

Atypische cholinerge Agonisten am Kolonepithel

Inauguraldissertation
zur Erlangung eines Doktors der Medizin des
Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Moreno Bußhoff, Sarah Catalina
aus Heidelberg
Gießen 2019

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. W. Kummer

und dem

Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. M. Diener

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der Disputation: 15.01.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Das Kolon und sein Epithel.....	1
1.1.1 Bakterienflora und Fermentation.....	2
1.2 Das non-neuronale cholinerge System	2
1.2.1 Das non-neuronale cholinerge System im Kolon	3
1.3 Nervenale Regulation und cholinerge Rezeptoren im Kolon	5
1.3.1 Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren.....	6
1.3.2 Nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren	6
1.4 Der IP ₃ -Weg im Kolon.....	7
1.5 Fragestellung.....	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Versuchstiere.....	11
2.2 Elektrolytlösungen	11
2.2.1 Lösungen für die Ussing-Kammer-Messungen	11
2.2.2 Lösungen für die Krypten.....	12
2.2.3 Lösungen für das Ca ²⁺ -Imaging mittels Fura-2.....	12
2.3 Substanzen.....	13
2.4 Gewebepräparation	13
2.4.1 Präparation der Mucosa.....	13
2.4.2 Präparation der isolierten Krypten.....	14
2.5 Ussing-Kammer	15
2.6 Ca ²⁺ -Imaging	18
2.6.1 Fura-2.....	18
2.6.2 Versuchsaufbau und Datenerfassung.....	18
2.7 Desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS)	21
2.8 Statistik.....	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Nachweis des physiologischen Vorkommens der atypischen Cholinester.....	23
3.2 Ermittlung einer möglichen Desensitivierung am Mucosa-Präparat aus dem distalen Kolon für die cholinergen Agonisten Butyrylcholin und Propionylcholin	25
3.3 Konzentrationswirkungsbeziehung für Butyrylcholin und Propionylcholin.....	29
3.4 Wirkung von Butyrylcholin und Propionylcholin in chloridfreiem Puffer.....	32
3.5 Überprüfung neuronaler Beteiligung mittels Tetrodotoxin.....	33
3.6 Untersuchung der Wirkmechanismen von Butyrylcholin und Propionylcholin am Kolonepithel mit Hilfe von Ussing-Kammer-Versuchen	35
3.6.1 Hemmung der Wirkung von Butyrylcholin und Propionylcholin durch Atropin.....	35
3.6.2 Wirkung von Subtyp-spezifischen Muskarin-Rezeptorblockern	37
3.6.3 Wirkung von Hexamethonium am Mucosa-Präparat	42
3.6.4 Wirkung von Hexamethonium und Eserin am Mucosa-Präparat	43
3.6.5 Wirkung des IP ₃ -Rezeptor-Blockers 2-Aminoethoxydiphenylborat	45
3.6.6 Wirkung von Butyrylcholin in Ca ²⁺ -freiem Puffer	46
3.6.7 Wirkung des Calmodulin-Antagonisten Calmidazolium auf den Butyrylcholin-Peak.....	47
3.7 Versuche mittels Ca ²⁺ -Imaging	49

3.7.1 Wirkung von Butyrylcholin und Acetylcholin an isolierten Krypten.....	49
3.7.2 Dimethylphenylpiperazinium und Butyrylcholin an isolierten Krypten	50
4 Diskussion	53
4.1 Physiologisches Vorkommen von Butyrylcholin und Propionylcholin	53
4.1.1 Synthese und Abbau	54
4.2 Atypische Agonisten im non-neuronalen cholinergen System.....	55
4.2.1 Rezeptorwirkung.....	56
4.2.2 Intrazelluläre Signalkaskade	57
4.2.3 Rolle des intrazellulären Calciums	58
4.3 Co-Stimulation von muskarinergen und nikotinergen Acetylcholin- Rezeptoren.....	59
4.4 Fazit: Rolle der Agonisten am Kolonepithel der Ratte	60
4.5 Das non-neuronale cholinerge System	62
5 Zusammenfassung	64
6 Summary	65
7 Publikation	66
8 Verzeichnisse.....	67
8.1 Abbildungsverzeichnis	67
8.2 Tabellenverzeichnis	68
8.3 Literaturverzeichnis.....	69
9 Anhang	77
9.1 Forschungsförderung.....	77
9.2 Nutzungserlaubnisse	77
Erklärung	80
Danksagung.....	81

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
AM	Acetoxymethylester
ATP	Adenosin-3',5'-triphosphat
BCh	Butyrylcholin
BSA	Bovines Serumalbumin
BuChE	Butyrylcholinesterase
Butyryl-CoA	Butyryl-Coenzym A
CCD	Charge-coupled-device
ChAT	Cholinacetyltransferase
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CPA	Cyclopiazonsäure
DAG	Diacylglycerol
DMPP	Dimethylphenylpiperazinium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G _t	Gewebeleitfähigkeit
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptor
I _{sc}	Kurzschlussstrom
Kap.	Kapitel
K _d	Dissoziationskonstante
Kgluc	Kaliumgluconat
mAChR	Muskarinerger Acetylcholin-Rezeptor
N	Anzahl
nAChR	Nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
NaGluc	Natriumgluconat

OCT	Organischer Kationentransporter
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCh	Propionylcholin
Pd _t	Transepitheliale Potentialdifferenz
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Propionyl-CoA	Propionyl-Coenzym A
ROI	Messfeld (region of interest)
R _t	Gewebewiderstand
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Sarkoplasmatisches-endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
Vol/Vol	Volumenanteil (Volumen/Volumen)
Δ	Änderung eines Parameters

1 Einleitung

1.1 Das Kolon und sein Epithel

Im Säugetier gehört das Kolon zur letzten Passagestation der aufgenommenen Nahrung, die man nun - zerkleinert und enzymatisch zersetzt - Chymus nennt. Zur Aufrechterhaltung des inneren Milieus findet im Kolon die Resorption von Natriumchlorid und ca. 1 Liter Wasser täglich sowie die Sekretion und Resorption verschiedener anderer Elektrolyte statt. Durch die Symbiose mit Mikroorganismen („Darmflora“) können im Kolon zudem Kohlenhydrate und Proteine, die in vorherigen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes nicht vollständig enzymatisch verdaut wurden, bakteriell aufgeschlossen werden. Das Kolon dient darüber hinaus als vorübergehender Speicher, bevor die eingedickten Faeces in das Rektum weiter transportiert und schließlich durch den Anus kontrolliert ausgeschieden werden.

Das Epithel und seine Zellen sind, wie in vielen anderen Organen auch, maßgeblich an der Funktion des Kolons beteiligt. Diese *Lamina epithelialis mucosae* vervollständigt vereint mit der *Lamina propria mucosae* und der *Lamina muscularis mucosae* die *Tunica mucosa* (Schleimhaut). Von luminal aus betrachtet folgen der *Tunica mucosa* die *Tunica submucosa*, die *Tunica muscularis* und die *Tunica serosa*. Gemeinsam bilden sie die Darmwand.

Die Kolonschleimhaut unterscheidet sich von der des vorangehenden Dünndarms durch das Fehlen von Zotten. Allerdings münden, wie im Dünndarm, auch im Kolon tief ziehende Krypten (auch *Glandulae intestinales* genannt) am Oberflächenepithel. Oberflächen- und Kryptenepithel bestehen hauptsächlich aus hochprismatischen Enterozyten, die dank ihrer langen Mikrovilli effektiv Resorption, aber ebenso Sekretion betreiben. Neben den Enterozyten findet man in den Krypten vermehrt Becherzellen, welche Schleim produzieren, der wiederum die Weiterleitung des Darminhalts erleichtert. In der Tiefe der Krypten liegen die Stammzellen, die sich zu Enterozyten oder auch anderen Zelltypen wie etwa enteroendokrinen Zellen differenzieren und dabei an die Oberfläche wandern. Die verschiedenen Zellen der Familie der enteroendokrinen Zellen sezernieren unterschiedliche Hormone (meist Peptide), die u.a. die Funktion von Magen, Darm, Gallenwege und Pankreas beeinflussen.

1.1.1 Bakterienflora und Fermentation

Durch die mikrobielle Besiedlung des Säugetierkolons werden nicht nur Nahrungsbestandteile fermentiert, die zuvor nicht vollständig verdaut worden sind, sondern auch Substrate endogenen Ursprungs, wie z.B. abgeschilfertes Epithel. Hierbei deckt die Bakterienflora anaerob ihren eigenen Energiebedarf und versorgt über die Herstellung von kurzkettigen Fettsäuren ebenso das Kolonepithel mit Energie. Kurzkettige Fettsäuren haben eine Kettenlänge von ein bis sechs C-Atomen (Bugaut 1987). Sie entstehen durch bakterielle Fermentation von Strukturkohlenhydraten wie etwa Cellulose im Kolonlumen, da Säugetiere keine körpereigenen Enzyme zur Spaltung von β -glykosidischen Bindungen aufweisen. Dabei fallen in der Kolonflüssigkeit über den Abbau von Kohlenhydraten ca. $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ an kurzkettigen Fettsäuren an (Bugaut 1987), davon machen ca. 60 % Acetat, 20 % Propionat und 20 % Butyrat aus (Binder 2010). Selbstverständlich sind die jeweiligen Anteile von der Nahrungsaufnahme abhängig (Bugaut 1987). Kurzkettige Fettsäuren sind wichtige Energielieferanten (Livesey und Elia, 1995), stimulieren im Darm eine Vasodilatation (Knock et al., 2002), die Kontraktion der glatten Muskulatur (Yajima 1985, Mitsui et al. 2005), die Peristaltik (Grider und Piland, 2007) und die Chlorid-Sekretion (Sakata und Setoyama 1995).

1.2 Das non-neuronale cholinerge System

Obwohl ACh schon früh im Mutterkorn entdeckt wurde (Ewins 1914), galt lange Zeit ACh lediglich als Neurotransmitter forschungswürdig. Spätestens als ACh aber auch in einzelligen (Bayer und Wense 1936), in Pflanzen (Hartmann und Kilbinger 1974) und in der menschlichen Plazenta (Comline 1946) nachgewiesen werden konnte, wurde das Interesse geweckt, die Rolle von ACh in anderen Zellen zu untersuchen. Heute ist allgemein akzeptiert, dass ACh auch non-neuronalen Ursprungs sein kann. ACh wird somit auch von anderen Zellen als Neuronen synthetisiert, gespeichert und freigesetzt, und das nicht nur in Säugern, sondern auch von Bakterien, Pilzen, Schwämmen, Algen und wirbellosen Tieren (Wessler et al. 1999, Horiuchi et al. 2003, Kawashima et al. 2007).

Tab. 1.1 Das non-neuronale cholinerge System (eine Auswahl der beteiligten Organe)

	Organ	Zelle	Funktion
Mensch	Harnblase	Urothelzellen (Lips et al. 2007b)	Kontraktilität?
Maus	Respirationstrakt	Epithelzellen (u.a. Bürstenzellen)	Immunität (Kummer et al. 2014)
Mensch	Haut	Keratinocyten, Endothelzellen und Immunzellen (Grando 2006, Kurzen et al. 2007)	Immunität, Keratinocyten -Proliferation, -Differenzierung, -Adhäsion und -Migration, Pigment- und Schweißproduktion u.a.
Mensch, Ratte u.a.	Blut	Lymphocyten	Immunität (Fujii et al. 2001)
Mensch, Ratte	Kolon u.a.	Kolonepithel (Klapproth et al. 1997, Bader et al. 2014)	Sekretion?

Am Rattenkolon konnte gezeigt werden, dass die Kolonepithelzellen alle Voraussetzungen erfüllen, um Synthese, Freisetzung, Signalvermittlung, Abbau und Recycling von ACh zu betreiben. Neben den muskarinergen Rezeptoren werden auch nikotinerge Rezeptoren beschrieben, welche an der Regulation des Ionentransports beteiligt sind (Bader und Diener 2015).

1.2.1 Das non-neuronale cholinerge System im Kolon

Die Cholinacetyltransferase (ChAT), das Schlüsselenzym für die Produktion von Acetylcholin, wurde u.a. in den Epithelzellen des menschlichen Dün- und Dickdarms (Klapproth et al. 1997) entdeckt, sodass man davon ausgehen kann, dass diese wie auch in den Neuronen die Synthese von ACh aus der kurzkettigen Fettsäure Acetyl-CoA und Cholin katalysiert. Intaktes ACh wurde auch im Kolonepithel selbst nachgewiesen (Yajima et al. 2011a).

In Herz- und Skelettmuskelzellen synthetisiert zudem die Carnitinacetyltransferase (CarAT) ACh (Tucek 1982, White und Wu 1973). Die CarAT befindet sich in der Mitochondrienmembran und ist Teil eines Transportsystems, das der Einschleusung von Fettsäuren in die Mitochondrien dient. Das non-neuronale ACh kann demnach durch zwei

Enzyme synthetisiert werden (Lips et al. 2007b). Am Kolon der Ratte wird die CarAT zwar exprimiert, scheint aber im Gegensatz zur ChAT hier keine Bedeutung für die Acetylcholinsynthese zu haben (Bader et al. 2014).

Im Mitochondrium werden die Fettsäuren in der β -Oxidation zur Energiegewinnung zu AcetylCoA abgebaut. Über den Citrat-Shuttle bzw. Citrat-Malat-Pyruvat-Zyklus gelangt das AcetylCoA vom Mitochondrium ins Zytosol. Cholin gelangt über die Nahrung in den Körper (z.B. aus cholinhaltigen Phospholipiden) und kann über einen Na^+ -Cholin-Symporter in die Zelle aufgenommen werden.

Durch die Acetylcholinesterase kann ACh z.B. nach Bindung an seine Rezeptoren wieder in Cholin und Acetat hydrolytisch gespalten werden. Dieses Enzym ist schon bei geringen ACh-Konzentrationen aktiv und kommt zwar hauptsächlich in cholinergen Nervenfasern und Synapsen vor, wurde aber auch schon in non-neuronalen Zellen nachgewiesen. Neben der Acetylcholinesterase baut bei hohem Substratangebot auch die Butyrylcholinesterase ("Pseudocholinesterase") ACh ab; dieses Enzym wurde u.a. in Blut und Lunge nachgewiesen (Wessler et al. 1998).

Beide Cholinesterasen werden von der Mucosa verschiedener Darmabschnitte exprimiert (Sine et al. 1988), was für das Rattenkolon bestätigt werden konnte (Bader et al. 2014).

Man geht davon aus, dass in non-neuronalen Zellen ACh nicht in Vesikeln gespeichert und nicht in Form von „Quanten“, also festen „Paketgrößen“, freigesetzt wird. Lips et al. fanden heraus, dass organische Kationentransporter (OCT1-2) hierbei eine Rolle spielen können (Lips et al. 2005). Diese polyspezifischen Transporter, die nicht nur für Kationen, sondern auch für schwache Basen und z.T. auch neutrale Moleküle die erleichterte Diffusion vermitteln (Koepsell 2013), werden in vielen non-neuronalen Zellen exprimiert (Koepsell et al. 2007). Auch am Kolon der Ratte wurden sie nachgewiesen (Bader et al. 2014) und ihnen eine signifikante Funktion bei der Acetylcholin-Freisetzung nach einem Stimulus zugesprochen. Speziell der humane OCTN1-Transporter, scheint für die Acetylcholin-Freisetzung verantwortlich zu sein. Daten von Pochini et al. weisen darauf hin, dass seine Beteiligung am nicht-neuronalen Acetylcholin-System für die Pathogenese von Morbus Crohn relevant sein könnte (Pochini et al. 2012). Daneben geht man am Kolonepithel auch von einer basalen Freisetzung aus, welche aber durch ein anderes Transportsystem vermittelt werden muss (Bader 2014). Abb. 1.2 zeigt den angenommenen Synthesezyklus von ACh im Kolon der Ratte.

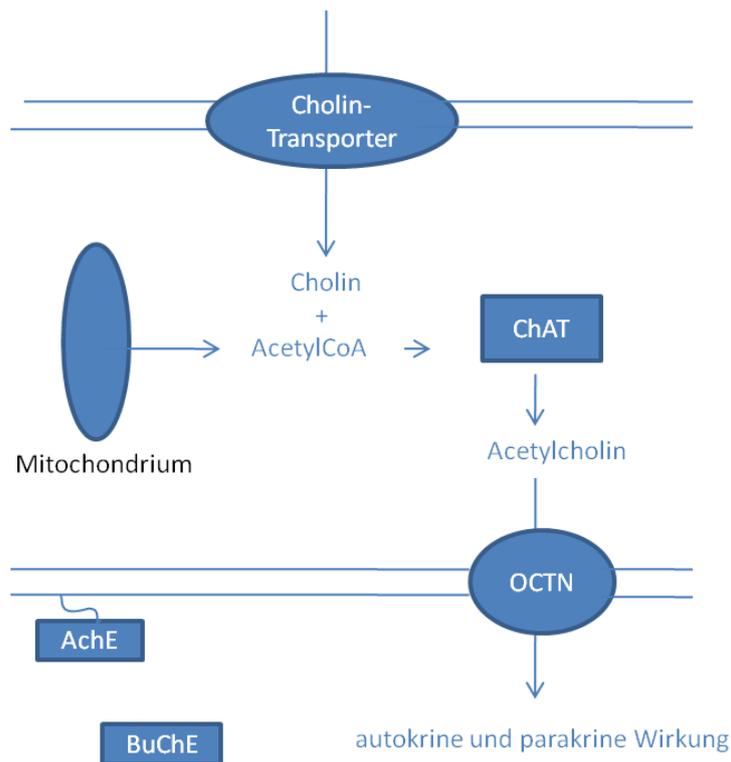


Abb. 1.1 Syntheszyklus des non-neuronalen Acetylcholins

Es wurde gezeigt, dass Propionat, also eine kurzkettige Fettsäure, die bei der Fermentation von Strukturkohlenhydraten physiologischerweise im Kolonlumen entsteht, eine Freisetzung von ACh nach basolateral auslöst (Yajima et al. 20011a). Die daraus folgende Chlorid-Sekretion war unbeeinflussbar durch das Neurotoxin Tetrodotoxin, jedoch hemmbar durch Atropin, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das freigesetzte ACh aus dem Kolonepithel stammt (Yajima et al. 20011a).

1.3 Nervale Regulation und cholinerge Rezeptoren im Kolon

Der Verdauungstrakt hat sein eigenes enterisches Nervensystem, bestehend aus dem *Plexus submucosus* und dem *Plexus myentericus*. Der *Plexus submucosus* befindet sich in der *Tunica submucosa* und der *Plexus myentericus* zwischen der Längs- und Ringmuskelschicht der *Tunica muscularis*. Das enterische Nervensystem ist Teil des vegetativen Nervensystems und wird über den Sympathikus und den Parasympathikus moduliert. Bei der Signalübertragung zwischen den Neuronen wird u.a. ACh als Transmitter eingesetzt. Da nun beobachtet wurde, dass im Kolon ACh auch non-neuronal anfällt, können die entsprechenden Rezeptoren folglich auch durch ACh aus non-neuronalen Quellen

stimuliert werden. Die Acetylcholin-Rezeptoren werden in zwei Klassen membrangebundener Proteine kategorisiert: Die Klasse der metabotropen muskarinergen und die Klasse der in der Regel als ionotrope Rezeptoren fungierenden nikotineren Acetylcholinrezeptoren (Starke 2001).

1.3.1 Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren

Muskarinische ACh-Rezeptoren sind benannt nach ihrem spezifischen Agonisten Muskarin, einem Pilzgift. Bindet ACh an diesen Rezeptor, wird ein G-Protein an der Innenseite der Membran aktiviert, sodass es sich hier um einen metabotropen Rezeptor handelt. Es werden beim Säuger fünf Subtypen von Muskarinrezeptoren unterscheiden, die alle durch Atropin (Antagonist) gehemmt werden. Sie unterscheiden sich in ihren Wirkungen, wobei sie nach Stimulation mindestens zwei unterschiedliche Second-Messenger-Pfade auslösen: Stimulierte M1-, M3- und M5-Rezeptoren aktivieren den intrazellulären IP₃-(Inositol-1,4,5-trisphosphat) Weg, stimulierte M2- und M4-Rezeptoren führen zu einer Hemmung der Adenylatcyclase.

M3- und M1-Rezeptoren befinden sich am Kolonepithel (Haberberger et al. 2006). Bader (2014) zeigte, dass Propionylcholin wie auch Butyrylcholin eine Chlorid-Sekretion auslösen – ähnlich wie auch ACh, sodass diese Substanzen vielleicht auch die Darmmotilität sowie die Sekretions- und Resorptionsleistung des Darms beeinflussen könnten. Ob Agonisten wie Butyrylcholin und Propionylcholin ebenso physiologisch non-neuronal im Darm anfallen, muss noch gezeigt werden und ist Teil der Fragestellung dieser Arbeit.

1.3.2 Nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren

Nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle. Sie sind nach ihrem Agonisten Nikotin benannt. Diese Gruppe von Rezeptoren kann je nach Expressionsort in den muskulären und den neuronalen Typ unterteilt werden (Schuller 2009), wobei der neuronale Typ aber auch in nicht-neuronalem Gewebe vorkommt. Bei der Bindung eines Agonisten kommt es zu einer Konformationsänderung des nikotineren Acetylcholin-Rezeptors vom aktivierbaren, geschlossenen in den aktiven, geöffneten Zustand, sodass er für Kationen durchlässig wird. Strömen auf diesem Wege Kationen (wie Na⁺ oder Ca²⁺) in die Zelle ein, wird zum einen die Zelle depolarisiert und zum anderen werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, die z.B. zur Freisetzung von Transmittern (Wonnacott 1997) führen.

1.4 Der IP₃-Weg im Kolon

Da man weiß, dass in der Darmwand hauptsächlich die M1- und M3-Rezeptoren für die Sekretion verantwortlich sind (Haberberger et al. 2006), wird sich im Folgenden nur auf die Erläuterung des IP₃-Wegs beschränkt (Abb.1.3).

Bindet der Ligand am M1-, M3- oder M5-Rezeptor, wird über die α -Untereinheit des membranständigen G-Proteins die Phospholipase C aktiviert. Die Phospholipase C katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). DAG aktiviert die Proteinkinase C, die je nach Zelltyp verschiedene zelluläre Antworten vermittelt. IP₃ gelangt über Diffusion zum Endoplasmatischen Retikulum und löst dort über IP₃-Rezeptoren vermittelt die Freisetzung von Calciumionen ins Zytosol aus. Subtypen des IP₃-aktivierten Ca²⁺-Kanals sind auch in der Kernmembran nachgewiesen worden (Siefjediers et al. 2007). Die Entleerung der intrazellulären Speicher ruft zeitversetzt die Aktivierung speichergesteuerter Kationenkanäle in der Plasmamembran hervor, so dass über diesen sogenannten kapazitiven Calciumstrom auch von extrazellulär Ca²⁺ in die Zelle strömen kann (Onodera et al. 2013).

Die erhöhte Calciumkonzentration bewirkt eine Aktivierung von Ca²⁺-abhängigen

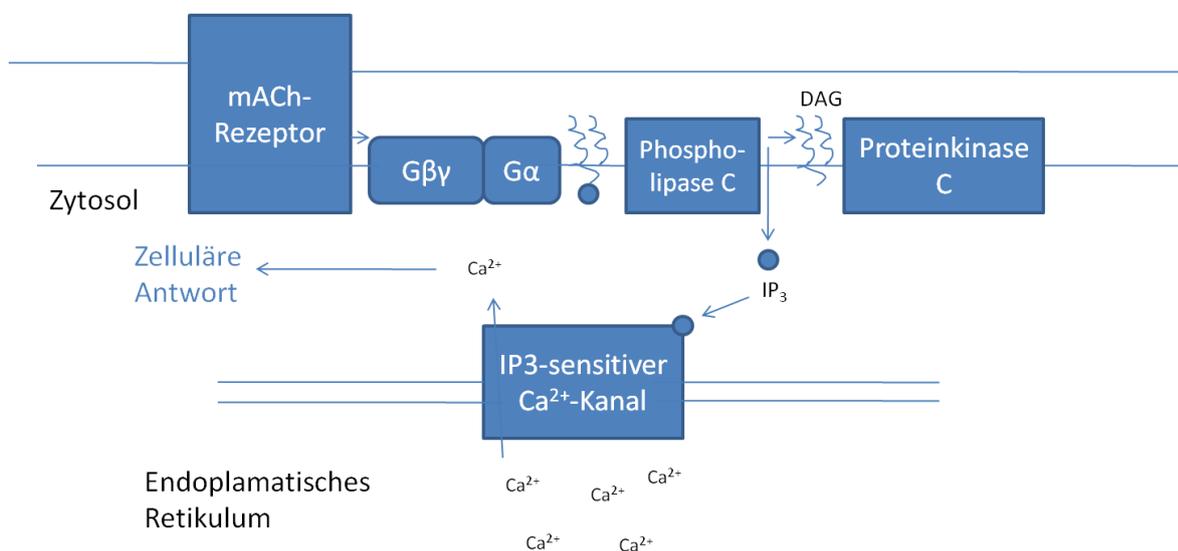


Abb. 1.2 Signalkaskade M1-, M3- und M5-Rezeptoren

Kaliumkanälen. Kaliumionen verlassen die Zelle; es folgt eine Hyperpolarisation der Membran, sodass der apikale Chloridausstrom durch Erhöhung der Triebkraft für den Anionenefflux verstärkt wird.

Netto gesehen sezerniert das Kolonepithel NaCl und KCl in das Lumen. Die basolaterale Na⁺-K⁺-ATPase transportiert zwei Kalium-Ionen im Austausch gegen drei Natrium-Ionen ins Zellinnere. Dadurch entsteht ein Konzentrationsgradient für Na⁺, der dem sekundär aktiven Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter (NKCC1) als Antriebskraft dient (Barrett und Keely 2000). Natrium, Kalium und Chlorid strömen in die Zelle bis die Chlorid-Konzentration über ihr elektrochemisches Gleichgewicht gestiegen ist. Werden neben den bereits geöffneten Kaliumkanälen weitere Kaliumkanäle über den Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration aktiviert, resultiert eine erhöhte Cl⁻-Sekretion. Außerdem öffnen sich kurzfristig Ca²⁺-abhängige Cl⁻-Kanäle (Hennig et al. 2008). Den Cl⁻-Ionen folgen parazellulär Na⁺-Ionen und K⁺-Ionen. Die Elektrolyte wiederum werden osmotisch von Wasser in das Darmlumen begleitet. Gerät dieser Mechanismus aufgrund einer fehlenden Resorption von Elektrolyten oder einer erhöhten Sekretion von Elektrolyten aus dem Gleichgewicht, so kommt es z.B. bei einer Hypersekretion zu Diarrhö.

1.5 Fragestellung

ACh, das in den Epithelzellen über die Cholintransferase (ChAT) aus Cholin und Acetyl-CoA synthetisiert wird (Wu und Hersh 1994), induziert eine Cl⁻-Sekretion. Die Cl⁻-Sekretion kann in der Ussing-Kammer als Anstieg des so genannten Kurzschlussstroms (I_{sc}) sichtbar gemacht werden (Bader 2014). Die ChAT ist zwar hochaffin für Cholin, arbeitet aber auch mit anderen Acylgruppen. Am Gehirn der Ratte wurde beispielsweise gezeigt, dass die ChAT gleichaffin für Acetyl-CoA, Propionyl-CoA und Butyryl-CoA ist (Rossier 1977).

Da das Kolonepithel durch die bakterielle Fermentation von Strukturkohlenhydraten hohen Konzentration (Gesamtkonzentration im Bereich von 100 mmol·l⁻¹) an verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren ausgesetzt ist (Binder 2010) und damit die ChAT, die v.a. im Oberflächenepithel exprimiert wird (Klapproth et al. 1997, Bader et al. 2014), permanent auch großen Mengen an Propionat und Butyrat exponiert ist, stellen sich folgende Fragen:

- Werden Butyrylcholin und Propionylcholin physiologisch im Kolon gebildet?
- Beeinflussen diese Ester den transepithelialen Ionentransport?
- Über welche Rezeptoren wirken Butyrylcholin und Propionylcholin im Kolonepithel?
- Welcher Signalweg wird durch Butyrylcholin ausgelöst?

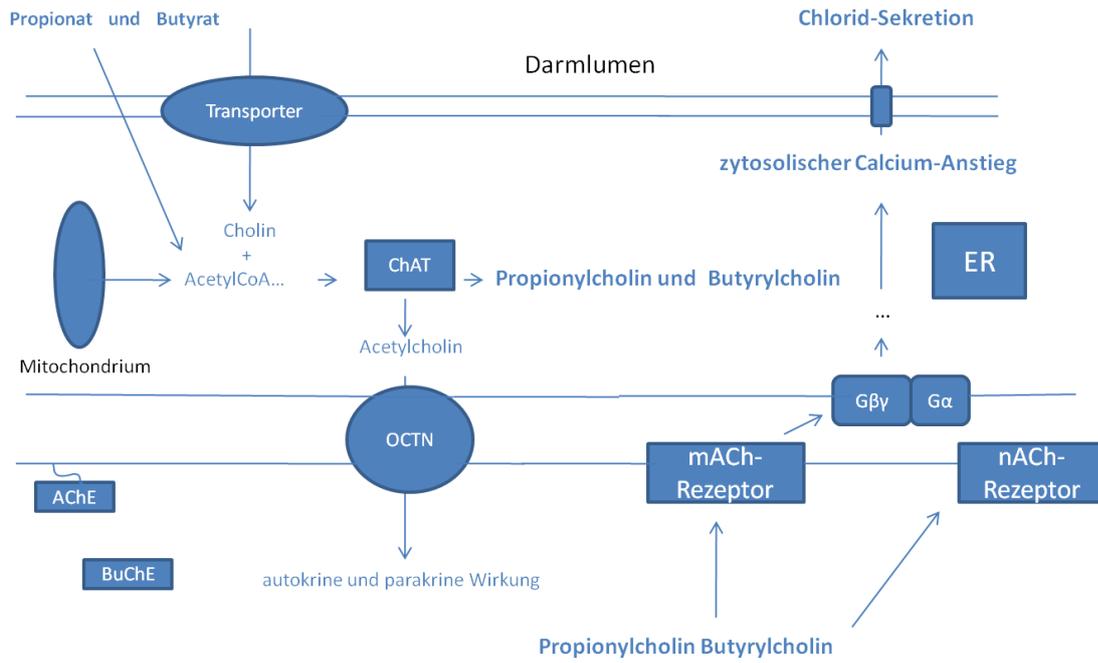


Abb. 1.3 Mögliche Wirkung von Butyrylcholin und Propionylcholin

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere, Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts, entstammten dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierbei wurden Ratten mit einem Gewicht von 150-200 g für die Ussing-Kammer-Versuche verwendet. Für die Experimente an isolierten Krypten sowie die DESI-Messungen wurden Tiere mit einer Körpermasse 100-180 g bzw. mit einem Alter von maximal neun Wochen verwendet. Standard-Zuchtfutter und Wasser stand den Ratten zuvor immer zur freien Verfügung. Die Tiere wurden nach Geschlechtern getrennt und in Kleingruppen in einem ganzjährig klimatisierten Raum bei 22,5 °C Raumtemperatur, bei 50-55 % relativer Luftfeuchtigkeit und unter einem 12-Stunden-hell-12-Stunden-dunkel-Regime gehalten.

Das Vorhaben der Tötung und anschließender Verwendung der Tiere im Rahmen des LOEWE-Schwerpunktes „Non-neuronale cholinerge Systeme“ wurde von Herrn Prof. Dr. Diener nach § 4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes gemeldet und von der Tierschutzbeauftragten Frau Dr. Peters am 18.10.2013 stattgegeben (Aktenzeichen 487_M).

2.2 Elektrolytlösungen

2.2.1 Lösungen für die Ussing-Kammer-Messungen

Die Kolonschleimhaut wurde in einer Bicarbonat-gepufferten Parsonslösung (Parson und Peterson 1965) inkubiert. Diese enthielt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 107; NaHCO_3 25; NaH_2PO_4 0,2; Na_2HPO_4 1,8; KCl 4,5; CaCl_2 1,25; MgSO_4 1; Glucose 12. Die Lösung wurde mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2 ; Vol/Vol) begast. Der pH-Wert wurde mit $\text{NaHCO}_3/\text{HCl}$ auf 7,4 eingestellt. Während des Versuchs wurde die Pufferlösung kontinuierlich mit Carbogen begast. Für die chloridfreie Parsonslösung wurde Chlorid äquimolar durch das impermeable Anion Gluconat (Gluc) ersetzt. Die Lösung enthielt somit (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): Natriumgluconat (NaGluc) 107; Kaliumgluconat (KGluc) 4,5; NaHCO_3 25; NaH_2PO_4 0,2; Na_2HPO_4 1,8; CaCl_2 1,25; MgSO_4 1; Glucose 12. Die Lösung wurde ebenfalls mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2 ; Vol/Vol) begast und der pH-Wert mit $\text{NaHCO}_3/\text{HCl}$ auf 7,4 eingestellt.

Bei der Herstellung des calciumfreien Puffers wurde auf die Zugabe von CaCl_2 verzichtet. Aufgrund einer dadurch sehr geringen Verringerung der Osmolalität wurde auf einen Ausgleich verzichtet.

2.2.2 Lösungen für die Krypten

Isolutionslösung

Die Isolutionslösung für die Kryptenpräparation aus dem distalen Kolon bestand in einer *Hanks balanced salt solution* (HBSS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , die $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure) enthielt. Die pH-Einstellung auf 7,4 erfolgte mit Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS) und HCl. Die Lösung wurde auf eine Temperatur von $38 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt.

Auffangtyrode

Die isolierten Krypten wurden anschließend in einer kaliumreichen, chloridarmen Tyrodelösung aufgefangen, die im Folgenden auch als Auffangtyrode bezeichnet wird (Böhme et al. 1991, Diener et al. 1991). Diese Lösung bestand aus (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): Kaliumgluconat (KGluc) 100; KCl 30; N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'(2-ethanolsulfonsäure (HEPES) 10; NaCl 20; MgCl_2 1; CaCl_2 1,25; Glucose 12,2; Natriumpyruvat 5 und BSA (bovines Serumalbumin) $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Der pH-Wert dieser Tyrode wurde mit KOH/HCl auf 7,4 titriert.

2.2.3 Lösungen für das Ca^{2+} - Imaging mittels Fura-2

Fura-2 AM-Lösung

1 mg Fura-2 AM (Fura-2-acetoxymethylester; Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) wurde in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. An jedem Versuchstag wurden dann der Auffangtyrode $3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fura-2 AM und das Detergenz Pluronic acid (Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) zugesetzt, um die Löslichkeit des Fura-2-AM zu verbessern.

Standard-Tyrodelösung

Die Standard-Tyrodelösung, die während der Calcium-Imaging-Versuche perfundiert wurde, enthielt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 140; KCl 5,4; CaCl_2 1; MgCl_2 1; HEPES 10 und Glucose 12,2. Der pH-Wert wurde mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

Bei der Herstellung des calciumfreien Puffers wurde auf CaCl_2 verzichtet.

2.3 Substanzen

Calmidazolium, Cyclopiazonsäure (Alexis, Grünberg, Deutschland), Darifenacin und J104129 (Langford, Großbritannien) wurden in DMSO (maximale DMSO-Konzentration $2,8 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$) gelöst. Tetrodotoxin war in $2\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Citratpuffer gelöst. Atropinsulfat, Butyrylcholin, Dimethylphenylpiperazinium, Eserin, Hexamethonium, Natriumpropionat, Pirenezepin und Telenzepin wurden in wässrigen Stammlösungen angesetzt. Sofern nicht anders angegeben, stammten die Substanzen von Sigma (Taufkirchen, Deutschland).

2.4 Gewebepräparation

2.4.1 Präparation der Mucosa

Die Ratten wurden durch einen Kopfschlag betäubt, anschließend wurde das Genick gebrochen und die Ratte durch einen Herzschnitt entblutet, sodass sie später der weiteren Verwertung als Tierfutter dienen konnten. Nach der Eröffnung der Bauchhöhle wurde das Kolon distal am Übergang zum Rektum, gekennzeichnet durch einen Lymphknoten (Lindström et al. 1979), und proximal am Übergang zum *Caecum* abgetrennt. Das nun freie Kolon wurde in eine eisgekühlte Carbogen-begaste Parsonslösung überführt und sein Lumen durch das Ausspülen mit Parsonslösung von den Faeces befreit. Dann wurde das Kolon auf einen Kunststoffstab (Durchmesser von 5 mm) gezogen, sodass die *Tunica serosa* und die *Tunica muscularis* nach einem circulären Schnitt am distalen Ende mit der Hand abgestreift werden konnten.

Danach wurde das Submucosa-Mucosa-Präparat in Längsrichtung aufgeschnitten. Das Gewebe wurde nun mit der mucosalen Seite nach oben flach auf einer eisgekühlten Glasplatte ausgebreitet und mit Parsonslösung umspült. Die Mucosa wurde mithilfe eines Objektträgers in Richtung proximales Kolonende von der Submucosa abpräpariert. Der Übergang vom distalen zum proximalen Kolon war an dessen Schleimhaut-Streifung erkennbar (Lindström et al. 1979). Hier wurde die Mucosa mit einem Skalpell abgetrennt.

2.4.2 Präparation der isolierten Krypten

Für die Isolation der Krypten wurde nur der distale Teil des Kolons verwendet. Nach der im Kapitel 2.4.1 beschriebenen Methode wurde ein Submucosa-Mucosa-Präparat hergestellt. Davon wurden ca. 3 cm mit Cyanacrylatkleber auf Plexiglashalter mit ovaler Aussparung geklebt (Schultheiss et al. 2002). Das Gewebe wurde nun je nach Gewicht und Geschlecht der Ratte für fünf bis zehn Minuten in einer Calcium-freien, EDTA-haltigen Isolationslösung (siehe Kapitel 2.2.2) bei 38°C unter Carbogenbegasung inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Halter in einem Vibromischer eingespannt und innerhalb der Auffangtyrode (siehe Kapitel 2.2.2) geschüttelt, sodass sich die Krypten (Abb. 2.1) von der Darmschleimhaut lösten. 30 µl der Kryptensuspension wurden mit einer Mikropipette aufgenommen und auf runde, mit Poly-L-Lysin (per Hand aufgetragen und trocknen gelassen) beschichtete Deckgläschen aufgebracht (Schultheiss et al. 2002), die dann mit der Auffangtyrode (100 µl) bedeckt wurden. Die Präparate konnten bis zu sechs Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden.

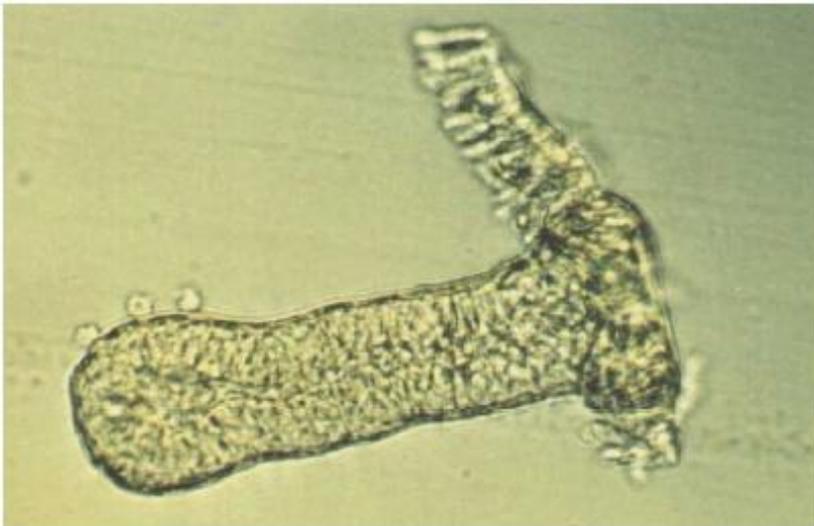


Abb. 2.1 Isolierte Krypte aus dem distalen Rattenkolon

(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

2.5 Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer dient zur Quantifizierung elektrogener Transportprozesse (Ussing und Zerahn 1951). Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten modifizierten Ussing-Kammern handelte es sich um zwei würfelförmige Plexiglashälften, die durch zwei Schrauben verbunden wurden. Das Mucosa-Präparat wurde auf spitze Metallstifte aufgespannt, die sich auf jeweils einer Seite der Kammer befanden, sodass nach dem Zusammenschrauben beider Kammerhälften das Kolongewebe die zwei mit Pufferlösung gefüllten Kompartimente trennte. Die Messoberfläche des Mucosa-Präparats betrug nach dem Einspannen 1 cm^2 . Die Kompartimente beiderseits des Gewebes fassten jeweils ein Volumen von 3,5 ml. Mit einem temperierten Wasserkreislauf wurde die Badlösung konstant auf 37 °C gehalten. An der Oberseite jeder Kammerhälfte befand sich eine Öffnung, sodass hierüber Lösungen ausgetauscht und Agonisten hinzugegeben werden konnten. Über zwei Gasfritten an der Unterseite der Kammerhälften wurde das Gewebe mit Carbogen versorgt, um den pH-Wert der Lösung konstant auf 7,4 zu halten (vgl. Abb. 2.2). Unter diesen Bedingungen können die epithelialen Funktionen mindestens sechs Stunden aufrecht gehalten werden. Innerhalb dieser Versuchszeit sind keine elektromikroskopischen Veränderungen der Gewebemorphologie zu erkennen (Diener et al. 1989b).

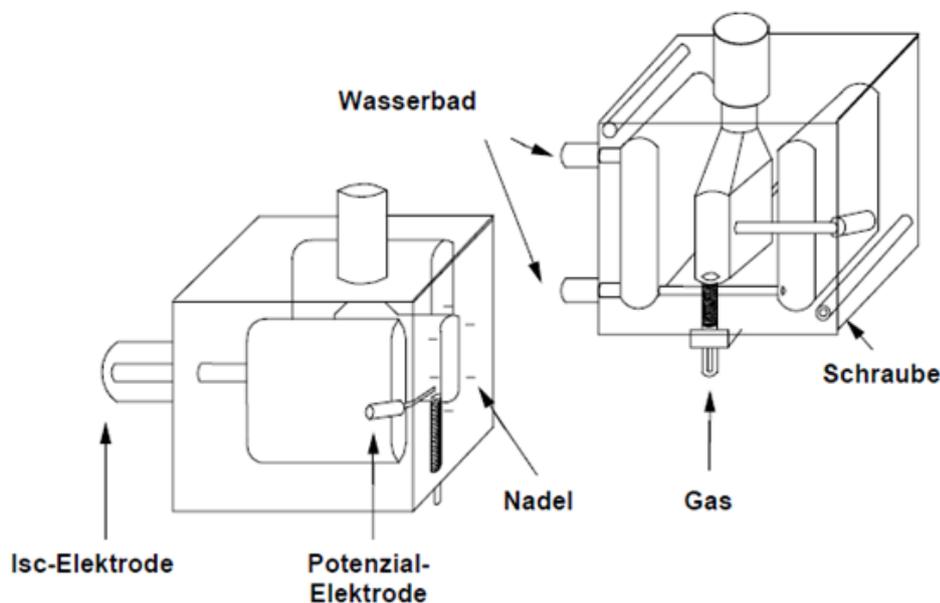


Abb. 2.2 Schema einer modifizierten Ussing-Kammer

(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

Für diese Arbeit wurde eine automatisierte Voltage-Clamp-Anlage mit dem Computer-Programm „WinClamp“ (Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen,

Deutschland) zur Erfassung der transepithelialen Potentialdifferenz und der Applikation des Kurzschlussstroms verwendet.

Die elektrischen Eigenschaften des Epithels können mit einem Ersatzschaltmodell beschrieben werden (Ussing und Zerahn 1951): Die Membranen der einzelnen Epithelzellen können als Kondensatoren und die einzelnen Kanäle mit durchfließenden Strömen als Widerstände übersetzt werden, die alle in Reihe geschaltet sind. An diesem Ersatzschaltbild wurde ein Schaltkreis aufgebaut. Mit „WinClamp“ konnte neben der transepithelialen Potentialdifferenz (Pd_t ; „t“ = Tissue) auch die Gewebeleitfähigkeit (G_t = Kehrwert des Widerstandes) und der Kurzschlussstrom (I_{sc}) erfasst bzw. (im Falle der Pd_t) auf bestimmte Werte eingestellt werden.

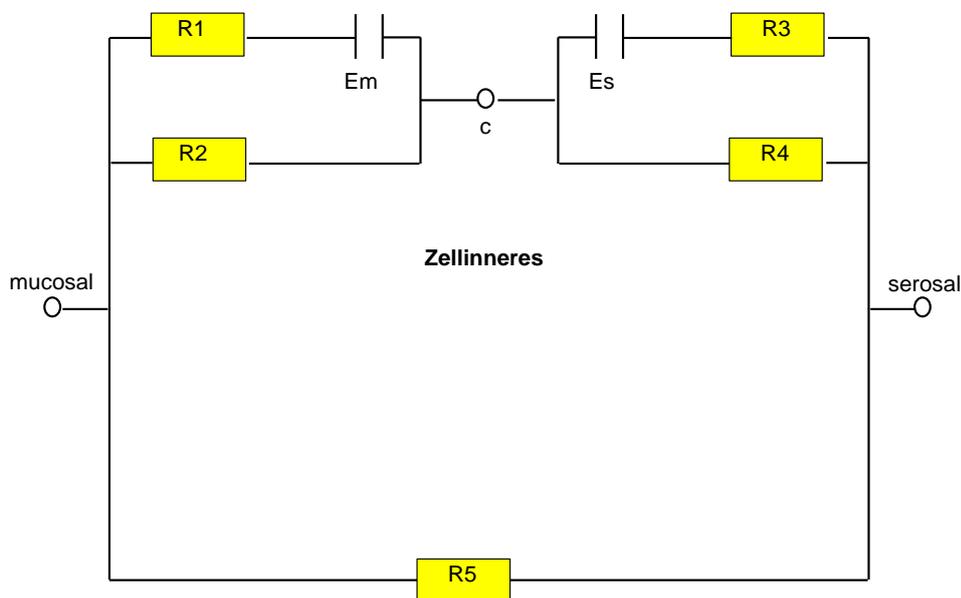


Abb. 2.3 Ersatzschaltkreismodell von Ussing und Zerahn (1951) für ein Epithel

(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener). R1 = Innenwiderstand der apikalen Stromquelle, R2 = Widerstand der apikalen Membran, R3 = Innenwiderstand der basolateralen Stromquelle, R4 = Widerstand der basolateralen Membran, R5 = parazellulärer Widerstand. E_m = Potential an der apikalen Membran, E_s = Potential an der basolateralen Membran.

Das eingespannte Kolongewebe sezerniert spontan insbesondere Cl^- - und Bikarbonat-Ionen (Strabel und Diener 1995), sodass eine Potentialdifferenz entsteht, bei der die serosale Seite gegenüber dem Lumen positiv geladen ist. Nachdem sich die Werte für Pd_t und Leitfähigkeit stabilisiert hatten, wurde das Gewebe dem Voltage-Clamp-Modus ausgesetzt. In dieser Einstellung konnte das transepitheliale Potential Pd_t durch Einspeisen eines Stroms auf definierte Werte eingestellt werden. Dadurch ließen sich die elektrophysiologischen Bedingungen für den Ionentransport verändern. Im Short-Circuit-Modus, eine Form des Voltage-Clamps, wurde das Pd_t auf 0 mV geklemmt. Der hierzu notwendige Strom wird als

Kurzschlussstrom (I_{sc}) bezeichnet, welcher somit der Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen an diesem Epithel entspricht. Unter diesen Bedingungen herrscht kein elektrischer Gradient und bei der Verwendung identischer Pufferlösung auf beiden Seiten der Kammer besteht auch kein chemischer Gradient für Ionenbewegungen durch das Gewebe.

Erfasst man unter diesen Bedingungen nun einen Nettotransport für ein Ion, handelt es sich um einen primär oder sekundär aktiven Transportvorgang. Ist der I_{sc} positiv, so kann man auf einen Netto-Anionentransport von der serosalen zur mucosalen Epithelseite schließen oder auf einen Netto-Kationentransport vice versa. Der I_{sc} wurde in $\mu\text{Equivalent}$ pro Stunde und pro cm^2 (mit $1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), also Ladungsverschiebungen eines einwertigen Ions pro Zeit und Gewebefläche, angegeben.

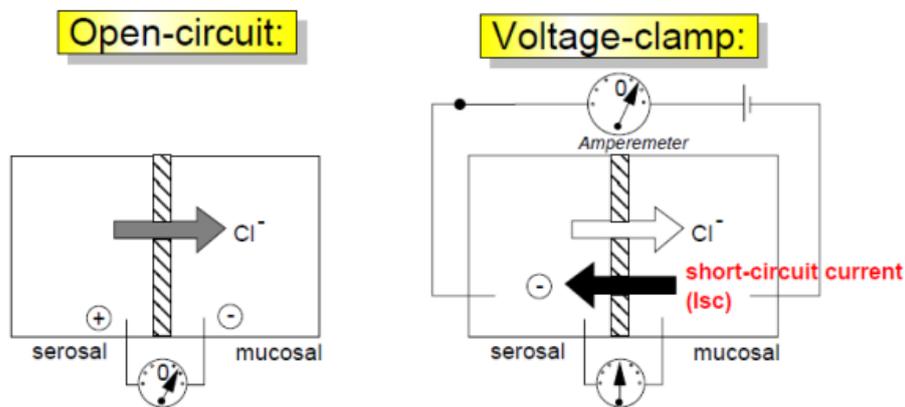


Abb. 2.4 Schaltbilder für (rechts) Open-circuit Modus und (links) Voltage-clamp Modus

(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

Am Ende des Versuchs wurden die Minutenwerte von I_{sc} und G_t ausgedruckt und die Daten zusätzlich in das Tabellen-Kalkulationsprogramm Excel exportiert.

Der Kurzschlussstrom unter basalen Versuchsbedingungen wird *Baseline* genannt. Diese wurde aus dem I_{sc} der letzten drei Minuten vor der Substanzzugabe gemittelt. Der höchste Wert nach Substanzzugabe wird als *Peak* bezeichnet und die Veränderung zwischen *Baseline* und *Peak* als ΔI_{sc} berechnet.

2.6 Ca²⁺-Imaging

2.6.1 Fura-2

Bei dieser Messmethode wurde eine Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration mit Hilfe eines selektiven Fluoreszenzfarbstoffes, dem Fura-2, gemessen. Bei seiner Grundstruktur handelt es sich um 1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA; Baylor und Hollingworth 2000). BAPTA stellt im Fura-2-Molekül den Ca²⁺-Chelatbildner dar. Die physiologische Ca²⁺-Konzentration unter Ruhebedingungen im Zytosol (ca. 100 nmol·l⁻¹) fällt in den optimalen Bereich (ca. 2 nmol·l⁻¹ bis ca. 20.000 nmol·l⁻¹) von Fura-2 mit der Dissoziationskonstante für Ca²⁺ von 224 nmol·l⁻¹.

Fura-2 ist allerdings stark negativ geladen, sodass es die Zellmembran per Diffusion nicht passieren kann. Somit wird der ungeladene, membrangängige Acetoxymethyl(AM)-Ester verwendet, um den Farbstoff in die Zelle zu schleusen. Der AM-Ester kann jedoch keine Ionen binden und zeigt auch keine Fluoreszenz. Innerhalb der Zelle wird der AM-Ester dann durch verschiedene unspezifische Esterasen in das aktive Fura-2 gespalten. Der aktive Fluoreszenzfarbstoff kann nach der Spaltung der Esterbindung die Zelle aufgrund seiner negativen Ladung jetzt nicht mehr verlassen, akkumuliert also intrazellulär (Tsien und Poenie 1986).

2.6.2 Versuchsaufbau und Datenerfassung

Das Ca²⁺-Imaging wurde an einem inversen Lichtmikroskop (Olympus IX-50, Olympus Optical, Tokyo, Japan) mit einem Epifluoreszenz-Setup und einer Imageanalyse Software (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Die Lichtquelle stellte eine Xenonlampe dar, deren Lichtwellen zunächst über einen Spiegel in den Lichtleiter und dann über einen dichromatischen Spiegel auf das Objekt geleitet wurden. Das Fura-2 wurde mit dem Licht der Wellenlänge 340 nm bzw. 380 nm angeregt, sodass die daraus resultierende Emission (gemessen bei 510 nm) den dichromatischen Spiegel passieren und über eine CCD-Kamera (*charge coupled device*; Till Photonics, Martinsried, Deutschland) aufgenommen werden konnte. Über den Computer konnten so in Form von sogenannten *live displays* die Veränderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration während der Versuche aufgezeichnet werden. Durch einen beweglichen Spiegel konnte das Licht zur Kamera oder zum Auge gelenkt werden.

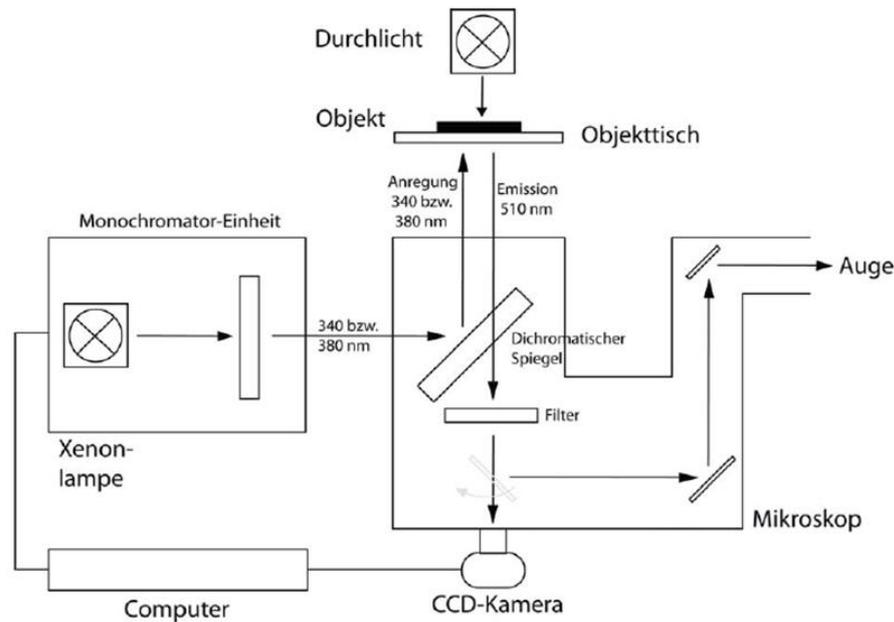


Abb. 2.5 Aufbau des Ca^{2+} -Imaging-Messtandes

(Verwendung der Skizze mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

Die Krypten wurden wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben isoliert und auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen fixiert. Danach wurden die Krypten mit der Fura-2-AM-Lösung für ein- bis anderthalb Stunden in Dunkelheit und bei Raumtemperatur aufgeladen. Nach der Inkubationszeit wurde überschüssiger Farbstoff, der nicht in die Zellen aufgenommen wurde, mit Auffangtyrode ausgespült und das Präparat in der gleichen Puffersubstanz wieder in Dunkelheit und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Messkammer bestand aus einer Metallplatte mit einer kreisrunden Aussparung (Durchmesser 1,8 cm) in der Mitte. Auf diese Aussparung wurde ein Deckgläschen mit den Krypten aufgelegt. Dann wurde ein Teflon-Ring mit einer Öffnung des gleichen Durchmessers auf die Metallplatte aufgesteckt und festgeschraubt. In den Teflon-Ring konnte 2 ml Flüssigkeit hinzugegeben werden. Die gesamte Vorrichtung wurde auf dem Objektstisch fixiert und an ein Perfusionssystem angeschlossen. Für den gesteuerten Zu- und Ablauf wurde die Schlauchpumpe (Typ 11OSC.G18.CH5B, Ole Dich Instrumentsmakres APS, Hvidovre, Dänemark) angeschlossen. Die Zu- und Ablaufschläuche wurden gegenüberliegend an etwa 2 cm hohen Teflon-Pins befestigt, sodass das Kammervolumen während der Perfusion konstant gehalten werden konnte. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug $250 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Durch ein 20x Objektiv wurde bei Durchlicht zügig nach einer geeigneten Krypte auf dem eingespannten Plättchen gesucht und diese dann in die Mitte des Blickfeldes gebracht.

Davon wurde mit der Imaging-Software ein *snap shot* erstellt, der auf dem Computerbildschirm in Falschfarben zu sehen war. Anhand dieser Darstellung wurden einzelne Zellen manuell als Messbereich (ROI = *region of interest*) festgelegt. Außerdem wurde für jede Messung ein ROI außerhalb der Krypte als Leerwertmessbereich aufgezeichnet.

Zu Beginn des Versuches wurde das Gewebe mit Standard-Tyrode-Lösung perfundiert und einige Minuten lang eine *Baseline* aufgenommen. Nachdem sich das Fluoreszenz-Signal stabilisiert hatte, konnten Substanzen vorsichtig pipettiert und wieder heraus perfundiert werden. Am Ende wurde eine Vitalitätskontrolle mit Cyclopiazonsäure (CPA; $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) durchgeführt. CPA blockiert die SERCA (= *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase*), eine Ca^{2+} -ATPase am endoplasmatischen Reticulum (Goeger 1988). Das ist das wichtigste Enzym zur Aufnahme von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher. Dessen Blockade bewirkt über einen Netto-Efflux von Ca^{2+} aus Speicherorganellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in vielen Zelltypen (Moncoq et al. 2007).

Zur Datenerfassung wurde die Software TILLvisION verwendet. Alle fünf Sekunden wurde ein Bildpaar aufgenommen. Dazu wurde die Emission bei einer Belichtung mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm (Belichtungsdauer 70 ms) und anschließend mit einer Anregungswellenlänge von 380 nm (Belichtungsdauer 70 ms) erfasst. Das Programm errechnete die Ratio aus der Emission bei beiden Anregungswellenlängen, sodass die Wirkung der Substanzen auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration direkt beobachtet werden konnte. Die Auswertung erfolgte über verschiedene Datenanalyse-Programme. Als *Baseline* galt die Fura-Ratio unter basalen Bedingungen, ermittelt als Durchschnittswert aus den letzten drei Minuten vor Substratzugabe. Der höchste Wert nach Substanzzugabe wurde als *Peak* bezeichnet und die Veränderung zwischen *Baseline* und *Peak* als $\Delta\text{Fura-Ratio}$ berechnet.

2.7 Desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS)

Mit der Elektrosprayionisation werden Ionen mithilfe der Elektrospray-Methode erzeugt (Dole 1968). Mit der *Desorption electro spray ionization massspectrometry* (DESI-MS) wurde die Methode weiterentwickelt und eine hochempfindliche Detektionsmethode, die zudem eine gewisse Raumauflösung erlaubt, geschaffen (Takáts et al. 2004).

Ein Lösungsmittel wurde durch eine Metallkapillare auf die zu analysierende Probe geleitet. An der Spitze der Kapillare wurde eine elektrische Spannung angelegt, sodass es zur Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode kam.

Das Kolon-Präparat aus den Ratten wurde hierfür unmittelbar nach der Euthanasie der Tiere auf Glasplättchen in Trockeneis gebracht. Die Kolon-Präparate wurden vor den Elektrosprayer gebracht und bei einer festen Flussrate von $5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ mit dem Spray-Lösungsmittel Acetonitril unter einer Spannung von 4 kV „beschossen“. Die substanzspezifischen Ionen wurden anschließend in einem Massenspektrometer (Finnigan LTQ Orbitrap Discovery, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und mit Atmosphärendruckinterface analysiert. Das Präparat wurde mit einer Raster-Geschwindigkeit von $200 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ bewegt, um die räumliche Verteilung des zu analysierenden Cholinesters zu erfassen. Die Messungen wurden freundlicherweise von Stefanie Gerbig aus dem Institut für Anorganische und Analytische Chemie der JLU Gießen durchgeführt.

Zur Unterscheidung der jeweiligen Signale wurden Fenster gelegt, in denen das Massen- zu Ladungsverhältnisse (m/z) der jeweiligen Substanz zu erwarten war. Diese m/z -Fenster lagen bei:

- Cholin: 104,10621-104.10855 (erwartet für das geladene Molekül: 104,106991).
- Acetylcholin: 146,11557-146,11969 (erwartet für das geladene Molekül: 146,117555).
- Propionylcholin: 160,13123-160,13481; (erwartet für das geladene Molekül: 160,133205).
- Butyrylcholin: 174,14714-174,15072 (erwartet für das geladene Molekül: 174,148855).

Die erwarteten Molekularmassen wurden (nach Korrektur um die Elektronenmasse wegen der Ladung in der DESI-Analyse) mit dem Programm Exact Mass Calculator (Scientific Instrument Services, 2015) berechnet.

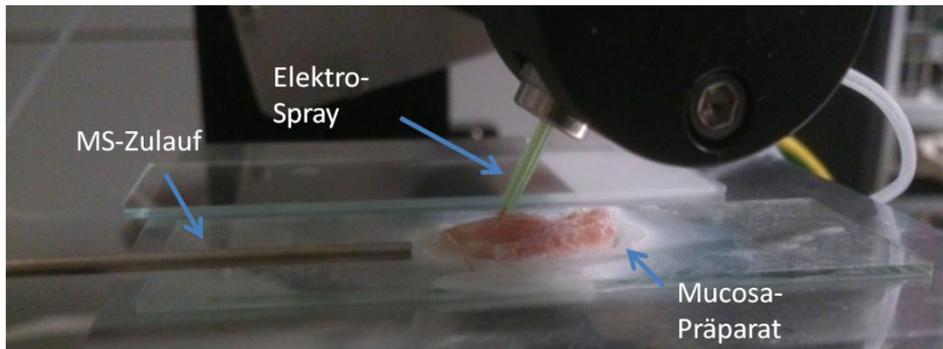


Abb. 2.6 Messung der aufgespannten Mucosa

(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Kooperation von Stefanie Gerbig, Institut für Anorganische und Analytische Chemie der JLU Gießen)

2.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM, *standard error of the mean*) oder in Originalkurven dargestellt. Wurden die Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen dargestellt, stellt die Balkenhöhe den Mittelwert und der Fehlerbalken den SEM dar. Bei den Ussing-Kammer-Versuchen bezeichnet n die Anzahl der verwendeten Gewebe und bei den Ca^{2+} -Imaging-Versuchen die Anzahl der Kryptenzellen. Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde ein Student-Test angewendet. Bei den Versuchen ging man von einer Normalverteilung der Ergebnisse aus (persönliche Mitteilung Prof. Dr. M. Diener 2014). Wenn die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem *Fishers Least-significant difference* Test durchgeführt. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden Effekte als statistisch signifikant betrachtet. Die Berechnungen erfolgten mittels einer Statistik-Software (Winstat). Bei den Ca^{2+} -Imaging-Versuchen wurde eine Antwort als solche gewertet, wenn sie eine absolute Schwelle von 0,1 und den 4-fachen Wert der Standardabweichung von der *Baseline* mindestens erreichte. Die Kurven, Balkendiagramme und auch die Kurvenanpassungen (fit auf e-Funktion) wurden mit dem Programm Prism erstellt und durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des physiologischen Vorkommens der atypischen Cholinester

Butyrylcholin und Propionylcholin konnten in allen vier für diese Messungen eingesetzten Mucosa-Präparaten des Rattenkolons nachgewiesen werden. Hierbei wurden mit der *Desorption electrospray ionization mass spectrometry* Methode (DESI-MS) die massenspektrometrischen Intensitäten von Cholin, ACh, Propionylcholin und Butyrylcholin, die bei „Beschuss“ der Mucosaoberfläche mit einem Acetonitril-Strahl unter Hochspannung freigesetzt wurden, gemessen. Nach der Ionisierung des Lösungsmittels (siehe Kapitel 2.7), fuhr ein Scanner mit einer Geschwindigkeit von $200 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ über einen Objektträger, auf dem sich das Mucosa-Präparat befand. Als ideale „interne“ Kontrolle erwies sich das Cholinsignal (wegen des hohen Gehalts an Cholin in Zellmembranen), das immer dann stark anstieg, wenn sich der Scanner über der Mucosa bewegte, und auf null abfiel, wenn sich der Scanner über dem reinen Objektträger befand (oberste Reihe in Abb. 3.1). In dem in Abb. 3.1 beispielhaft dargestellten Scan bewegte sich der Scanner im Zeitraum von ca. 0,6 bis 1,35 Minuten über der Mucosa. Im gleichen Zeitraum wurde ein massenspektrometrisches Signal für ACh gemessen (Reihe 2 in Abb. 3.1). Gleichzeitig waren auch Propionyl- und Butyrylcholin (Reihe 3 bzw. 4 in Abb. 3.1) auffindbar.

Die DESI-MS-Scans werden routinemäßig derart dargestellt, dass die relative Signalstärke in jedem Messfenster auf das höchste Signal für die jeweilige Substanz normiert wurde, welches dann als 100 % gesetzt wurde. Dementsprechend erscheinen die Peakhöhen für die verschiedenen Cholinderivate in Abb. 3.1 gleich groß. Werden jedoch die absoluten Signalstärken der beiden „atypischen“ Ester Propionylcholin und Butyrylcholin mit derjenigen von ACh im gleichen Präparat (die als 100 % gesetzt wurde) verglichen, findet man für Propionylcholin eine Signalstärke von $2,6 \pm 0,85 \%$ und für Butyrylcholin von $2,3 \pm 0,46 \%$ (Mittelwert \pm SEM, $n = 4$) der Signalstärke im Vergleich zu epitheliale ACh. Die Konzentration beider Ester im Kolonepithel ist zwar geringer als die des „klassischen“ Cholinesters ACh, aber sie kommen physiologischerweise im Kolonepithel vor.

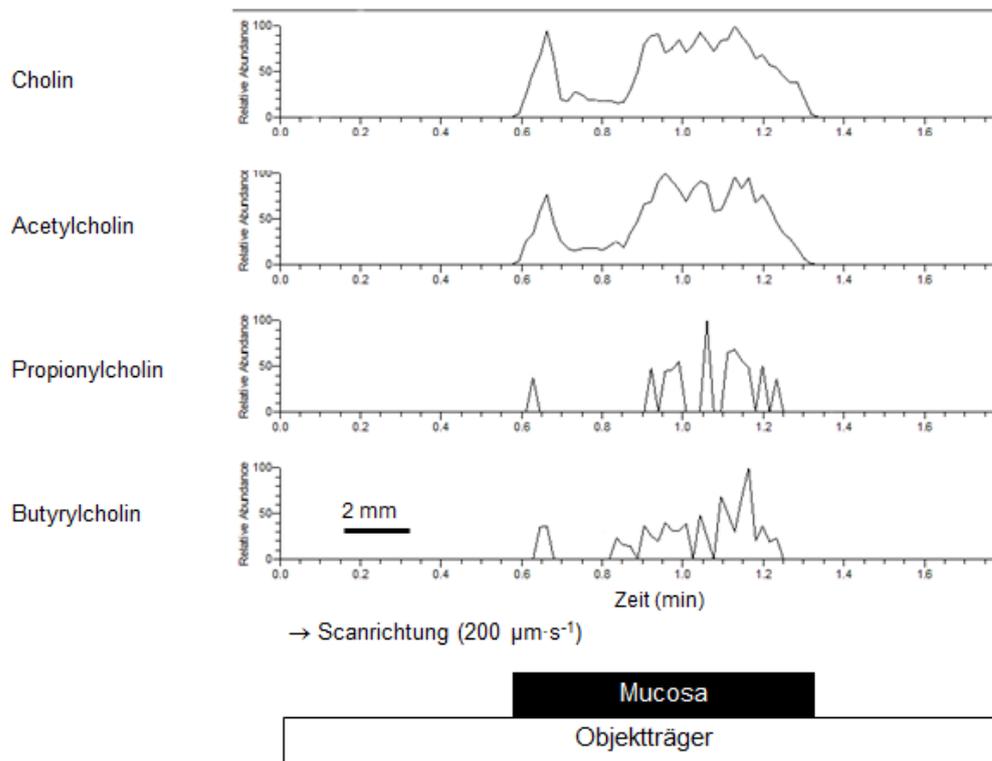


Abb. 3.1 Nachgewiesene Signale im Mucosa-Homogenat

(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Kooperation von Stefanie Gerbig, Institut für Anorganische und Analytische Chemie der JLU Gießen)

DESI-MS Signal von Cholin (Reihe 1), Acetylcholin (Reihe 2), Propionylcholin (Reihe 3) und Butyrylcholin (Reihe 4) bei Abrasterung eines auf einen Objekträger geklebten Mucosa-Präparats aus dem Kolon der Ratte. Die Abtastgeschwindigkeit betrug 200 µm·s⁻¹. Die Einstellungen (m/z) für die massenspektrometrische Analysefenster lauteten für Cholin: 104,10621-104,10855, für Acetylcholin: 146,11557-146,11969, für Propionylcholin: 160,13123-160,13481 und für Butyrylcholin: 174,14714-174,15072.

Die relative Signalstärke in jeder Reihe ist normiert auf das höchste Signal für jede Substanz, welches jeweils als 100 % gesetzt wurde. Die Abbildung zeigt das typische Ergebnis von 4 unabhängigen Versuchen.

3.2 Ermittlung einer möglichen Desensitivierung am Mucosa-Präparat aus dem distalen Kolon für die cholinergen Agonisten Butyrylcholin und Propionylcholin

In Gehirnen von Ratten konnte gezeigt werden, dass die ChAT dieselbe Affinität für Acetyl-CoA, Propionyl-CoA und Butyryl-CoA aufweist (Rossier 1977). Da die Expression der ChAT im Kolonepithel der Ratte nachgewiesen werden konnte (Bader 2014), das Kolonepithel durch die Fermentation von Strukturkohlenhydraten permanent hohen Konzentration an Butyrat und Propionat ausgesetzt ist (Binder 2010) und nun in dieser Arbeit auch Konzentrationen von Propionyl- und Butyrylcholin am Kolonepithel der Ratte nachgewiesen werden konnten, liegt die Vermutung sehr nahe, dass die ChAT auch an der Synthese von Butyrylcholin und Propionylcholin am Kolonepithel der Ratte beteiligt ist. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob diese Ester auch eine Anionensekretion am Mucosa-Präparat auslösen können. Dazu wurden Mucosa-Präparate aus dem distalen Kolon der Ratte für die Ussing-Kammer-Versuche gewählt. Durch die mechanische Ablation der Submucosa wurden in diesem Präparat die sekretomotorischen Neuronen des *Plexus submucosus* entfernt. Die Cholinester sollten also, wenn sie wirksam sind, dann hauptsächlich über Rezeptoren direkt an den Epithelzellen wirken können. Allerdings blieb die Frage, ob nicht noch die im Gewebe verbliebenden Nervenendigungen Einfluss auf den I_{sc} haben könnten. Bader und Diener wiesen 2018 nach, dass am Caecum der Ratte der Anstieg des I_{sc} durch Propionat conotxinresistent ist, sodass angenommen werden kann, dass die verbliebenden Nervenendigungen nicht am Anstieg des I_{sc} beteiligt sind und der I_{sc} Resultat von non-neuronalen Cholinester ist (Bader und Diener 2018).

Initial wurde daher getestet, ob Butyrylcholin ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite appliziert) einen Anstieg des I_{sc} auslöst und – falls ja – ob diese Antwort bei wiederholter Zugabe des Agonisten eine Desensitivierung zeigt. Zwischen jeder Butyrylcholingabe wurde die serosale Seite des Gewebes drei Mal in einem Abstand von fünf Minuten ausgewaschen.

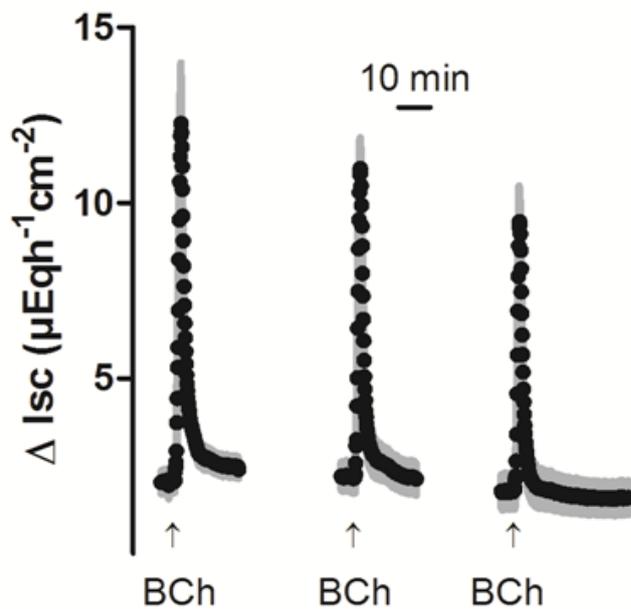


Abb. 3.2 Wirkung wiederholter Butyrylcholingabe auf den I_{sc}

Nach jeder Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite, markiert durch die senkrechten Pfeile) zu den Mucosa-Präparaten aus dem distalen Rattenkolon wurde ein transients Anstieg des I_{sc} gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte (schwarze Kreise) \pm SEM (graue Fläche). Um die einzelnen Kurven auf die Zugaben von Butyrylcholin zu synchronisieren, wurden Zeitintervalle von 5 bis 10 Minuten herausgenommen. So erklären sich die Unterbrechungen der Kurve; $n = 8$, Statistik siehe Tab. 3.1.

In der Varianzanalyse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Peaks untereinander ermittelt werden (Tab. 3.1), sodass, obwohl eine leichte Tendenz zum Abfall zu beobachten war, von keiner Desensitivierung ausgegangen werden konnte.

Für alle folgenden Versuche mit dem Mucosa-Präparat konnte somit ein- und dasselbe Präparat als Versuchs- und Kontroll-Präparat verwendet werden. Das heißt, für alle Experimente, in denen die Sensitivität der Butyrylcholinantwort auf Inhibitoren untersucht wurde, wurde zuerst die Antwort des Gewebes auf Butyrylcholin in Abwesenheit des vermuteten Hemmstoffes getestet. Nach einem Waschschrift und nachfolgender Applikation des Inhibitors wurde (nach 10-15 min Wartezeit) dann Butyrylcholin ein zweites Mal zu dem gleichen Gewebe appliziert. Durch die Verwendung jeweils einer internen Kontrolle (Butyrylcholinantwort am gleichen Gewebe) konnte die Anzahl der verwendeten Versuchstiere minimiert werden.

Tab. 3.1 Wirkung wiederholter Butyrylcholingabe auf den I_{sc}

Butyrylcholin	ΔI_{sc} ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
1. Zugabe	11,62 \pm 1,49
2. Zugabe	10,20 \pm 1,03
3. Zugabe	8,85 \pm 0,83

Angegeben ist der maximale Anstieg des I_{sc} , den Butyrylcholin ($5\cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ serosal) bei mehrfacher Applikation zu Mucosa-Präparaten aus dem Kolon der Ratte auslöst. Die Daten sind als Differenz zur Baseline unmittelbar vor Applikation von Butyrylcholin dargestellt (ΔI_{sc}) und sind Mittelwerte \pm SEM; n = 8. Die Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,26$) zwischen den Mittelwerten der Zugaben (1-3) des Agonisten.

Anschließend wurde getestet, ob auch Propionylcholin (10^{-3} mol·l⁻¹ auf der serosalen Seite appliziert) einen Anstieg des I_{sc} auslöst und ob diese Antwort bei wiederholter Zugabe des Agonisten eine Desensitivierung zeigt. Zwischen jeder Propionylcholinzugabe wurde die serosale Seite des Gewebes drei Mal in einem Abstand von fünf Minuten ausgewaschen.

Nach Varianzanalyse konnten bei diesem Ester signifikante Unterschiede zwischen den drei Propionylcholin-Peaks untereinander ermittelt werden (Tab. 3.2), sodass von einer Desensitivierung ausgegangen werden musste. Für alle folgenden Versuche mit dem Mucosa-Präparat musste daher jeweils ein Kontroll- und ein Versuchspräparat verwendet werden. Für alle Inhibitorenversuche wurde somit jeweils ein Gewebe mit dem vermuteten Hemmstoff vorbehandelt und 10 - 15 min Propionylcholin appliziert. Diese Antwort wurde mit der Propionylcholinantwort einer „externen“ Kontrolle, d.h. einem Kontrollgewebe, das nicht mit dem jeweiligen Inhibitor vorbehandelt wurde, verglichen.

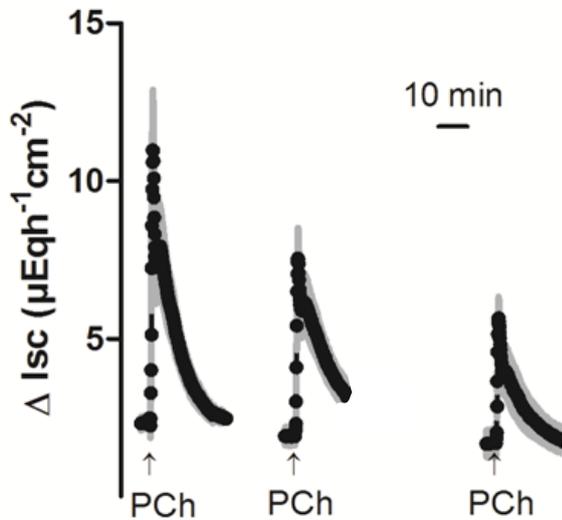


Abb. 3.3 Wirkung wiederholter Propionylcholingabe auf den I_{sc}

Nach jeder Zugabe von Propionylcholin (PCh; $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite, markiert durch die senkrechten Pfeile) zu den Mucosa-Präparaten aus dem distalen Rattenkolon wurde ein transienter Anstieg des I_{sc} gemessen. Um die einzelnen Kurven auf die Zugaben von Propionylcholin zu synchronisieren, wurden Zeitintervalle von 5 bis 10 Minuten herausgenommen. So erklären sich die Unterbrechungen der Kurve; Dargestellt sind Mittelwerte (schwarze Kreise) \pm SEM (graue Fläche), $n = 6$, Statistik siehe Tab. 3.2.

Tab. 3.2 Wirkung wiederholter Propionylcholingabe auf den I_{sc}

Propionylcholin	ΔI_{sc} ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
1. Zugabe	$9,69 \pm 1,60^a$
2. Zugabe	$5,87 \pm 0,90^b$
3. Zugabe	$4,17 \pm 0,44^b$

Angegeben ist der maximale Anstieg des I_{sc} , den Propionylcholin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal), bei mehrfacher Applikation zu Mucosa-Präparaten aus dem Kolon der Ratte auslöst. Die Daten sind als Differenz zur Baseline unmittelbar vor Applikation von Propionylcholin (ΔI_{sc}) dargestellt und sind Mittelwerte \pm SEM; $n = 6$. Die Varianzanalyse zeigte eine signifikante Abnahme ($p = 0,0082$) der Wirkung bei wiederholter Applikation von Propionylcholin zu dem gleichen Präparat. Statistisch homogene Gruppen sind mit den gleichen Buchstaben (a, b) gekennzeichnet (Fishers Least-significant difference Test).

3.3 Konzentrationswirkungsbeziehung für Butyrylcholin und Propionylcholin

In diesem Versuch wurden in Ussing-Kammer-Versuchen Mucosa-Präparaten des distalen Kolons Butyrylcholin und Propionylcholin in verschiedenen Konzentrationen auf der serosalen Seite zugegeben. Bei den Versuchen mit Butyrylcholin wurde vor der nächsten Zugabe das Gewebe drei Mal im Abstand von fünf Minuten ausgewaschen. Für die Versuche mit Propionylcholin wurde jeweils eine Konzentration je Gewebestück appliziert, um die Desensitivierung zu umgehen.

Butyrylcholin löste bei einer Konzentration von $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ einen signifikanten Anstieg des I_{sc} aus. Eine Erhöhung der Konzentration bewirkte einen größeren Anstieg des I_{sc} , bis die Antwort in einem Konzentrationsbereich von ca. 10^{-4} bis $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ein Plateau erreichte (Abb. 3.4). Eine Konzentration von $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Butyrylcholin wurde für die weiteren Versuche eingesetzt.

Der Anstieg des I_{sc} , den Propionylcholin auslöste, war im Vergleich zu Butyrylcholin geringer. Ein erster signifikanter Anstieg des I_{sc} wurde ab einer Konzentration von $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ beobachtet. Die Antwort erreichte ab einer Konzentration von ca. $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ein Plateau (Abb. 3.5). Bei diesem Ester wurden alle weiteren Versuche mit einer Konzentration im maximalen Wirkungsbereich ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) durchgeführt (Siehe auch Kapitel 4).

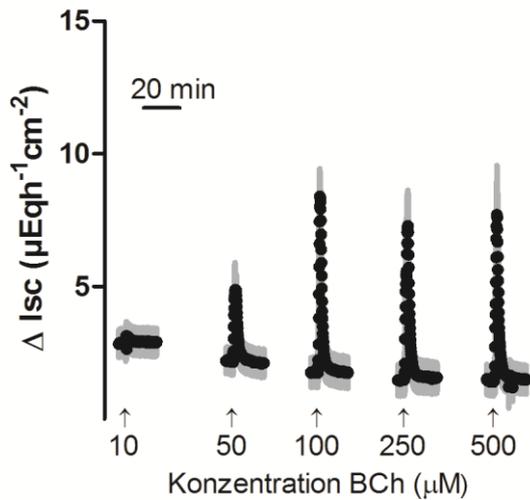


Abb. 3.4 Konzentrationswirkungskurve für Butyrylcholin am Mucosa-Präparat

Da in dieser Arbeit bei Butyrylcholin (BCh) von keiner Desensitivierung ausgegangen wird, konnten alle Konzentrationen auf ein Gewebe appliziert werden, wobei zwischen den einzelnen Applikationen ein Waschschritt erfolgte. Nach jeder Zugabe von Butyrylcholin (auf der serosalen Seite appliziert) wurde ein transienter Anstieg des I_{sc} gemessen. Gezeigt sind die gemittelten Kurven mit Mittelwert (Symbole) \pm SEM (graue Fläche). Um die einzelnen Kurven auf die Zugaben von Butyrylcholin zu synchronisieren, wurden Zeitintervalle von 5 bis 10 Minuten herausgenommen. So erklären sich die Unterbrechungen der Kurve; $n = 8$, Statistik s. Tab. 3.3

Tab. 3.3 Konzentrationswirkungskurve von Butyrylcholin am Mucosa-Präparat

ButyrylcholinKonzentration	ΔI_{sc} ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
$10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,57 \pm 0,18 *$
$5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$3,83 \pm 1,04 *$
$10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$7,57 \pm 0,83 *$
$2,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$8,72 \pm 0,96 *$
$5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$7,55 \pm 1,51 *$

Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SEM für den Anstieg des I_{sc} im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor der jeweiligen Applikation von Butyrylcholin (ΔI_{sc}) dar; $n = 8$. T-Test für abhängige Stichproben * $P < 0,05$ versus der Baseline.

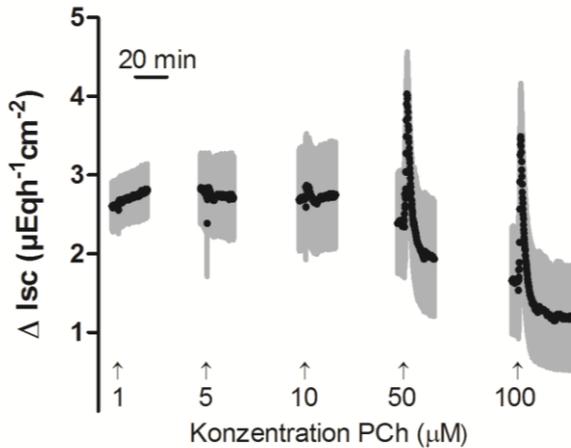


Abb. 3.5 Konzentrationswirkungskurve für Propionylcholin

Nach jeder Zugabe von Propionylcholin (PCh; auf der serosalen Seite appliziert) wurde ein transienter Anstieg des I_{sc} gemessen. Gezeigt sind die gemittelten Kurven mit Mittelwert (Symbole) \pm SEM (graue Fläche). Um die einzelnen Kurven auf die Zugaben von Propionylcholin zu synchronisieren, wurden Zeitintervalle von 5 bis 10 Minuten herausgenommen. So erklären sich die Unterbrechungen der Kurve; $n = 6$, Statistik s. Tab. 3.4.

Tab. 3.4 Konzentrationswirkungskurve von Propionylcholin am Mucosa-Präparat

Propionylcholinkonzentration	ΔI_{sc} ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
$10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,25 \pm 0,05$ *
$5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,18 \pm 0,07$
$10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,33 \pm 0,08$ *
$5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$2,00 \pm 0,59$ *
$10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$2,13 \pm 0,44$ *

Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SEM für den Anstieg des I_{sc} im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der jeweiligen Propionylcholin-Applikation (ΔI_{sc}) dar; $n = 6$. T-Test für abhängige Stichproben * $P < 0,05$ versus der *Baseline*.

3.4 Wirkung von Butyrylcholin und Propionylcholin in chloridfreiem Puffer

Im Falle von ACh wird der Anstieg des I_{sc} von einer Sekretion von Chloridionen getragen (Strabel und Diener 1995). Um zu prüfen, ob der Anstieg des I_{sc} , den Butyrylcholin auslöst, ebenfalls auf eine Chlorid-Sekretion zurückgeht, wurden Anionensubstitutionsversuche durchgeführt. Dazu wurde die Wirkung von Butyrylcholin an Mucosa-Präparaten zuerst in Gegenwart von Chlorid und dann unter chloridfreien Bedingungen gemessen.

Für die chloridfreie Parsonslösung wurde Chlorid durch das Anion Gluconat ersetzt (Kapitel 2.2.1). Sie wurde auf serosaler und mucosaler Seite eingewaschen. Das Ergebnis zeigte, dass die Butyrylcholin-Antwort am Kolonepithel von einer Sekretion von Cl^- -Ionen getragen wird: Nach einer Gabe von Butyrylcholin ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) unter chloridfreien Bedingungen war der ΔI_{sc} -Wert von $0,33 \pm 0,13 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ gegenüber des ΔI_{sc} -Peaks von $7,39 \pm 1,33 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ nach der Kontrollgabe von Butyrylcholin in chloridhaltigem Puffer signifikant reduziert (Abb. 3.6).

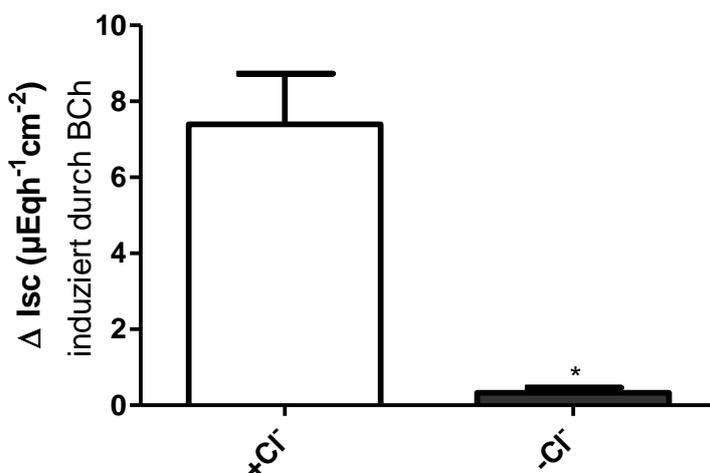


Abb. 3.6 Butyrylcholin bewirkt eine Chlorid-Sekretion

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle in normalem chloridhaltigem Puffer, der graue Balken steht für den Versuch mit chloridfreiem Puffer. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 6$, T-Test für abhängige Stichproben * $P < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe.

Eine ähnliche und signifikante Abhängigkeit des I_{sc} von der Präsenz von Cl^- im Puffer bestand für den I_{sc} -Anstieg, der durch Propionylcholin ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) im

Mucosa-Präparat induziert wurde. Er betrug $10,01 \pm 2,35 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) in der Anwesenheit und $1,35 \pm 0,36 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ in der Abwesenheit von Cl^- ($n = 6$) (Abb. 3.7).

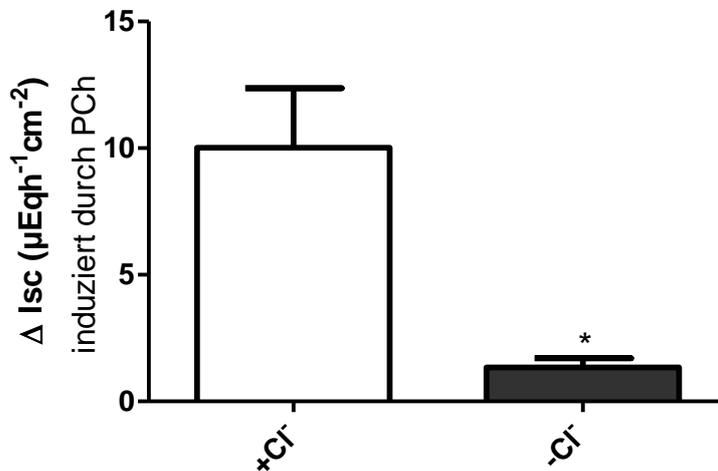


Abb. 3.7 Propionylcholin bewirkt eine Chlorid-Sekretion

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Propionylcholin (PCh; $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle in normalem chloridhaltigem Puffer, der graue Balken steht für den Versuch mit chloridfreiem Puffer. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 6$, T-Test für unabhängige Stichproben * $P < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe.

3.5 Überprüfung neuronaler Beteiligung mittels Tetrodotoxin

Nun wurde untersucht, ob die durch Butyrylcholin- und Propionylcholin induzierte Chlorid-Sekretion am Mucosa-Präparat möglicherweise auch von der Aktivität enterischer Neurone abhängig ist, da in der *Lamina propria* sich am distalen Kolon der Ratte auch neuronale Somata des *Plexus mucosus* nachweisen lassen (Andres et al. 1985). Um die neuronale Aktivität zu unterdrücken, wurde vor den jeweiligen Cholinester-Applikationen das Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, auf der serosalen Seite) eingesetzt, welches spannungsabhängige Na^+ -Kanäle in Nervenzellen blockiert und somit die Weiterleitung der Aktionspotentiale in enterischen Neuronen verhindert (Catterall 1980). Wie den Abbildungen 3.8 und 3.9 zu entnehmen ist, führte eine Vorbehandlung mit TTX zu keiner signifikanten Veränderung des durch die atypischen Cholinester induzierten Stromanstiegs, sodass eine wesentliche Beteiligung enterischer Neurone ausgeschlossen werden konnte.

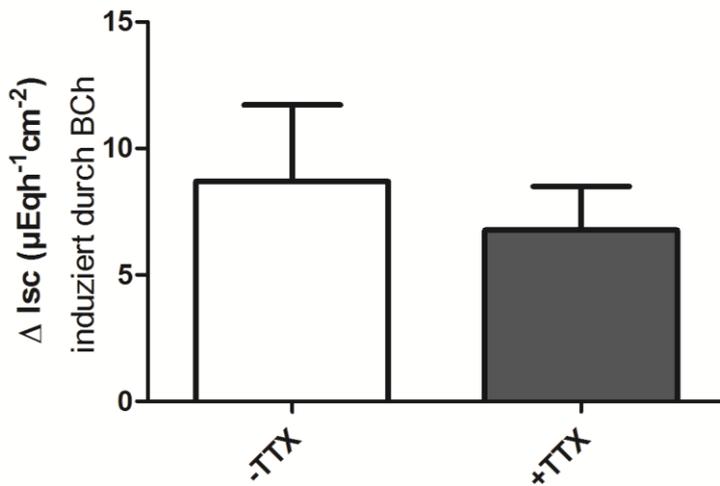


Abb. 3.9 Keine signifikante Hemmung der Butyrylcholin-Antwort durch TTX

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Inhibitor, der graue Balken steht für den Versuch mit Tetrodotoxin (TTX; $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ serosal). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I_{sc} über die *Baseline* (ΔI_{sc}) dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 6$. T-Test für abhängige Stichproben ($P = 0,203$).

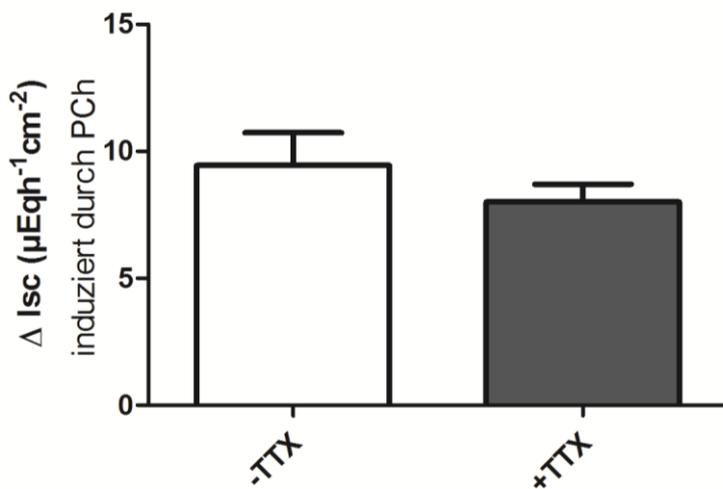


Abb. 3.8 Keine signifikante Hemmung der Propionylcholin-Antwort durch Tetrodotoxin

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Propionylcholin (PCh; $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Inhibitor, der graue Balken steht für den Versuch mit Tetrodotoxin (TTX; $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ serosal). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I_{sc} über die *Baseline* (ΔI_{sc}) dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 6$. T-Test für unabhängige Stichproben ($P = 0,176$).

3.6 Untersuchung der Wirkmechanismen von Butyrylcholin und Propionylcholin am Kolonepithel mit Hilfe von Ussing-Kammer-Versuchen

In den folgenden Experimenten sollte geprüft werden, über welche Rezeptoren und über welchen Signalweg Butyrylcholin und Propionylcholin auf die Mucosa wirken.

3.6.1 Hemmung der Wirkung von Butyrylcholin und Propionylcholin durch Atropin

Vorbehandlung mit Atropin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der der serosalen Seite) führte sowohl im Falle von Butyrylcholin (Abb. 3.10 und Abb 3.11) als auch im Falle von Propionylcholin (Abb. 3.12) zu einer signifikanten Hemmung des durch den jeweiligen Ester ausgelösten Anstiegs des I_{sc} an den Mucosa-Präparaten. Sowohl Butyrylcholin als auch Propionylcholin scheinen also ihre Wirkungen über muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren zu vermitteln.

Im Vergleich beider Cholinester fiel allerdings auf, dass die Hemmung durch Atropin in der verwendeten Konzentration von $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ im Fall von Butyrylcholin deutlich schwächer ausfiel als im Fall von Propionylcholin. Daher wurde für diesen Ester eine zweite Versuchsserie durchgeführt, bei der die Atropinkonzentration auf $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (auf der serosalen Seite) erhöht wurde. Diese Atropinkonzentration unterdrückte nahezu vollständig die Antwort auf Butyrylcholin ($5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), sie betrug lediglich $0,28 \pm 0,06 \mu \text{ Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 7$) im Vergleich zu $6,00 \pm 0,91 \mu \text{ Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ in der dazu gehörigen Kontrollserie ohne Atropin (Abb. 3.11). Mit anderen Worten, es scheinen höhere Konzentrationen am kompetitiven Antagonisten Atropin notwendig zu sein, um die Bindung von Butyrylcholin an die epithelialen Muskarinrezeptoren zu verhindern. Allerdings kann Atropin in diesem Konzentrationsbereich auch nikotinerge Rezeptoren blockieren (Ambache 1955, siehe auch weiter unten).

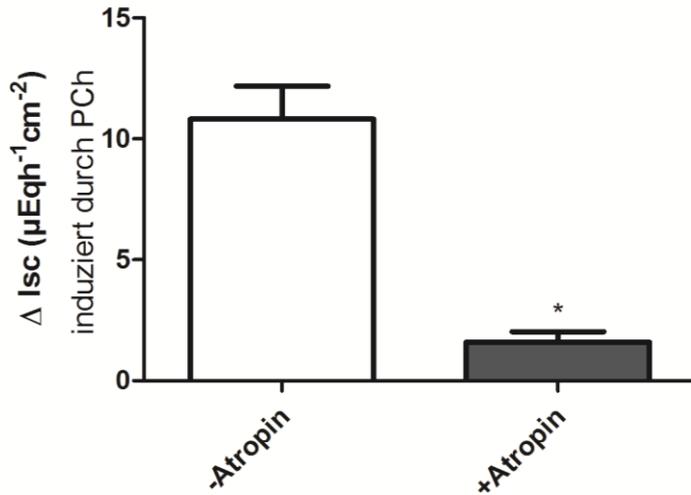


Abb. 3.11 Atropin ($10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) hemmt den I_{sc} -Anstieg nach Zugabe von Butyrylcholin am Mucosa-Präparat

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Atropin, der graue Balken steht für den Versuch mit Atropin ($10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ serosal). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des (ΔI_{sc}) dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 7$, * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe. T-Test für abhängige Stichproben.

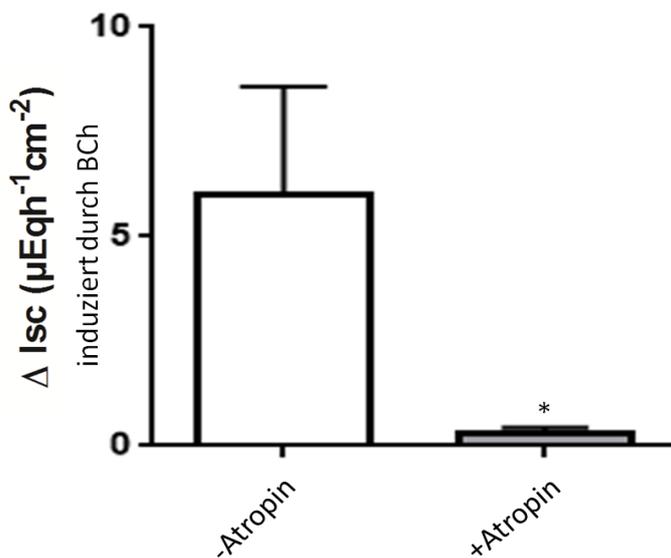


Abb. 3.10 Atropin ($10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) hemmt den I_{sc} -Anstieg nach Zugabe von Butyrylcholin am Mucosa-Präparat

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Atropin, der graue Balken steht für den Versuch mit Atropin ($10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ serosal). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des (ΔI_{sc}) dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 7$, * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe. T-Test für abhängige Stichproben.

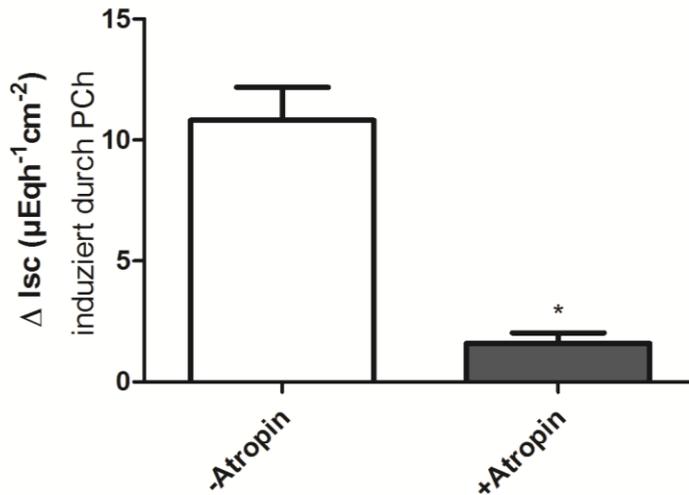


Abb. 3.12 Atropin hemmt den I_{sc} -Anstieg nach Zugabe von Propionylcholin am Mucosa-Präparat

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} nach Zugabe von Propionylcholin (PCh; $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Atropin, der graue Balken steht für den Versuch mit Atropin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des (ΔI_{sc}) dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 6-7$, * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe. T-Test für unabhängige Stichproben.

3.6.2 Wirkung von Subtyp-spezifischen Muskarin-Rezeptorblockern

Da sich am Kolonepithel die Subtypen M1 und M3 des muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors befinden (Haberberger et al. 2006, Khan et al. 2013), sollte durch den Einsatz selektiver M1- und M3-Inhibitoren getestet werden, ob nur einer von beiden Subtypen oder beide Subtypen die Butyrylcholin- und/oder Propionylcholinwirkung an der Mucosa vermitteln.

Zu diesem Zweck wurde nach einer Kontroll-Butyrylcholin-Gabe ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal) und einem dreimaligen Waschschrift vor der zweiten Butyrylcholin-Gabe ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal) der jeweilige Inhibitor serosal hinzugegeben. Telenzepin, ein selektiver M1-Rezeptor-Blocker (Galvan et al. 1989) ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal), bewirkte eine Hemmung von mehr als 50 % der Antwort auf Butyrylcholin ($n = 8$). Ein anderer M1-Blocker, Pirenzepin (Starke 2001) ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal), führte zu einer Verringerung um ca. ein Drittel der Butyrylcholin-Antwort ($n = 7$).

Im Anschluss dazu wurden die M3-Rezeptor-Blocker Darifenacin (Zinner 2007) und J104129 (Mitsuya et al. 1999) eingesetzt. Bereits in einer Konzentration von $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (serosal) verminderte Darifenacin die Antwort auf Butyrylcholin signifikant (Abb. 3.13, Tab. 3.5). Es fiel aber auf, dass die Hemmwirkung deutlich schwächer war als diejenige, die der zweite

eingesetzte M3-Rezeptor-Blocker, das J104129 ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) ausübte, welches die Antwort auf Butyrylcholin weitgehend unterdrückte. Daher wurde in einem weiteren Versuch die Konzentration von Darifenacin auf $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (auf der serosalen Seite) erhöht. Dies verminderte die Antwort von Butyrylcholin ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) von $5,50 \pm 0,71 \mu \text{ Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 8$) auf $0,36 \pm 0,08 \mu \text{ Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 8$, $p < 0,05$ versus Antwort in Abwesenheit von Darifenacin).

Ein ähnliches Muster, d.h. eine moderate Hemmung durch die M1-Rezeptorblocker Telenzepin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) und Pirenzepin ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) und eine starke Hemmung durch die M3-Rezeptorblocker Darifenacin ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) und J104129 ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) wurde auch bei der Antwort der Mucosa-Präparate auf Propionylcholin ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) beobachtet (Abb. 3.14, Tab. 3.6).

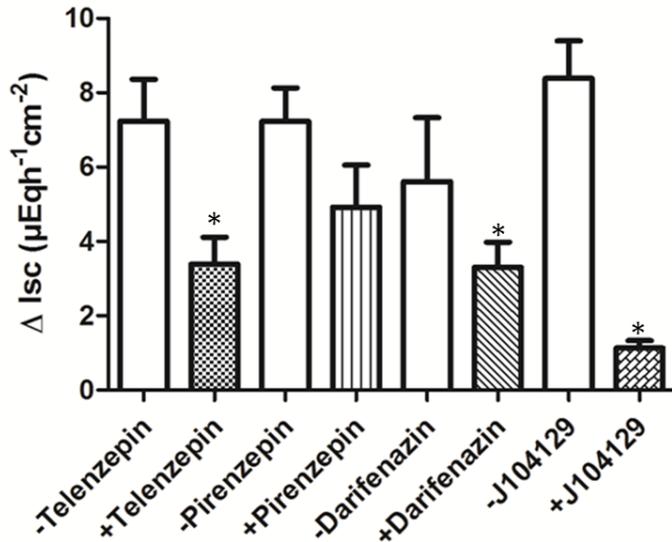


Abb. 3.13 Einfluss der Blockade der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren auf BCh-Wirkung

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) nach Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Inhibitor, der gemusterte Balken steht für den Versuch mit dem jeweiligen Inhibitor (Konzentrationen siehe Tab 3-5). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I_{sc} dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 7-8$, * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe.

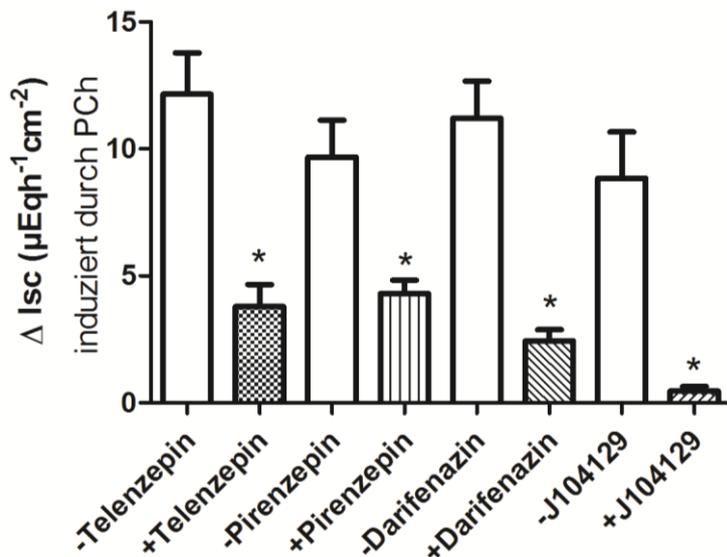


Abb. 3.14 Einfluss der Blockade der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren auf PCh-Wirkung

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) nach Zugabe von Propionylcholin (PCh; $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Inhibitor, der gemusterte Balken steht für den Versuch mit dem jeweiligen Inhibitor (Konzentrationen im Text oder in Tab 3-6 ablesbar). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I_{sc} dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 6-7$, * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe.

Tab. 3.5 Einfluss der Blockade der muskarinergen Acetylrezeptoren auf die Wirkung von Butyrylcholin

Bedingungen	ΔI_{sc} ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	n
M1-Rezeptor-Blockade		
-Telenzepin	7,24 \pm 1,12	8
+Telenzepin	3,19 \pm 0,59 *	8
-Pirenzepin	7,23 \pm 0,90	7
+Pirenzepin	4,92 \pm 1,14	7
M3-Rezeptoren-Blockade		
-Darifenacin	5,62 \pm 1,71	7
+Darifenacin	3,31 \pm 0,67 *	7
-J104129	8,39 \pm 1,00	8
+J104129	1,13 \pm 0,20 *	8

Gemessen wurde der I_{sc} -Anstieg (ΔI_{sc}) nach Butyrylcholin-Zugabe ($5\cdot 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal) in Abwesenheit (-) von Inhibitoren oder nach Vorbehandlung (+) mit Telenzepin ($10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal), Pirenzepin ($10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal), Darifenacin ($10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal) oder J104129 ($5\cdot 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal). Die Daten stellen die Mittelwerte \pm SEM für den Anstieg von I_{sc} im Vergleich zu einer über drei Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Butyrylcholin-Applikation dar. T-Test für abhängige Stichproben mit * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe.

Tab. 3.6 Einfluss der Blockade der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren auf die Wirkung von Propionylcholin

Bedingungen	ΔI_{sc} ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	n
M1-Rezeptor-Blockade		
-Telenzepin	12,16 \pm 1,62	6
+Telenzepin	3,79 \pm 0,87 *	6
-Pirezepin	9,68 \pm 1,45	6
+Pirezepin	4,31 \pm 0,52 *	7
M3-Rezeptor-Blockade		
-Darifenacin	11,21 \pm 1,46	6
+Darifenacin	2,45 \pm 0,44 *	6
-J104129	8,85 \pm 1,82	6
+J104129	0,47 \pm 0,18 *	6

Gemessen wurde der I_{sc} -Anstieg nach Propionylcholin-Zugabe (10^{-3} mol·l⁻¹ serosal) in Abwesenheit (-) von Inhibitoren oder nach Vorbehandlung (+) mit Telenzepin (10^{-7} mol·l⁻¹ serosal), Pirezepin (10^{-6} mol·l⁻¹ serosal), Darifenacin (10^{-6} mol·l⁻¹ serosal), J104129 ($5\cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ serosal). Die Daten stellen die Mittelwerte \pm SEM für den Anstieg von I_{sc} im Vergleich zu einer über drei Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Propionylcholin-Applikation dar. T-Test für unabhängige Stichproben mit * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe.

3.6.3 Wirkung von Hexamethonium am Mucosa-Präparat

Atropin als muskarinerges Antagonist bewirkte eine signifikante Hemmung der Butyrylcholinantwort (vgl. Kapitel 3.6.1). Die Hemmung war allerdings nicht komplett - auch nicht bei Erhöhung der Atropinkonzentration. Hier stellte sich die Frage, ob Butyrylcholin seine Wirkung zusätzlich über andere Rezeptoren entfaltet. Da Bader und Diener (2014) nachweisen konnten, dass nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren auch im Kolonepithel der Ratte von funktioneller Bedeutung sind, wurde in folgender Versuchsreihe Hexamethonium als unselektiver Hemmer von nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren (Baranowska et al. 2008) eingesetzt.

$10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Hexamethonium (serosal) führten am Mucosa-Präparat zu einer signifikanten Hemmung der Butyrylcholinantwort: Die Antwort auf Butyrylcholin ($5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal) betrug lediglich $1,51 \pm 0,19 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) im Vergleich zu $5,10 \pm 1,13 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ in der dazu gehörigen Kontrollserie ohne Hexamethonium ($p < 0,05$ versus ΔI_{sc} in Gegenwart von Hexamethonium, $n = 5$).

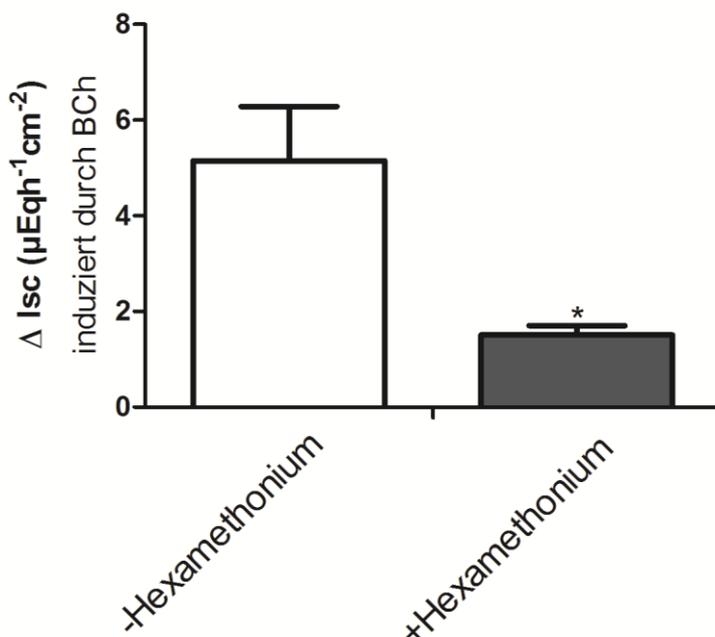


Abb. 3.15 Hexamethonium hemmt den I_{sc} -Anstieg nach Zugabe von Butyrylcholin am Mucosa-Präparat

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) nach Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Hexamethonium, der graue Balken steht für den Versuch mit Hexamethonium ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des ΔI_{sc} dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 5-6$, T-Test für abhängige Stichproben * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe.

Daraus lässt sich schließen, dass dieser Ester auch nikotinerge Rezeptoren am Epithel stimuliert. Da interessanterweise sowohl Atropin (Abb. 3.10) als auch Hexamethonium (Abb. 3.15) die Antwort auf Butyrylcholin um jeweils mehr als 50 % hemmen, deutet dies möglicherweise auf eine Potenzierung der sekretorischen Antwort hin, wenn beide Rezeptoren gleichzeitig stimuliert werden oder, dass eine Costimulation von Muskarin- und Nikotinrezeptoren womöglich letztlich notwendig ist, um eine volle Antwort am Epithel auszubilden.

Im Gegensatz dazu führten am Mucosa-Präparat 10^{-4} mol·l⁻¹(serosal) Hexamethonium zu keiner signifikanten Hemmung der Propionylcholinantwort: Die Antwort auf Propionylcholin ($5 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹serosal) im Hexamethonium vorbehandeltem Mucosa-Präparat war lediglich tendenziell mit $6,34 \pm 1,38$ $\mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (n = 6) im Vergleich zu $9,49 \pm 1,75$ $\mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ in der dazu gehörigen Kontrollserie ohne Hexamethonium verringert.

3.6.4 Wirkung von Hexamethonium und Eserin am Mucosa-Präparat

Da Butyrylcholin stärkere Anstiege des I_{sc} als Propionylcholin auslöste (vgl. z.B. Abb. 3.4 und 3.5) und auch um die Zahl der benötigten Versuchstiere zu reduzieren, wurden folgende Versuche nun mit Butyrylcholin als prototypisches Beispiel eines atypischen Cholinesters durchgeführt.

Zuerst wurde untersucht, ob der transiente Zeitverlauf der I_{sc} -Antwort auf Butyrylcholin durch einen Abbau durch Acetylcholinesterasen, die am Kolonepithel histochemisch nachgewiesen worden sind (Bader und Diener 2015), beruht. In dieser Versuchsreihe wurde Eserin als Acetylcholinesterasehemmer (Koelle 1946) eingesetzt. Gleichzeitig stabilisiert Eserin nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren in ihrer offenen Konformation (Albuquerque et al. 1984) und fungiert somit als Nikotinagonist. Dies machte eine Vorbehandlung mit Hexamethonium als nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor-Blocker (Baranowska et al., 2008) notwendig, um die sekretionsauslösende Wirkung von Eserin durch Stimulation epithelialer nikotinerger Rezeptoren auszuschalten.

Die Kontroll-Butyrylcholin-Antwort ($5 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ serosal) betrug $9,41 \pm 2,75$ $\mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Nach einer Zugabe von 10^{-5} mol·l⁻¹ Hexamethonium und 10^{-4} mol·l⁻¹ Eserin betrug die Butyrylcholin-Antwort nur noch $1,05 \pm 0,31$ $\mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Dies bestätigt noch einmal, dass die Wirkung von Butyrylcholin auch über nikotinerge ACh-Rezeptoren vermittelt sein könnte.

Zusätzlich war an den Kurvenverläufen des ΔI_{sc} nach der Butyrylcholin-Gabe bei vorheriger Behandlung der Mucosa mit Hexamethonium und Eserin im Vergleich zu den Kontrollen ein

weniger steiler Abfall zu beobachten. Dieser verlangsamte Abfall verlief annähernd exponentiell. In Abb. 3.16 wurde an Hand der gemessenen Daten eine e-Funktion ermittelt.

Der Versuch zeigt, dass die Blockade der Acetylcholinesterase die Wirkung von Butyrylcholin verlängert (Abb. 3.17).

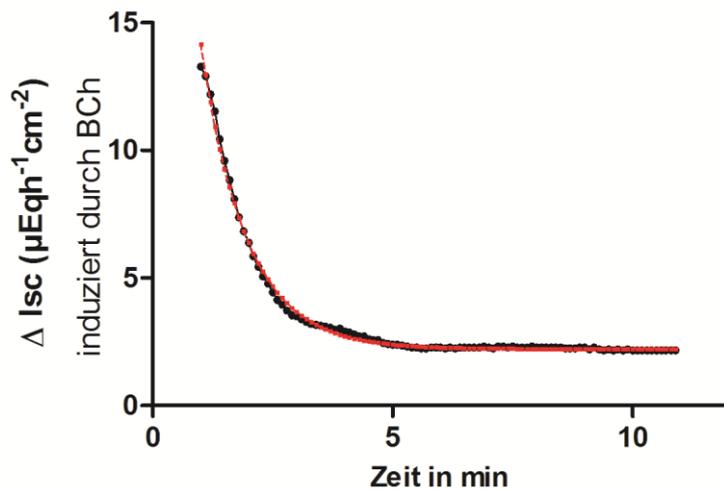


Abb. 3.16 Eserin senkt die Geschwindigkeit des ΔI_{sc} Peak-Abfalls

Die schwarze Kurve stellt die gemessenen Werte des Butyrylcholin-Peak-Abfalls nach Zugabe von BCh ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) bei Vorbehandlung der Mucosa mit $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Hexamethonium und $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Eserin serosal dar. Die rote Kurve ist die e-Funktion, die aus diesen Werten ermittelt wurde.

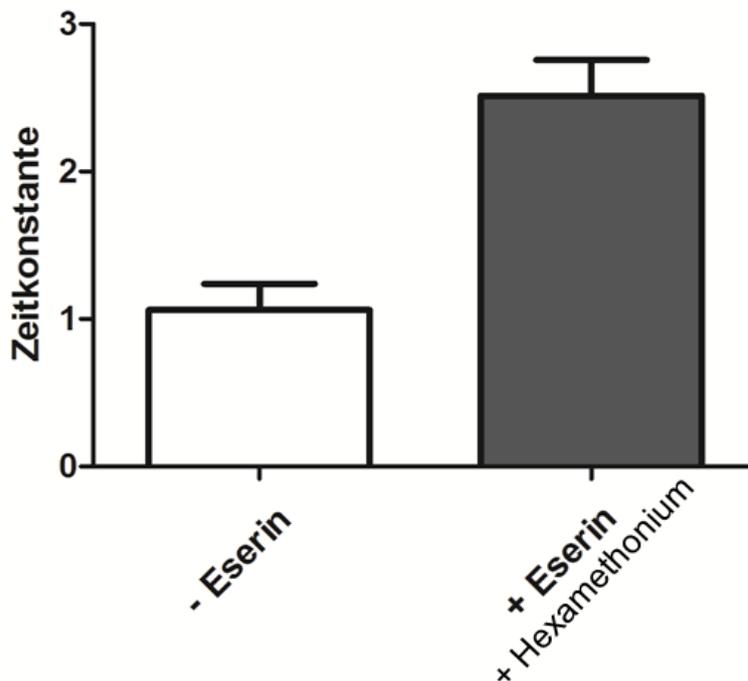


Abb. 3.17 Eserin verlängert die Zeit des ΔI_{sc} Peak-Abfalls

Dieses Balkendiagramm zeigt die gemittelten Zeitkonstanten des ΔI_{sc} Peak-Abfalls. Der weiße Balken zeigt den Wert nach alleiniger Zugabe von Butyrylcholin ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal). Der graue Balken gibt den Wert bei vorheriger Behandlung des Mucosa-Präparats mit $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Hexamethonium und $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Eserin serosal an ($n = 6$).

3.6.5 Wirkung des IP_3 -Rezeptor-Blockers

2-Aminoethoxydiphenylborat

Ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kann eine Cl^- -Sekretion induzieren (Hennig et al. 2008). Das Calcium kann hierbei aus intrazellulären Speichern oder durch den Einstrom aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol gelangen. Ein intrazellulärer Speicher ist z.B. das Endoplasmatische Retikulum, an dem sich IP_3 -Rezeptoren befinden (Yoshida und Imai 1997).

2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) inhibiert diese IP_3 -Rezeptoren (Maruyama et al. 1997, Bootman et al. 2002). IP_3 ist ein *second messenger*, der sich vom Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) ableitet. IP_3 bewirkt über die Stimulation von IP_3 -Rezeptoren die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Calciumspeichern (Kapitel 1.4). Im folgenden Versuch wurde 2-APB verwendet, um die Bedeutung der intrazellulären Calciumfreisetzung bei der Signalkaskade der Butyrylcholinwirkung zu untersuchen.

2-Aminoethoxydiphenylborat wurde im Lösungsmittel DMSO gelöst. Lösungsmittelkontrollen, um die alleinige Wirkung von DMSO auf das Gewebe zu ermitteln, ergaben, dass bei der Zugabe von reinem DMSO die Kurvenverläufe sich nicht von den Desensitivierungsversuchen unterschieden.

2-APB ($10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) hemmte signifikant die Butyrylcholin-Antwort gegenüber der ersten Kontroll-Butyrylcholin-Gabe ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) (vgl. Abb. 3.18). Die butyrylcholin-induzierte Cl^- -Sekretion ist also von der Aktivierung des IP_3 -Rezeptors und somit wesentlich vom intrazellulären Calciumspeicher abhängig.

Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass 2-APB auch die *Baseline* senkte, sodass man davon ausgehen kann, dass die basale Cl^- -Sekretion ebenfalls von 2-APB gehemmt wird.

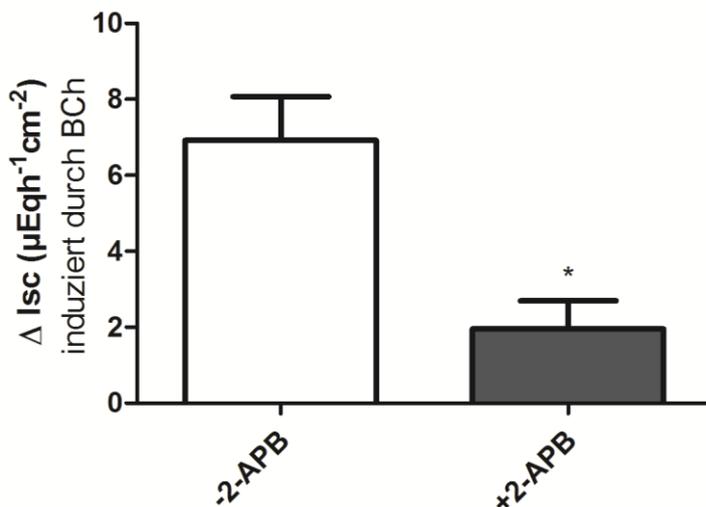


Abb. 3.18 Der IP_3 -Rezeptorblocker 2-APB hemmt die Wirkung von Butyrylcholin.

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) nach Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Inhibitor, der graue Balken steht für den Versuch mit 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB; $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I_{sc} dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 7$, T-Test für abhängige Stichproben * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe.

3.6.6 Wirkung von Butyrylcholin in Ca^{2+} -freiem Puffer

Nun wurde der Einfluss des extrazellulären Ca^{2+} auf die butyrylcholin-induzierte Cl^- -Sekretion untersucht. Hier wurde wieder zunächst serosal Butyrylcholin ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zugegeben. Dann wurde das Gewebe drei Mal im Abstand von fünf Minuten mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen. Anschließend wurde nach der Stabilisierung der *Baseline* ein zweites Mal

Butyrylcholin ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) appliziert. Es konnte dabei eine geringe, aber statistisch signifikante Abschwächung des zweiten Butyrylcholin-Peaks um ca. 40% beobachtet werden (Abb. 3.19). Die Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} scheint also für die Auslösung einer Chlorid-Sekretion durch diesen Cholinester nicht essenziell zu sein.

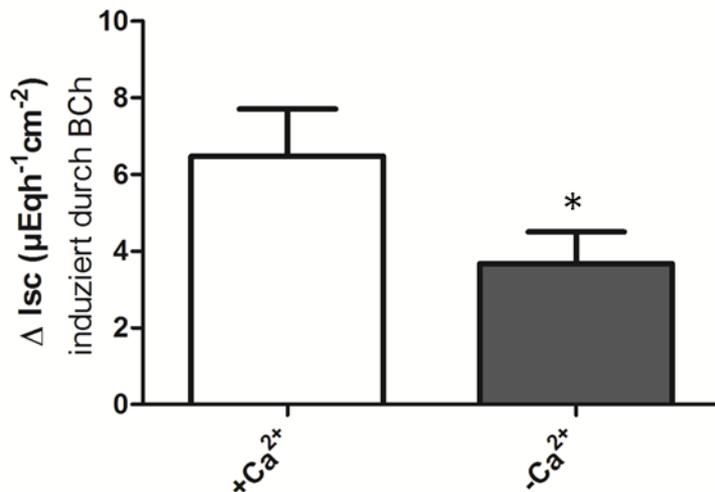


Abb. 3.19 Wirkung von Butyrylcholin in der An- und Abwesenheit von Ca^{2+} auf der serosalen Seite.

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) nach Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle mit normalem calciumhaltigem Puffer, der graue Balken steht für den Versuch in calciumfreiem Puffer (appliziert auf der serosalen Seiten). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I_{sc} dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 8$, T-Test für abhängige Stichproben, * $p < 0,05$ versus ΔI_{sc} der entsprechenden Kontrollgruppe.

3.6.7 Wirkung des Calmodulin-Antagonisten Calmidazolium auf den Butyrylcholin-Peak

Der Ca^{2+} /Calmodulin-Weg ist eine Signalkaskade, die zur Aktivierung von calciumabhängigen Chloridkanälen führt (Hartzell et al. 2005). Hierbei muss zunächst das Ca^{2+} an das intrazelluläre Rezeptorprotein Calmodulin binden. Der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex vermittelt die Öffnung der Chloridkanäle.

Calmidazolium ist ein Hemmstoff des Calmodulins (Adkins et al. 2000). Dieser Calmodulin-Antagonist (eingesetzt in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) hatte jedoch keine Wirkung auf den durch Butyrylcholin ausgelösten Anstieg des I_{sc} (Abb. 3.20).

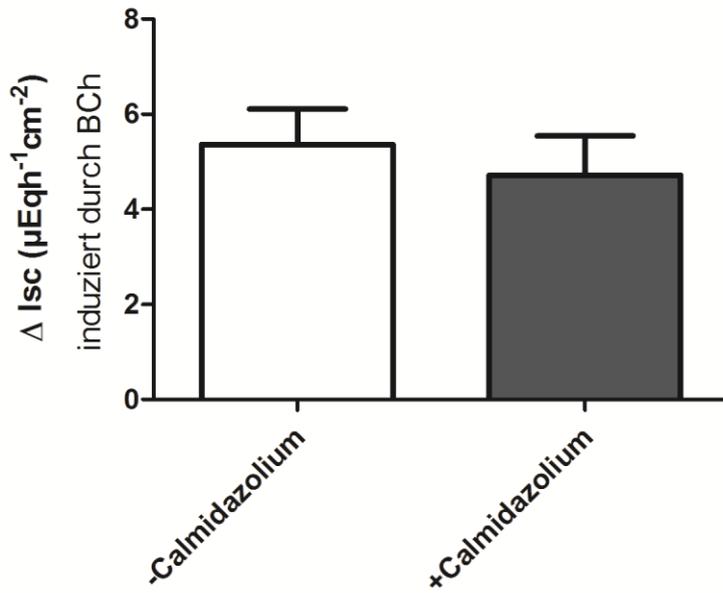


Abb. 3.20 Wirkung von Calmidazolium auf die Butyrylcholinantwort

Dargestellt ist der Anstieg des I_{sc} (ΔI_{sc}) nach Zugabe von Butyrylcholin (BCh; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ serosal) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe. Der weiße Balken steht für die Kontrolle ohne Inhibitor, der graue Balken steht für den Versuch mit Calmidazolium ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ serosal). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I_{sc} dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; $n = 12$. T-Test für abhängige Stichproben mit $p = 0,2$.

3.7 Versuche mittels Ca²⁺-Imaging

Die Ussing-Kammer-Versuche mit 2-ABP deuten auf eine Rolle von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern bei der Wirkung von Butyrylcholin am Kolonepithel hin. Um dies zu überprüfen, wurden Ca²⁺-Imaging-Versuche an isolierten Krypten (s. Kapitel 2.6) durchgeführt.

3.7.1 Wirkung von Butyrylcholin und Acetylcholin an isolierten Krypten

Isolierte Krypten aus dem Kolon wurden mit Fura-2 beladen, sodass Änderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration an Hand von Änderungen des Fura-2-Ratio-Signals sichtbar gemacht werden konnten. Dabei wurde die Wirkung von Butyrylcholin (10⁻³ mol·l⁻¹) mit derjenigen von ACh (10⁻³ mol·l⁻¹) verglichen. Es wird in dieser Arbeit angenommen, dass höhere Konzentrationen der Cholinester als bei den Ussing-Kammern-Versuchen benötigt wurden, um eine Wirkung zu erzielen, da die Versuche an den isolierten Krypten bei Raumtemperatur und nicht, wie die Ussing-Kammer-Versuche, bei 37 ° C stattfanden, sodass das fehlende Temperaturoptimum durch eine höhere Konzentration kompensiert wurde. Beide Substanzen wurden per Superfusion (Superfusionsgeschwindigkeit von 250 ml·h⁻¹ bei einem Kammervolumen von ca. 2 ml, was eine schnelle Applikation der Ester erlaubt) den isolierten Krypten zugeführt.

Butyrylcholin bewirkte im Vergleich zu ACh nur eine geringere und inkonsistentere Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration (Abb. 3.21). Gemessen wurden 71 Zellen, denen zuerst Butyrylcholin und nach einem Waschschrift ACh appliziert wurde. 21 % der Zellen reagierten auf Butyrylcholin mit einem Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals von $0,15 \pm 0,01$ (n = 15). Demgegenüber standen 66 % der Zellen, die auf die nachfolgende Zugabe von ACh mit einem Anstieg der Fura-2-Ratio um $0,43 \pm 0,06$ (n = 47) reagierten.

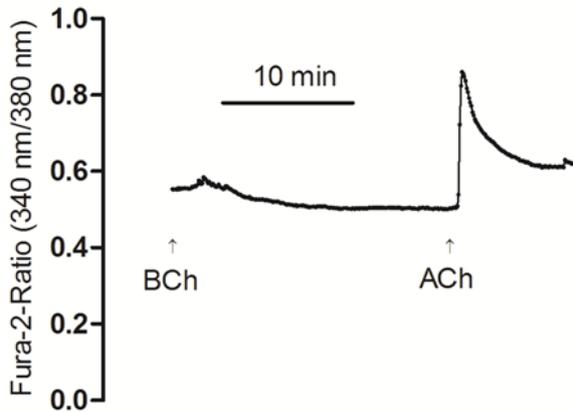


Abb. 3.21 Wirkung von Butyrylcholin und Acetylcholin auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration

Hier ist ein Originalkurvenverlauf einer Fura-2-Imaging-Messung an einer Kryptenzelle dargestellt. Die Zugabe von Butyrylcholin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) führte im Vergleich zu der Zugabe von Acetylcholin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nur zu einem geringen Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals.

3.7.2 Dimethylphenylpiperazinium und Butyrylcholin an isolierten Krypten

In den Ussing-Kammer-Versuchen ließ sich die Wirkung von Butyrylcholin zu mehr als 95 % durch Atropin und zu mehr als 70 % Hexamethonium hemmen. Diese „Überadditivität“ deutet an, dass möglicherweise eine Co-Stimulation von epithelialen Muskarin- und Nikotinrezeptoren, die sich in ihrer Wirkung gegenseitig potenzieren, notwendig ist, um einen maximalen Effekt auszulösen. Um diese Hypothese zu testen, wurde Butyrylcholin gemeinsam mit Dimethylphenylpiperazinium (DMPP), einem nikotineren Agonisten (Trapper und Lewand 1981), appliziert und Änderungen im Fura-2-Ratio Signal der isolierten Krypten gemessen. DMPP alleine bewirkt keinen Calcium-Anstieg in der Fura-2-Imaging-Messung (persönliche Mitteilung Prof. Dr. M. Diener, 2018).

Im Vergleich zur alleinigen Applikation von Butyrylcholin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Abb. 3.21) kam es bei der Gabe von Butyrylcholin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in Kombination mit DMPP ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zu einem signifikant größeren Anstieg des Fura-2-Signals. An 107 getesteten Zellen löste die Kombination beider Agonisten an 8 Zellen (8 %) einen Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals um $0,25 \pm 0,05$ aus (Abb. 3.22). Dies war signifikant höher als die Antwort auf Butyrylcholin allein (Abb. 3.23). Hier reagierten 15 von 71 der Zellen (21 %) auf Butyrylcholin mit einem Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals von $0,15 \pm 0,01$.

Die nachfolgende Applikation von ACh ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) führte bei 65 der getesteten 107 Zellen (ca. 60 %) zu einem Anstieg des Fura-2 Signals um $0,47 \pm 0,05$. So wurde sichergestellt, dass an vitalen Zellen gemessen wurde.

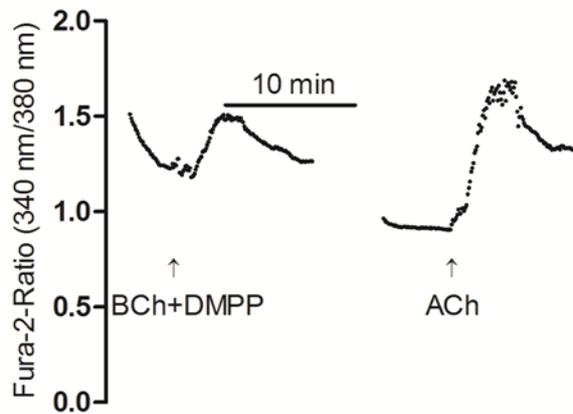


Abb. 3.22 DMPP unterstützt die Butyrylcholin-Antwort

Hier ist ein Originalkurvenverlauf einer Fura-2-Imaging-Messung an einer Kryptenzelle dargestellt. Die Zugabe von Butyrylcholin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in Kombination mit DMPP ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) führte zu einer Veränderung der zytosolischen Calcium-Konzentration. Am Ende des Versuchs wurde Acetylcholin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) appliziert, um die Reaktionsfähigkeit der Kryptenzelle auf die Stimulation cholinergere Rezeptoren zu überprüfen. Statistik s. Abb. 3.23.

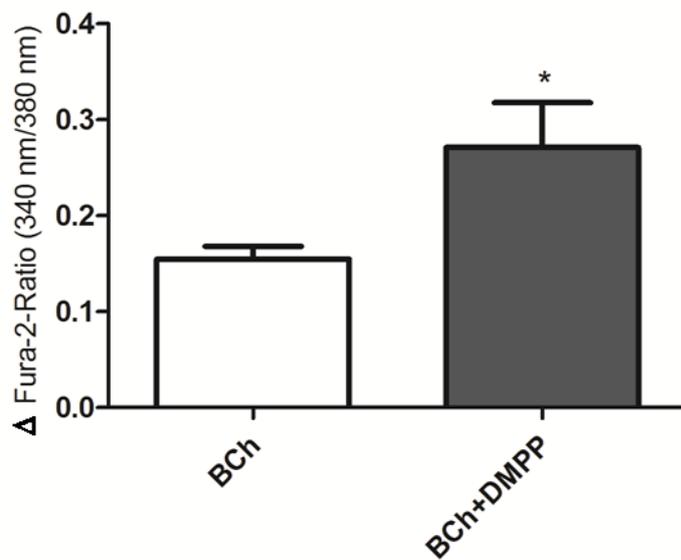


Abb. 3.23 DMPP verstärkt die Butyrylcholin-Antwort signifikant

Der weiße Balken stellt den Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration (gemessen als Fura-2 Ratio-Signal) nach Zugabe von Butyrylcholin ($10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen *Baseline* direkt vor der Zugabe dar ($n = 15$). Der graue Balken steht für den Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration nach Zugabe von Butyrylcholin ($10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) und DMPP ($10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) ($n = 8$). Die vertikalen Linien stehen für den SEM. T-Test für unabhängige Stichproben * $p < 0,05$ versus Δ Fura-2-Ratio bei der alleinigen Zugabe von Butyrylcholin.

4 Diskussion

ACh ist nicht nur ein Neurotransmitter, sondern wird auch parakrin als Mediator von Zellen des so genannten non-neuronalen cholinergen Systems freigesetzt. Zu diesem System gehören hauptsächlich epitheliale Zellen mit Barrierefunktion, z.B. in der Haut, in den Luftwegen oder im Gastrointestinaltrakt, sowie Zellen mit Abwehrfunktion wie Makrophagen oder Granulozyten. All diese Zellen produzieren ACh und setzen diesen Botenstoff frei (Wessler et al. 2003).

Bader (2014) charakterisierte Transporter und Enzyme des non-neuronalen Acetylcholins am Kolon der Ratte und zeigte, dass lediglich die bereits von Klapproth (1997) nachgewiesene Cholinacetyltransferase vom Oberflächenepithel exprimiert wird und an der Synthese von ACh beteiligt ist.

Bader (2014) brachte außerdem Butyrylcholin und Propionylcholin als atypische Agonisten im non-neuronalen cholinergen System des Rattenkolon in die aktuelle Diskussion. Bislang war lediglich das Ausgangsprodukt von Propionylcholin - die kurzkettige Fettsäure Propionat - als Induktor einer Acetylcholinfreisetzung am Kolonepithel bekannt (Yajima et al. 2011a). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Vorkommen und Funktionsweise beider atypischen Ester am distalen Rattenkolon genauer zu untersuchen.

Für die Publikation aus dem Jahre 2016 (siehe Kapitel 7) wurde der EC_{50} -Wert (Wert der mittleren effektiven Konzentration) am Mucosa-Präparat mit ca. $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ für Butyrylcholin und ca. $2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ für Propionylcholin ermittelt. Dies zeigt eine deutlich geringere Affinität der atypischen Ester für die Acetylcholin-Rezeptoren. Der maximale Anstieg des I_{sc} lag jedoch im gleichen Bereich wie derjenige, der durch Acetylcholin hervorgerufen wurde, was darauf hinweist, dass sie als volle Agonisten wirken. Für Propionylcholin wurde außerdem ein konstanter Anstieg des I_{sc} bis zu einer Konzentration von $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ gemessen.

4.1 Physiologisches Vorkommen von Butyrylcholin und Propionylcholin

Es ist bekannt, dass hohe Mengen an kurzkettigen Fettsäuren im Kolon durch bakterielle Fermentation entstehen. Hierbei fallen Acetat, Propionat und Butyrat in einem Verhältnis von 60:20:20 bei einer Gesamtkonzentration von etwa $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ an (Binder 2010). Da diese kurzkettigen Fettsäuren schnell über Diffusion oder Anionentransporter (vgl. Hadjiagapiou et al. 2000) in die Zelle gelangen, stellte sich die Frage, ob die epitheliale Cholinacetyltransferase daraus auch die entsprechenden Cholinester synthetisiert.

Für das Rattenkolon konnte in DESI-Messungen tatsächlich der Nachweis für das physiologische Vorkommen von Propionylcholin und Butyrylcholin erbracht werden. Die

Signalstärke von Propionylcholin betrug $2,6 \pm 0,85$ % im Vergleich zu epitheliale ACh. Butyrylcholin wies eine Signalstärke von $2,3 \pm 0,46$ % im Vergleich zu epitheliale ACh auf. Unter dem hohen Druck und der hohen Spannung des Elektrosprays werden bei den DESI-Messungen vermutlich die Zellmembranen des Kolonepithels zerstört, sodass man annehmen kann, dass diese Messungen die intrazellulären Konzentrationen der Ester zeigen.

In dieser Arbeit wurde somit nachgewiesen, dass das Epithel mit seiner (wie in Kapitel 4.1.1. noch beschrieben) Enzymausstattung auch Butyryl- und Propionylcholin neben ACh produzieren könnte. Man kann folglich annehmen, dass unter physiologischen Bedingungen im Kolon der Ratte kontinuierlich verschiedene Cholinester freigesetzt werden. Die jeweiligen Konzentrationen hängen von der aufgenommenen Nahrung ab, da abhängig vom Substratangebot die bakterielle Flora unterschiedliche kurzkettige Fettsäuren synthetisiert (Bugaut 1987).

Es bleibt also noch herauszufinden, inwieweit über ein Eingreifen in die Produktion der kurzkettigen Fettsäuren im Kolon (beispielsweise über ballaststoffreiche Nahrung oder Antibiotikatherapie) die jeweiligen Konzentrationen moduliert werden können und ob dies Auswirkung auf die Regulation der Funktion der Darmschleimhaut durch das epitheliale cholinerge System (Yajima et al. 2011b) hat. Auch bleibt noch offen, ob die Bakterienflora ebenfalls die atypischen Ester produziert.

4.1.1 Synthese und Abbau

Am Gehirn der Ratte wurde schon früh nachgewiesen, dass die Cholin-acetyltransferase dieselbe Affinität für Acetyl-CoA, Propionyl-CoA und Butyryl-CoA aufweist (Rossier 1977). Die Expression der Cholinacetyltransferase wurde bereits im Kolonepithel des Menschen (Klapproth et al. 1997) nachgewiesen. Bader (2014) zeigte diese Expression auch im Kolon der Ratte, sodass man aufbauend auf den DESI-Analysen nun davon ausgehen kann, dass auch Propionyl- und Butyrylcholin von der epithelialen Cholinacetyltransferase im Kolon der Ratte produziert werden.

Der Abbau von ACh erfolgt - wie am Kolonepithel histochemisch nachgewiesen (Bader und Diener 2015) - u.a. über die Acetylcholinesterase bzw. Butyrylcholinesterase. Außerdem kann man annehmen, dass die Acetylcholinesterase der Ratte stärker von Eserin gehemmt wird als die Butyrylcholinesterase der Ratte (Bitzinger et al. 2016). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Blockade der Acetylcholinesterase die Wirkung von Butyrylcholin am Mucosa-Präparat verlängert und so der Abbau von Butyrylcholin auch durch die Acetylcholinesterase katalysiert wird.

4.2 Atypische Agonisten im non-neuronalen cholinergen System

Die mögliche Rolle von Butyrylcholin und Propionylcholin als Agonisten des non-neuronalen ACh untersuchte schon Bader (2014): In Ussing-Kammer-Versuchen am Mucosa-Submucosa-Präparat wurde von ihr nachgewiesen, dass Butyrylcholin und Propionylcholin einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Kurzschlussstroms bewirkten.

Darauf aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob diese Ester auch am Mucosa-Präparat, also in Abwesenheit des *Plexus submucosus*, eine Anionensekretion auslösen. Hierbei wurden durch die mechanische Ablation der *Submucosa* die sekretomotorischen Neuronen des *Plexus submucosus* entfernt, sodass die Cholinester nur über Rezeptoren direkt an den Epithelzellen wirken konnten. Beide Ester führten in Ussing-Kammer-Versuchen mit Mucosa-Präparaten zu einem Anstieg des Kurzschlussstroms. Die Amplitude des durch die atypischen Ester induzierten I_{sc} ist von der Größenordnung her vergleichbar mit dem maximalen Anstieg, den klassische Agonisten von cholinergen Rezeptoren wie ACh oder Carbachol auslösen (Strabel und Diener 1995). Sie wirken also als volle Agonisten an den cholinergen Rezeptoren. Vergleicht man die notwendigen Konzentrationen in Relation zu ACh (s. z.B. Diener et al. 1989a), so fällt auf, dass höhere Konzentrationen der beiden atypischen Ester notwendig sind, um eine Cl^- -Sekretion auszulösen; sie scheinen also eine insgesamt eine niedrigere Affinität als natives ACh zu den beteiligten cholinergen Rezeptoren zu besitzen. Diese atypischen Ester haben womöglich bei den physiologisch vorkommenden Konzentrationen über eine Desensitivierung der Rezeptoren eher eine modulierende Funktion auf das stärker wirkende und in höheren Konzentrationen vorkommende ACh. Dies ähnelt der Wirkung von Cholin im Kolon der Ratte, welches die muskarinergen Rezeptoren desensitiviert (Bader und Diener 2015).

Im darauf folgenden Anionensubstitutionsversuch waren die Butyryl- und auch die Propionylcholin-Antwort unter chloridfreien Bedingungen signifikant reduziert. Beide Ester führen also zu einer Chlorid-Sekretion - so wie ACh (Strabel und Diener 1995).

Eine Vorbehandlung mit Tetrodotoxin führte zu keiner signifikanten Veränderung des durch die atypischen Cholinester induzierten Stromanstiegs, sodass eine Beteiligung von Natriumkanälen an verbliebenden Nervenendigungen unwahrscheinlich ist.

4.2.1 Rezeptorwirkung

Um der Frage, an welchen Rezeptoren Butyrylcholin und Propionylcholin ihre Wirkung entfalten, nachzugehen, wurde Atropin als muskarinerges Antagonist eingesetzt. Da Bader und Diener (2014) nachweisen konnten, dass auch nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren im Kolonepithel der Ratte von funktioneller Bedeutung sind, wurde zudem Hexamethonium als unselektiver Hemmer von nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren (Baranowska et al. 2008) eingesetzt. Atropin wie auch Hexamethonium führten am Mucosa-Präparat zu einer signifikanten Hemmung der Butyrylcholinantwort. Die Propionylcholinantwort wurde lediglich durch Atropin signifikant gehemmt. Im Gegensatz dazu führte am Mucosa-Präparat Hexamethonium zu keiner signifikanten Hemmung der Propionylcholinantwort.

Daraus lässt sich schließen, dass womöglich eine Co-Stimulation von Muskarin- und Nikotinrezeptoren notwendig ist, um eine volle Antwort auf Butyrylcholin auszubilden. Diese Potenzierung der sekretorischen Antwort, wenn beide Rezeptoren gleichzeitig stimuliert werden, scheint bei Propionylcholin weniger ausgeprägt zu sein.

Da am Kolonepithel M1 und M3 muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren beschrieben sind (Lindqvist et al. 1998, Haberberger et al. 2006, Khan et al. 2013), wurden die Effekte von Butyrylcholin und Propionylcholin in Gegenwart von selektiven M1- und M3-Antagonisten untersucht, um zu überprüfen, welcher muskarinerge Acetylcholin-Rezeptorsubtyp ihre Antwort vermittelt. Die selektiven M1-Rezeptor-Blocker (Pirenzepin und Telenzepin) bewirkten zwar eine statistisch signifikante Hemmung der Butyrylcholinantwort, die im Vergleich zu der über 80 %-igen Hemmung über die M3-Rezeptor-Blocker (Darifenacin und J104129) aber wesentlich geringer war. Ein ähnliches Muster, d.h. eine moderate Hemmung durch die M1-Rezeptorblocker Telenzepin und Pirenzepin und eine starke Hemmung durch die M3-Rezeptorblocker Darifenacin und J104129, wurde in der vorliegenden Arbeit auch bei der Antwort der Mucosa-Präparate auf Propionylcholin beobachtet. Es spielen somit beide Subtypen von muskarinergen Rezeptoren bei der Vermittlung der epithelialen Antwort auf atypische Cholinester eine Rolle. Die stärkere Hemmung durch M3-Antagonisten könnte bedeuten, dass entweder M3-Rezeptoren stärker vom Epithel exprimiert werden als M1-Rezeptoren oder aber, dass sie mit höherer Effektivität an die intrazellulären Signalwege, die in die Regulation der intestinalen Cl⁻-Sekretion eingebunden sind, gekoppelt sind. Abb. 4.1 zeigt einen Überblick der eingesetzten Rezeptorblocker und den Kreislauf der atypischen Cholinester am Kolon der Ratte.

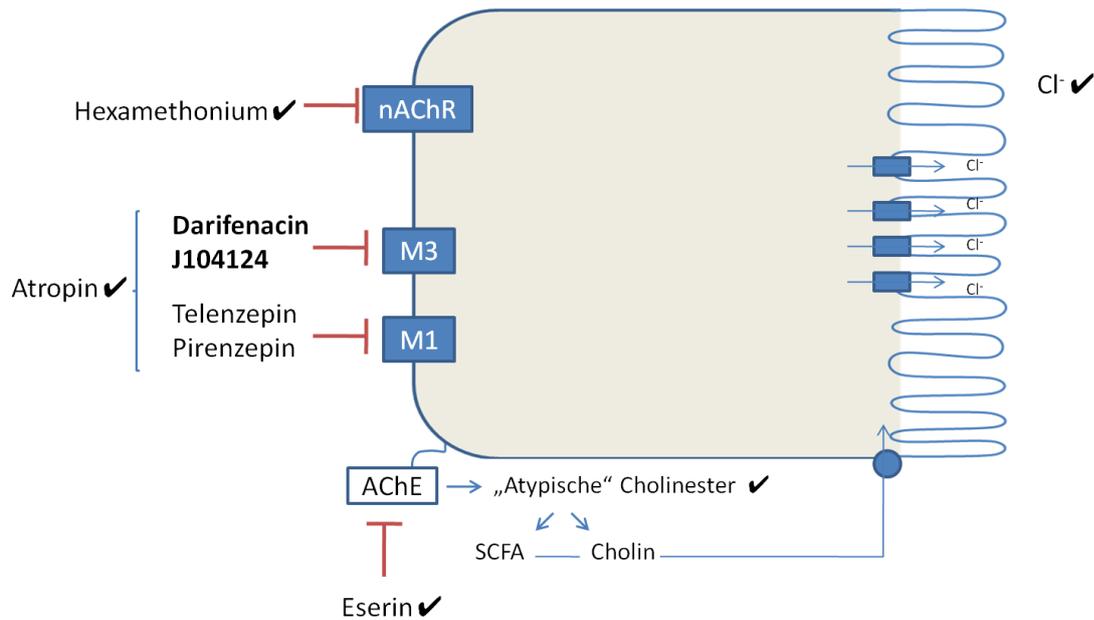


Abb. 4.1 Ussing-Kammer-Versuche: Rezeptorwirkung

Die Abbildung zeigt schematisch eine Zelle des Kolonepithels. An der serosalen Seite sind die muskarinergen Rezeptoren (M1- und M3-Rezeptor), ein nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor (nAChR), sowie die membrangebundene Acetylcholinesterase (AChE), die die Cholinester in kurzkettenige Fettsäuren (SCFA) und Cholin spaltet, dargestellt. Auf der mucosalen Seite sind die Cl⁻-Kanäle abgebildet. Zudem sind alle eingesetzten Hemmsubstanzen in den Ussing-Kammer-Versuchen zur Untersuchung der Rezeptorwirkung eingetragen. Die Häkchen bedeuten, dass die Wirkung der eingesetzten Hemmstubsenzen (bzw. die Vermittlung des I_{sc}-Anstiegs, den atypische Cholinester auslösen, durch eine Cl⁻-Sekretion) experimentell in dieser Arbeit überprüft wurden.

4.2.2 Intrazelluläre Signalkaskade

Aus den Ussing-Kammer-Versuchen geht hervor, dass Butyrylcholin eine etwas höhere Affinität zu muskarinergen Rezeptoren als Propionylcholin aufweist, da höhere Konzentrationen an Atropin notwendig waren, um eine vergleichbare Hemmwirkung zu erzielen. Zur Untersuchung der Signaltransduktion wurde daher lediglich Butyrylcholin als Agonist eingesetzt.

Butyrylcholin bewirkt über die Stimulation von muskarinergen sowie nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren eine Cl⁻-Sekretion am Mucosa-Präparat. Ein Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration kann eine Cl⁻-Sekretion induzieren (Hennig et al. 2008). Das Calcium kann hierbei aus intrazellulären Speichern oder durch den Einstrom aus dem extrazellulären Raum ins Zytosol gelangen. Die Versuche mit 2-APB und die Calcium-Substitutionsversuche ergaben, dass ein calciumfreier Puffer nur eine geringe (und statistisch nicht signifikante) Abschwächung von ca. 40 % der Butyrylcholinantwort bewirkte. Der intrazelluläre Calcium-Speicher, das Endoplasmatische Retikulum, scheint über die IP₃-

Rezeptoren eine deutlich einflussreichere Rolle in der Signalkaskade zu spielen. Hierbei kann der Ca^{2+} /Calmodulin-Weg, der zur Aktivierung von calciumabhängigen Chloridkanälen führt (Hartzell et al. 2005), als Signalweg von Butyrylcholin ausgeschlossen werden, da ein Calmodulinantagonist, das Calmidazolium, unwirksam war.

4.2.3 Rolle des intrazellulären Calciums

Die Rolle von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bei der Wirkung von Butyrylcholin am

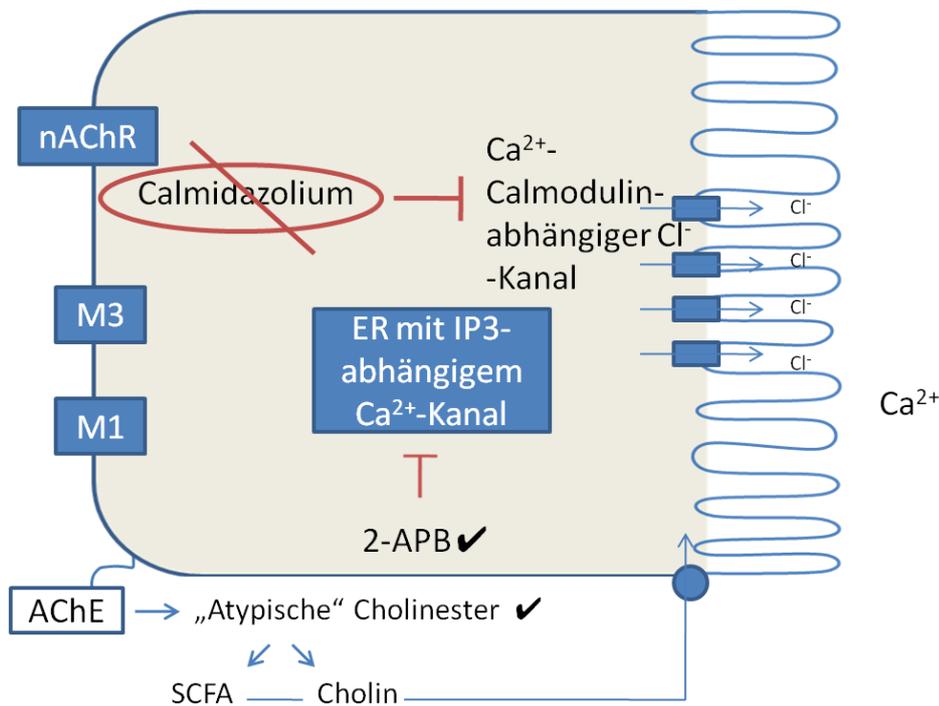


Abb. 4.2 Ussing-Kammer-Versuche: intrazelluläre Signalkaskade

Die Abbildung zeigt schematisch eine Zelle des Kolonepithels. An der serosalen Seite sind die muskarinergen Rezeptoren (M1- und M3-Rezeptor), ein nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor (nAChR), sowie die membrangebundene Acetylcholinesterase (AChE), die die Cholinester in kurzkettinge Fettsäuren (SCFA) und Cholin spaltet, dargestellt. In der Zelle ist das endoplasmatische Retikulum (ER) schematisch abgebildet. Auf der mucosalen Seite sind die Cl^- -Kanäle abgebildet. In dieser Abbildung sind die Blocker und die Puffervariation „calciumfrei“ eingetragen. Die Häkchen bedeuten wieder, dass diese Substanzen eine Wirkung auf die Butyryl- bzw. Propionylcholinantwort erzielen. Die umkreisten, durchgestrichenen Substanzen hatten keinen Einfluss auf die Butyryl- bzw. Propionylcholinantwort.

Kolonepithel wurde weiter in Ca^{2+} -Imaging-Versuchen an isolierten Krypten untersucht. Hierbei bewirkte Butyrylcholin im Vergleich zu ACh nur eine geringere und inkonsistentere Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration: Nur ein kleiner Anteil der Zellen reagierte auf Butyrylcholin, während die überwiegende Mehrheit auf ACh eine Antwort zeigte.

4.3 Co-Stimulation von muskarinergen und nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren

Da sich in den Ussing-Kammer-Versuchen die Wirkung von Butyrylcholin zu mehr als 95 % durch Atropin und zu mehr als 70 % durch Hexamethonium hemmen ließ, wurde weitergehend in Imaging-Versuchen Butyrylcholin gemeinsam mit DMPP, einem nikotineren Agonisten (Trapper und Lewand 1981), an isolierten Krypten appliziert und Änderungen im Fura-2-Ratio-Signal gemessen, um eine Co-Stimulation des Ca^{2+} -Signalwegs zu zeigen. Diese Messungen bestätigten in der Tat, dass es bei der Gabe von Butyrylcholin in Kombination mit DMPP zu einem signifikant größeren Anstieg des Fura-2-Signals kommt, wenn beide Agonisten kombiniert werden. Diese „Überadditivität“ deutet an, dass eine Co-Stimulation von epithelialen Muskarin- und Nikotinrezeptoren, die sich in ihrer Wirkung gegenseitig potenzieren, notwendig ist, um einen maximalen Effekt der Butyrylcholinantwort auszulösen.

4.4 Fazit: Rolle der Agonisten am Kolonepithel der Ratte

Durch bakterielle Fermentation von Strukturkohlenhydraten am Kolonepithel entstehen kontinuierlich Konzentrationen von etwa $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Butyrat und Propionat (Binder 2010). Die Gesamtkonzentration an kurzkettigen Fettsäuren beträgt $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Bugaut 1987). Damit stellen Acetat, Butyrat und Propionat den Hauptteil der Anionen im Kolonlumen dar (Charney et al. 1998). Die epitheliale Cholinacetyltransferase ist im Rattenkolon nachgewiesen worden und wird für die Synthese von ACh funktionell verantwortlich gemacht (Bader 2014). Die kurzkettigen Fettsäuren Butyrat und Propionat gelangen über Diffusion (Hadjiagapiou et al. 2000) oder einen apikalen SCFA⁻-HCO₃⁻-Austauscher (Mascolo et al. 1991, Harig et al. 1991, Harig et al. 1996) in die Epithelzellen. Die Fragen, ob die dann entstehenden Ester in der Zelle gespeichert werden und wie sie freigesetzt werden, bleiben noch offen. Gesichert wurde durch diese Arbeit das physiologische Vorkommen der beiden vermeintlich „untypischen“ Ester. Diese fungieren, wie auch ACh, im Kolon als non-neuronale Botenstoffe, die Auskunft über das aktuelle Darmmilieu und die aktuelle Bakterienaktivität bzw. das Mikrobiom („Darmflora“) geben können. Ihre Wirkung gleicht auf den ersten Blick der von ACh: Über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zu einer Sekretion von Chlorid in das Darmlumen. Doch aufgrund der physiologisch weitaus geringeren Konzentration im Vergleich zu ACh muss ihre Wirkung mehr als modulierend interpretiert werden. Die atypischen Ester binden an die gleichen Rezeptoren wie ACh und bewirken eine Chlorid-Sekretion. Diese fällt jedoch auch affinitätsbedingt geringer aus, sodass diese Rezeptoren für eine volle Wirkung des stärkeren Acetylcholins vielmehr desensitiviert werden.

Kurzkettige Fettsäuren, die Ausgangsstoffe von ACh bzw. der beiden atypischen Cholinester in der Darmschleimhaut, spielen aber auch eine Rolle bei der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe (Rao et al. 1988) oder anderen Darmerkrankungen. Das Ausgangsprodukt von Propionylcholin - die kurzkettige Fettsäure Propionat - gilt als Induktor einer Acetylcholinfreisetzung am Kolonepithel (Yajima et al. 2011a).

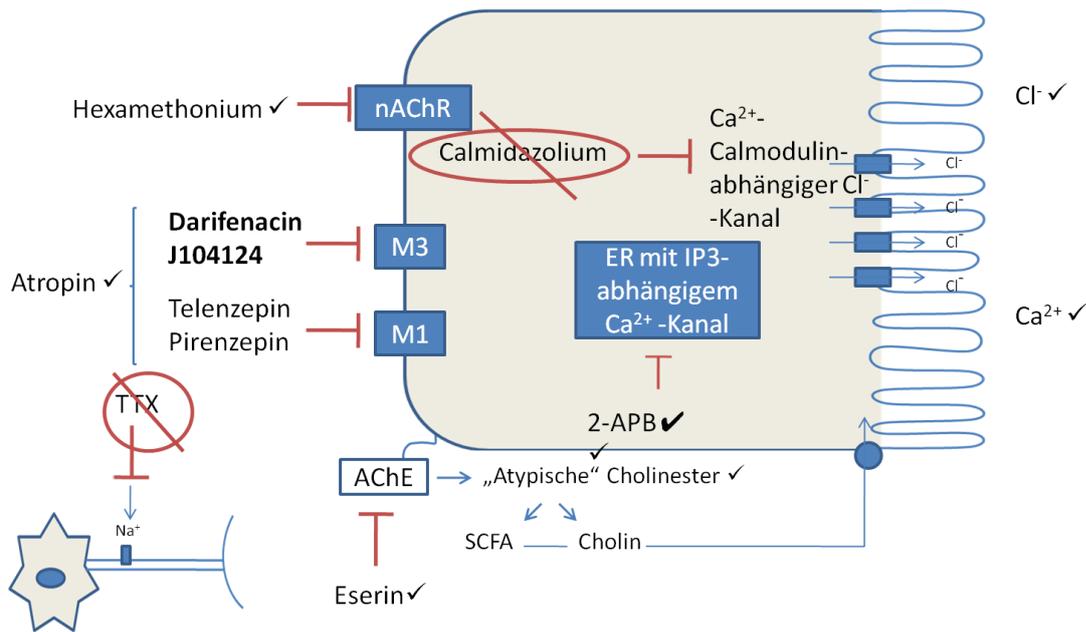


Abb. 4.3 Ergebnisse im Überblick

Die Abbildung zeigt schematisch eine Zelle des Kolonepithels. An der serosalen Seite sind die muskarinergen Rezeptoren (M1- und M3-Rezeptor), ein nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor (nAChR), sowie die membrangebundene Acetylcholinesterase (AChE), die die Cholinester in kurzkettinge Fettsäuren (SCFA) und Cholin spaltet, dargestellt. Zudem ist ein Natriumkanal einer Nervenendigung schematisch serosal abgebildet. In der Zelle ist das endoplasmatische Retikulum (ER) schematisch abgebildet. Auf der mucosalen Seite sind die Cl⁻-Kanäle abgebildet. In dieser Grafik sind die Blocker, die in den Ussing-Kammer-Versuchen eingesetzt wurden, mit dem jeweiligen Wirkort sowie die Puffervariationen (chloridfrei bzw. calciumfrei) eingetragen. Die Häkchen bedeuten, dass diese Substanzen eine Wirkung auf die Butyrylcholin- bzw. Propionylcholinantwort erzielten. Die umkreisten, durchgestrichenen Substanzen hatten keinen Einfluss auf die Butyrylcholin- bzw. Propionylcholinantwort.

Die Idee, über Probiotika Darmerkrankungen wie die Antibiotika-assoziierte Diarrhö prophylaktisch zu behandeln (Beniwal 2003), könnte somit um das non-neuronale cholinerge System erweitert werden. Nicht nur die Bakterienkolonisation, sondern auch das Substratangebot für die epitheliale Cholinacetyltransferase spielt hierbei eine wichtige Rolle. Bei Wiederkäuern konnte nachgewiesen werden, dass die Zusammensetzung des Futters die Produktion von kurzkettingen Fettsäuren im Vormagen wesentlich beeinflusst (Church 1988). Das heißt, über die Änderung der Nahrung oder auch der Darmflora könnte man die Produktion kurzkettinger Fettsäuren beeinflussen. Hier stellt sich die Frage, wie diese primär auf die Cl⁻-Sekretion wirken: Zum einen können sie direkt über eine Stimulierung der Freisetzung von ACh eine Cl⁻-Sekretion bewirken, aber womöglich auch gleichzeitig über die Freisetzung von atypischen Cholinestern, die wiederum die Rezeptoren desensitivieren, die

Sekretion dämpfen. Zum anderen sind sie notwendige Substrate, damit die atypischen Cholinester überhaupt synthetisiert werden können.

4.5 Das non-neuronale cholinerge System

Das Kolonepithel ist Teil des sogenannten non-neuronalen cholinergen Systems, zu dem in der Hauptsache epitheliale Zellen mit Barrierefunktion wie z.B. in der Haut, in den Luftwegen oder im Gastrointestinaltrakt, sowie Zellen mit Abwehrfunktion wie Makrophagen oder Granulozyten gehören (Wessler et al. 2003).

Haut und Schleimhäute erfüllen eine Barriere- und Abwehrfunktion. Beide sind Teil des angeborenen Immunsystems. Damit sie diese lebenswichtige Aufgabe erfüllen können, muss die Haut bzw. müssen die Schleimhäute intakt sein und über einen Signalweg verfügen, der u.a. die Zellen des angeborenen Immunsystems alarmiert. Intakt bzw. geschützt vor mechanischen und pathogenen mikrobiellen Einflüssen bleibt die Schleimhaut, wenn sie über eine adäquate Mucusschicht verfügt. In diesem, auf den ersten Blick, einfachen Zusammenhang haben mittlerweile bereits viele Arbeiten eine besondere Rolle des non-neuronalen cholinergen Systems gezeigt (Wessler et al. 2003). Im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren synthetisieren also auch Epithelzellen des Kolons ACh (Klapproth et al. 1997, Bader et al. 2014) und, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, zusätzlich Butyrylcholin und Propionylcholin.

Im non-neuronalen System des respiratorischen Epithels werden von luminal aus cholinerge Rezeptoren auf Makrophagen und apikale Rezeptoren des Lungeneithels parakrin über non-neuronales ACh angesprochen. Außerdem erhalten auch sensorische Neurone der oberen Atemwege über nikotinerge Rezeptoren von non-neuronalem bzw. epitheliale ACh Informationen wie z.B. über pathogene Keime (Kummer und Krasteva-Christ 2014). Auch spielen muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren womöglich eine wichtige Rolle in der Kontrolle der neuronal stimulierten Schleimsekretion in den Luftwegen (Rogers 2002). Hier scheint ACh auch am inflammatorischen Prozess der COPD beteiligt zu sein (Gosens et al. 2004, Profita et al. 2005, Bateman et al. 2009, Profita et al. 2009).

Auch im Urothel konnte ein eigenständiges non-neuronales cholinerges System nachgewiesen werden (Klapproth et al. 1997, Lips et al. 2007b). Dieses unterscheidet sich bezüglich der Synthese und Freisetzung vom klassischen neuronalen cholinergen System, sodass hier ein neuer pharmakologischer Ansatz für die Therapie beispielsweise der überaktiven Blase gefunden werden könnte (Lips et al. 2007b). Auch dieses System könnte der Abwehr von pathologischen Keimen dienen.

In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass auch in der Plazenta non-neuronal ACh synthetisiert wird (Wessler et al. 2001). In der Plazenta soll ACh die Aufnahme von Nährstoffen, den Blutfluss in den Plazentagefäßen und die Vaskularisierung während der Plazentaentwicklung über die Stimulierung von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren und muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren steuern (Lips et al. 2005).

Das non-neuronale cholinerge System spielt zusätzlich in der Kutis eine herausragende Rolle: Hier sorgt es - wieder über nikotinerge und muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren vermittelt - für den Zusammenhalt der Keratinozyten, also die Zell-Zell-Adhäsion, sowie für die Zell-Matrix-Adhäsion (Grando et al. 2006). Dies ist besonders für Krankheiten wie z.B. dem Pemphigus vulgaris interessant, bei denen autoimmunbedingt die Zell-Zell-Kontakte gestört sind. Beim Pemphigus vulgaris finden sich Auto-Antikörper gegen das Desmoglein der Desmosomen. Es wird aber diskutiert, dass womöglich weitere Antikörper gegen Acetylcholin-Rezeptoren diese Krankheit mit bedingen (Grando et al. 2006). In-vivo-Experimente an Mäusen mit Pemphigus vulgaris zeigten, dass cholinerge Agonisten die Läsionen reduzierten (Fania et al. 2012). ACh wird aber nicht nur in den Keratinozyten, sondern auch in den Endothelzellen und insbesondere in immunkompetenten Zellen der Haut synthetisiert (Kurzen et al. 2007). Eine zusammenfassende Darstellung einer Auswahl der Organe des non-neuronalen cholinergen Systems gibt Tab. 1.1.

Das Kolonepithel ist durch seinen intensiven Kontakt mit dem Mikrobiom, mit welchem der Säuger in Symbiose lebt, ein besonderer Teil dieses allgemeinen non-neuronalen cholinergen Systems: Alle (Schleim-)häute, die sich im ständigen Kontakt mit der Außenwelt befinden, verfügen über eine physiologische mikrobielle Flora. Dies gilt für die Kutis, die Schleimhäute des oberen Respirationstrakts und des Urogenitaltrakts und, wie in den vorangehenden Kapiteln ausführlich geschildert, für die des Gastrointestinaltrakts. Diese Darmflora produziert also womöglich nicht nur im Kolon, sondern auch in anderen Schleimhäuten aus abgeschilferten Epithelzellen verschiedene kurzkettige Fettsäuren. Es bleibt herauszufinden, ob die cholinergen Agonisten Butyrylcholin und Propionylcholin in weiteren non-neuronalen cholinergen Systemen zu finden sind und eine besondere modulierende Rolle bei der cholinergen Signalübertragung spielen.

5 Zusammenfassung

Das Kolonepithel produziert ACh, welches freigesetzt wird, nachdem die kurzkettige Fettsäure Propionat an G-Protein gekoppelte Rezeptoren bindet. ACh wiederum induziert über cholinerge Rezeptoren eine epitheliale Anionensekretion. Das Schlüsselenzym der Acetylcholinsynthese, die Cholineacetyltransferase, verestert Cholin unselektiv mit kurzkettigen Fettsäuren. Da über die bakterielle Fermentation das Kolonepithel permanent hohen Konzentrationen von verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren ausgesetzt ist, stellte sich die Frage, ob auch andere Cholinester (also nicht nur ACh) wie PCh oder BCh am Kolonepithel produziert werden. In der Folge war zu untersuchen, ob diese „atypischen“ Ester ebenfalls cholinerge Rezeptoren stimulieren, was wiederum eine Anionensekretion bewirkt.

Experimentelles Vorgehen: Desorption electrospray ionization mass spectroscopy (DESI-MS) und Ussing-Kammer-Versuche wurden an Mucosa-Präparaten des distalen Rattenkolons durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration Fura-2-Messungen an Kolonkrypten durchgeführt.

Ergebnisse: Die Analyse mit der DESI-MS bestätigte das physiologische Vorkommen von ACh, PCh und BCh. In der Ussing-Kammer bewirkten beide atypischen Cholinester über die Stimulation einer Anionensekretion einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Kurzschlussstroms. Die Versuche mit Blockern wurden an Mucosa-Präparaten ohne Submucosa durchgeführt, um den Einfluss der Somata sekretomotorischer Neuronen des *Plexus submucosus* zu verringern und die Wirkung der Cholinester hauptsächlich auf die Rezeptoren direkt an den Epithelzellen zu beschränken. Im Gegensatz zu BCh, welches nikotinerge und muskarinerge Rezeptoren stimulierte, wirkte PCh überwiegend an muskarinergen Rezeptoren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Co-Stimulation beider Rezeptortypen nahe, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung potenzieren. Dies konnte auch mit Ca^{2+} -Imaging mit BCh bestätigt werden. In weiteren Ussing-Kammer-Versuchen wurde als Ursache für die Erhöhung des I_{sc} eine Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Sekretion nachgewiesen.

Schlussfolgerung und Ausblick: Diese Ergebnisse weisen auf einen Signalübertragungsweg hin, der der Kommunikation zwischen den Darmmikroben und dem Wirt dient, welche kurzkettige Fettsäuren produzieren. Hierbei wird über die epitheliale Produktion von Cholinestern das Kolonepithel parakrin beeinflusst. Hier stellt sich die Frage wie man den modulierenden Einfluss der atypischen Cholinester in der Therapie bzw. Prophylaxe von Diarrhö anwenden könnte.

6 Summary

The colonic surface epithelium produces acetylcholine, which is released after binding of propionate to G-protein coupled receptors for this short-chain fatty acid (SCFA). The consequence is the induction of epithelial anion secretion via stimulation of cholinergic receptors by epithelial acetylcholine. The key enzyme responsible for acetylcholine synthesis, choline acetyltransferase, is known to be unselective concerning the fatty acid used for esterification of choline. The colonic epithelium is permanently exposed to high concentrations of different SCFA, which are produced by bacterial fermentation. In this thesis the question was asked whether choline esters other than acetylcholine, i.e. propionylcholine or butyrylcholine, are produced by the colonic epithelium, too, and whether these 'atypical' esters are able to stimulate cholinergic receptors involved in the regulation of colonic ion transport.

Experimental approach: Desorption electrospray ionization mass spectroscopy (DESI-MS) and Ussing chamber experiments were performed at the mucosa of the distal colon of the rat. In addition the signal from Fura-2 in Ca^{2+} -imaging experiments was measured.

Key results: DESI-MS analyses revealed the production of acetylcholine, propionylcholine and butyrylcholine in the colonic surface epithelium. In Ussing chamber experiments, both atypical choline esters caused a concentration-dependent increase in short-circuit current, i.e. stimulated epithelial anion secretion. Inhibitor experiments in the absence of the submucosal plexus revealed mainly the stimulation of epithelial cholinergic receptors. While butyrylcholine obviously stimulated both nicotinic and muscarinic receptors, propionylcholine predominantly stimulated muscarinic receptors. Overadditive actions of antagonists for muscarinic and nicotinic suggest a co-stimulation of both receptor types at level of the epithelium. Ca^{2+} -imaging experiments with butyrylcholine directly confirmed this conclusion a co-stimulation. Additional Ussing chamber experiments revealed that the increase in short-circuit current is caused by a secretion of chloride, which is modulated by the intracellular calcium concentration.

Conclusions and Implications: These results suggest a novel pathway for communication between intestinal microbes producing SCFA and the host. This communication is mediated via modification of epithelial production of choline esters involved in the paracrine regulation of the colonic epithelium. Thus the question arises how the modulating effect of atypical choline esters could be used in therapy or prophylaxis of diarrhea.

7 Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit flossen in folgende Publikation ein:

Moreno S., Gerbig S., Schulz S., Spengler B., Diener M., Bader S. (2016)

Epithelial propionyl- and butyrylcholine as novel regulators of colonic ion transport
Brit. J. Pharmacol. 173(18): 2766–2779

8 Verzeichnisse

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Syntheseyklus des non-neuronalen Acetylcholins	5
Abb. 1.2 Signalkaskade M1-, M3- und M5-Rezeptoren.....	7
Abb. 1.3 Mögliche Wirkung von Butyrylcholin und Propionylcholin	10
Abb. 2.1 Isolierte Krypte aus dem distalen Rattenkolon.....	14
Abb. 2.2 Schema einer modifizierten Ussing-Kammer.....	15
Abb. 2.3 Ersatzschaltkreismodell von Ussing und Zerahn (1951) für ein Epithel	16
Abb. 2.4 Schaltbilder für (rechts) Open-circuit Modus und (links) Voltage-clamp Modus	17
Abb. 2.5 Aufbau des Ca^{2+} -Imaging-Messstandes	19
Abb. 2.6 Messung der aufgespannten Mucosa.....	22
Abb. 3.1 Nachgewiesene Signale im Mucosa-Homogenat	24
Abb. 3.2 Wirkung wiederholter Butyrylcholingabe auf den I_{sc}	26
Abb. 3.3 Wirkung wiederholter Propionylcholingabe auf den I_{sc}	28
Abb. 3.4 Konzentrationswirkungskurve für Butyrylcholin am Mucosa-Präparat.....	30
Abb. 3.5 Konzentrationswirkungskurve für Propionylcholin.....	31
Abb. 3.6 Butyrylcholin bewirkt eine Chlorid-Sekretion.....	32
Abb. 3.7 Propionylcholin bewirkt eine Chlorid-Sekretion.....	33
Abb. 3.8 Keine signifikante Hemmung der Propionylcholin-Antwort durch Tetrodotoxin	34
Abb. 3.9 Keine signifikante Hemmung der Butyrylcholin-Antwort durch TTX	34
Abb. 3.10 Atropin ($10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) hemmt den I_{sc} -Anstieg nach Zugabe von Butyrylcholin am Mucosa-Präparat	36
Abb. 3.11 Atropin ($10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) hemmt den I_{sc} -Anstieg nach Zugabe von Butyrylcholin am Mucosa-Präparat	36
Abb. 3.12 Atropin hemmt den I_{sc} -Anstieg nach Zugabe von Propionylcholin am Mucosa-Präparat.....	37
Abb. 3.13 Einfluss der Blockade der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren auf BCh-Wirkung	39
Abb. 3.14 Einfluss der Blockade der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren auf PCh-Wirkung	39
Abb. 3.15 Hexamethonium hemmt den I_{sc} -Anstieg nach Zugabe von Butyrylcholin am Mucosa-Präparat	42
Abb. 3.16 Eserin senkt die Geschwindigkeit des ΔI_{sc} Peak-Abfalls	44
Abb. 3.17 Eserin verlängert die Zeit des ΔI_{sc} Peak-Abfalls.....	45
Abb. 3.18 Der IP_3 -Rezeptorblocker 2-APB hemmt die Wirkung von Butyrylcholin.	46
Abb. 3.19 Wirkung von Butyrylcholin in der An- und Abwesenheit von Ca^{2+} auf der serosalen Seite.....	47
Abb. 3.20 Wirkung von Calmidazolium auf die Butyrylcholinantwort	48

Abb. 3.21 Wirkung von Butyrylcholin und Acetylcholin auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration	50
Abb. 3.22 DMPP unterstützt die Butyrylcholin-Antwort	51
Abb. 3.23 DMPP verstärkt die Butyrylcholin-Antwort signifikant.....	52
Abb. 4.1 Ussing-Kammer-Versuche: Rezeptorwirkung	57
Abb. 4.2 Ussing-Kammer-Versuche: intrazelluläre Signalkaskade	58
Abb. 4.3 Ergebnisse im Überblick.....	61

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Das non-neuronale cholinerge System (eine Auswahl der beteiligten Organe).....	3
Tab. 3.1 Wirkung wiederholter Butyrylcholingabe auf den I_{sc}	27
Tab. 3.2 Wirkung wiederholter Propionylcholingabe auf den I_{sc}	28
Tab. 3.3 Konzentrationswirkungskurve von Butyrylcholin am Mucosa-Präparat	30
Tab. 3.4 Konzentrationswirkungskurve von Propionylcholin am Mucosa-Präparat	31
Tab. 3.5 Einfluss der Blockade der muskarinergen Acetylrezeptoren auf die Wirkung von Butyrylcholin	40
Tab. 3.6 Einfluss der Blockade der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren auf die Wirkung von Propionylcholin.....	41

8.3 Literaturverzeichnis

Adkins CE, Morris SA, De Smedt H, Sienaert I, Török K, Taylor CW (2000) Ca^{2+} -calmodulin inhibits Ca^{2+} release mediated by type-1,-2 and -3 inositol triphosphate receptors. *Biochem J* 345: 357-363

Albuquerque EX, Akaike A, Shaw KP, Rickett DL (1984) The interaction of anticholinesterase agents with the acetylcholine receptor-ionic channel complex *Fundam Appl Toxicol* 4:S27-S33

Ambache N (1955) The use and limitations of atropine for pharmacological studies on autonomic effectors. *Pharmacol Rev* 7: 467-494

Andres H, Bock R, Bridges RJ, Rummel W, Schreiner J (1985) Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa. *J Physiol* 364: 301-312

Bader S (2014) Das non-neuronale cholinerge System des Kolons der Ratte. Inauguraldissertation, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2014/11250/pdf/BaderSandra_2014_11_12.pdf

Bader S, Diener M (2015) Novel aspects of cholinergic regulation of colonic ion transport. *Pharmacol Res Perspec* 3: e00139 (doi: 10.1002/prp2.139)

Bader S, Diener M (2018) Segmental differences in the non-neuronal cholinergic system in rat caecum. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 470: 669-679

Bader S, Klein J, Diener M (2014) Choline acetyltransferase and organic cation transporters are responsible for synthesis and propionate-induced release of acetylcholine in colon epithelium. *Eur J Pharmacol* 733: 23-33

Baranowska U, Gothert M, Rudz R, Malinowska B (2008) Methanandamide allosterically inhibits in vivo the function of peripheral nicotinic acetylcholine receptors containing the alpha 7-subunit. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 912–919

Barrett KE, Keely SJ (2000) Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62: 535-572

Bateman ED, Rennard S, Barnes PJ, Diczpinigaitis PV, Gosens R, Gross NJ, Nadel JA, Pfeifer M, Racké K, Rabe KF, Rubin BK, Welte T, Wessler I (2009) Alternative mechanisms for tiotropium. *Pulm Pharmacol Ther* 22: 533-42

- Bayer G, Wense T** (1936) Über den Nachweis von Hormonen in einzelligen Tieren. *Pflügers Arch* 237:417-422
- Baylor SM, Hollingworth S** (2000) Measurement and interpretation of cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ signals from calcium-indicator dyes. *News Physiol Sci* 15: 19–26
- Beniwal RS, Arena VC, Thomas L, Narla S, Imperiale TF, Chaudhry RA, Ahmad UA** (2003) A randomized trial of yogurt for prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Dig Dis Sci.* 48:2077-82
- Binder HJ** (2010) Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Annu Rev Physiol* 72: 297-313
- Bitzinger D, Gruber M, Tümmler S, Michels B, Bundscherer A, Hopf S, Trabold B, Graf BM, Zausig YA** (2016) Species- and concentration-dependent differences of acetyl- and butyrylcholinesterase sensitivity to physostigmine and neostigmine. *Neuropharmacology* 109:1-6
- Böhme M, Diener M, Rummel W** (1991) Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. *Pflügers Arch* 419: 144-151
- Bootman MD, Collins TJ, Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ, Peppiatt CM** (2002) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of $InsP_3$ -induced Ca^{2+} release. *FASEB J* 16: 1145-50
- Bugaut M** (1987) Occurrence, absorption and metabolism of short fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B* 86: 439-472
- Catterall WA** (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20: 15-43
- Charney AN, Micic L, Egnor RW** (1998) Nonionic diffusion of short fatty acid across rat colon. *Am J Physiol* 274: G518-542
- Church DC** (1988) Salivary function and production. *The Ruminant Animal, Digestive Physiology and Nutrition*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ 117–124
- Comline RS** (1946) Synthesis of acetylcholine by non-nervous tissue. *J Physiol* 105: 6-7
- Diener M, Eglème C, Rummel W** (1991) Phospholipase C-induced anion secretion and its interaction with carbachol in the rat colonic mucosa. *Eur J Pharmacol* 200: 267–276
- Diener M, Knobloch SF, Bridges RJ, Keilmann T, Rummel W** (1989a) Cholinergic-mediated secretion in the rat colon: neuronal and epithelial muscarinic responses. *Eur J Pharmacol* 168: 219–229

- Diener M, Mestres P, Bridges RJ, Rummel W** (1989b) Functional and morphological changes during electric field stimulation of rat colon descendens. In: *Nerves and the Gastrointestinal Tract*, MV Singer, H Goebell (Eds.), MTP Press, Lancaster Boston The Hague Dordrecht: 705-712
- Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD and Alice MB** (1968) Molecular Beams of Macroions *J. Chem. Phys.* 49, 2240
- Ewins AJ** (1914) Acetylcholine, a new active principle of ergot. *Biochem J* 8: 44–49
- Fania L, Zampetti A, Guerriero G, Feliciani C** (2012) Alteration of cholinergic system in keratinocytes cells produces acantholysis: a possible use of cholinergic drugs in pemphigus vulgaris. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 11: 238-42
- Fujii T, Kawashima K** (2001) An independent non-neuronal cholinergic system in lymphocytes. *Jap J Pharmacol* 85:11-15
- Galvan M, Boer R, Schudt C** (1989) Interaction of telenzepine with muscarinic receptors in mammalian sympathetic ganglia. *Eur J Pharmacol* 167: 1–10
- Goeger DE, Riley RT, Dorner JW, Cole RJ** (1988) Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca²⁺-transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem Pharmacol* 37: 978–981
- Gosens R, Zaagsma J, Grootte Bromhaar M, Nelemans A, Meurs H** (2004) Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur J Pharmacol* 500: 193-201
- Grando SA** (2006) Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp Dermatol* 15: 265-282
- Grider JR, Piland BE** (2007) The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G429-437
- Haberberger R, Schultheiss G, Diener M** (2006) Epithelial muscarinic M1 receptors contribute to carbachol-induced ion secretion in mouse colon. *Eur J Pharmacol* 530:229–233
- Hadjigapiou C, Schmidt L, Dudeja PK, Layden TJ, Ramaswamy K** (2000) Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G775-80
- Harig JM, Ng EK, Dudeja PK, Brasitus TA, Ramaswamy K** (1996) Transport of n-butyrate into human colonic luminal membrane vesicles. *Am J Physiol* 271: G415-G422
- Harig JM, Soergel KH, Barry JA, Ramaswamy K** (1991) Transport of propionate by human ileal brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 260:G776-782

- Hartmann E, Kilbinger H** (1974) Occurrence of light-dependent acetylcholine concentrations in higher plants. *Experientia* 30: 1397–1398
- Hartzell C, Putzier I, Arreola J** (2005) Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67:719-58
- Hennig B, Schultheiss G, Kunzelmann K, Diener M** (2008) Ca²⁺-induced Cl⁻ efflux at rat distal colonic epithelium. *J Membr Biol* 221: 61–72
- Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, Kato T, Kawashima K** (2003) Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci* 72: 1745–1756
- Kawashima K, Misawa H, Moriwaki Y, Fujii YX, Fujii T, Horiuchi Y, Yamada T, Imanaka T, Kamekura M** (2007) Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems. *Life Sci* 80: 2206–2209
- Khan, Md Rafiqul Islam, Anisuzzaman, Abu Syed Md, Semba S, Ma Y, Uwada J, Hayashi H, Suzuki Y, Takano T, Ikeuchi H, Uchino M, Maemoto A, Ushikubi F, Muramatsu I, Taniguchi T** (2013) M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptors on mouse colonic epithelial cells. *J Gastroenterol* 48: 885–896
- Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Hohle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I** (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355: 515-523
- Knock G, Psaroudakis D, Abbot S, Aaronson PI** (2002) Propionate-induced relaxation in rat mesenteric arteries: a role for endothelium-derived hyperpolarising factor. *J Physiol* 538: 879-90
- Koelle GB** (1946) Protection of cholinesterase against irreversible inactivation by diisopropyl fluorophosphate in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 88:232-237
- Koepsell H** (2013) The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med* 34: 413–435
- Koepsell H, Lips K, Volk C** (2007) Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 24: 1227–1251
- Kummer W, Krasteva-Christ G** (2014) Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. *Curr Opin Pharmacol* 16C: 43–49
- Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick C, Kawashima K, Grando S** (2007) The Non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39: 125–135

- Lindqvist SM, Sharp P, Johnson IT, Satoh Y, Williams MR** (1998) Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis. *Gastroenterology* 115: 1131–1143
- Lindström CG, Rosengren JE, Fork FT** (1979) Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn* 20: 523-536
- Lips KS, Brüggmann D, Pfeil U, Vollerthun R, Grando SA, Kummer W** (2005) Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta* 26: 735–746
- Lips KS, Lührmann A, Tschernig T, Stoeger T, Alessandrini F, Grau V, Haberberger RV, Koepsell H, Pabst R, Kummer W** (2007a) Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. *Life Sci* 80: 2263–2269
- Lips KS, Wunsch J, Zarghooni S, Bschiepfer T, Schukowski K, Weidner W, Wessler I, Schwantes U, Koepsell H, Kummer W** (2007b) Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol* 51: 1042-1053
- Livesey G, Wilkinson JA, Roe M, Faulks R, Clark S, Brown JC, Kennedy H, Elia M** (1995) Influence of the physical form of barley grain on the digestion of its starch in the human small intestine and implications for health. *Am J Clin Nutr* 61:75-81.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K**(1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* 122:498-505
- Mascolo N, Rajendran VM, Binder HJ** (1991) Mechanism of short-chain fatty acid uptake by apical membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology* 101:331-438
- Mitsui R, Ono S, Karaki S, Kuwahara A** (2005) Propionate modulates spontaneous contractions via enteric nerves and prostaglandin release in the rat distal colon. *Jap J Physiol* 55: 331-8
- Mitsuya M, Mase T, Tsuchiya Y, Kawakami K, Hattori H, Kobayashi K, Ogino Y, Fujikawa T, Satoh A, Kimura T, Noguchi K, Ohtake N, Tomimoto K** (1999) J-104129, a novel muscarinic M₃ receptor antagonist with high selectivity for M₃ over M₂ receptors. *Bioorg Med Chem* 7: 2555–2567
- Moncoq K, Trieber CA, Young HS** (2007) The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J Biol Chem* 282: 9748–9757
- Onodera K, Pouokam E, Diener M** (2013) STIM1-regulated Ca²⁺ influx across the apical and the basolateral membrane in colonic epithelium. *J Membr Biol* 246: 271–285

- Parsons, DS, Paterson, CR** (1965) Fluid and solute transport across rat colonic mucosa. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 50: 220–231
- Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Pani G, Siminovitch KA, Indiveri C** (2012) The human OCTN1 (SLC22A4) reconstituted in liposomes catalyzes acetylcholine transport which is defective in the mutant L503F associated to the Crohn's disease. *Biochim Biophys Acta* 1818: 559-65
- Profita M, Bonanno A, Siena L, Bruno A, Ferraro M, Montalbano AM, Albano GD, Riccobono L, Casarosa P, Pieper MP, Gjomarkaj M** (2009) Smoke, choline acetyltransferase, muscarinic receptors, and fibroblast proliferation in chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 753-63
- Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Bousquet J, Vignola AM** (2005) Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy* 60: 1361-9
- Rao SS, Edwards CA, Austen CJ, Bruce C, Read NW** (1988) Impaired colonic fermentation of carbohydrate after ampicillin. *Gastroenterology* 94: 928-932
- Rogers DF** (2002) Pharmacological regulation of the neuronal control of airway mucus secretion. *Curr Opin Pharmacol* 2: 249–255
- Rossier J** (1977) Acetyl-coenzyme A and coenzyme A analogues. Their effects on rat brain choline acetyltransferase. *Biochem J* 165: 321–326
- Sakata T, Setoyama H** (1995) Local stimulatory effect of short-chain fatty acids on the mucus release from the hindgut mucosa of rats (*Rattus norvegicus*). *Comp Biochem Physiol A Physiol* 111:429-432
- Schuller HM** (2009) Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer* 9: 195–205
- Schultheiss G, Kocks SL, Diener M** (2002) Methods for the study of ionic currents and Ca²⁺-signals in isolated colonic crypts. *Biol Proced Online* 3: 70–78
- Scientific Instrument Services** (2015) Online im Internet: <http://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm>. Zuletzt abgerufen am 25.05.2016
- Siefjediers A, Hardt M, Prinz G, Diener M** (2007) Characterization of inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) receptor subtypes at rat colonic epithelium. *Cell Calcium* 41: 303-315
- Sine JP, Ferrand R, Colas B** (1988) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the gut mucosal cells of various mammal species: distribution along the intestine and molecular forms. *Comp Biochem Physiol* 91: 597-602

- Starke K** (2001) Pharmakologie cholinergere Systeme. In: W Forth, D Henschler, W Rummel, U Förstermann, K Starke. (Eds.), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 3. Aufl., Urban & Fischer, München, Jena: 147-174
- Strabel D, Diener M** (1995) Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 274: 181-191
- Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG** (2004) Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 306:471-473
- Trapper EJ, Lewand DL** (1981) Actions of a nicotinic agonist, DMPP, on intestinal ion transport in vitro. *Life Sci* 28: 155-162
- Tsien, RY, Poenie M** (1986) Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling. *TIBS* 11: 450-455
- Tucek S** (1982) The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322: 53-69
- Ussing HH, Zerahn K** (1951) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23: 110–127
- Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ** (2003) The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci*;72: 2055-61. Review.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Raché K** (1999) The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198-205
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K** (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and functions in humans. *Pharmacol Ther* 77: 59-79
- Wessler I, Roth E, Detsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H** (2001) Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Brit J Pharmacol* 134: 941-956
- White HL, Wu JC** (1973) Choline and carnitine acetyltransferases of heart. *Biochemistry* 12: 841-846
- Wonnacott S** (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors *Trends Neurosci.* 20: 92-8.
- Wu D, Hersh LB** (1994) Choline acetyltransferase: Celebrating its fiftieth year. *J Neurochem* 62: 1653-1663

Yajima T, Inou R, Matsumoto M, Yajima M (2011a) Non-neuronal release of Ach plays a role in secretory response to luminal propionate in rat colon. *J Physiol* 589: 953-962

Yajima T, Inou R, Yajima M, Tyuruta T, Karaki S, Hira T, Kuwahara A (2011b) The G-protein on cholesterol-rich membrane microdomains mediates mucosal sensing of short-chain fatty acid and secretory response in rat colon. *Acta Physiol* 203: 381-389

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

Yoshida Y, Imai S (1997) Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jap J Pharmacol* 74:125-37

Zinner N (2007) Darifenacin: a muscarinic M3-selective receptor antagonist for the treatment of overactive bladder. *Expert Opin Pharmacother* 8: 511-523

9 Anhang

9.1 Forschungsförderung

Die vorliegende Arbeit wurde durch das LOEWE-Projekt (Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz) „Non-neuronale cholinerge Systeme“, als Teilprojekt “Cholinerge Regulation des intestinalen Ionentransports“, finanziell gefördert.

9.2 Nutzungserlaubnisse

Dr. Stefanie Gerbig
Institute of Inorganic and
Analytical Chemistry
Heinrich-Buff-Ring 17
35392 Giessen

Giessen, den 29.11.2018

Nutzungserlaubnis

Hiermit erteile ich, Frau Dr. Stefanie Gerbig, Frau Sarah Moreno Bußhoff die Nutzungserlaubnis für folgende Abbildungen Abb. 2.6 „Messung der aufgespannten Mucosa“ und Abb. 3.1 „Nachgewiesene Signale im Mucosa-Homogenat“ in ihrer Dissertation „Atypische cholinerge Agonisten am Kolonepithel“.


Dr. Stefanie Gerbig

Prof. Dr. Martin Diener
Institut für Veterinär-Physiologie und -
Biochemie
Fachbereich Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Str. 100
35392 Gießen

Gießen, den 28.11.2018

Nutzungserlaubnis

Hiermit erteile ich, Herr Prof. Dr. Martin Diener, Frau Moreno Bußhoff die Nutzungserlaubnis für folgende Abbildungen Abb. 2.1 „Isolierte Krypte aus dem distalen Rattenkolon“, Abb. 2.2 „Schema einer modifizierten Ussing-Kammer“, Abb. 2.3 „Ersatzschlatkreismodell von Ussing und Zerahn (1951) für ein Epithel“, Abb. 2.4 „Schaltbilder für (rechts) Open-circuit Modus und (links) Voltage-clamp Modus“ und Abb. 2.5 „Aufbau des Ca²⁺-Imaging-Messstandes“ in ihrer Dissertation „Atypische cholinerge Agonisten am Kolonepithel“.



Prof. Dr. Martin Diener

Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 30.01.2019

Danksagung

Mein größter Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Diener für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen und immer geduldigen Hilfe. *Das habe ich nie als eine Selbstverständlichkeit angesehen. Herzlichen Dank!*

Ich danke auch herzlich Herrn Prof. Dr. Kummer für die Ermutigung und die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Erstgutachter. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Krasteva-Christ, die am 27.11.13 die Vertretung im Neurowissenschaftlichen Seminar für Prof. Dr. Kummer übernahm und dem Land Hessen, das mich als Stipendiatin im LOEWE-Projekt aufnahm.

Ferner danke ich Frau Dr. Bader für ihre Unterstützung in allen Bereichen, die Überlassung notwendiger Quellen und Dokumente und die herzliche Aufnahme ins Team. Auch möchte ich mich bei Stefanie Gerbig vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Brigitta Brück, Barbara Schmidt, Eva Haas und Alice Stockinger für ihre Unterstützung und eine humorvolle und schöne Zeit bedanken. Ein weiterer Dank gilt Ervice Pouokam für sein immer offenes Ohr und seine Hilfe bei Fragen zur Auswertung der Daten.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und allen anderen guten Seelen, die mich in meinem Lebensweg begleitet und unterstützt haben und immer noch begleiten und unterstützen: Ich danke Anne B. und Christian S. und ihren reizenden Töchtern für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und wunderschöne Kindheitserinnerungen. Vielen Dank Tante Magaly für deine Kraft und deinen Humor. Vielen Dank an Fabienne S. und ihre phänomenale Familie - für alles. Ich danke Ursula und Bernhard B. für ihre herzliche Aufnahme und ihre Wärme. Vielen Dank Erna und Ludger B. für eure große Unterstützung. Ich danke auch meinen umwerfenden Eltern Arturo M. und Ulrike B. sowie meinen brillanten und sensationellen Geschwistern, die immer an mich glauben und mich immer unterstützen. Ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen. Ich danke Martin B. für seine Liebe und seinen klugen Rat. Ich danke euch allen von ganzem Herzen!