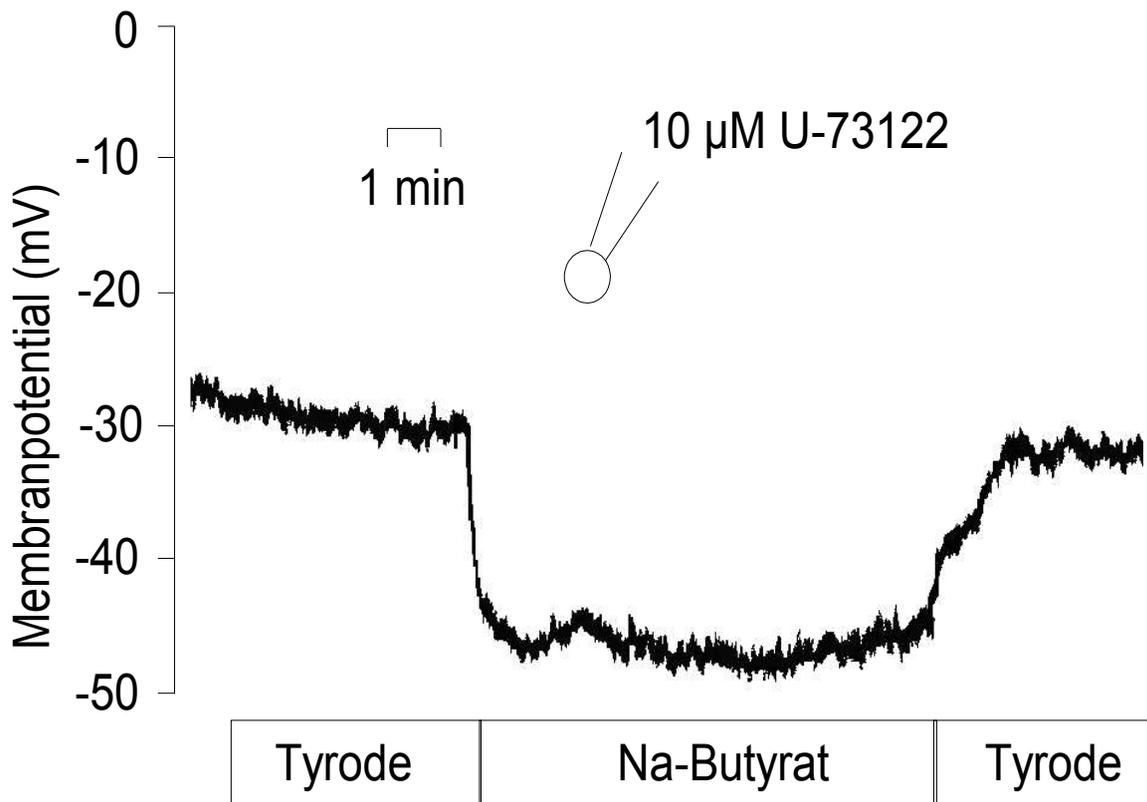


Abb. 32: Hemmung der Phospholipase C mit U-73122 ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in der Patch-Pipette) hat keinen Einfluss auf die durch Butyrat ($90 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}/50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na-Butyrat}$) induzierte Hyperpolarisation. Die Originalaufzeichnung ist typisch für 6 Versuche mit ähnlichem Ergebnis, Statistik siehe Abb. 35.

Die Beteiligung des Phospholipase-IP₃-Signalweges am Zustandekommen des Butyrat-effektes erscheint damit als unwahrscheinlich. Eine andere Möglichkeit, Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freizusetzen, ist die Stimulation von Ryanodinrezeptoren. Diese lassen sich durch Ruthenium Rot (Abb. 33) hemmen (Sorrentino 1995, Franzini-Amstrong und Protasi 1997, Taylor et al. 1998, Kocks et al. 2002). Um die Beteiligung von Ryanodinrezeptoren an der Butyratantwort zu untersuchen, wurde gemessen, ob Butyrat nach Blockade von Ryanodinrezeptoren mit Ruthenium Rot noch in der Lage ist, eine Hyperpolarisation der Membran zu induzieren.

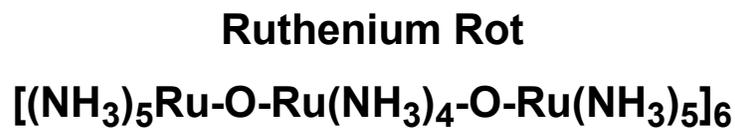


Abb. 33: Formel von Ruthenium Rot (Pottosin 1999)

In Gegenwart von Ruthenium Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, mit der Patch-Pipette appliziert) betrug das basale Membranpotential $-47,9 \pm 5,2 \text{ mV}$ ($n = 10$). In Gegenwart des Inhibitors war die Hyperpolarisation, die Butyrat ($90 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NaCl}/50 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Na-Butyrat}$) auslöste, deutlich abgeschwächt (Abb. 34). Sie betrug lediglich $4,7 \pm 0,4 \text{ mV}$ ($n = 10$). Dieser Wert entspricht 40 % der unter Kontrollbedingungen durch Butyrat induzierten Hyperpolarisation ($11,6 \pm 1,0 \text{ mV}$; $n = 7$, $p < 0,05$ versus Butyratantwort unter Kontrollbedingungen).

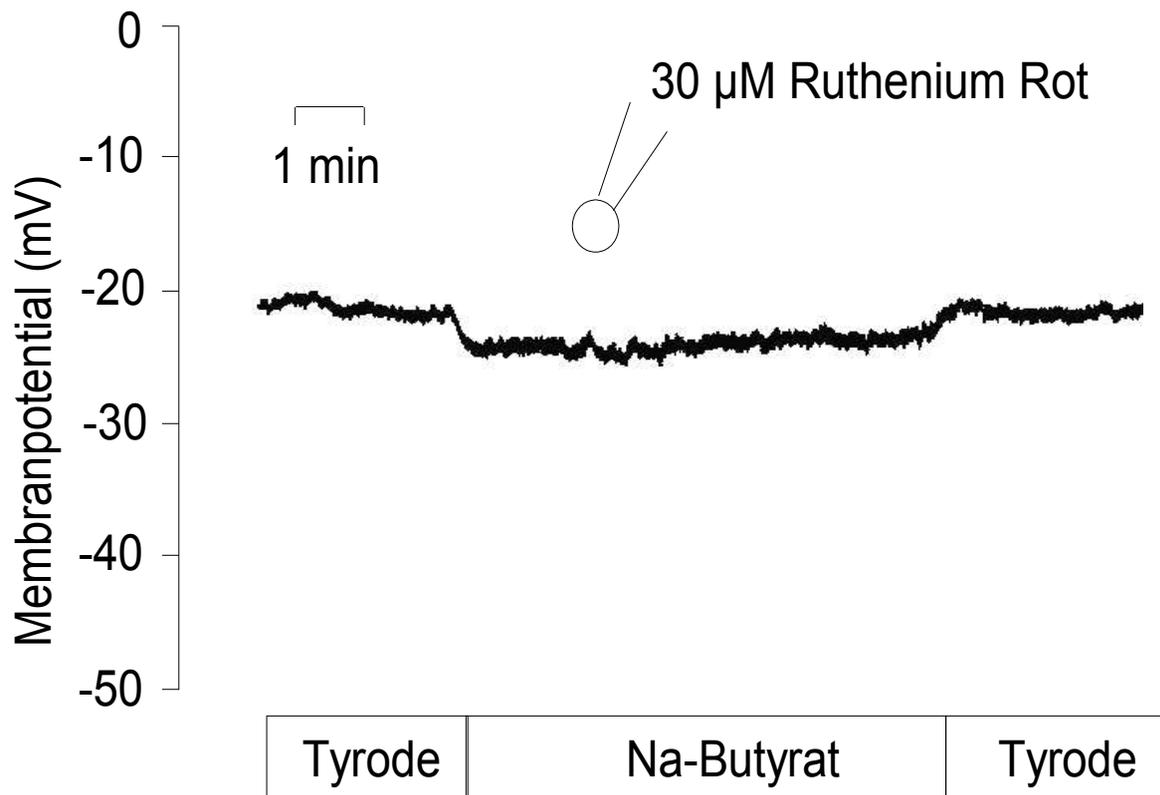


Abb. 34: Ruthenium Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in der Patch-Pipette, siehe schematische Zeichnung) vermindert deutlich die durch Butyrat ($90 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na-Butyrat}$) ausgelöst wird. Die Originalaufzeichnung ist typisch für 10 Versuche mit ähnlichem Ergebnis; Statistik siehe Abb. 35.

4. Zusammenfassung der Inhibitor-Experimente

In Abbildung 35 sind zusammenfassend die bisherigen Resultate dargestellt. Die Zellmembran hyperpolarisiert nach Zugabe von Butyrat. Inhibitoren des Phospholipase C/IP₃-Signalwegs wie Heparin oder U-73122 beeinflussen diese Antwort nicht. Hemmung von Ryanodinrezeptoren mit Ruthenium Rot hingegen vermindert die Butyrat-induzierte Hyperpolarisation um ca. 60 % (n = 6 - 10, p < 0,05 versus Butyratantwort unter Kontrollbedingungen).

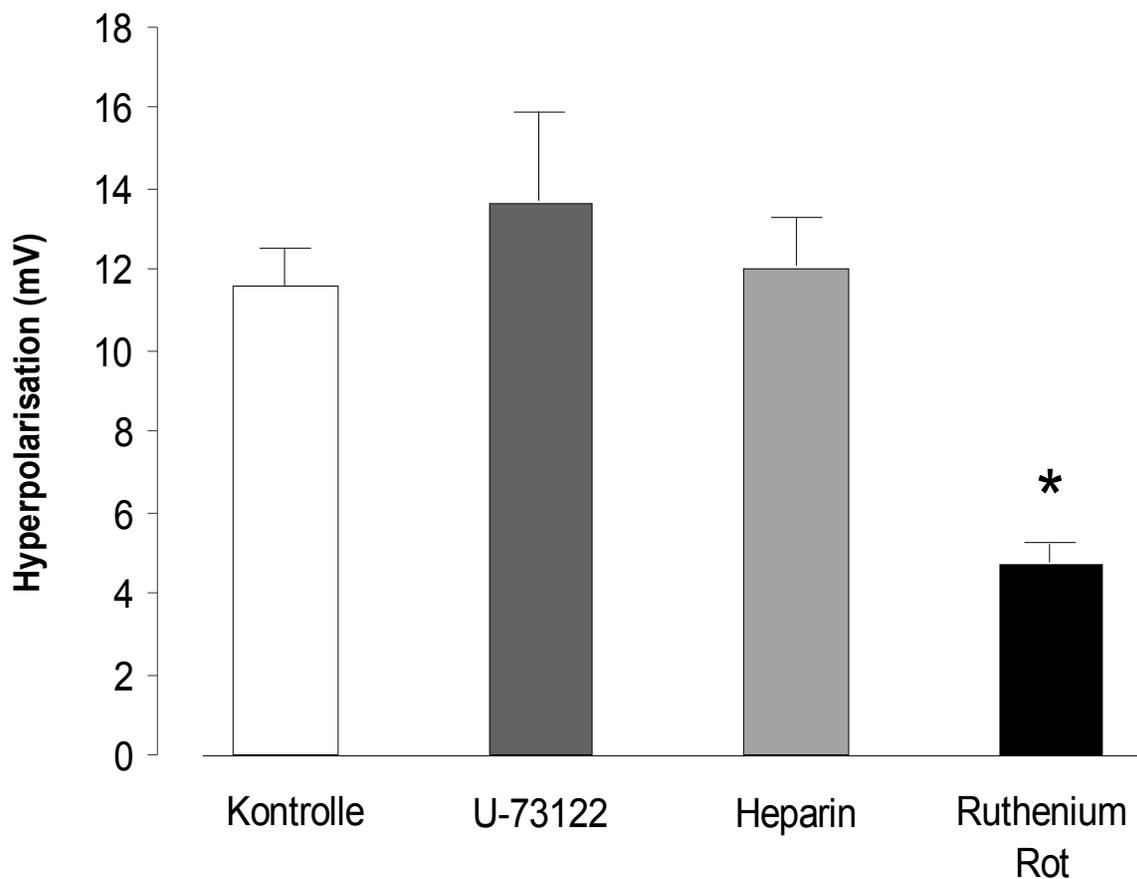


Abb. 35: Darstellung der durch Butyrat ($90 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl/ $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na-Butyrat) ausgelösten Hyperpolarisation in Abwesenheit von Inhibitoren (Kontrolle, weiße Säule) und in Anwesenheit von U-73122 (dunkelgraue Säule, $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mit der Patch-Pipette appliziert), Heparin (hellgraue Säule, $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mit der Patch-Pipette appliziert) oder Ruthenium Rot (schwarze Säule, $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mit der Patch-Pipette appliziert). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n = 6 - 10. * p < 0,05 versus Butyratereffekt in Abwesenheit jeglicher Inhibitoren.

5. Fura-2-Messungen

5.1 Ryanodinrezeptoren

Die Inhibitorexperimente legen die Vermutung nahe, dass Butyrat eine Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} aus Speicherorganellen über Ryanodinrezeptoren auslöst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Neurone mit Fura-2 aufgeladen. Das Verhältnis der Emission dieses Fluoreszenzfarbstoffes bei Anregung mit Licht von 340 nm dividiert durch die Emission bei einer Anregung bei 380 nm steigt bei zunehmender Beladung mit Ca^{2+} , d.h. bei einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, an (Grynkiewicz et al. 1985).

Superfusion der Neurone mit Butyrat unter Kontrollbedingungen erhöhte das Fluoreszenzverhältnis von Fura-2 um $0,13 \pm 0,02$ (Abb. 36a), was eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration anzeigt. Mit Hilfe der Grynkiewicz-Gleichung (Grynkiewicz et al. 1985) ist es möglich, auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zurückzurechnen, der einem bestimmten Wert für die Ratio zu Grunde liegt. Die Grynkiewicz-Gleichung lautet:

$$[\text{Ca}]_i = K_D \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

Es bedeuten:

$[\text{Ca}]_i$ = intrazelluläre Calciumkonzentration

K_D = Dissoziationskonstante = $224 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$

$$\beta = \frac{\text{Fluoreszenzsignal bei 340 nm bei } 0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Calcium}}{\text{Fluoreszenzsignal bei 380 nm bei } 10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Calcium}}$$

R = Ratio

R_{\min} = Ratio bei $0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Calcium

R_{\max} = Ratio bei $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Calcium

Nach der Grynkiewicz-Gleichung lag die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration vor Zugabe von Butyrat bei $12,0 \pm 3,3 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nach Butyrat Applikation stieg die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration auf $23,2 \pm 4,0 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($n = 11$). Dieser Anstieg ist unabhängig von der Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} , muss also auf eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern zurückgehen (Haschke et al. 2002). Um die vermutete Beteiligung

von Ryanodinrezeptoren an dieser Antwort zu untersuchen, wurden die Neurone mit Ruthenium Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) vorbehandelt. Unter diesen Bedingungen löste Butyrat nur noch einen geringen und stark verzögerten Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses aus (Abb. 36b). Die Ausgangsratio änderte sich von $0,48 \pm 0,02$ bei Zugabe von Butyrat auf $0,52 \pm 0,02$ (gemessen 10 min nach Butyratgabe) bei 11 untersuchten Zellen. Die Amplitude des Butyrat-induzierten Anstiegs betrug in Gegenwart von Ruthenium-Rot nur noch $0,04 \pm 0,01$ ($n = 11$) gegenüber $0,13 \pm 0,01$ ($n = 5$) unter Kontrollbedingungen (Abb. 37). Einfaktorische Varianzanalyse und ungepaarter t-Test zeigten einen signifikanten Unterschied der beiden Datenreihen an ($p < 0,05$).

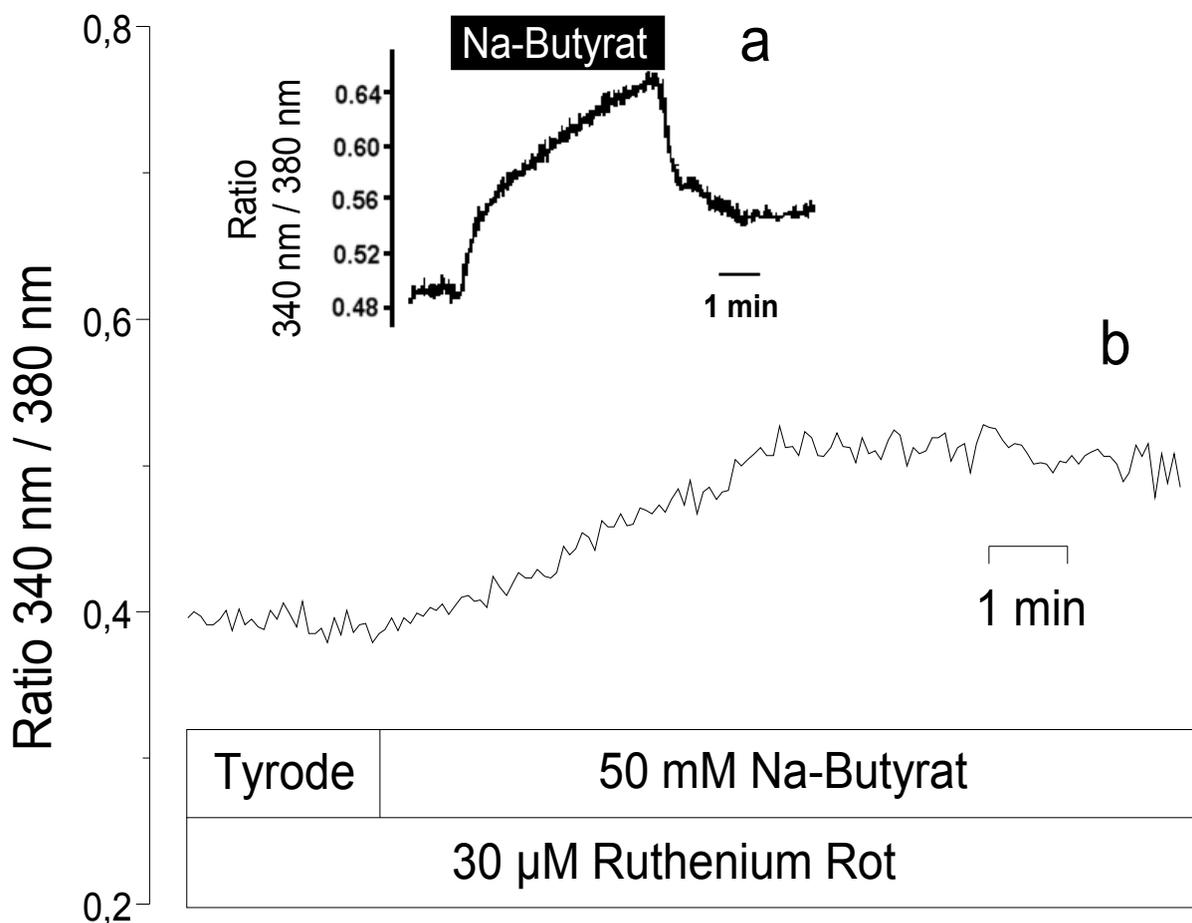


Abb. 36a: Die Gabe von Natrium-Butyrat ($90 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na-Butyrat}$) führt zu einem Anstieg der Emission von Fura-2 bei Anregung mit Licht von 380 nm im Vergleich zu einer Anregung bei 340 nm, was gleichbedeutend mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist. **b:** In Anwesenheit von Ruthenium Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ist dieser Anstieg gehemmt. Die Originalaufzeichnung ist typisch für 11 Versuche mit ähnlichem Ergebnis, Statistik siehe Abb. 37.

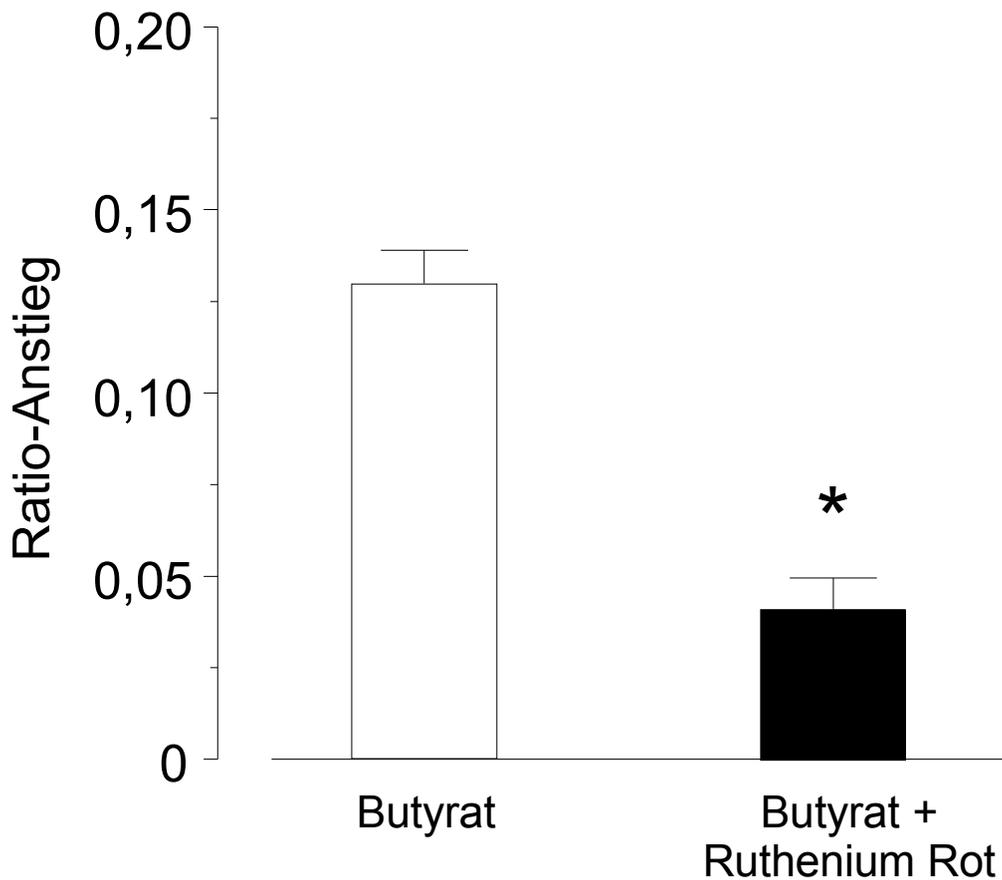


Abb. 37: Ruthenium Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) hemmt den Anstieg der Fura-2-Ratio, den Butyrat ($90 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}/50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na-Butyrat}$) induziert. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 5 - 11$, * $p < 0,05$ versus Butyratantwort unter Kontrollbedingungen.

5.2 Einfluss hoher Ryanodinkonzentrationen

Aus der Literatur ist bekannt, dass Ryanodinrezeptoren durch Ryanodin in hohen Konzentrationen gehemmt werden können, damit wird dann ein Ca^{2+} -induzierter Ca^{2+} -Ausstrom vermindert (Franzini-Amstrong und Protasi 1997, Ozawa 2001). Um zu überprüfen, ob dies auch an den myenterischen Neuronen der Fall ist, wurde zuerst im Rahmen der Fura-Messung mit normaler Tyrode-Lösung perfundiert. Dann wurde diese Lösung durch eine Tyrode mit $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Ryanodin ersetzt. Dies führte zu einem (nicht signifikanten) Abfall der Fura-2-Ratio von $0,56 \pm 0,07$ auf $0,48 \pm 0,04$ ($n = 8$). In Gegenwart von dieser hohen Ryanodinkonzentration induzierte Butyrat überhaupt keinen Anstieg der Fura-2-Ratio mehr, sondern im Gegenteil sank das Fura-2-Signal weiter (nicht signifikant) auf einen Wert von $0,45 \pm 0,03$ ($n = 8$). Die Abbildung 38 zeigt beispielhaft einen solchen Kurvenverlauf, Abbildung 39 die dazugehörige Statistik.

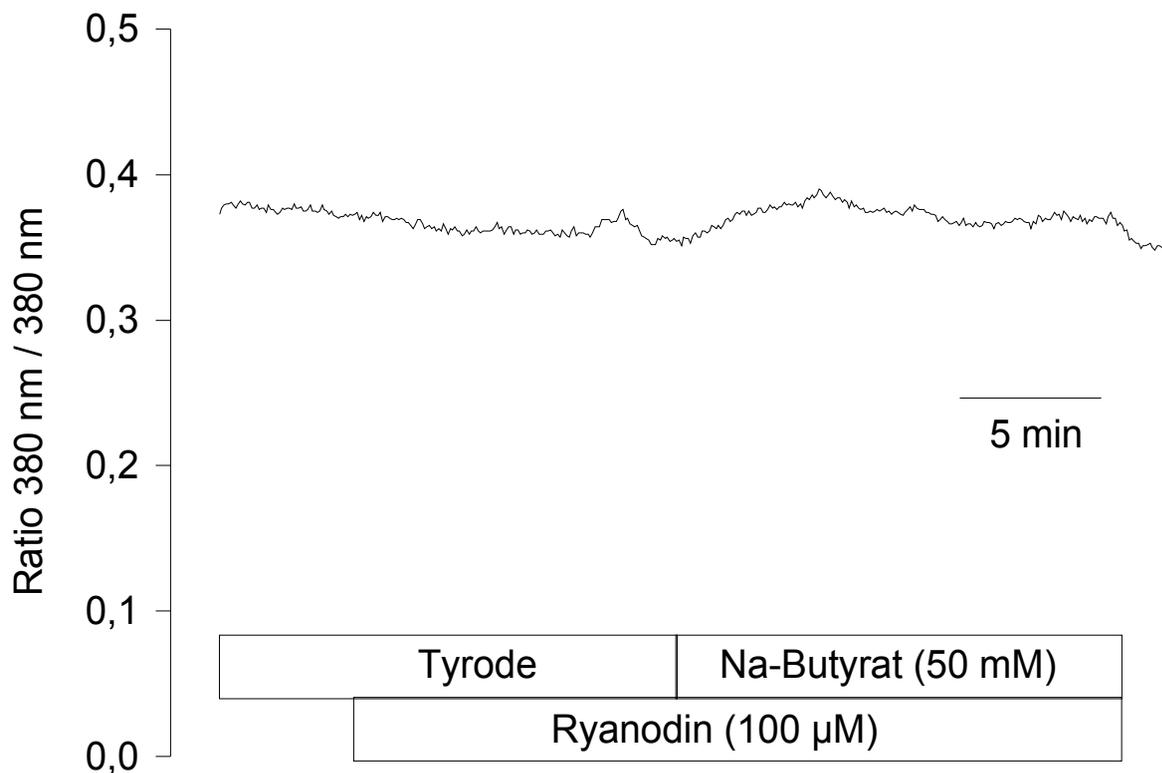


Abb. 38: Unter dem Einfluss von Ryanodin ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) findet kein signifikanter Anstieg der Fura-2 Ratio durch Butyratzugabe mehr statt. Hier eine Originalaufzeichnung von insgesamt 8 ähnlichen Verläufen, Statistik siehe Abb. 39.

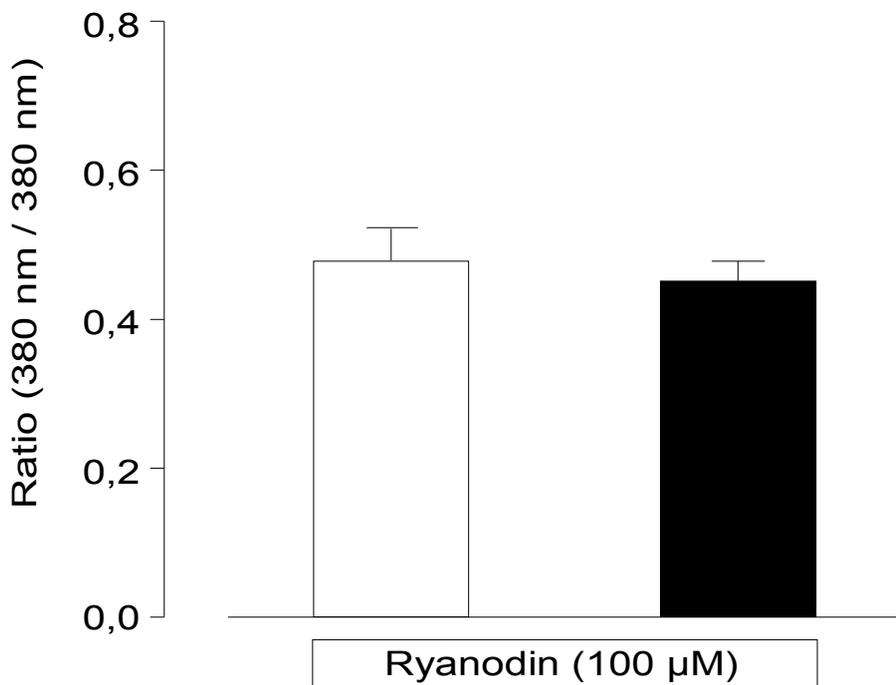
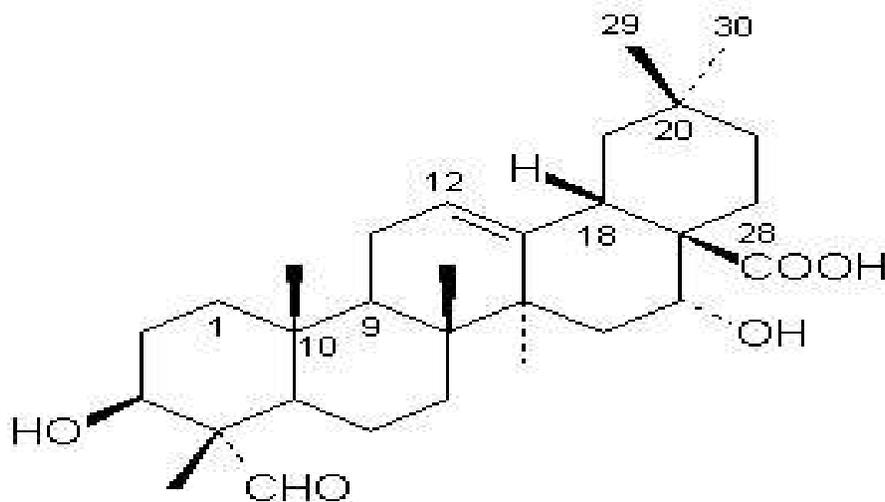


Abb. 39: Fura-2-Ratio in Gegenwart von Ryanodin ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; weiße Säule) und in Gegenwart von Ryanodin gemeinsam mit Butyrat ($90 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na-Butyrat}$; schwarze Säule). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 8$.

5.3 Beeinflussung der Ca^{2+} -Freisetzung durch Permeabilisation

In einer letzten Versuchsserie sollte herausgefunden werden, ob Butyrat über Vermittlung von membranständigen Rezeptoren (Brown et al. 2003, Le Poul et al. 2003) zu einer Ca^{2+} -Freisetzung via Ryanodinrezeptoren führt, oder ob die kurzkettige Fettsäure direkt die Ryanodinrezeptoren zu stimulieren vermag. Hierzu wurden die Neurone mit Saponin (Abb. 40) permeabilisiert.



Quillajasäure

ein Triterpen-Sapogenin

Abb. 40: Strukturformel von Saponin (aus: www.omikron-online.de/naturhaus/angebote/kraeuter/monograf/2336-mon.htm).

Diese Substanz, die in einer Konzentration von $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt wurde, bildet Poren in der Zellmembran (Schulz 1990). Diese Poren sind für Moleküle bis zu 200 kD permeabel. Da auch Fura-2 (Molekulargewicht der freien Säure: 641 D) diese Poren zu passieren vermag, musste das Fura-2 ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) mit dem Superfusionsmedium appliziert werden. Außerdem erwies es sich in Vorversuchen als günstig, die Butyratkonzentration zu reduzieren, da Butyrat unter diesen Bedingungen seinen vermuteten Zielort, die intrazellulären Speicherorganellen, direkt, d.h. ohne vorherige Diffusion durch die Zellmembran, erreichen kann.

Unter diesen Bedingungen, bei denen durch die massive Permeabilisation der Zellmembran eine intrazelluläre Vermittlung von der Zellmembran über diffusible second messenger zu den Speicherorganellen ausgeschlossen werden kann, war Butyrat

immer noch in der Lage, einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der myenterischen Neurone auszulösen (Abb. 41). Der Ausgangswert der Ratio von $0,38 \pm 0,02$ erhöhte sich signifikant ($p < 0,05$) nach der Zugabe von Butyrat auf $0,51 \pm 0,02$ ($n = 5$), dies entspricht einer Zunahme um 34 % (Abb. 42).

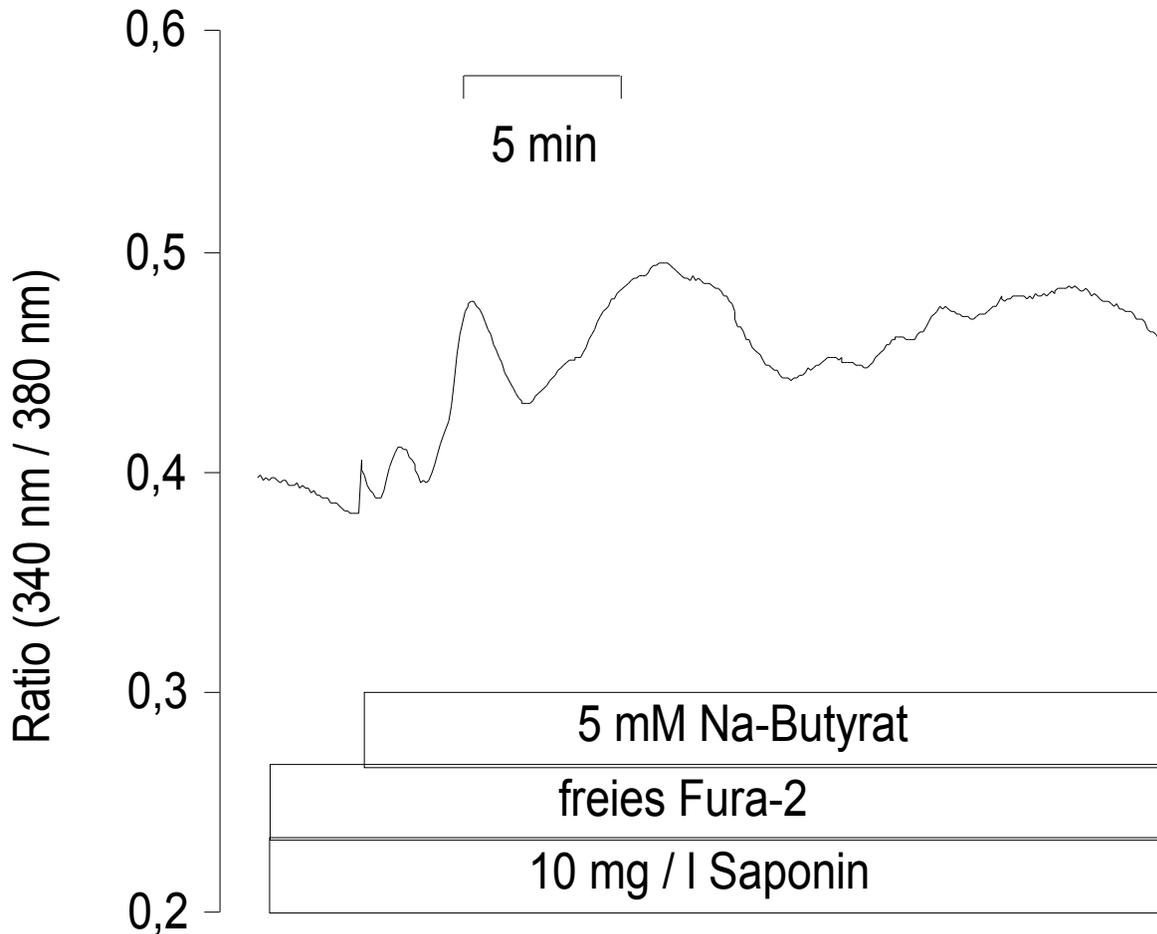


Abb. 41: In mit Saponin ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) permeabilisierten Zellen verursacht Butyrat ($100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KGluc / $30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl / $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl / $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Na Butyrat) einen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses. Die Originalaufzeichnung ist typisch für 5 Versuche mit ähnlichem Ergebnis, Statistik siehe Abb. 42.

Die Ergebnisse sind in Abb. 42 zusammenfassend dargestellt.

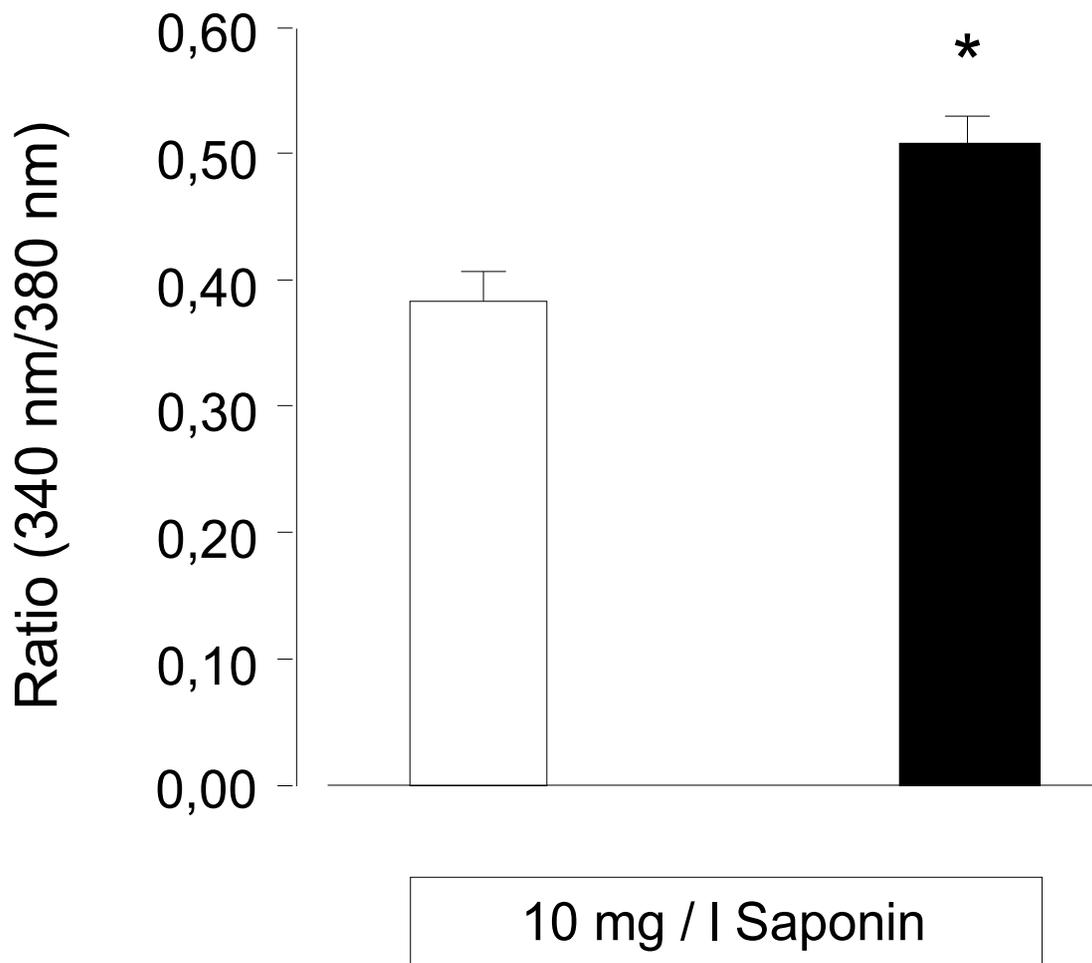


Abb. 42: Anstieg der Fura-2-Ratio vor (□) und nach (■) Butyrat ($135 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na Butyrat}$) in mit Saponin permeabilisierten myenterischen Neuronen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 5$, * $p < 0.05$ versus Fura-2-Ratio in Abwesenheit von Butyrat.

Um zu überprüfen, ob dieser Anstieg des Fura-2-Signals in permeabilisierten Neuronen auf eine Stimulation von Ryanodinrezeptoren zurückgeht, wurde Ruthenium Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) als Blocker eingesetzt. In Gegenwart von Ruthenium Rot verursachte Butyrat nur einen geringen Anstieg des Fura-Signals. Vor der Zugabe betrug die Ratio $0,59 \pm 0,02$, nach Butyratzugabe zeigte sich eine Ratio von $0,65 \pm 0,02$, die Zunahme betrug im Mittel lediglich $0,06 \pm 0,01$ ($n = 9$; Mittelwert \pm SEM). Das entspricht einer Hemmung von ca. 50 % ($p < 0,05$) im Vergleich zur Butyratantwort in Abwesenheit von Ruthenium Rot. Die Abbildung 43 zeigt einen von 9 ähnlichen Kurvenverläufen.

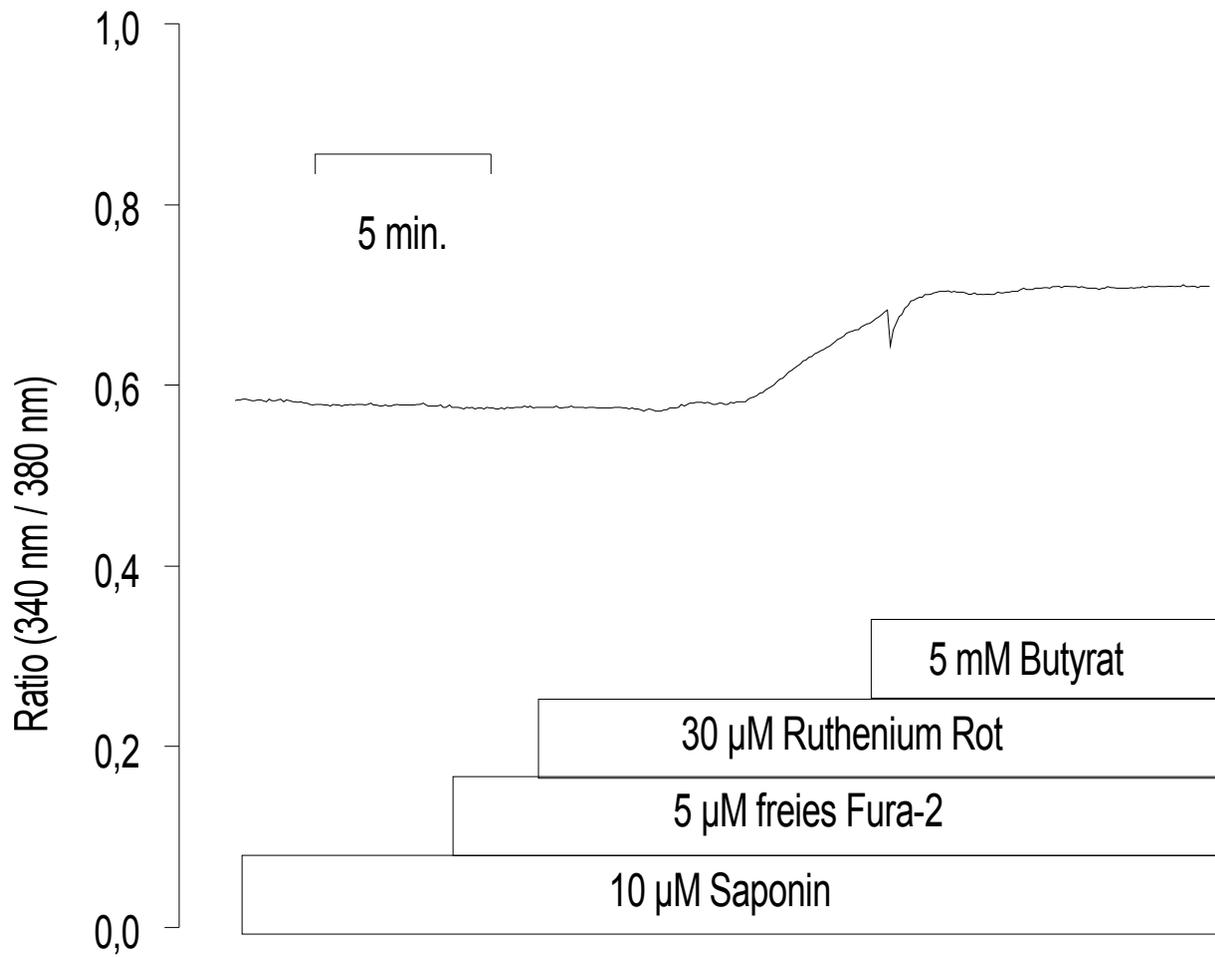


Abb. 43: In mit Saponin ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) permeabilisierten Zellen verursacht Butyrat ($100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KGluc / $30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl / $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl / $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Na Butyrat) in Gegenwart von Ruthenium Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) nur einen geringen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses. Die Originalaufzeichnung ist typisch für 9 Versuche mit ähnlichem Ergebnis, Statistik siehe Abb. 44.

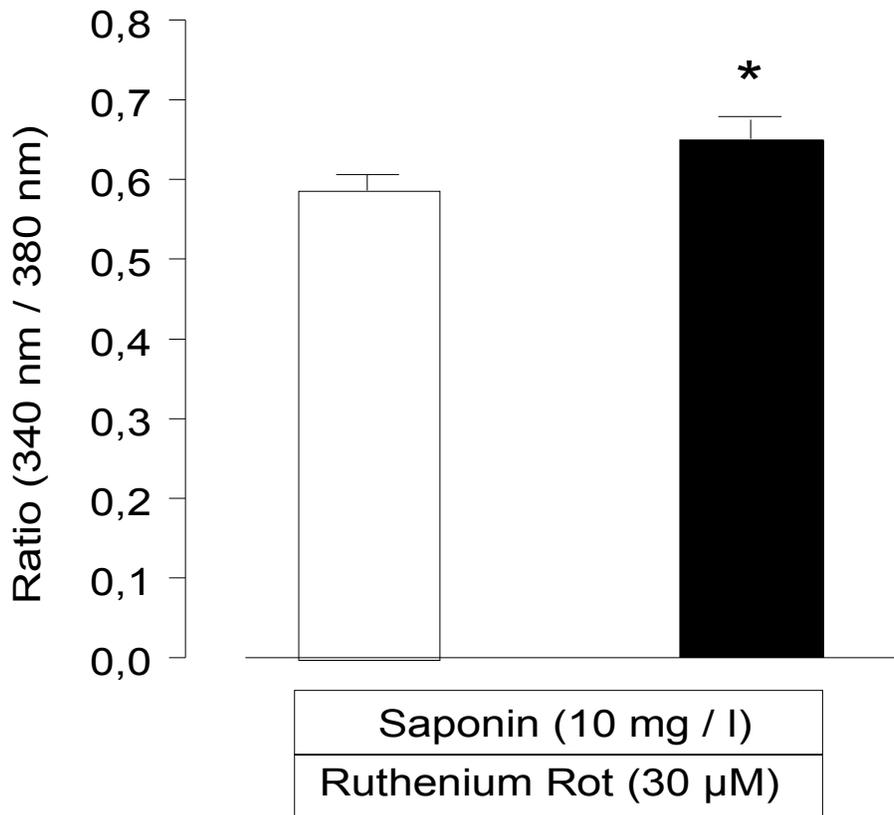


Abb. 44: Anstieg der Ratio vor (□) und nach (■) Butyrat ($135 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na Butyrat}$) in mit Saponin permeabilisierten myenterischen Neuronen unter der Einwirkung von Ruthenium-Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 9$, * $p < 0.05$ versus Fura-2-Ratio in Abwesenheit von Butyrat.

Beim Vergleich der Saponin-Messreihen (Abb. 41 und 43) fällt auf, dass die Zunahme des Anstieg der Ratio nach Butyratgabe unter dem Einfluss von Ruthenium-Rot sich extrem erniedrigt. Der Anstieg der Ratio nach Butyratapplikation betrug $0,12 \pm 0,01$ ($n = 5$) in Saponin-behandelten Neuronen, und halbierte sich bei den permeabilisierten und mit Ruthenium Rot behandelten Neuronen ($0,06 \pm 0,01$; $n = 9$). Der Vergleich der beiden Ratio-Zunahmen ist in der nächsten Abbildung grafisch dargestellt.

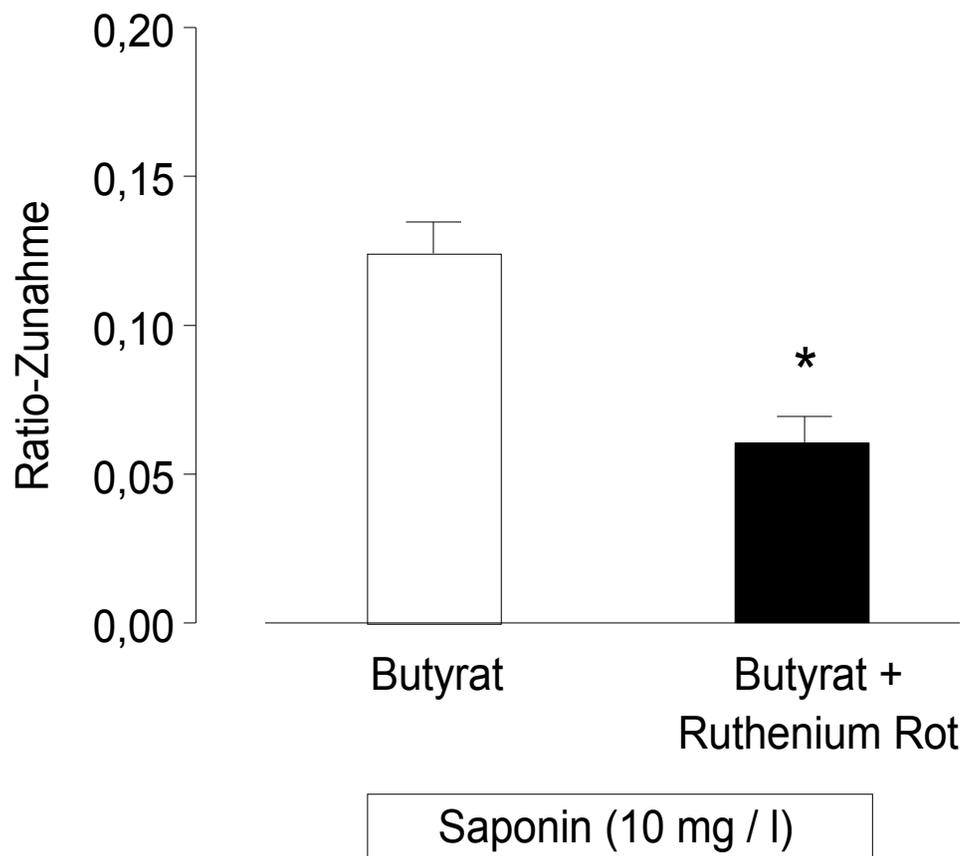


Abb. 45: Vergleich der Butyrat-induzierten Zunahme der Fura-2-Ratio in Saponin-permeabilisierten Neuronen in Abwesenheit (□) bzw. Anwesenheit von Ruthenium Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; ■). Es zeigt sich eine signifikante Reduktion (* $p < 0,05$) der Zunahme unter dem Einfluss des Inhibitors Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 5-9$.

IV. DISKUSSION

Das enterale Nervensystem wurde in den letzten drei Dekaden intensiv in elektrophysiologischer und immunhistologischer Hinsicht untersucht (Wood 1994). Um die Zusammenhänge zwischen dem enterischen Nervensystem und Störungen in Funktionen des Gastrointestinaltrakts besser zu verstehen, kann eine Primärkultur von Neuronen des Plexus myentericus herangezogen werden (Schäfer et al. 1997, Haschke et al. 2002). Diese Neurone können mit der Patch-Clamp Technik leicht untersucht werden. Sie weisen einen typischen Na^+ -getragenen schnellen Einwärtsstrom bei Depolarisation der Membran auf, der unter Normalbedingungen zur Entwicklung eines Aktionspotentials führt. Eine frühere elektrophysiologische Charakterisierung deckte auf, dass diese Neurone unterschiedliche Arten von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen funktionell exprimieren, die bei verschiedenen Schwellenpotentialen aktiviert werden (Haschke et al. 2002).

Die myenterischen Neurone ändern ihr Membranpotential in Gegenwart von kurzkettigen Fettsäuren wie Butyrat, die durch bakterielle Fermentationsvorgänge in hohen Konzentrationen vor allem im Dickdarmlumen vorliegen (Bugaut 1987). Ziel meiner Arbeit war eine nähere Untersuchung des Mechanismus, der der Hyperpolarisation der Membran durch Butyrat zugrunde liegt.

Butyrat wurde den Neuronen extrazellulär appliziert, wobei sich eine Hyperpolarisation des Membranpotentials um bis zu 15 mV (Abb. 25) einstellte. Bisher war unbekannt, ob die Konzentration von Butyrat einen Einfluss auf die Höhe der Hyperpolarisation hat. Daher wurde Na-Butyrat in unterschiedlichen Konzentrationen (10 - 100 mmol l^{-1}) auf myenterische Neurone eingesetzt (Abb. 23). Durch eine ansteigende Butyratkonzentrationsreihe wurde das Membranpotential konzentrationsabhängig hyperpolarisiert. Anhand der Michaelis-Menten-Kinetik ($V_{\text{max}} = 25,9 \pm 2,4 \text{ mV}$ und $K_m = 29,7 \pm 7,2 \text{ mmol l}^{-1}$) lag die in den folgenden Versuchen eingesetzte Konzentration von 50 mmol l^{-1} Butyrat weit über der halbmaximalen Konzentration von rund 30 mmol l^{-1} , also im fast gesättigten Bereich (Abb. 24). Aus diesem Grund wurde in den vorliegenden Untersuchungen eine Butyratkonzentration von 50 mmol l^{-1} gewählt.

Eine Möglichkeit, eine Hyperpolarisation der Membran auszulösen, ist eine Stimulation der K^+ -Leitfähigkeit. Dass eine solche auch dem Butyrateffekt zugrunde liegt, lässt sich daraus vermuten, dass Blockade von K^+ -Kanälen durch intrazellulär appliziertes Cs^+ , welches unselektiv eine Vielzahl von K^+ -Kanälen hemmt, die Butyratantwort unterdrückt (Haschke et al. 2002). Allerdings war es bisher nicht möglich, die betroffenen K^+ -Kanäle näher zu charakterisieren, da sich alle bisher getesteten selektiveren K^+ -Kanalblocker wie Ba^{2+} , Tetraethylammonium (TEA) oder 4-Aminopyridin (4-AP) als unwirksam erwiesen hatten. Aus Vorversuchen von Haschke et al. (2002) ist aber bekannt, dass bei der Butyrat-induzierten Hyperpolarisation Ca^{2+} -Ionen beteiligt sind. Dies legt die Möglichkeit nahe, dass Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle die Butyratwirkung vermitteln.

Aus diesem Grunde wurde Charybdotoxin (CHTX), ein Gift des Scorpions *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Sugg et al. 1990), als spezifischer Blocker von Ca^{2+} -aktivierbaren K^+ -Kanälen (Cui et al. 2001, Fu et al. 2002) eingesetzt. In einem ersten Ansatz wurde CHTX über die Patch-Pipette intrazellulär appliziert. In dieser Anordnung wirkte Charybdotoxin nicht (Daten nicht gezeigt). Wurde Charybdotoxin dagegen mit der extrazellulären Perfusionslösung gegeben, konnte Butyrat keine dauerhafte Hyperpolarisation mehr bewirken (Abb. 28).

Charybdotoxin bindet mit seiner helikalen Struktur (Abb. 27) an der extrazellulären Öffnung des K^+ -Kanals und blockiert damit den Ionentransport (Anderson et al. 1988, MacKinnon et al. 1989, 1990, Sugg et al. 1990). Charybdotoxin blockiert den Ionenfluss nicht nur an spannungsabhängigen und an Ca^{2+} -aktivierbaren K^+ -Kanälen, sondern auch an einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanälen (Cui et al. 2001; Abb. 46).

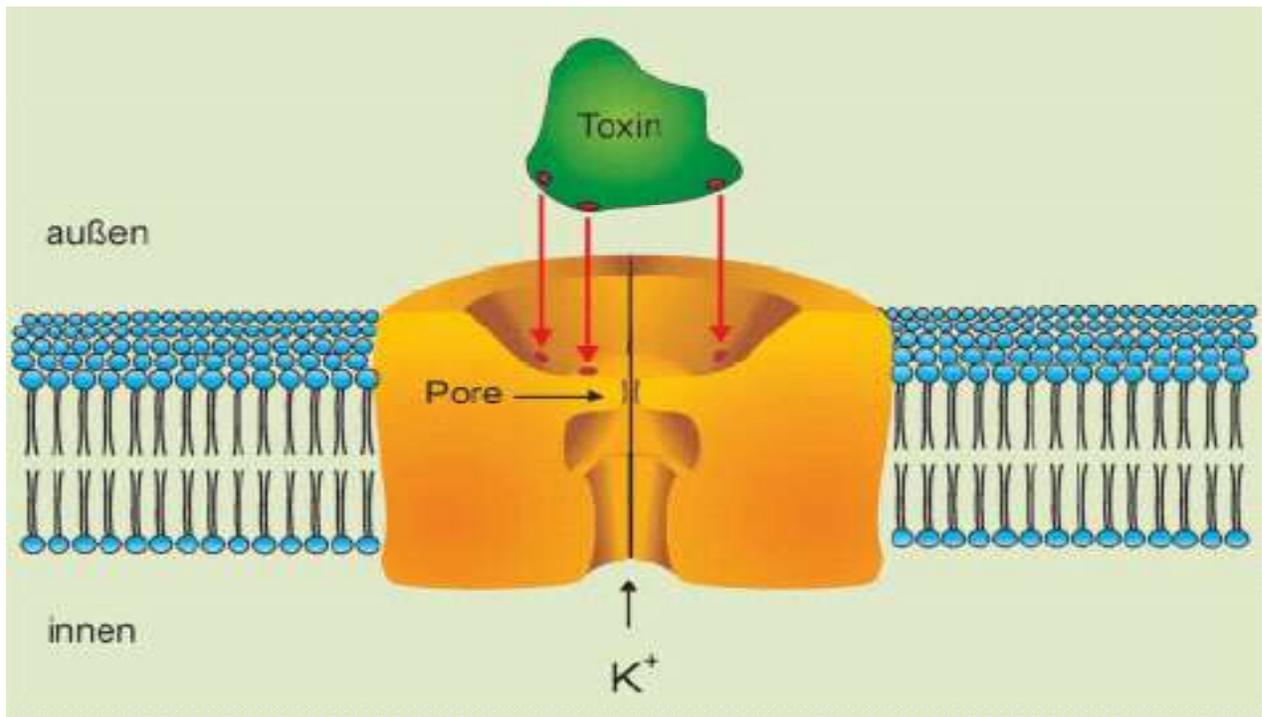


Abb. 46: Modell eines Kaliumkanals, der in die Plasmamembran einer Zelle eingebettet ist. Der Kanal besteht aus vier Untereinheiten; die beiden vorderen sind nicht gezeichnet, um Einblick in die Kanalpore zu gewähren. K^+ -Ionen dringen von der Zellinnenseite in den Kanal ein und treffen auf eine enge Stelle, die Kanalpore, die nur K^+ -Ionen, nicht aber Na^+ -, Ca^{2+} - oder Cl^- -Ionen passieren lässt. Auf der Zellaußenseite hat der Kanal einen weiten Vorhof, in dem Charybdotoxin binden und damit den Kanal blockieren kann. Der Durchmesser eines Charybdotoxinmoleküls beträgt ungefähr 1,5 nm. Aus *Biologie in unserer Zeit* 32: 148-158; 2002

Die Bindung von Scorpiongiften aus der Charybdotoxin-Familie an K^+ -Kanäle ist mittlerweile auch auf molekularer Ebene relativ gut untersucht. Vier Strukturen in dem Molekül binden mit hoher Wahrscheinlichkeit elektrostatisch an bestimmte Domänen des K^+ -Kanals (Cui et al. 2001, 2002). Mit Hilfe dieser Strukturen konnte ein dreidimensionales Modell des Toxin- K^+ -Kanal-Komplexes durch Dreigruppenkontaktanalyse, elektrostatische Abhängigkeiten und durch Brownsche Dynamik-Simulationen (Abb. 47) hergeleitet werden.

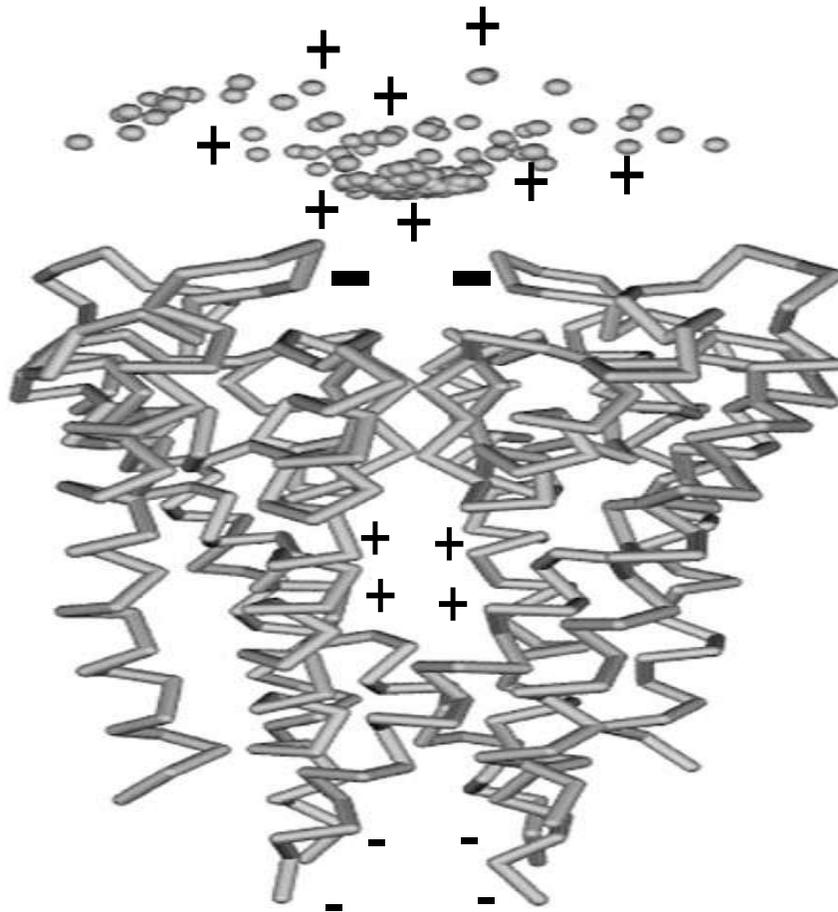


Abb. 47: Verteilung von Charybdotoxin (Kugeln) um die extrazelluläre Öffnung des K^+ -Kanals (Stabmodell). Um die Pore des Kanals ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit am höchsten. Ladungssymbole geben die Oberflächenladungen von K^+ -Kanal und Charybdotoxin wieder (aus Cui et al. 2001, verändert).

Wie erwartet trägt die extrazelluläre Öffnung des K^+ -Kanals ein großes negatives elektrostatisches Potential, während die Oberfläche von Charybdotoxin ein positives elektrostatisches Potential aufweist. Zusätzlich ist das elektrostatische Potential des K^+ -Kanals an der Zellinnenseite negativ, während es innerhalb des Kanals positiv ist. Diese Ladungsverteilung zieht das Kaliumion zur Kanalöffnung.

In den von mir durchgeführten Versuchen ließ sich beobachten, dass Charybdotoxin den Zeitverlauf der Wirkung von Butyrat (50 mmol l^{-1}) auf das Membranpotential massiv verändert. In Anwesenheit des Charybdotoxins wurde die Zellmembran der Neurone nur noch für kurze Zeit durch Na^+ -Butyrat hyperpolarisiert. Im Unterschied zu den Kontrollversuchen war die Hyperpolarisation nur noch transient und ging nach kurzer Zeit in

eine massive Depolarisation über (Abb. 28). Der Zeitverlauf dieser Hemmung der Butyratwirkung durch Charybdotoxin ist relativ gut mit den bekannten Bindungseigenschaften von Charybdotoxin an K^+ -Kanäle erklärbar. Offenkundig stimuliert Butyrat auch in Gegenwart dieses Toxins initial noch das Öffnen der Kanäle. Dadurch steigt, wie am Skelettmuskel gezeigt wurde, die Affinität der K^+ -Kanäle für Charybdotoxin deutlich an (Anderson et al. 1988). Folge ist ein Schließen der Kanäle, was dann die Hyperpolarisation beendet.

Danach kehrte sich der Butyrateffekt bei der Mehrzahl der untersuchten Zellen in eine paradoxe, sekundäre Depolarisation um (Abb. 28). Der Grund für die Sekundärdepolarisierung, die durch Butyrat in Anwesenheit von Charybdotoxin entsteht, ist nicht sicher bekannt. Sie könnte durch eine Stimulation von Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanälen verursacht werden. Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle sind an myenterischen Neuronen der Maus nachgewiesen wurden (Kang et al 2003). Ihr Öffnen führt dazu, dass sich das Membranpotential näher zum Cl^- -Gleichgewichtspotential verschiebt (-32,8 mV unter den von mir gewählten Bedingungen mit $44 \text{ mmol l}^{-1} Cl^-$ in der Pipettenlösung und $149,9 \text{ mmol l}^{-1} Cl^-$ im Superfusionsmedium). Dieses Phänomen wurde jedoch wegen der inkonsistenten Natur der Sekundärdepolarisation (und der hohen Kosten bei einer Superfusion mit Charybdotoxin) nicht weiter untersucht.

In fast allen Zellen spielen intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher eine essenzielle Rolle bei der Kontrolle des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels. Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER), dienen als Ca^{2+} -Speicher. Ein Ausstrom von Ca^{2+} aus diesen Speichern kann z.B. durch eine positive Rückkopplung über die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung ausgelöst werden, aber auch durch Botenstoffe wie z.B. Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). Das endoplasmatische Retikulum bzw. im Muskel das sarkoplasmatische Retikulum steht im Mittelpunkt des Ca^{2+} -Signalwegs. Unter physiologischen Bedingungen spielen die Mitochondrien keine besondere Rolle während einer Signalübertragung, da sie erst durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen stimuliert werden (Lee 1999); sie wirken im Gegenteil eher als Puffer, die stärkere Schwankungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Ca^{2+} -Aufnahme dämpfen.

Die Änderung im Membranpotential, die durch Butyrat induziert wird, wird durch eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration über eine Freisetzung von Ca^{2+} aus

Thapsigargin-sensitiven intrazellulären Speichern hervorgerufen (Haschke et al. 2002). Thapsigargin ist ein Gift, das die Ca^{2+} -ATPase blockiert, welche Ca^{2+} wieder zurück in die Speicher pumpen kann.

Es gibt zwei bekannte direkte Wege, die zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern führen können. Eine Freisetzung über IP_3 -Rezeptoren (Bultynck et al. 2003) oder eine Freisetzung über Ryanodin-Rezeptoren (Franzini-Amstrong und Protasi 1997). Der erste Weg ist abhängig von der Stimulation der Phospholipase C, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) umwandelt, welches als intrazellulärer Botenstoff dient. Dadurch wird das endoplasmatische Retikulum zur Abgabe von Ca^{2+} Ionen in das Zytosol der Zelle stimuliert. Gleichzeitig entsteht Diacylglycerol, welches in der Zellmembran zurückbleibt und dort die Proteinkinase C aktiviert, welche über Phosphorylierung die Zellfunktionen beeinflussen kann. In meinen Experimenten wurde Heparin, ein IP_3 -Rezeptor Antagonist (Bultynck et al. 2003), über die Patch-Pipette in die Zellen appliziert. Heparin hatte keinen Effekt auf die Butyratantwort (Abb. 30). Im folgenden Experiment wurde U-73122, ein Blocker der Phospholipase C (Taylor und Broad 1998), in die Zellen injiziert. Wie in Abb. 32 gezeigt, hatte auch dieser Hemmstoff keinen Einfluss auf die durch Butyrat induzierte Hyperpolarisation.

Diese Beobachtungen sprechen gegen die Beteiligung der G-Protein/Phospholipase C-verbundenen Rezeptoren GPR41 oder GPR43 an der Butyratantwort der myenterischen Neurone. Wie vor kurzem gezeigt wurde, sind kurzkettige Fettsäuren in der Lage diese Rezeptoren zu stimulieren (Brown et al. 2003, Le Poul et al. 2003). GPR41 zum Beispiel wird stark im Fettgewebe exprimiert, während GPR43 überwiegend in den Monozyten oder neutrophilen Leukozyten (Brown et al. 2003) vorhanden ist. Es ist spekuliert worden, dass diese Rezeptoren eine Rolle bei der Aktivierung von Leukozyten spielen (Le Poul et al. 2003). Die oben genannten Befunde lassen aber eine Beteiligung dieser Rezeptorsignalwege mit nachgeschalteter Phospholipase C/ IP_3 -Produktion an den kultivierten enterischen Neuronen als eher unwahrscheinlich erscheinen.

Um die Beteiligung von Ryanodinrezeptoren an der Butyratantwort zu untersuchen, wurde Ruthenium Rot, ein Blocker von Ryanodinrezeptoren (Sorrentino 1995, Franzini-Amstrong und Protasi 1997), über die Patch-Pipette in die Zelle appliziert. Ruthenium Rot verringerte deutlich die Hyperpolarisation der Membran, die durch Butyrat ausgelöst wird (Abb. 34). Diese Inhibitorexperimente legten die Vermutung nahe, dass Butyrat

eine Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} aus Speicherorganellen via Stimulation von Ryanodinrezeptoren auslöst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die myenterischen Zellen mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff (Fura-2) aufgeladen. Diese Substanz wird als Acetoxymethylester zu den Zellen appliziert. In dieser Form ist der Farbstoff lipophil und kann durch die Membran in die Zelle diffundieren. Innerhalb der Zelle wird die Esterbindung durch unspezifische Esterasen gespalten und der aktive Farbstoff wird in der Zelle freigesetzt. Das Fura-2 ändert sein Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Nachdem Ca^{2+} mit dem Farbstoff einen Komplex gebildet hat, gibt es eine Verschiebung der optimalen Anregungswellenlänge zu einer niedrigeren Wellenlänge. Dieses kann leicht registriert werden.

Wurde Butyrat der extrazellulären Perfusionslösung hinzugegeben, führte dies zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration (Abb. 36a). Dieser Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration konnte durch Ruthenium Rot gehemmt werden (Abb. 36b). Außerdem hemmte Ruthenium Rot signifikant die durch Butyrat induzierte Hyperpolarisation in Patch-Clamp Ableitungen (Abb. 34). Infolge dessen erscheint die Annahme plausibel, dass die Thapsigargin-sensitive Freisetzung von Ca^{2+} aus Speicherorganellen durch Butyrat über eine Aktivierung der Ryanodinrezeptoren vermittelt wird. Diese Rezeptoren, von denen 3 Subtypen (RyR1 – RyR3) bekannt sind, vermitteln eine so genannte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (Sorrentino 1995). Sie können auch durch die second messenger Substanz cADP-Ribose stimuliert werden, die aus dem Vorläufer Nicotin Amid Adenin Dinukleotid (NAD) durch das Enzym ADP Ribosylzyklase produziert wird (Lee 1999, Harmer et al. 2001). Ein anderes Stoffwechselprodukt, das durch die ADP Ribosylzyklase hergestellt wird, ist Nikotinsäure Adenin Dinukleotid Phosphat (NAADP). Diese Substanz wird produziert, wenn Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat (NADP) als Substrat für das Enzym dient; NAADP kann ebenfalls Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern mobilisieren.

Um herauszufinden, ob die kurzkettige Fettsäure direkt die Ryanodinrezeptoren stimuliert oder ob Butyrat über Vermittlung von second messenger Substanzen indirekt die Ryanodinrezeptoren zu stimulieren vermag, wurden die Neurone durch Perfusion mit Saponin permeabilisiert (Abb. 40). Saponin ist ein pflanzliches Glykosid, das die Zellmembran durchlässig für Moleküle mit einem Molekulargewicht bis zu 200 kD

macht (Schulz 1990). Auch unter diesen Bedingungen war Butyrat noch in der Lage, eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung zu verursachen (Abb. 41). Nach Saponin-Permeabilisation erscheint es ziemlich unwahrscheinlich, dass Butyrat über eine Zunahme der Konzentration von löslichen second messengern wie Ca^{2+} , IP_3 , cADP-Ribose oder anderen Substanzen wirken kann, da diese niedermolekularen Substanzen durch Diffusion durch die Saponinporen aus dem Zytoplasma verloren gehen. Eine direkte Wirkung des Butyrats auf Ryanodinrezeptoren erscheint demnach am plausibelsten.

Durch Saponin können ebenfalls die Membranen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher permeabilisiert werden. Hierzu sind aber wesentlich höhere Konzentrationen ($> 200 \text{ mg l}^{-1}$) an Saponin notwendig, da die Membran intrazellulärer Organellen im Unterschied zur Plasmamembran nur wenig Cholesterin enthält, was als Bindungspartner für das Saponin dient (Schulz 1990).

Zur weiteren Überprüfung der Hypothese, dass kurzkettige Fettsäuren auf Ryanodinrezeptoren einwirken, wurde an den permeabilisierten myenterischen Neuronen ein Inhibitor der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung, das Ruthenium Rot, eingesetzt. In Gegenwart des Inhibitors war der Anstieg des Fura-2-Floureszenzverhältnisses, den Butyrat auslöste, deutlich verringert (Abb. 44, 45). Diese Versuchsreihe liefert einen weiteren Hinweis, dass Butyrat durch eine Stimulation von Ryanodinrezeptoren zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt.

Es ist bekannt, dass Ryanodin in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Wirkungen auslöst (Coronado et al. 1994, Sorrentino 1995, Franzini-Amstrong und Protasi. 1997, Ozawa 2001). In hohen Konzentrationen ($> 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) hemmt es die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung, in niedrigen Konzentrationen ($< 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) stimuliert es sie (Meissner 1986, Humeriickhouse et al. 1993, Coronado et al. 1994). Aus diesem Grund wurde in meinen Experimenten ein hohe Konzentration ($10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) von Ryanodin eingesetzt, um eine Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung zu erreichen. In Gegenwart von Ryanodin löste Butyrat keinen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mehr aus (Abb. 38 und 39).

Ryandinrezeptoren verstärken in vielen Zellen intrazelluläre Ca^{2+} -Signale durch eine positive Rückkopplung. Ryanodinrezeptoren spielen an myenterischen Neuronen vom AH-Typ eine wichtige Rolle bei der Entstehung der langsamen Nachhyperpolarisation, die

einem Aktionspotential an diesem Neuronentyp folgt. An myenterischen Neuronen des Meerschweinchens ist gezeigt worden, dass diese Nachhyperpolarisation mit einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verbunden ist. Hemmung von Ryanodinrezeptoren verringert stark sowohl die Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration als auch die Hyperpolarisation der Membran nach einem Aktionspotential (Hillsley et al. 2000).

Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass Butyrat auch unter physiologischen Bedingungen Einfluss auf die Erregbarkeit von enterischen Neuronen nehmen kann, zumindest in solchen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts, in denen hohe Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren vorliegen. Das sind das Kolon, das Caecum und in einem geringeren Grad auch das Ileum. Die genaue Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren innerhalb der intestinalen Wand ist nicht bekannt. Jedoch ist unter pathophysiologischen Bedingungen gezeigt worden, dass die luminale Konzentration dieser Fermentationsstoffwechselprodukte sich verändert. Eine Abnahme der Konzentration ist in den Faeces von Patienten mit Colitis ulcerosa (Vernia et al. 1988) oder während einer osmotischen Diarrhoe gezeigt worden, die durch Gabe von Laktulose verursacht wurde (Holtug et al. 1992). Ähnliches gilt für die frühe Phase von akuten wässrigen Diarrhöen (Ramakrishna et al. 1993). Somit ist es gut möglich, dass die Änderung in den lokalen Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren die Funktion der enterischen Neurone unter diesen Bedingungen ändern könnte. Ein Ausstrom von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, den kurzkettige Fettsäuren verursachen, kann über Stimulation von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen eine Membranhyperpolarisation auslösen (Abb. 28), was dann die Frequenz der Aktionspotentialerzeugung herabsetzen würde.

Interessant ist, dass die Stimulation einer intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung nicht auf enterische Neurone im Magen-Darm-Trakt beschränkt ist. Auch an einer Epithelzelllinie des Kolons, den HT29-Zellen, konnte mit kurzkettigen Fettsäuren (wie Azetat) gezeigt werden, dass sie eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern auslösen, und zwar ohne dass dabei eine Änderung im IP_3 -Gehalt der Zellen stattfindet (Nitschke et al. 1997). In der folgenden Abbildung (Abb. 48) wird gezeigt, dass die kurzkettigen Fettsäuren als eine Art Bremse auf das enterische Nervensystem wirken können. Durch die Aufnahme von Butyrat in die Zelle sinkt der pH-Wert (Haschke et al. 2002), was den Na^+ -Einwärtstrom hemmt. Die Experimente, die ich durchgeführt habe, zeigen, dass Butyrat eine Freisetzung von Ca^{2+} aus Ca^{2+} -Speichern über Ryanodinre-

zeptoren verursacht, welche durch Ruthenium Rot und hohe Konzentrationen von Ryanodin blockiert werden können. Diese Freisetzung von Ca^{2+} führt zur Öffnung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen, die durch einen spezifischen Blocker (Charybdotoxin) blockiert werden. Letztliche Folge ist eine Änderung des Membranpotentials der Neurone.

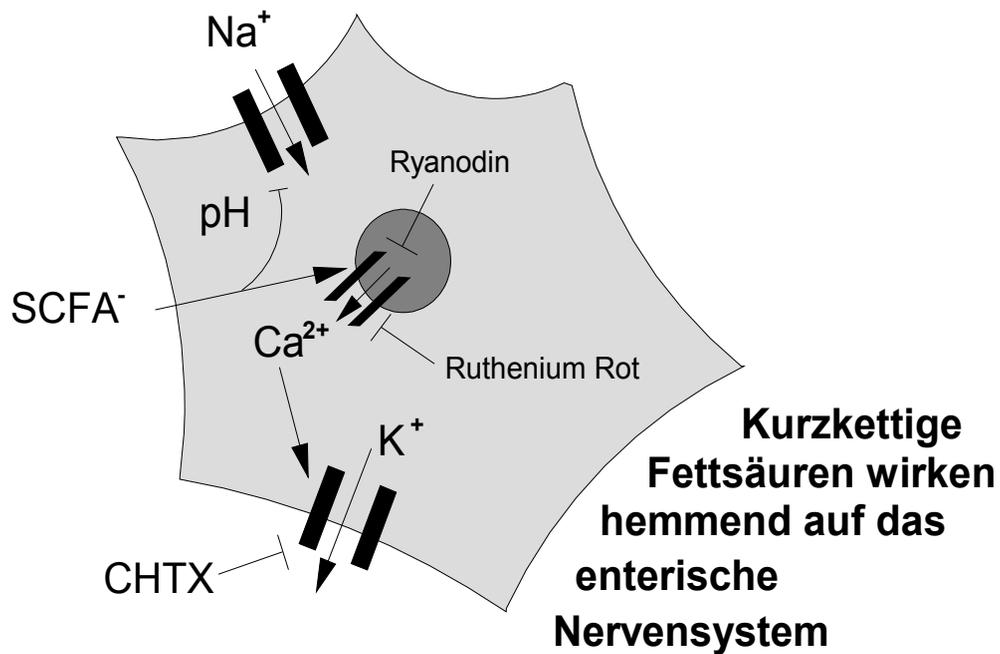


Abb. 48.: Modell zur Wirkung von Butyrat an myenterischen Neuronen (CHTX: Charybdotoxin; SCFA: Kurzkettige Fettsäuren).

V. Zusammenfassung

Kurzkettige Fettsäuren, die durch die bakterielle Fermentation von Kohlenhydraten produziert werden, sind in hohen Konzentrationen innerhalb des Kolonlumens anwesend. Es ist gezeigt worden, dass sie die Erregbarkeit von enterischen Neuronen ändern. Die vorliegende Untersuchung sollte die Änderungen des Membranpotentials an myenterischen Neuronen durch Butyrat näher charakterisieren und die beteiligten Signalwege klären. Myenterische Neurone von 4 - 10 Tage alten Ratten wurden aus dem Dünndarm durch eine enzymatische Verdauung mit Kollagenase isoliert. Einzelne Zellen und/oder vereinzelt Ganglien wurden aufgesammelt und für 1 Woche in Kultur gehalten. Nach 2 bis 5 Tagen in Kultur wurde das Membranpotential mit der Whole-Cell Patch-Clamp-Technik und die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration mit der Fura-2 Methode gemessen. Butyrat ($10 - 100 \text{ mmol l}^{-1}$) verursachte eine reversible und konzentrationsabhängige Hyperpolarisation der Membran. Diese Hyperpolarisation wurde durch Charybdotoxin ($10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$), einen spezifischen Blocker von Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanälen, unterdrückt. Die Butyrat-induzierte Hyperpolarisation war resistent gegen Blockade der Phospholipase C durch U-73122 ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) oder Blockade von IP_3 -Rezeptoren mittels Heparin ($6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$). Im Gegensatz hierzu konnte Ruthenium Rot ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), ein Blocker des Ryanodinrezeptors, die durch Butyrat induzierte Hyperpolarisation der Membran sowie die Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration erheblich verringern. In Gegenwart von Ryanodin ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) induzierte Butyrat keinen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mehr, sondern im Gegenteil sank das Fura-2-Signal. Auch in mit Saponin ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) permeabilisierten Neuronen war Butyrat immer noch in der Lage eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern anzuregen. Somit kann eine direkte Wirkung der kurzkettigen Fettsäure an den Ca^{2+} -Speichern ohne Vermittlung eines löslichen intrazellulären second messengers postuliert werden.

VI. Summary

Short-chain fatty acids produced by the bacterial fermentation of carbohydrates are present in high concentrations within the colonic lumen and have been shown to alter the excitability of enteric neurons. The present study was designed to investigate the mechanisms of butyrate-induced changes in membrane potential of myenteric neurons. Myenteric neurons from 4 - 10 day old rats were isolated from the small intestine by an enzymatic digestion with collagenase and kept in culture for up to 1 week. After 2 - 5 days in culture, membrane potential was measured with the whole-cell patch-clamp technique and the intracellular Ca^{2+} concentration was measured with the fura-2 method. The short-chain fatty acid butyrate ($10 - 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) induced a reversible and concentration-dependent hyperpolarization of the membrane with a half-maximal effect at $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. The hyperpolarization evoked by butyrate ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) was strongly inhibited by charybdotoxin ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), a specific blocker of Ca^{2+} -dependent K^{+} channels. The butyrate-induced hyperpolarization was resistant against blockade of phospholipase C by U-73122 ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), and resistant against inclusion of heparin ($6 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), an inositol-1,4,5-trisphosphate receptor antagonist, in the patch-pipette. In contrast, ruthenium red ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), an inhibitor of ryanodine receptors, significantly reduced both the hyperpolarization of the membrane as well as the increase in the intracellular Ca^{2+} concentration evoked by butyrate. In the presence of ryanodine ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) the increase in intracellular Ca^{2+} evoked by butyrate was completely suppressed. Even in neurons permeabilized with saponin ($10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), butyrate was able to stimulate a release of stored intracellular Ca^{2+} suggesting a direct action of the short-chain fatty acid at the stores without mediation of a soluble intracellular second messenger.

VII. Literaturverzeichnis

Anderson CS, MacKinnon R, Smith C, Miller C (1988). Charybdotoxin block of single Ca^{2+} -activated K^{+} channels. Effects of channel gating, voltage, and ionic strength. *J Gen Physiol* 91: 317 – 333.

Auerbach L (1862). Über einen Plexus gangliosis myogastricus. *39er Jahr-Bericht u Abh d. Schlesischen Gesellschaft f Vaterländ Cultur*: 103-104.

Berridge MJ, Irvine RF (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321.

Berridge MJ, Irvine RF (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205.

Bertrand PP, Kunze WAA, Bornstein JC, Furness JB, Smith ML (1997). Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 273: G422-G435.

Bridges RJ, Rack M, Rummel W, Schreiner J (1986). Mucosal plexus and electrolyte transport across the rat colonic mucosa. *J Physiol* 376: 531-542.

Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, Bird GSJ, Kurosaki T, Putney JW (2001). Role of the phospholipase C-inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 276: 15945–15952.

Brown DA, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 278: 1131-11319.

Bugaut M (1987). Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B* 86: 439-472.

Bultynck G, Sienaert I, Parys JB, Callewaert G, De Smedt H, Boens N, Dehaen W, Missiaen L (2003). Pharmacology of inositol trisphosphate receptors. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 445: 629-642.

Busche R, Dittmann J, Meyer zu Düttingdorf HD, Glockenthör U, von Engelhardt W, Sallmann HP (2002). Permeability properties of apical and basolateral membranes of the guinea pig caecal and colonic epithelia for short-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1565: 55-63.

Cherbut C, Aube AC, Blottiere HM, Pacaud P, Scarpignato C, Galmiche JP (1996). In vitro contractile effects of short chain fatty acids in the rat terminal ileum. *Gut* 38:53-58.

Cherbut C, Ferrier L, Roze C, Anini Y, Blottiere H, Lecannu G, Galmiche JP (1998). Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275: G1415-G1422.

Cole KS (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch Sci Physiol* 3: 253-258.

Cornado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan D (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 266: C1485-1504.

Cui M, Shen J, Briggs JM, Luo X, Tan X, Jiang H, Chen K, Ji R (2001). Brownian dynamics simulations of interaction between scorpion toxin Lq2 and potassium ion channel. *Biophys J* 80: 1659-1669.

Cui M, Shen J, Briggs JM, Fu W, Wu J, Zhang Y, Luo X, Chi Z, Ji R, Jiang H, Chen K (2002). Brownian dynamics simulations of the recognition of the scorpion toxin P05 with the small-conductance calcium-activated potassium channels *J Mol Biol* 318: 417–428.

Diener M, Peter A, Scharrer E (1994). The role of volume-sensitive Cl⁻ channels in the stimulation of chloride absorption by short-chain fatty acids in the rat colon. *Acta Physiol Scand* 151: 385-394.

Diener M, Vujicic Z, Scharrer E (1996). Neuronally mediated anion secretion induced by short-chain fatty acids in the rat distal small intestine. *Acta Physiol Scand* 157: 33-40.

Dogiel AS (1899). Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch Anat Physiol Anat Abt*: 130-158.

Dohgen M, Hayahshi H, Yajima T, Suzuki Y (1994). Stimulation of bicarbonate secretion by luminal short-chain fatty acid in the rat and human colon in vitro. *Jpn J Physiol* 44: 519-531.

Doughty JM, Plane F, Langton PD (1999). Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *Am J Physiol Heart Circul Physiol* 276: H1107-H1112.

Drasch O (1880). Beiträge zur Kenntnis des feineren Baues des Dünndarmes, insbesondere die Nerven desselben. *Sitz Ber Akad Wiss, Math Naturwiss Kl, Wien, Abt. III* 82: 168-198.

Engelhardt W, Gros G, Burmester M, Hansen K, Becker G, Rechkemmer G (1994). Functional role of bicarbonate in propionate transport across guinea pig isolated caecum and proximal colon. *J Physiol* 477: 365-371.

Flourie B, Phillips S, Richter H 3rd, Azpiroz F (1989). Cyclic motility in canine colon: responses to feeding and perfusion. *Dig Dis Sci.* 34: 1185-1192.

Franzini-Amstrong C, Protasi F (1997). Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev* 77: 699- 729.

Fu W, Cui M, Briggs JM, Huang X, Xiong B, Zhang Y, Luo X, Shen J, Ji R, Jiang H, Chen K (2002). Brownian dynamics simulations of the recognition of the scorpion toxin maurotoxin with the voltage-gated potassium ion channels. *Biophysical J* 83: 2370-2385.

Furness JB, Costa M (1987). The enteric nervous system, Churchill Livingstone. Edinburgh.

Garcia ML, Gao YD, McManus OB, Kaczorowski GJ (2001). Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39: 739-748.

Gerlach D (1985). Das Lichtmikroskop. 2. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart: 199-208.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺-indicators with improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 391: 85-100.

Hanner M, Vianna-Jorge R, Kamassah A, Schmalhofer WA, Knaus HG, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1998). The β -subunit of the high conductance calcium-activated potassium channel. *J Biol Chem* 273: 16289-16296.

Harig JM, Soergel KH, Barry JA, Ramaswamy K (1991). Transport of propionate by human ileal brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 260: G776-G782.

Harmer AR, Gallacher DV, Smith PM (2001). Role of Ins(1,4,5)P₃, cADP-ribose and nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in Ca²⁺ signalling in mouse submandibular acinar cells. *Biochem J* 353: 555-560.

Haschke G, Schäfer H, Diener M (2002). Effect of butyrate on membrane potential, ionic currents and intracellular Ca^{2+} concentration in cultured rat myenteric neurones. *Neurogastroenterol Mot* 14: 133-142.

Hillsley K, Kenyon JL, Smith TK (2000). Ryanodine-sensitive stores regulate the excitability of AH neurons in the myenteric plexus of guinea-pig ileum. *J Neurophysiol* 84: 2777-2785.

Hirst GDS, Holman ME, Spence I (1974). Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J Physiol* 236: 303-326.

Hodgkiss JP, Lees GM (1983). Morphological studies of electrophysiologically-identified myenteric plexus neurons of the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 8: 593-608.

Hodgkin AL, Huxley AF (1952a). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116: 449-472.

Hodgkin AL, Huxley AF (1952b). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116: 473-496.

Hodgkin AL, Huxley AF (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116: 497-506.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1949). Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch Sci Physiol* 3: 129-150

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1952). Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116: 424-448.

Holtug K, Clausen MR, Hove H, Christiansen J, Mortensen PB (1992). The colon in carbohydrate malabsorption: Short-chain fatty acids, pH and osmotic diarrhoea. *Scand J Gastroenterol* 27: 545-552.

Humerrickhouse RA, Besch HR, Gerzon K, Ruest L, Sutko JL, Emmick JT (1993). Differential activating and deactivating effects of natural ryanodine congeners on the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum: evidence for separation of effects at functionally distinct sites. *Mol Pharmacol* 44: 412-421.

Kang SH, Vanden Berghe P, Smith TK (2003). Ca^{2+} -activated Cl^{-} current in cultured myenteric neurons from murine proximal colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C839-C847.

Kellenberger E, Mer G, Kellenberger C, Marguerie G, Lefèvre JF (1999). Solution structure of a conformationally constrained Arg-Gly-Asp-like motif inserted into the a/b scaffold of leiurotoxin I. *Eur J Biochem* 260: 810-817.

Kettunen P, Krieger P, Hess D, El Manira A (2002). Signaling mechanisms of metabotropic glutamate receptor 5 subtype and its endogenous role in a locomotor network. *J Neurosci* 22: 1868-1873,

Kocks SL, Schultheiss G, Diener M (2002). Ryanodine receptors and the mediation of Ca^{2+} -dependent anion secretion across rat colon. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 445: 390-397.

Langmann G (1975). Vorkommen von Ganglienzellen im Schleimhautstroma von Colon, Sigma und Rektum. *Virchows Arch* 365A: 257-261.

Lee HC (1999). A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: cyclic ADP-ribose and NAADP. *Biol Chem* 380: 785-793.

Le Poul E, Loison C, Strufy S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq MW, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Detheux M (2003). Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem* 278: 23481-23489.

Leis HJ, Köfeler H, Raspotnig G, Zach D, Fauler G, Windischhofer W (2000). Effect of the aminosteroid U73122 on prostaglandin E₂ production in a murine clonal osteoblast like cell line, MC3T3-E1. *Biochem Pharmacol* 60: 899-904.

MacKinnon R, Miller C (1989). Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a-pore-blocking peptide inhibitor. *Science* 245: 1382-1385.

Mackinnon R, Heginbotham L, Abramson T (1990). Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibition. *Neuron*. 5: 767-771.

Marmont G (1949). Studies on the axon membrane. A new method. *J Comp Physiol* 34:351-382.

Meissner G (1857). Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med N F* 8: 364-366.

Meissner G (1986). Ryanodine activation and inhibition of the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261: 6300-6306.

Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.

Neunlist M, Dobрева G, Schemann M (1999). Characteristics of mucosally-projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *J Physiol* 517: 533-546.

Nishi S, North RA (1973). Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig. *J Physiol* 231: 471-491.

Nitschke R, Benning N, Ricken S, Leipziger J, Fischer KG, Greger R (1997). Effect of intracellular pH on agonist induced [Ca²⁺]_i transients in HT29 cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 434: 466-474.

Ozawa T (2001). Ryanodine-sensitive Ca release mechanism in non-excitabile cells. *Int J Mol Med* 7: 21-25.

Plaisancie P, Dumoulin V, Chayvialle JA, Cuber JC (1996). Luminal peptide YY-releasing factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *J Endocrinol* 151:421-429.

Pottosin II, Dobrovinskaya OR, Muñiz J (1999). Cooperative block of the plant endomembrane ion channel by ruthenium red. *Biophys J* 77: 1973-1979.

Ramakrishna BS, Mathan VI (1993). Colonic dysfunction in acute diarrhoea: the role of luminal short chain fatty acids. *Gut* 34: 1215-1218.

Reynolds DA, Rajendran VM, Binder HJ (1993). Bicarbonate-stimulated [¹⁴C]butyrate uptake in basolateral membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology* 105: 725-732.

Schäfer KH, Saffrey MJ, Burnstock G, Mestres-Ventura P (1997). A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract. *Brain Res Prot* 1: 109-113.

Schulz I (1990). Permeabilizing cells: some methods and applications for the study of intracellular processes. *Methods Enzymol* 192: 280-300.

Schroder O, Opritz J, Stein J (2000). Substrate and inhibitor specificity of butyrate uptake in apical membrane vesicles of the rat distal colon. *Digestion* 62: 152-158.

Sehested J, Diernæs L, Møller PD, Skadhauge E (1999). Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH. *Comp Biochem Physiol A* 123: 359-368.

Sellin JH, DeSoignie R (1990). Short-chain fatty acid absorption in rabbit colon in vitro. *Gastroenterology* 99: 676-683.

Sellin JH, DeSoignie R, Burlingame S (1993). Segmental differences in short-chain fatty acid transport in rabbit colon: Effect of pH and Na. *J Membr Biol* 136: 147-158.

Sellin JH (1999). SCFAs: The enigma of weak electrolyte transport in the colon. *News Physiol Sci* 14: 58-64.

Sorrentino V (1995). The ryanodine receptor family of intracellular calcium release channels. *Adv Pharmacol* 33: 67-90.

Squires PE, Rumsey RD, Edwards CA, Read NW (1992). Effect of short-chain fatty acids on contractile activity and fluid flow in rat colon in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 262:G813-G817.

Stein J, Schroder O, Milovic V, Caspary WF (1995). Mercaptopropionate inhibits butyrate uptake in isolated apical membrane vesicles of the rat distal colon. *Gastroenterology* 108: 673-679.

Sugg EE, Garcia ML, Reuben JP, Patchett AA, Kaczorowski GJ (1990). Synthesis and structural characterization of charybdotoxin, a potent peptidyl inhibitor of the high conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channel. *J Biol Chem* 265: 18745-18748.

Surprenant A (1994). Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. *Annu Rev Physiol* 56: 117-140.

Taylor CW, Broad LM (1998). Pharmacological analysis of intracellular Ca²⁺ signalling: problems and pitfalls. *Trend Physiol Sci* 19: 370-375.

Tyagi S, Venugopalakrishnan J, Ramaswamy K, Dudeja PK (2002). Mechanism of n-butyrate uptake in the human proximal colonic basolateral membranes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G676-G682.

Umesaki Y, Yajima T, Yokokura T, Mutai M (1979). Effect of organic acid absorption on bicarbonate transport in rat colon. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 379: 43-47.

Vernia P, Gnaedinger A, Hauck W, Breuer RI (1988). Organic anions and the diarrhea of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 33: 1353-1358.

Vogt S, Grosse R, Schultz G, Offermanns S (2003). Receptor-dependent rhoA activation in G₁₂/G₁₃-deficient cells: genetic evidence for an involvement of G_q/G₁₁. *J Biol Chem* 278: 28743-28749.

Wang YP, Xu H, Mizoguchi K, Oe M, Maeta H (2001). Intestinal ischemia induces late preconditioning against myocardial infarction: a role nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 49: 391-398.

Wood JD (1994). Physiology of the enteric nervous system. In: Johnson LR (ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*. Volume 1, 2nd ed., pp. 423-482. Raven press, New York.

Yajima T (1985). Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J Physiol* 368: 667-678.

Yajima T (1988). Luminal propionate-induced secretory response in the rat distal colon in vitro. *J Physiol* 403: 559-575.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich in irgendeiner Form unterstützt und so zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben. Eine besondere Anerkennung gebührt:

An erster Stelle **Herrn Prof. Dr. Martin Diener**, meinem immer freundlichen Betreuer, für die Überlassung des Themas, die intensive, sehr hilfsbereite und ausgesprochen kompetente Unterstützung, die intensive und mutige Hilfe bei der Ausarbeitung von Problemen, die meinem Aufenthalt und das Leben während der Doktorarbeit in Deutschland ermöglicht und angenehmer gemacht hat. Dies gilt sowohl für die praktische Versuchsdurchführung als auch alle Arbeiten am Computer und nicht zuletzt die Abfassung dieser Doktorarbeit.

An **Dr. Matthias Rehn**, der mich in Phasen der Entstehung der Doktorarbeit hervorragend unterstützt hat und für die Hilfestellung im Umgang mit der Versuchstechnik und mit dem Computer.

An **PD. Dr. Gerhard Schultheiß** für die ständige Unterstützung und Diskussionsbeiträge.

An **Dr. Guido Haschke** für die Freundlichkeit und Diskussionsbeiträge und die Geduld, die er mir bei der Präparation der Ratte entgegen gebracht hat.

Brigitta Brück, Eva-Maria Haas, Alice Metternich und Bärbel Schmidt für die freundliche und angenehme Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

An Michael Haas und Silke Handstein für die gute Pflege und Versorgung der Versuchstiere.

An Karl-Hermann Maurer für die Hilfsbereitschaft und Reparatur aller Versuchsmaterialien, an Karin Pfeiff für die Hilfe bei Problemen, die mit Bürokratie zu tun hatten.

An alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Physiologie für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

An meinem Onkel Hani und seine Familie, die mich während der Promotion in jeder Hinsicht liebevoll unterstützt haben.

An meine Eltern, die mich immer auf allen Wegen bedingungslos unterstützten, die ich erst durch Ihre Hilfe einschlagen konnte und dass sie mir eine Ausbildung in diesem Rahmen ermöglicht haben.

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

Giessen, den 08. Juni 2004

Salah Aldin Hamodeh

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
Email: vvb-ips@t-online.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-693-7



9 7 8 3 8 9 6 8 7 6 9 3 5