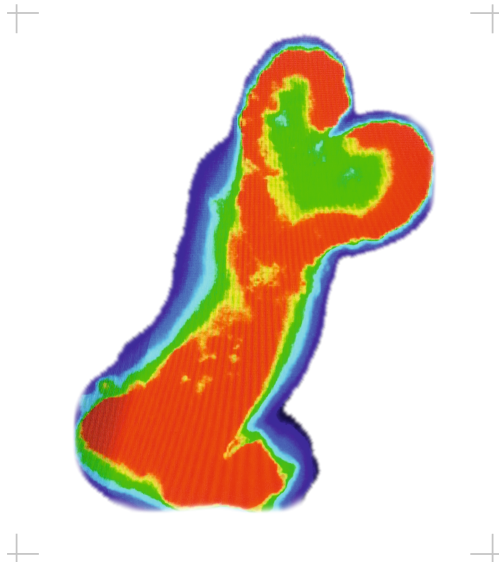


Sabine Schindele

Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den Ionen-transport am Kolonepithel der Ratte



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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

1. Auflage 2017

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

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für
Veterinär-Physiologie und -Biochemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den Iontentransport am Kolonepithel der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sabine Schindele

Tierärztin aus Überlingen am Bodensee

Gießen 2016

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener

Gutachter: Prof. Dr. Kerstin Fey

Tag der Disputation: 24. März 2017

„In der Wissenschaft gibt es nie ein Erreichen des Ziels.

In der Wissenschaft gibt es immer nur Etappenziele.“

(Henning M. Beier)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	- 1 -
1. O₂-Abhängigkeit des Kolons und Reaktion auf Hypoxie	- 1 -
2. Das Kolon	- 2 -
2.1 Aufbau	- 2 -
2.2 Aufbau Kryptenepithel	- 4 -
2.3 Funktion des Kolonepithels	- 7 -
2.3.1 Transportprozesse am Kolonepithel	- 7 -
2.3.2 Calciumabhängige Chloridkanäle	- 9 -
2.3.3 ATP-sensitive Kaliumkanäle	- 10 -
2.4 Hypoxie am Darm – Pathophysiologie	- 12 -
2.5 Reoxygenierung und reaktive Sauerstoffspezies	- 13 -
2.5.1 Reaktive Sauerstoffspezies	- 13 -
2.5.2 Das Superoxid-Anion	- 14 -
2.5.3 Das Wasserstoffperoxid und das Hydroxyl-Radikal	- 16 -
2.6 Antioxidatives Schutzsystem	- 17 -
2.6.1 Superoxid-Dismutasen (SOD)	- 17 -
2.6.2 Glutathion	- 19 -
2.6.3 Der Radikalfänger Tocopherol α – Vitamin E	- 20 -
2.7 Reperfusionsschaden	- 21 -
3. Eigene Fragestellung	- 22 -
II. Material und Methoden	- 23 -
1. Versuchstiere	- 23 -
2. Verwendete Lösungen	- 24 -
2.1 Lösung für die Präparation	- 24 -
2.1.1 Bicarbonat-gepufferte Parsonslösung	- 24 -

Inhaltsverzeichnis

2.2	Lösungen für die Ussingkammer-Versuche	- 24 -
2.2.1	Standard-Tyrodellösung	- 24 -
2.2.2	Chloridfreie Tyrodellösung (KGluc-Lösung)	- 24 -
2.2.3	Calciumfreie Tyrodellösung	- 25 -
2.3	Lösungen für die Imaging-Versuche	- 25 -
2.3.1	Isolutionslösung für die Gewinnung isolierter Krypten	- 25 -
2.3.2	Auffangtyrode	- 25 -
2.3.3	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.....	- 26 -
2.3.4	Lösung zur Beschichtung der Glasplättchen	- 27 -
3.	Substanzen	- 27 -
4.	Die Gewebepreparation	- 28 -
4.1	Preparation der Mukosa.....	- 28 -
4.2	Preparation isolierter Krypten	- 29 -
5.	Die Ussingkammer Technik	- 30 -
5.1	Theorie des Ussingkammer Messprinzips	- 30 -
5.1.1	Die modifizierte Messkammer	- 33 -
5.2	Versuchsdurchführung und Datenerfassung	- 34 -
6.	Die Imaging Technik	- 35 -
6.1	Theorie des Ca ²⁺ - Imaging	- 35 -
6.2	Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM	- 36 -
6.3	Fluoreszenzfarbstoff ThiolTracker™ Violet Stain	- 38 -
6.4	Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX™ Red Superoxid Indikator	- 39 -
6.5	Der Messstand	- 41 -
6.6	Die Hypoxiekammer mit Perfusionssystem.....	- 43 -
6.7	Imaging-Experimente an isolierten Krypten.....	- 45 -

Inhaltsverzeichnis

6.7.1	Aufladung der Krypten	- 45 -
6.7.2	Versuchsdurchführung.....	- 45 -
6.7.2.1	Fura-2	- 45 -
6.7.2.2	ThiolTracker™ Violet Stain und MitoSOX™ Red	- 47 -
6.7.3	Datenerfassung	- 47 -
6.7.3.1	Fura-2	- 47 -
6.7.3.2	ThiolTracker™ Violet Stain und MitoSOX™ Red	- 47 -
7.	Statistik	- 49 -
III.	Ergebnisse	- 50 -
1.	Hypoxie löst eine Sekretion am Kolonepithel aus.....	- 50 -
1.1	Beteiligung basolateraler Kaliumkanäle.....	- 53 -
1.2	Sind K_{ATP} -Kanäle an der Hypoxie-Antwort des Darmes beteiligt?	- 55 -
1.2.1	Stimulation mit Pinacidil zeigte ebenfalls keinen Effekt.....	- 56 -
2.	Verantwortlich für die I_{sc}-Veränderungen sind Änderungen in der Chloridsekretion	- 59 -
3.	Wenn nicht der Mangel an $[ATP]_i$, was löst dann den Chloridausstrom aus?.....	- 65 -
3.1	Extrazelluläres Calcium moduliert Sekretionsantwort.....	- 65 -
3.2	Beteiligte intrazelluläre Botenstoffe	- 70 -
3.2.1	Fura-2 Imaging	- 70 -
3.2.2	Ein Einstrom von extrazellulärem Calcium ist an der Änderung des Fura-2 Signals beteiligt	- 73 -
4.	Radikale als intrazelluläre Botenstoffe.....	- 78 -
4.1	Erste Hinweise auf Radikalbildung in Ussingkammer-Experimenten ..	- 78 -
4.2	Trolox C hat auch Einfluss auf die zytosolische Calciumkonzentration	- 80 -
4.3	Rolle des Glutathion.....	- 81 -

Inhaltsverzeichnis

4.4	Mitochondriale Superoxide	- 84 -
IV.	Diskussion.....	- 87 -
1.	Hypoxie-Effekte	- 87 -
1.1	Hypoxie löst eine Chloridsekretion aus	- 88 -
1.1.1	Die Chloridsekretion ist Calciumabhängig	- 89 -
1.1.2	Fura-2 Imaging bestätigt Calcium-Beteiligung	- 90 -
2.	Die Rolle der Kaliumkanäle	- 92 -
3.	Veränderungen in der Gewebeleitfähigkeit	- 95 -
4.	Reperfusion und Beteiligung von Radikalen	- 97 -
5.	Fazit	- 100 -
V.	Zusammenfassung	- 101 -
VI.	Summary	- 102 -
VII.	Verzeichnisse	- 103 -
1.	Abkürzungsverzeichnis	- 103 -
2.	Abbildungsverzeichnis	- 106 -
3.	Tabellenverzeichnis	- 109 -
VIII.	Literaturverzeichnis	- 110 -
IX.	Anhang	- 122 -
1.	Publikation	- 122 -
2.	Danksagung.....	- 123 -
3.	Erklärung.....	- 125 -

I. Einleitung

1. O₂-Abhängigkeit des Kolons und Reaktion auf Hypoxie

Das Kolon gehört zu den Geweben, welche eine geringe Toleranz gegenüber Sauerstoff- und Substratmangel aufweisen, da sein Stoffwechsel überwiegend oxidativ verläuft. Eine Mangelversorgung durch Verengung, Verlegung oder Verschluss von Blutgefäßen führt über eine verminderte Durchblutung (*Ischämie*) zu einem verminderten Sauerstoffangebot im Gewebe, also zu einer *Hypoxie* (Striebel 2008). Eine systemische Hypoxie kann beispielsweise im Rahmen eines hypovolämischen oder eines septischen Schocks hervorgerufen werden (Thadhani et al. 1996). Besonders empfindlich reagieren dabei die sog. *Schockorgane*. Diese Bezeichnung beschreibt Organe, deren „Gefäßsystem stark auf sympathiko-adrenerge Stimulation infolge besonders guter Versorgung mit α -Rezeptoren anspricht“ (Schubert und Bethke 1987), wie z.B. Magen und Darm, aber u.a. auch die Niere, die Leber oder das Pankreas.

Eine intestinale Hypoxie kann durch einen arteriellen oder venösen Verschluss (Thrombose) oder durch mechanische Kompression entstehen, z.B. bei einem Volvulus beim Hund oder einer Darmverschlingungskolik beim Pferd. Diese schwerwiegenden gastroenterologischen Erkrankungen gehen mit einer erhöhten Letalität einher (Haglund und Bergqvist 1999). Durch die Reduktion des mukosalen Blutflusses kann der hohe Energiebedarf des intestinalen Epithels nicht mehr gedeckt werden, was ernste mukosale Schäden nach sich zieht und im weiteren Verlauf zu einem Verlust der Barrierefunktion des Darmepithels führt (Ward et al. 2014).

2. Das Kolon

2.1 Aufbau

Der Gastrointestinaltrakt nimmt essentielle Aufgaben für den Organismus wahr. So findet der Großteil der Verdauung und Aufnahme der Nährstoffe in Magen und Dünndarm statt, während die Hauptaufgabe des Dickdarmes v.a. in der Resorption von Wasser und Elektrolyten besteht. So resorbiert das Intestinum des Menschen täglich ungefähr 9 Liter Flüssigkeit und ca. 1 kg Nährstoffe. Diese Aufgabe erfüllen epitheliale Transportprozesse, die alle stark energie- und sauerstoffabhängig sind (Ward et al. 2014). Demgegenüber steht eine deutlich geringere Sekretion im Dickdarm, wobei eine Plasma-isotone Flüssigkeit sezerniert wird, welche neben Muzinen auch Cl^- , K^+ und HCO_3^- -Ionen enthält.

Bei Säugetieren kann der Dickdarm in Caecum, Kolon, Rektum, Ampulla recti und den Analkanal untergliedert werden. Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden alle am Kolon der Ratte durchgeführt. Dieses lässt sich makroskopisch in folgende Abschnitte unterteilen: proximales Kolon (*Colon ascendens*), große Flexur (*Colon transversum*) und distales Kolon (*Colon descendens*), welches schließlich in das Rektum übergeht. Das *Colon ascendens* lässt sich durch seine charakteristische Querstreifung der Schleimhaut – die Palmbblätter-Streifen (Lindstroem et al. 1979) – gut vom *Colon descendens* unterscheiden, welches eine Längsfaltung der Schleimhaut (Lindstroem et al. 1979) aufweist. Der Übergang zum Rektum wird durch einen großen Lymphknoten in der Darmwand markiert, der bei der adulten Ratte ungefähr 3 cm vor dem Anus liegt (Lindstroem et al. 1979, Olds und Olds 1984).

Die Wand des Kolons setzt sich von innen nach außen aus den folgenden Schichten zusammen (s. Abbildung I-1): Die ***Tunica mucosa*** (Schleimhaut) bildet die innerste Schicht und teilt sich ihrerseits in die *Lamina epithelialis mucosae*, die *Lamina propria mucosae* und die *Lamina muscularis mucosae* auf. Die für das Kolon typischen Lieberkühn'schen Krypten werden von der *Lamina epithelialis mucosae* geformt,

I. Einleitung

zudem werden dicht nebeneinanderliegende, bis tief in die *Lamina propria mucosae* reichende, schlauchförmige Einstülpungen gebildet. Die *Lamina propria mucosae* dient als Stüttschicht für die *Lamina epithelialis mucosae* und enthält in ihrer bindegewebigen Struktur Blutgefäße und Lymphfollikel. Unterhalb davon befindet sich die *Lamina muscularis mucosae*, die aus glatten Muskelzellen besteht. Die *Tela submucosa*, eine Schicht aus lockerem Bindegewebe, enthält Drüsen sowie Blut- und Lymphgefäße. Darüber hinaus befindet sich hier der *Plexus submucosus* (Meissner-Plexus). Die ***Tunica muscularis*** wird aus zwei verschiedenen Schichten glatter Muskulatur, dem *Stratum circulare* (zirkulärer Verlauf der Muskelzellen) und dem *Stratum longitudinale* (in der Längsrichtung verlaufende Muskelzellen), gebildet. Zwischen diesen beiden befindet sich das Nervengeflecht des *Plexus myentericus* (Auerbach-Plexus). Auf die Muskelschicht folgt die ***Tunica serosa***.

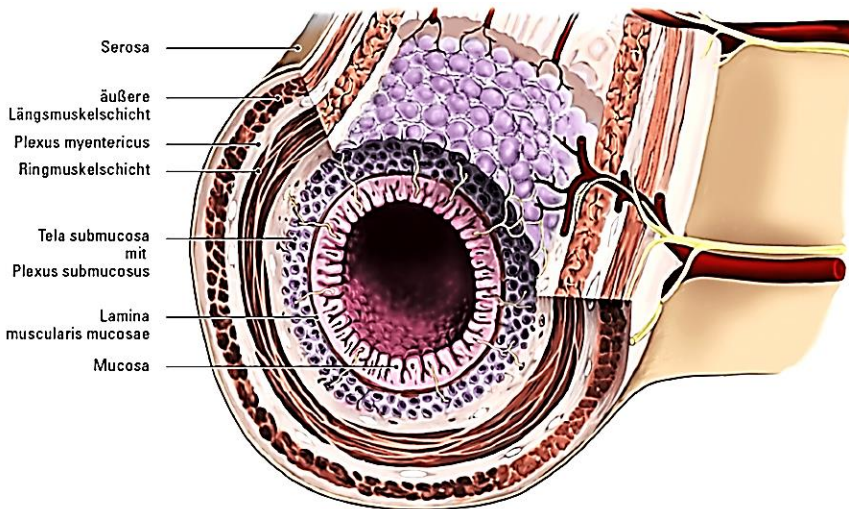


Abbildung I-1 – Schichten des Gastrointestinaltrakts

Abbildung modifiziert nach MEDI-LEARN Skript Histologie 3

2.2 Aufbau Kryptenepithel

Das Kryptenepithel (*Lamina epithelialis mucosae*), welches in dieser Arbeit im Vordergrund steht, ist aus verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt. Dabei wird der Hauptanteil von hochprismatischen Epithelzellen, den *Enterozyten*, gebildet. Sie sind zur Resorption befähigt und außerdem in der Lage, Elektrolyte und Wasser zu sezernieren. Diese Transportvorgänge werden dadurch erleichtert, dass die Kolonoberfläche sowie der obere Teil der Krypten mit Mikrovilli besetzt sind. Diese wiederum vergrößern die Oberfläche um den Faktor 30 und bilden somit eine enorme Kontaktfläche mit dem Darmlumen. Die *Becherzellen* sind für die Schleimproduktion zuständig; der Schleim gewährleistet neben dem Weitertransport der Ingesta auch einen epithelialen Schutz (Potten et al. 1997). Als dritte Zellart existieren in der *Lamina epithelialis mucosae* die *enteroendokrinen Zellen*, welche je nach Zelltyp Somatostatin, Serotonin, Glukagon und andere Hormone sezernieren können (Christensen 1991).

Die Krypten lassen sich anhand des Differenzierungsgrades der Zellen und deren Funktionalität in drei grundsätzliche Regionen einteilen (s. Abbildung I-2): die *Fundusregion*, in der sich die Stammzellen befinden, die *mittlere Region* und schließlich die *Oberflächenregion*.

I. Einleitung

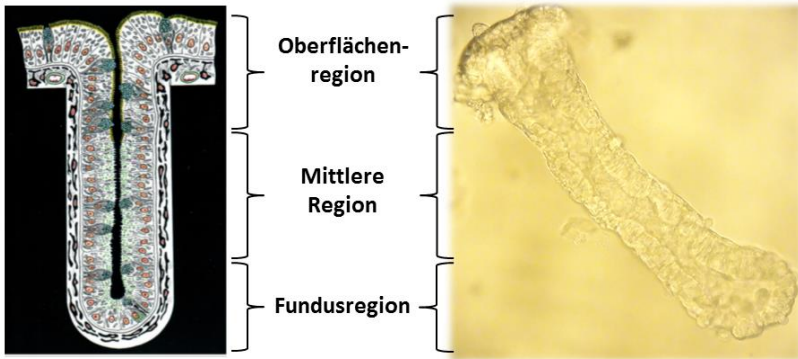


Abbildung I-2 – Halbschematischer Schnitt einer Lieberkühn'schen Krypte (links) und ein Originalbild (rechts)

Schema modifiziert nach Specht (1977)

Die Zellen wandern (s. Abbildung I-3 A) vom Fundus über die Mitte bis zur Oberfläche der Kolonschleimhaut, differenzieren sich dabei und erlangen schließlich ihre spezifische Funktion (Barrett und Keely 2000). An der Kolonoberfläche angelangt, unterliegen sie einer natürlichen Apoptose und werden zum Darmlumen hin abgeschilfert (Potten et al. 1997). Beim Nager beträgt ein solcher Zyklus in der Regel 2 - 3 Tage (Lipkin 1985). Die noch unreifen Zellen am Kryptenfundus sind v.a. zur Sekretion befähigt, gewinnen aber im Laufe ihrer Reifung auch die Fähigkeit, Elektrolyte und Wasser zu resorbieren (s. Abbildung I-3 B).

I. Einleitung

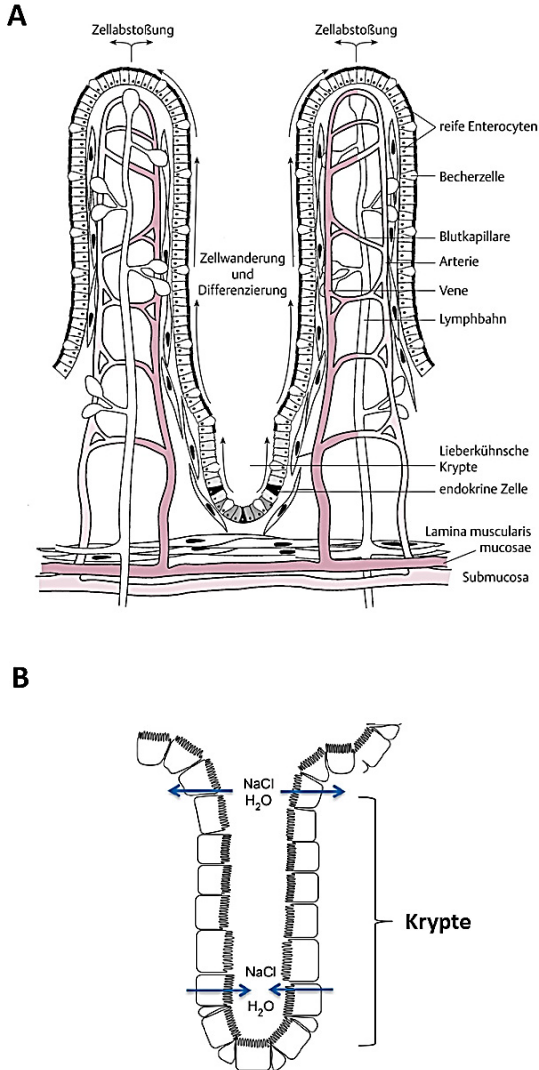


Abbildung I-3 – (A) Zellreife an den Lieberkühnschen Krypten und (B) schematische Darstellung der Transport-bzw. Resorptionsvorgänge

(A) schematische Stadien der Zellreife. (Abbildung A aus: Engelhardt et al. „Physiologie der Haustiere“ (2015)). **(B)** zeigt die wesentlichen Sekretions-, bzw. Resorptionsvorgänge an der Krypte (Abbildung B modifiziert nach Ward et al. (2014)).

2.3 Funktionen des Kolonepithels

Das Kolonepithel stellt eine Art Grenzschicht zwischen dem Körperinneren (Interstitium und Kapillaren) und der „Außenwelt“ dar, d.h. es bildet eine Barriere, die verhindert, dass Mikroorganismen oder anderes luminales Material unkontrolliert in das Körperinnere eindringen können. Als weitere wichtige Funktion sind die Zellen für die transepitheliale Resorption von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser zuständig. Diese Transport- und Barrierefunktionen sorgen gemeinsam für die Aufrechterhaltung des physiologischen Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes und dienen darüber hinaus der immunologischen Abwehr (Potten et al. 1997).

2.3.1 Transportprozesse am Kolonepithel

Am Epithel des distalen Kolons werden Na^+ , K^+ und Cl^- resorbiert, darüber hinaus wird eine Cl^- - und K^+ -Sekretion an diesem Darmabschnitt beobachtet (Binder et al. 1997). Dabei spielt die Chloridsekretion eine herausragende Rolle, sowohl unter physiologischen Bedingungen, wie beispielsweise der mechanischen Dehnung des Darms (Diener und Rummel 1990), als auch bei pathophysiologischen Vorgängen, z.B. der sekretorischen Diarrhoe (Barrett 2006). Als erster Schritt der transepithelialen Sekretion von Chlorid tritt dieses Anion über einen basolateral gelegenen Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Kotransporter (NKCC1; s. Abbildung I-4) in die Zelle ein. Dieser Transporter arbeitet sekundär aktiv und wird energetisiert durch einen Na^+ -Gradienten (Kaplan et al. 1996, Kunzelmann und Mall 2002). Für den Übertritt der Ionen in das Darmlumen sind apikale Chloridkanäle verantwortlich, da hier kein Konzentrationsgefälle, sondern das Membranpotential als Triebkraft für den Cl^- -Ausstrom dient. Aus Gründen des Ladungsausgleiches kommt es neben einer Cl^- -Sekretion auch zu einem parazellulären Na^+ -Fluss. Diesem folgt – ebenfalls vorwiegend parazellulär – Wasser zum Ausgleich des osmotischen Gradienten (Barrett und Keely 2000).

I. Einleitung

Für die apikale Leitfähigkeit sorgt ein CFTR-Kanal (CFTR = cystic fibrosis transmembrane regulator; Strabel und Diener 1995, Barrett und Keely 2000, Greger 2000), welcher durch cAMP aktiviert wird. Daneben befinden sich weitere Cl⁻-Kanäle in der basolateralen Enterozyten-Membran, welche u.a. an der Volumenregulation beteiligt sind (Diener et al. 1992).

Der bereits erwähnte NKCC1-Transporter dient nicht nur der Cl⁻-Aufnahme in die Zelle, er stellt auch K⁺-Ionen zur Sekretion bereit (s. Abbildung I-4). Dabei werden apikal gelegene Kaliumkanäle über eine Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels stimuliert und K⁺ kann in das Darmlumen übertreten (Schultheiss und Diener 1998). Weiterhin kann Kalium die Zelle über basolaterale Kaliumkanäle verlassen, dies führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle, was wiederum die Triebkraft für die Ausschleusung von Chloridionen an der apikalen Seite (v.a. über den CFTR-Kanal) erhöht (s. Abbildung I-4).

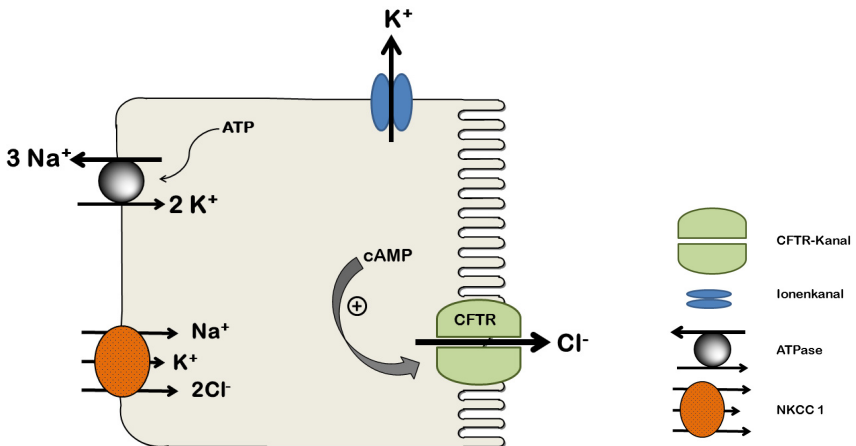


Abbildung I-4 – Wichtige Transportproteine am Kolonepithel

Durch die Na⁺/K⁺-ATPase wird ein Na⁺-Gradient aufgebaut, der für die Energetisierung anderer Transportprozesse von enormer Bedeutung ist. Auf der basolateralen Seite ist ein Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter (NKCC1) für die Bereitstellung der Ionen zur Sekretion verantwortlich. Chlorid verlässt die Zelle apikal hauptsächlich über den CFTR-Kanal, welcher über den cAMP-Weg aktiviert wird.

I. Einleitung

2.3.2 Calciumabhängige Chloridkanäle

Calcium-aktivierte Chloridkanäle (CaCC) wurden in vielen verschiedenen Zelltypen beschrieben, so auch am Kolonepithel (Schultheiss et al. 2002, Hennig et al. 2008, Verkman und Galletta 2009). Ihre Leitfähigkeit lässt sich u.a. durch 5-Nitro-2-(3-phenylpropyl-amino)-benzoesäure (NPPB) blockieren. Über verschiedene Stimuli (z.B. Acetylcholin am Kolonepithel; Bader 2014) wird über die Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃)-Rezeptor-Aktivierung der zytosolische Calciumspiegel erhöht, indem intrazelluläre Ca²⁺-Speicher (v.a. Endoplasmatisches Reticulum, ER) geleert werden. Neben Calcium als Regulator werden CaCCs am Kolonepithel durch Phosphorylierung durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) aktiviert (Verkman und Galletta 2009). Dies führt zellartspezifisch zu verschiedenen Wirkungen, am Kolonepithel resultiert daraus u.a. eine Chloridsekretion (s. Abbildung I-5).

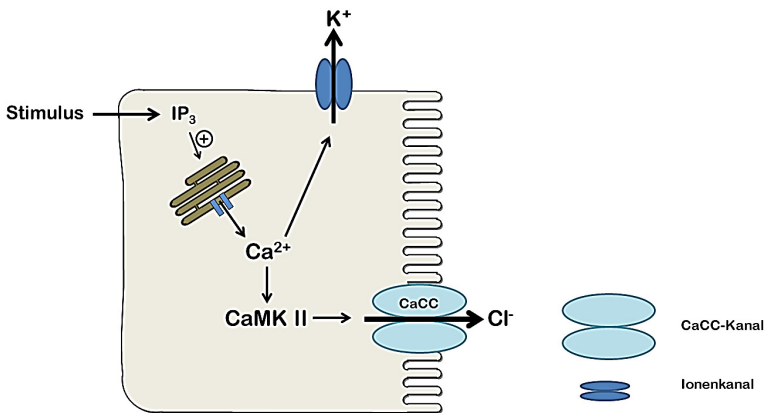


Abbildung I-5 – Wichtigste Schritte der Calcium-vermittelten Chloridsekretion

Über einen Stimulus werden die IP₃-Rezeptoren am ER aktiviert, woraufhin Calcium ins Zytosol ausgeschüttet wird. Dieses aktiviert zum einen über die Calcium/Calmodulin Kinase II (CaMK II) CaCCs. Zum anderen werden Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle geöffnet, was zu einer Hyperpolarisation der Membran führt (s. Kapitel I.2.3.1).

I. Einleitung

2.3.3 ATP-sensitive Kaliumkanäle

ATP-sensitive Kanäle (K_{ATP} -Kanäle) verbinden die elektrische Aktivität der Zellmembran und den zellulären Metabolismus miteinander (Cook und Hales 1984). Unter physiologischen Bedingungen hält das intrazelluläre ATP diese Kanäle geschlossen. Kommt es aber zu einem Absinken des ATP-Gehaltes, wie z.B. bei einer Hypoxie, ist eine Öffnung der K_{ATP} -Kanäle die Folge. Dadurch wird die Zellmembran hyperpolarisiert, was an Nerven- oder Muskelgewebe die Auslösbarkeit von Aktionspotentialen, also die Erregbarkeit, reduziert. Der biologische Sinn dahinter ist die Senkung des Energiebedarfs der Zelle (Hibino et al. 2010). K_{ATP} -Kanäle erfassen somit den Energiestatus der Zelle (Hund und Mohler 2011). Beschrieben wurden sie bisher, wie bereits erwähnt, an erregbaren Geweben wie Herz und Gehirn (Noma 1983, Amoroso et al. 1990), an vaskulären Muskelzellen (Standen et al. 1989) und als bekanntestes Beispiel am endokrinen Pankreas (Cook und Hales 1984).

Diese Kanäle stellen Hetero-Oktamere (Babenko et al. 1998) mit vier porenformenden Untereinheiten (Kir) dar und bilden einen einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal (s. Abbildung I-6). Dazu kommen noch vier regulatorische Untereinheiten („Sulfonylurea receptor“ (SUR); Babenko et al. 1998). Auf molekularer Ebene konnten im Jahr 2013 auch am distalen Kolonepithel der Ratte zwei porenformende Isoformen (Kir 6.1 und 6.2) sowie zwei regulatorische Untereinheiten (SUR1, SUR2B) identifiziert werden und zwar sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene (Pouokam et al. 2013).

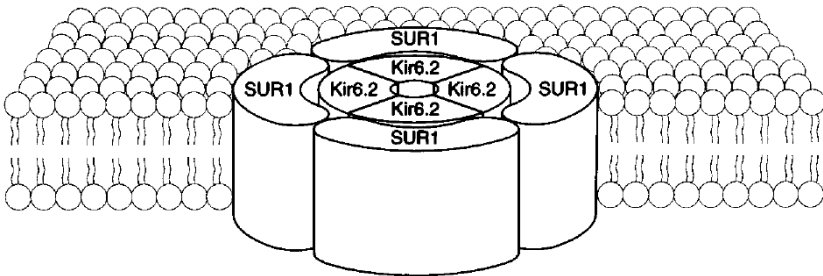


Abbildung I-6 – Schematische Darstellung K_{ATP}-Kanal

Dargestellt ist ein K_{ATP}-Kanal am Beispiel einer β -Zelle des Pankreas. Dieser Kanal (Oktamer) besteht aus vier Kir 6.2- sowie vier SUR1-Untereinheiten. Die Kaliumpore wird dabei von den Kir-Untereinheiten gebildet. (Abbildung aus: Seino (1999))

2.4 Hypoxie am Darm – Pathophysiologie

Der Dickdarm ist aufgrund seiner Funktion extrem gut durchblutet und besitzt neben der Leber das ausgeprägteste Kapillarbett mit einer relativ hohen Kapillarpermeabilität (Haglund und Bergqvist 1999). Das Kolon reagiert sehr empfindlich auf eine Hypoxie, allerdings sind dabei nicht alle Wandschichten in demselben Ausmaß betroffen. Betrachtet am menschlichen Kolon ist die Mukosa am wenigsten tolerant; hier verursacht eine Ischämie schon nach ca. 20 Minuten mikroskopisch sichtbare Schäden (Haglund und Bergqvist 1999). Eine Nekrose des Epithels, der Basalmembran und der Lamina propria (Müller-Wieland 1982) entsteht bereits 12 bis 24 Stunden nach einer Ischämie. Hierbei werden die oberflächlichen Kapillaren zerstört, Blut und Plasma dringen daraufhin in Interstitium und Darmlumen ein. Die sich ansammelnde Flüssigkeit in der Submukosa ruft Schwellungen hervor, die das Darmlumen einengen und im schlimmsten Fall zu einem Ileus führen können. Durch diese Schwellungen kommt es außerdem zu einem gestörten Abtransport von anfallenden Stoffwechselprodukten, da der normale Blutfluss erheblich gestaut wird. Diese Flüssigkeit wird dem Gesamtvolumen entzogen, in der Folge kann es zu einem hypovolämischen Schock kommen. Durch das Zusammenbrechen der Mukosazell-Barriere können Bakterien und Antigene in die Submukosa und das Blutgefäßsystem eindringen, eine Septikämie mit Endotoxinschock sind oft tödliche Folgen (Müller-Wieland et al. 1982). Die Muskelschichten hingegen sind gegenüber einem O₂-Mangel weniger empfindlich. Greift die Hypoxie aber auf die *Tunica muscularis* über, entsteht eine Nekrose der ganzen Wand des entsprechenden Darmabschnittes. Am längsten vital bleiben bei einer Ischämie das Bindegewebe der Submukosa und der Subserosa (Müller-Wieland et al. 1982, Attard et al. 2005).

2.5 Reoxygenierung und reaktive Sauerstoffspezies

2.5.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Wird nach einer Ischämie oder Hypoxie die Blutversorgung wieder hergestellt, werden die Schäden an der Schleimhaut sogar noch verstärkt. Dafür verantwortlich sind im Wesentlichen Stoffwechselforgänge in den Mitochondrien. Diese Organellen metabolisieren permanent Sauerstoff. Dabei entstehen als Nebenprodukte durch die unvollständige Verstoffwechslung des Sauerstoffs reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS), auch „freie Radikale“ genannt. Diese Nebenprodukte sind v.a. das Superoxid-Anion $O_2^{\cdot-}$, das Hydroxyl Radikal OH^{\cdot} und das Wasserstoffperoxid („Hydrogenperoxid“, H_2O_2) (Kirkinezos und Moraes 2001, Dröge 2002). Unter physiologischen Bedingungen können die Auswirkungen der ROS von verschiedenen Antioxidans-Systemen abgefangen werden (Dröge 2002), sowohl enzymatisch als auch nicht enzymatisch. Oxidativer Stress hingegen – wie bei einer Hypoxie – entsteht, wenn die Balance von Produktion und Abfangen aus dem Gleichgewicht gerät. Dann überwiegen die schädigenden Einflüsse der ROS (s. auch Abbildung I-11, Kapitel I.2.7).

2.5.2 Das Superoxid-Anion

Im Fall der mitochondrial produzierten reaktiven Sauerstoffspezies ist das Superoxid-Anion $O_2^{\bullet-}$ das erste freie Radikal, das gebildet wird (Kirkinezos und Moraes 2001). Es stellt ein hochreaktives Molekül dar und kann aufgrund seiner Ladung nicht einfach aus der Zelle heraus diffundieren (Kowaltowski et al. 2009).

Die Bildung dieser Radikale beginnt bereits während der Hypoxie. Verantwortlich dafür ist das Enzym Xanthin-Oxidoreduktase (XOR; Turrens et al. 1982, Harrison 2004). Dieses Metalloenzym ist ein wesentlicher Bestandteil des Purin-Abbau-Mechanismus und liegt in der Regel als *Xanthin-Dehydrogenase* (XDH) vor (Enroth et al. 2000). Es katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin, welches wiederum weiter oxidiert wird zu Harnsäure (Dröge 2002; s. Abbildung I-7). Durch Proteolyse oder Oxidation der Sulfhydrylreste kann XDH in die oxidierte Form *Xanthin-Oxidase* (XO) überführt werden. Während XDH v.a. mit NAD reagiert, kann XO ausschließlich Sauerstoff als Substrat verwenden (Enroth et al. 2000). Bei beiden Reaktionen entsteht Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) durch Reduktion des Sauerstoffs um ein Elektron. Bei manchen Zellen (v.a. den Leukozyten) sind Superoxid-Anionen essentiell für deren Funktion, da diese ROS beim „respiratory burst“ helfen pathogene Mikroorganismen abzutöten (Amulic et al. 2012). Außerhalb dieser wichtigen Immunreaktion müssen die ROS durch Antioxidantien unschädlich gemacht werden.

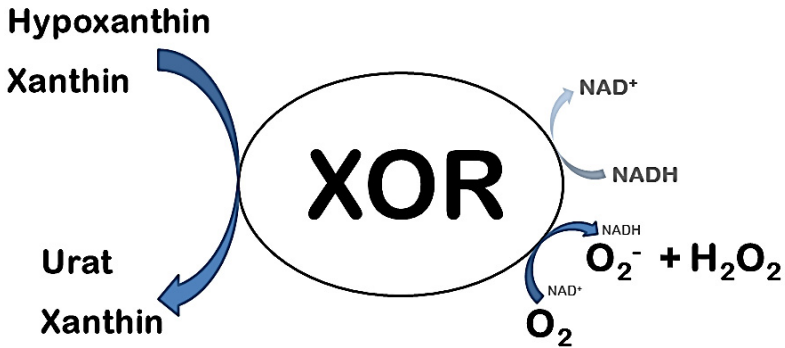


Abbildung I-7 – Vereinfachte Darstellung des XOR-Enzyms

Die Abbildung zeigt die XOR-katalysierte Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin (die typischen Substrate dieses Enzyms) und die Bildung des Superoxid-Anions durch Reduktion von Sauerstoff. *Abbildung modifiziert nach Harrison (2004).*

Bei einer Hypoxie kommt es bereits vor der Reoxygenierung zu einer Akkumulation von Hypoxanthin und zu einer vermehrten proteolytischen Umsetzung des XDH zu XO. Wird im Anschluss die Sauerstoffversorgung wieder hergestellt, steigt die Bildung von Superoxid-Anionen in den Mitochondrien (Dröge 2002, Gonzalez et al. 2015).

I. Einleitung

2.5.3 Das Wasserstoffperoxid und das Hydroxyl-Radikal

Das zweithäufigste gebildete Radikal ist das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches an sich – da ihm die freien Elektronen fehlen – zwar kein freies Radikal darstellt, aber trotzdem eine bedeutende Rolle in der ROS-vermittelten Zellschädigung einnimmt (Kirkinezos und Moraes 2001). Es kann chemisch sehr vielseitig reagieren und besitzt dank seiner geringen Größe ein hohes Diffusionsvermögen. Im Vergleich zu den restlichen ROS vermag H_2O_2 aufgrund dieser Eigenschaften auch Schäden an weiter entfernten Organen als dem Bildungsort zu verursachen. Darüber hinaus kann H_2O_2 über die sog. Fenton-Reaktion (s. Abbildung I-8) mit zweiwertigen Eisenionen reagieren und dabei das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($\text{OH}\bullet$) bilden (Goldstein et al. 1993). Das Hydroxyl-Radikal hat eine sehr kurze Halbwertszeit und reagiert praktisch mit allen organischen Molekülen, die sich in seiner Nähe befinden. Dadurch werden gravierende Schäden an DNS, Proteinen und Lipiden verursacht (Kirkinezos und Moraes 2001).



Abbildung I-8 – Fenton-Reaktion

Dargestellt ist die Reaktion des H_2O_2 mit zweiwertigen Eisenionen, wobei das hochreaktive Hydroxyl-Radikal $\text{OH}\bullet$ entsteht.

2.6 Antioxidatives Schutzsystem

Das antioxidative Schutzsystem umfasst eine Gruppe von Antioxidantien, die eine "Entsorgung" von ROS und freien Radikalen in der Zelle garantieren. Bestandteile dieses Systems sind Enzyme wie Superoxid-Dismutasen, Katalasen und Peroxidasen. Sie enthalten als essentielle Co-Faktoren Mangan, Eisen und Zink sowie Kupfer und Selen. Als Radikalfänger dienen v.a. Tocopherol α (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C) und verschiedene Ubichinone (Coenzym Q₁₀).

2.6.1 Superoxid-Dismutasen (SOD)

Superoxide werden v.a. durch das mitochondriale Enzym Mangan-Superoxid Dismutase (MnSOD) abgefangen (Turrens 2003; s. Abbildung I-9). Dabei entsteht zunächst H₂O₂. Da Mitochondrien selbst keine Katalase enthalten, ist ihre einzige Abwehr gegen die toxischen Auswirkung des H₂O₂ das Enzym Glutathionperoxidase (GPx), welches Glutathion (GSH) als Coenzym enthält (näheres in Kapitel I.2.6.2) und H₂O₂ zu Wasser und CO₂ konvertieren kann, was wiederum die ROS komplett entgiftet (Aslund et al. 1997).

I. Einleitung

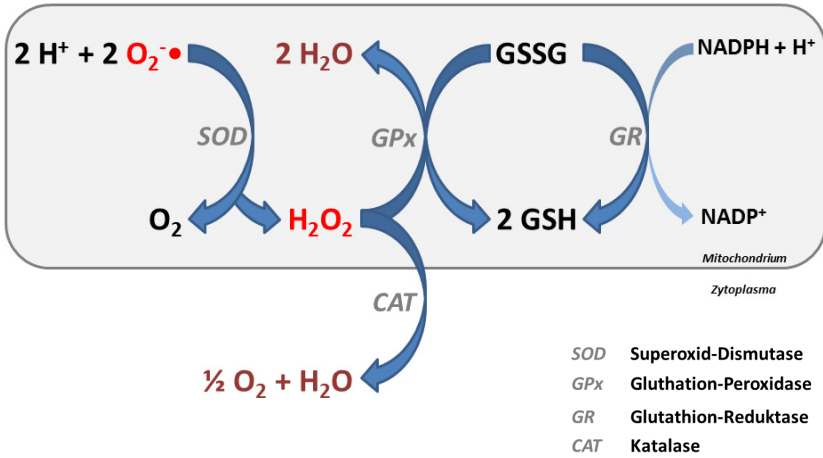


Abbildung I-9 – Enzymatischer Abbau des Superoxid-Anion-Radikals

Dargestellt sind die wichtigsten Schritte des enzymatischen Abbaus des Superoxid-Anions (in Rot markiert). Der graue Kasten stellt die Stoffwechselforgänge innerhalb des Mitochondriums dar.

I. Einleitung

2.6.2 Glutathion

Glutathion (GSH), ein Tripeptid bestehend aus den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin, kommt in fast allen Körperzellen vor (Aslund et al. 1997). Es ist ein wesentlicher Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems, da dieses Peptid sowohl oxidiert als auch reduziert werden kann (Sagone et al. 1984) – so verhindert es z.B. die Oxidation des zweiwertigen Eisenions im Hämoglobin (Robinson et al. 1992). Wie bereits oben erwähnt, spielt Glutathion bei der Entgiftung der ROS eine herausragende Rolle. Reduziertes Glutathion besitzt am Cystein eine freie Thiolgruppe, welche zur Eliminierung freier Radikale und Peroxiden notwendig ist. Dabei wird Glutathion selbst oxidiert und geht von seiner monomeren Form GSH in ein Glutathion-Disulfid-Dimer (GSSG) über (s. Abbildung I-10). Bei dieser Reaktion werden Elektronen auf Sauerstoffradikale (ROS) übertragen und unschädlich gemacht (Aslund et al. 1997). Durch die Glutathion-Reduktase können aus einem GSSG-Dimer unter Verbrauch von NADPH wieder zwei reduzierte GSH hergestellt werden (Mandavilli und Janes 2010). Gleichzeitig stellt GSH eine Reserve für die zur Proteinsynthese wichtige Aminosäure Cystein (Sagone et al. 1984, Cole und Deeley 2006) dar.

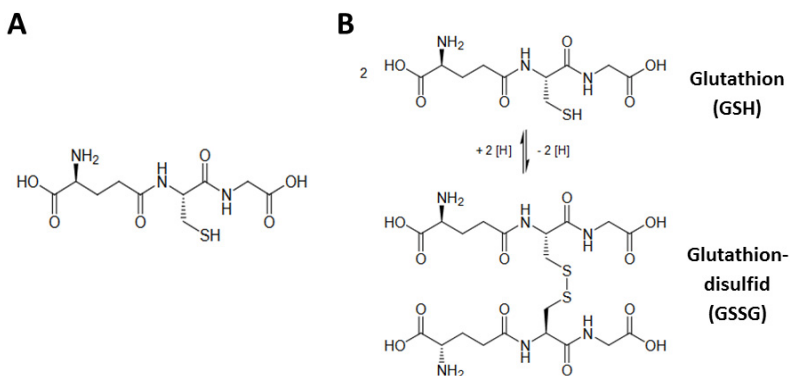


Abbildung I-10 – (A) Strukturformel Glutathion und (B) Reaktionsschema des GSH zum GSSG
Abbildung modifiziert nach www.chemgapedia.de

I. Einleitung

2.6.3 *Der Radikalfänger Tocopherol α – Vitamin E*

Der Begriff Vitamin E beschreibt im Grunde eine Gruppe von Verbindungen, das bekannteste von ihnen ist Tocopherol α (Meier et al. 2003). Dieses ist in der Lage, freie Radikale direkt abzufangen. Dabei wird es seinerseits zu einem sog. „stabilen Radikal“ (Brigelius-Flohe 2009). Dieses Tocopherol-Radikal ist nur noch wenig reaktiv, eine weitere Schädigung der Zelle findet erst einmal nicht statt. Im Anschluss daran wandert es zur Membranoberfläche und wird unter Bildung eines Ascorbatradikals durch Reaktion mit Vitamin C wieder regeneriert (Brigelius-Flohe 2009). Mithilfe von GSH kann auch dieses Ascorbatradikal letztlich zu Ascorbat regeneriert werden.

2.7 Reperfusionsschaden

Obwohl die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung für das Überleben des Gewebes essentiell notwendig ist, kann durch die Reperfusion bzw. Reoxygenierung ein zusätzlicher, unter Umständen sogar ein irreversibler Schaden entstehen (Turer und Hill 2010). Dabei kommt es bereits während der Hypoxie durch den Sauerstoffmangel in den Mitochondrien zur Bildung der ROS (Kowaltowski et al. 2009). Durch die plötzliche Wiederherstellung der O₂-Versorgung explodiert förmlich deren Produktion. Diese freien Radikale führen dann z.B. über Lipidperoxidation zur Schädigung und/oder Zerstörung der Zellmembran, was wiederum zu erheblichen Zell- und Gewebeschäden bis hin zur Nekrose führen kann (Dröge 2002; s. Abbildung I-11).

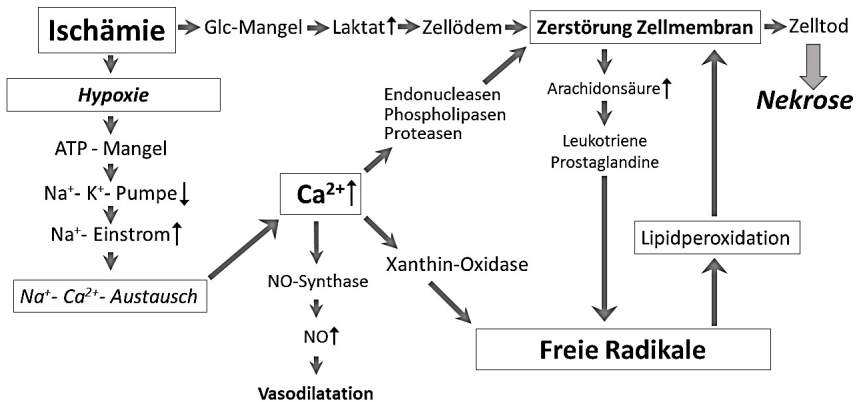


Abbildung I-11 – Übersicht über die wichtigsten Schritte der Schäden verursacht durch Hypoxie

Das Schema beschreibt die wichtigsten Stoffwechselschritte, über die Hypoxie zum Zelltod führen kann. Bisher noch nicht erwähnt ist der Effekt durch Stickstoffmonoxid (NO). Durch die intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel-Erhöhung werden NO-Synthasen aktiviert, die NO-Konzentration nimmt zu und führt letztlich zu einer Vasodilatation (Ignarro et al. 1987). Die Abkürzung „Glc“ beschreibt Glucose.

3. Eigene Fragestellung

Ischämie und Hypoxie sind weit verbreitet und enden oft tödlich. Bereits seit längerer Zeit ist bekannt, dass in einer Energiemangelsituation im Kolon energieverbrauchende Prozesse wie z.B. Sekretion vermehrt ablaufen (Grosse-Brockhoff 1969). In der Tiermedizin gilt v.a. bei Hund (Baumgärtner und Gruber 2015) und Pferd (Dietz und Huskamp 2005) der Darm als Schockorgan Nummer eins. Daher war für mich von großem Interesse, wie und warum sich der Ionentransport am Kolonepithel unter Hypoxie und Reoxygenierung verändert. Dabei sollte geklärt werden, wie sich der transepitheliale Ionenstrom unter Hypoxie bzw. Reoxygenierung verändert und ob die kürzlich am Kolonepithel beschriebenen K_{ATP} -Kanäle (Pouokam et al. 2013) dabei eine Rolle spielen. Weiterhin war von Interesse, ob die Radikalbildung während der Reoxygenierung als mögliche Ursache der Hypoxie-vermittelten Schäden in Frage kommt.

Insgesamt sollten also folgende Fragen durch meine Untersuchungen beantwortet werden:

- ↳ Inwiefern verändert sich der Ionentransport am Kolonepithel während einer Hypoxie und der anschließenden Reoxygenierung?
- ↳ Vermindert die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen die Wirkung von Energiemangel bzw. Hypoxie/Reoxygenierung?
- ↳ Führt ein Energiemangel bzw. Hypoxie/Reoxygenierung am Kolonepithel auch zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration?
- ↳ Sind freie Radikale in die Hypoxie-vermittelten Effekte involviert?

II. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen gezüchtet. Dabei handelte es sich um Wistar-Ratten beider Geschlechter. Die Tiere wurden nach dem Absetzen bis zum jeweiligen Versuchstag nach Geschlechtern getrennt und in kleinen Gruppen in einem ganzjährig klimatisierten Raum bei einem 12 Stunden-hell-dunkel-Rhythmus und 50-55 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Während dieser Zeit hatten die Ratten permanent freien Zugang zu frischem Wasser und Standard-Pellet-Futter (ssniff® R-Z).

Für die Imaging Versuche an isolierten Krypten wurden Tiere beider Geschlechts mit einer Körpermasse von 170 - 210 g bzw. bis zu einem Alter von maximal 9 Wochen ausgesucht. Sind die Tiere schwerer und damit älter, ist eine Isolierung intakter Krypten nicht mehr möglich (Schultheiss et al. 2001). Bei den Versuchen zur Nettoionenstrommessung in der Ussingkammer spielten weder das Geschlecht noch das Alter eine Rolle.

2. Verwendete Lösungen

2.1 Lösung für die Präparation

2.1.1 Bicarbonat-gepufferte Parsonslösung

Das entnommene Kolon wurde in einer eisgekühlten Parsonslösung (Parsons und Paterson 1965) aufbewahrt. Die Lösung enthielt in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$: 107 NaCl; 25 NaHCO_3 ; 1,8 Na_2HPO_4 ; 4,5 KCl; 0,2 NaH_2PO_4 ; 1,25 CaCl_2 ; 1 MgSO_4 und 12,2 Glucose. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von HCl unter Begasung des Puffers mit Carbogen (5 % Kohlendioxid, 95 % Sauerstoff; Vol/Vol) auf 7,4 eingestellt.

2.2 Lösungen für die Ussingkammer-Versuche

2.2.1 Standard-Tyrodellösung

Für alle folgenden Versuche wurde eine $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl Tyrodellösung verwendet. Dieser Puffer enthielt in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$: 140 NaCl; 5,4 KCl; 10 HEPES (N-(2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure)), 5 Glucose; 1,25 CaCl_2 ; 1 MgCl_2 . Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte mit Hilfe von NaOH/HCl.

2.2.2 Chloridfreie Tyrodellösung (KGluc-Lösung)

Um die Rolle der Chloridionen zu klären, wurde eine chloridfreie Tyrode eingesetzt, die in ihrer Zusammensetzung der oben beschriebenen Standard-Tyrodellösung entsprach, das Chlorid allerdings äquimolar durch Gluconat (Gluc) ersetzt wurde (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): 140 NaGluc; 5,4 KGluc; 10 HEPES; 5 Glucose; 7,6 CaGluc; 1 MgCl_2 . Der pH-Wert wurde auch hier mit NaOH/HCl auf 7,4 titriert.

2.2.3 Calciumfreie Tyrodelösung

Um ein calciumfreies Milieu zu schaffen wurde eine modifizierte Tyrodelösung benutzt, in der kein CaCl_2 enthalten war. Auf den zusätzlichen Einsatz eines Ca^{2+} -Chelators wurde verzichtet.

2.3 Lösungen für die Imaging-Versuche

2.3.1 Isolationslösung für die Gewinnung isolierter Krypten

Zur Krypten-Isolation wurde eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Hanks balanced salt solution (HBSS) verwendet, in der $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure) gelöst wurden. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte mit TRIS-Base (Tris(hydroxy-methyl-)aminomethan).

2.3.2 Auffangtyrode

Die gewonnenen isolierten Krypten wurden in einer chloridarmen und kaliumreichen Tyrodelösung („Auffangtyrode“) aufgefangen (Böhme et al. 1991, Diener et al. 1991). Darin enthalten waren (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): 100 KGluc; 30 KCl; 10 HEPES; 20 NaCl; 1,25 CaCl_2 ; 12,2 Glucose (pH 7,4). Anschließend wurde dieser Lösung noch $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Natriumpyruvat und $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ bovines Serumalbumin (BSA) zugesetzt.

II. Material und Methoden

2.3.3 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Zunächst wurden von allen Farbstoffen Stammlösungen hergestellt, deren Konzentrationen in Tabelle II-1 ersichtlich sind. Diese konnten aliquotiert und lichtgeschützt bei -20°C eingefroren werden. Um die Krypten aufzuladen, musste täglich eine Gebrauchslösung hergestellt werden, deren jeweilige Zusammensetzung und Arbeitskonzentration ebenfalls in Tabelle II-1 aufgeführt ist.

Tabelle II-1 – Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Stammlösung (in DMSO)	Zusatz	End- konzentration	Anregungs- maximum
Fura-2 AM	1 mmol·l ⁻¹	0,5 µl Pluronic acid 3 ml Auffangtyrode	3 µmol·l ⁻¹	340/380 nm
ThiolTracker™ Violet Stain	20 mmol·l ⁻¹	3 ml Standard- Tyrode	20 µmol·l ⁻¹	380 nm
MitoSOX™ Red	5 mmol·l ⁻¹	3 ml Standard- Tyrode	5 µmol·l ⁻¹	390 nm

Aufgeführt sind die jeweils für das Imaging verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe, deren Stamm- und Arbeitskonzentrationen und die jeweiligen Anregungswellenlängen. Genaueres zur Durchführung der Versuche wird in Kapitel II.6.7.2 erläutert.

2.3.4 Lösung zur Beschichtung der Glasplättchen

Um das Anheften der isolierten Krypten während der Imaging-Versuche zu verbessern, wurden Deckgläschen (Durchmesser 22 mm) mit Poly-L-Lysin ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, Molekulargewicht $> 300.000 \text{ D}$) beschichtet. Dazu wurden zunächst $50 \mu\text{l}$ dieser gebrauchsfertigen Lösung unverdünnt auf das Deckgläschen pipettiert und anschließend ein 1 cm hoher Silikonring, mit einem Durchmesser von ca. 6 mm (FlexiPERM micro 12; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) auf das Plättchen aufgebracht. Die Glasplättchen wurden für ca. 15 Min auf eine Heizplatte (38°C) gelegt, bis keine Flüssigkeit mehr zu sehen war. Poly-L-Lysin eignet sich gut als Untergrund da es negative Festladungen besitzt und somit elektrostatische Kräfte ausübt, welche das Anheften von isolierten Zellen oder Zellverbänden verbessern.

3. Substanzen

Bumetanid wurde in Ethanol gelöst (maximale Endkonzentration: 0,25 % Vol/Vol). 2-Aminoethoxy-diphenylborat (2-APB), Cyclopiazonsäure (CPA; Alexis, Grünberg, Deutschland), Glibenclamid (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland), 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat (NPPB), Pinacidil und Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylicacid) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO; höchste maximale Konzentration: 1 % Vol/Vol) gelöst. Barium (BaCl_2) und Gadolinium (GdCl_3) wurden in einer wässrigen Stammlösung angesetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Substanzen von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

4. Die Gewebepräparation

4.1 Präparation der Mukosa

Die Ratten wurden durch einen Genickschlag mechanisch betäubt und anschließend mittels zervikaler Dislokation, gefolgt von Entbluten durch einen Herzschnitt getötet (genehmigt durch die Tierschutzbeauftragte der JLU Gießen, Aktenzeichen 487_M). Hierzu musste die Bauchhöhle entlang der Linea alba bis in den Thorax eröffnet werden. Um die Präparation zu erleichtern, wurden entlang der Leiste zwei Entlastungsschnitte gesetzt. Jetzt konnte das Kolon vorsichtig vorgelagert werden und am distalen Übergang zum Rektum, welcher durch einen großen Lymphknoten markiert ist (Lindstroem et al. 1979), mit einer Schere abgesetzt werden. Durch stumpfe Präparation wurde das Kolon bis zu seinem proximalen Ende frei gelegt. Dort wurde es schließlich am Übergang zum Blinddarm mit einer Schere abgetrennt. Sofort nach der Entnahme wurde das Kolon in eisgekühlter Parsonslösung unter Carbogenbegasung gelagert, damit sich die Muskulatur entspannte. Mit Hilfe einer Spülspritze wurde das Darmlumen gespült bis keine Kotrückstände mehr vorhanden waren. Im Anschluss daran wurde das Darmstück über einen Kunststoffstab mit einem Durchmesser von 5 mm gestülpt. Am distalen Ende erfolgte oberhalb des erwähnten Lymphknotens mit einem stumpfen Skalpell vorsichtig eine ringförmige Inzision, welche die *Tunica serosa* und die *Tunica muscularis* von den restlichen Schichten abtrennen sollte. Diese Schichten konnten dann stumpf mit dem Daumen nach proximal abgelöst („gestrippt“) werden.

Zur weiteren Versuchsdurchführung wurde das gestrippte Mukosa-Submukosa-Präparat zuerst in ca. 3 cm lange Stücke unterteilt und anschließend am Mesenterialansatz längs aufgetrennt. Diese Präparate konnten sowohl für die Ussingkammer- als auch für die Imaging-Versuche verwendet werden.

4.2 Präparation isolierter Krypten

Das Mukosa-Submukosa-Präparat wurde mit Hilfe eines Cyanacrylatklebers auf einem Plexiglashalter fixiert, welcher in der Mitte ein ovales Loch besitzt (Schultheiss et al. 2001). Abhängig vom Gewicht der Tiere wurde das Gewebe in der calciumfreien EDTA-haltigen Isolationslösung (s. Kapitel II.2.3.1) für 5-7 Minuten bei 38°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Präparat sofort in einen Vibromischer (Chemap, Volketswil, Schweiz) eingespannt und für ca. 30 Sekunden vibriert, dieser Vorgang wird im Folgenden als Schütteln bezeichnet. Die isolierten Krypten wurden dabei in ein Gefäß mit Auffangtyrode (s. Kapitel II.2.3.2) geschüttelt. Nach einer kurzen Wartezeit, die zur Absenkung der Krypten diente, wurden unter Sichtkontrolle mit einer Mikropipette 30 µl der isolierten Krypten auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Plättchen pipettiert. Diese Suspension wurde schließlich mit 70 µl Auffangtyrode aufgefüllt. Die Präparate konnten lichtgeschützt bis zu 6 Stunden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.



Abbildung II-1 – Originalbild einer isolierten Krypte

5. Die Ussingkammer Technik

5.1 Theorie des Ussingkammer Messprinzips

Um die elektrischen Eigenschaften von Epithelgeweben zu messen, wurde 1946 von dem dänischen Physiologen Hans Henriksen Ussing die Kurzschlussstrom-Technik entwickelt (Ussing und Zerhahn 1950). Mit dieser Methode wurde es möglich, Transport- und Barrierefunktionen von lebendem Gewebe zu erfassen und zu quantifizieren. Ussing und Zerahn entwickelten hierbei ein Ersatzschaltkreismodell, wobei das eingespannte Gewebe als Widerstand bzw. Batterie fungiert, die Widerstände der apikalen und basolateralen Membran sind dabei in Reihe geschaltet. Somit kann die Ussingkammer verwendet werden, um den Ionenfluss eines Gewebes theoretisch zu beschreiben, aber auch um den Transport von Nährstoffen und anderen Substanzen zu erforschen.

Gemessen werden dabei elektrische Parameter wie der Kurzschlussstrom (I_{sc} ; sc = short-circuit), die Gewebeleitfähigkeit (G_t ; G = Kehrwert des Widerstandes und t = tissue) und die transepitheliale Potentialdifferenz (P_d). Dazu sind die Kammern mit zwei verschiedenen Elektrodenpaaren über Agarbrücken (50 g·l⁻¹ Agar in Parsonslösung) verbunden. Eins der Elektrodenpaare ist gewebe nah (ca. 1 mm Abstand von der Schleimhaut) angebracht um Potentialverluste durch den Lösungswiderstand zu minimieren. Das andere Elektrodenpaar dient als Stromlieferant (Ag/AgCl-Elektroden) und wird gewebe fern angebracht, damit eine möglichst gleichmäßige Stromdichte erreicht werden kann.

Durchgeführt wurden meine Messungen mit einer computerkontrollierten Voltage-Clamp-Anlage (Winclamp; Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland). Der Messstand erlaubte das Umschalten zwischen zwei Messarten: dem *Open-circuit-Modus* und dem *Voltage-clamp-Modus* (s. Abbildung II-2).

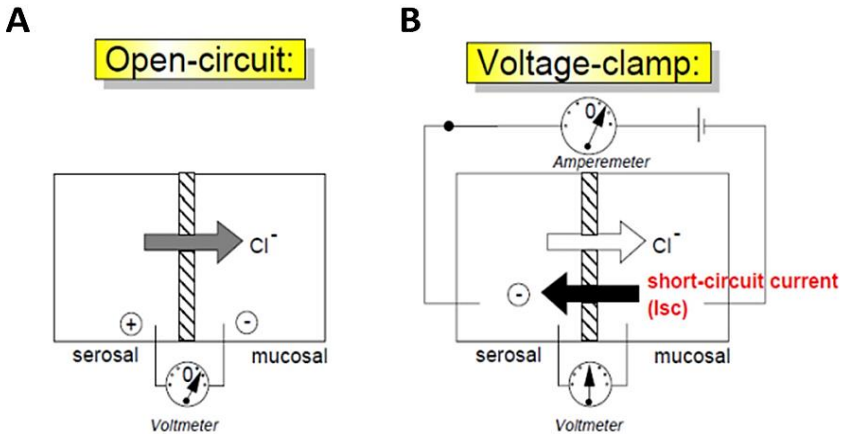


Abbildung II-2 – Schaltbild für (A) den Open-Circuit-Modus und (B) den Voltage-clamp-Modus

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

Zu Versuchsbeginn wurde kurz nach dem Einspannen des Präparates der *Open-Circuit-Modus* gewählt, um eine Stabilisation des Gewebes zu gewährleisten. Beide Kammerhälften wurden mit derselben Pufferlösung (Standard-Tyrode) befüllt, wodurch der hydrostatische Druck und chemische Gradienten als Motor für Ionen- bzw. Stofftransport ausgeschlossen werden konnten. Unter diesen Bedingungen beruht der Nettotransport von Ionen ausschließlich auf aktiven Transportvorgängen durch das Epithel. Üblicherweise wird am Rattenkolon eine spontane Sekretion von Anionen, in erster Linie von Cl^- und HCO_3^- (Strabel und Diener 1995), beobachtet. Dies hat zur Folge, dass sich die serosale (basolaterale) Seite gegenüber dem Lumen (apikal in Bezug auf die Epithelzellen bzw. mukosal in Bezug auf die Mukosa) positiv auflädt, was als transepitheliale Potentialdifferenz bezeichnet wird.

II. Material und Methoden

Nach ca. 1 Minute im *Open-Circuit-Modus* wurde in den *Voltage-Clamp-Modus* umgeschaltet. Durch Einleiten eines externen Stromes kann die Potentialdifferenz auf einen beliebigen Wert eingestellt werden. Damit passive Ionenbewegungen ausgeschlossen werden konnten, wurde für dieses Projekt eine besondere Form des Voltage-Clamp-Modus gewählt, der *Short-circuit-Modus*. Der vom Epithel erzeugte transepitheliale Strom wird dabei durch einen entgegengesetzten Strom kompensiert, es entsteht ein Kurzschluss und das Epithel wird damit auf 0 mV geklemmt. Dieser Kurzschluss-Strom („short-circuit current“ = I_{sc}) ist ein Maß für die Nettoionenbewegung durch das Epithel.

Wie bereits oben erwähnt ist eine Änderung im I_{sc} unter diesen Voraussetzungen immer auf einen aktiven Transport zurückzuführen. Ein positiver I_{sc} spricht dabei für einen Netto-Anionentransport von der serosalen zur mukosalen Seite, im Umkehrschluss zeigt ein negativer I_{sc} einen Netto-Kationentransport von der mukosalen zur serosalen Seite des Epithels. Der Strom wird dabei in $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ angegeben, dies ist gleichbedeutend mit dem Transport eines einwertigen Ions pro Zeit und freier Gewebefläche:

$$1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}.$$

Damit die elektrischen Gewebeeigenschaften vollständig charakterisiert werden konnten, musste die Gewebeleitfähigkeit (G_t ; mit t = tissue) und zusätzlich der Gewebewiderstand (R_t) ermittelt werden. Während der Messungen im *Voltage-Clamp-Modus* wirkten hierbei Stromimpulse mit einer Amplitude von $\pm 50 \mu\text{A}$ für eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe ein. Aus der resultierenden Änderung der Potentialdifferenz konnte nun mit dem Ohm'schen Gesetz der Gewebewiderstand (R_t) errechnet werden:

$$\text{Spannung (U)} = \text{Widerstand (R)} \cdot \text{Strom (I)} \text{ und daraus folgt: } R_t = U/I$$

Hieraus ergibt sich wiederum die Gewebeleitfähigkeit (G_t) = I/U .

II. Material und Methoden

5.1.1 Die modifizierte Messkammer

Die verwendeten Kammern (s. Abbildung II-3) bestanden aus zwei Plexiglashälften, welche durch zwei Plexiglasschrauben miteinander verbunden wurden. Damit der Verschluss möglichst dicht war, wurde im Bereich der Kontaktflächen ein dünner Silikonfilm aufgetragen. Das Mukosa-Submukosa-Präparat wurde unter leichter Spannung mithilfe feiner Metallnadeln zwischen den Kammerhälften fixiert und im Anschluss daran die Kammer verschraubt. Somit entstanden zwei getrennte Kompartimente, jedes mit einem Volumen von 3,5 ml, in welche die Tyrodelösung gefüllt wurde. An jeder Hälfte der Kammern befand sich oben ein Zugang, über den Lösungen oder Substanzen zugegeben werden oder Pufferwechsel stattfinden konnten. Die Temperatur wurde über einen geheizten Wasserkreislauf während der gesamten Versuchsdauer konstant bei 37°C gehalten. An der Unterseite jeder Kammerhälfte konnte die Begasung eingeleitet werden, in diesem Projekt wurde eingangs über eine Membranpumpe (EHEIM 100; EHEIM, Deizisau, Deutschland) mit Raumluft und für die Dauer der Hypoxie mit Stickstoff (99,8 % N₂; Air Liquid, Düsseldorf, Deutschland) begast.

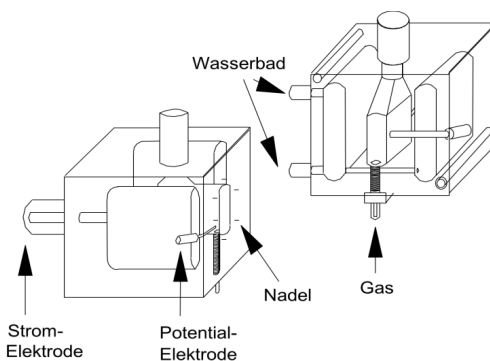


Abbildung II-3 – Schema einer modifizierten Ussingkammer

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

5.2 Versuchsdurchführung und Datenerfassung

Vor dem Einspannen des Gewebes in die Messkammer wurde die Potentialdifferenz zwischen den einzelnen Spannungselektroden und der Widerstand der verwendeten Tyrodellösung (s. Kapitel II.2.2.1) bestimmt; die erhobenen Messdaten wurden um diese „Offset“-Werte korrigiert. Damit sich der Gewebewiderstand stabilisieren konnte, wurden die Gewebe für 60 Min unter *short-circuit*-Bedingungen gehalten, bevor mit den eigentlichen Versuchen begonnen wurde. Je nach Versuchsreihe konnten dann Pufferlösungen ersetzt oder Substanzen appliziert werden. Die Messwerte des Kurzschlussstroms (I_{sc}), der Potentialdifferenz (Pd) und der Gewebeleitfähigkeit (G_e) wurden kontinuierlich durch den Computer alle 6 Sekunden erfasst und gespeichert. Die Daten wurden als Minutenwerte ausgedruckt und gleichzeitig in ein Tabellen Kalkulationsprogramm exportiert (Microsoft Excel).

Die *Baseline* entsprach dem I_{sc} unter basalen Versuchsbedingungen und wurde grundsätzlich aus den letzten drei Minuten als Mittelwert der Äquilibrierungsphase ermittelt, bzw. drei Minuten vor dem eigentlichen Versuchsbeginn. In der Hypoxiephase wurde als *Dec1* der Minimalwert während der ersten fünf Minuten (Minute 0-5) und als *Dec2* der Minimalwert von Minute 5 – 15 bezeichnet. Als *Peak* wurde der höchste Wert während der ersten fünf Minuten (Minute 0-5) der Hypoxiephase gewertet und die Veränderung zwischen Baseline und Peak, bzw. *Dec1* und *Dec2* als ΔI_{sc} angegeben. Ähnliches galt für die Berechnung der Reoxygenierungsphase, die in jeder Versuchsreihe der Hypoxie folgte. Hier wurde der höchste Wert von Minute 3 - 15 gewertet und als *Peak Reoxy* angegeben. Dieser wurde mit der vorhergehenden Baseline (Mittelwert der letzten 3 Minuten der Hypoxiephase) verglichen. Die Ergebnisse wurden ebenfalls als ΔI_{sc} angegeben.

6. Die Imaging Technik

6.1 Theorie des Ca^{2+} - Imaging

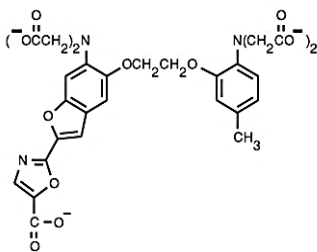
Ca^{2+} -Ionen sind wichtige intrazelluläre Botenstoffe. Änderungen der zytosolischen Calciumkonzentration lassen sich semiquantitativ in vitalen Zellen mit Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. Fura-2 messen. Fura-2 (s. Abbildung II-4) gehört zur Gruppe der wellenlängenändernden Farbstoffe (wavelength shifting dyes). Binden die Ca^{2+} -Ionen an den Farbstoff, ändert sich dessen optimale Anregungswellenlänge. Vorteil dieser Substanz ist, dass sich ein Ca^{2+} -freier und ein Ca^{2+} -gesättigter Farbstoffanteil unterscheiden lassen. So ist es möglich, dass eine Verhältnismessung (Ratio-Messung) durchgeführt werden kann, bei der die Emissionswerte des ionengebundenen Anteils durch die des freien Farbstoffes dividiert werden. Ca^{2+} -gebundenes Fura-2 hat sein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm, freies Fura-2 hingegen hat sein Maximum bei 362 nm. Allerdings ist eine Messung bei einer Anregungswellenlänge von 362 nm wenig sinnvoll, da der isoemissive Punkt des Fura-2-spezifischen Fluoreszenzspektrums (s. Abbildung II-5) sehr nah an dieser Wellenlänge liegt. Das bedeutet, die Fluoreszenzintensität ist (unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration) bei dieser Wellenlänge immer gleich. Stattdessen wird bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm gemessen, da hier der Unterschied zwischen der Fluoreszenzintensität von Ca^{2+} -freiem und Ca^{2+} -gebundenem Fura-2 am größten ist. Durch die unterschiedlichen Anregungsmaxima ergibt sich nun die Möglichkeit der Ratio-Messung (Emission bei Anregung 340 nm/Emission bei Anregung 380 nm). Die Vorteile dieser Messmethode bestehen in der Unabhängigkeit von Zelldicke und Zellgröße, der intrazellulär vorhandenen Menge an Indikatorsubstanz sowie einer evtl. ungleichen Verteilung des Farbstoffes (Tsien und Poenie 1986). Da die Fura-2-Ratio auch durch andere Faktoren wie pH-Wert, Osmolarität oder intrazelluläre Proteine beeinflusst wird (Baylor und Hollingworth 2000), wird heute in der Regel auf eine Kalibrierung zur Berechnung der absoluten

zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verzichtet und stattdessen – wie auch in dieser Arbeit geschehen – nur das Fura-2-Ratio-Signal ausgewertet.

6.2 Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM

Die Krypten wurden mit Fura-2 AM, einem lipophilen Ester des eigentlichen Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffs Fura-2 (Tsien 1980), aufgeladen. Fura-2 an sich ist ein stark negativ geladenes Molekül, welches die Zellmembran nicht permeieren kann. Sein ungeladener Acetoxymethylester (Fura-2 AM) hingegen ist lipophil und kann per Diffusion die Zellmembran passieren. Sobald der Fura-2 AM Farbstoff im Zytosol angelangt ist, spalten zelleigene unspezifische Esterasen die Esterbindung; es entsteht die freie Säureform des Farbstoffs. Die geladenen Fura-2-Moleküle fluoreszieren und können nicht mehr aus der Zelle heraus diffundieren (Tsien und Poenie 1986). Aufgrund dieser Molekülstruktur besitzt der Farbstoff eine hohe Selektivität um zweiwertige Kationen, besonders Ca^{2+} , zu binden. Überschüssiger Farbstoff, der nicht in die Zelle aufgenommen wurde, kann durch vorsichtiges Waschen entfernt werden.

A



B

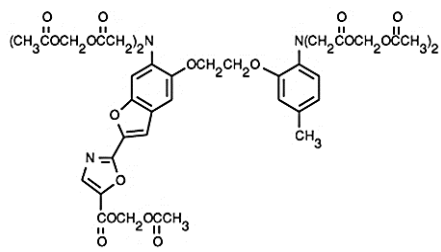


Abbildung II-4 – (A) Strukturformel Fura-2 (B) Strukturformel Fura-2-AM
(modifiziert nach Haugland (2010))

II. Material und Methoden

Die Dissoziationskonstante (K_D) beschreibt den Wert, bei dem 50 % des Fura-2 an Ca^{2+} gebunden ist. Die Bindungskurve von Calcium an Fura-2 verläuft sigmoidal (s. Abbildung II-5). Die K_D für den Fluoreszenzfarbstoff beträgt $224 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, der optimale Messbereich liegt somit zwischen $22,4 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $2240 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Die zytosolische Calciumkonzentration einer ruhenden Zelle liegt bei ca. $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, d.h. dieser Wert fällt genau in den optimalen Messbereich von Fura-2. Somit lassen sich mit diesem Farbstoff Änderungen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sehr genau erfassen.

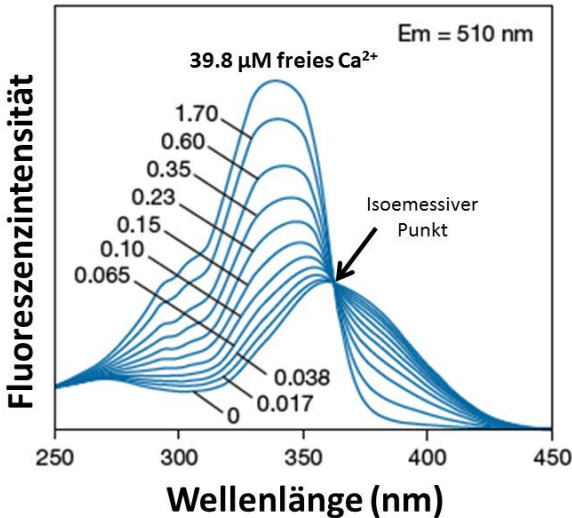


Abbildung II-5 – Exzitationsspektum von Fura-2 bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen
Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität von Fura-2 in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen freien Ca^{2+} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) bei einer Emissionswellenlänge (E_m) von 510 nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (nm).
(modifiziert nach Haugland (2010))

6.3 Fluoreszenzfarbstoff ThiolTracker™ Violet Stain

Um die Zelle vor oxidativem Stress und vorzeitigem Zelltod zu schützen, spielt Glutathion (GSH) eine wichtige Rolle (Aslund et al. 1997; s. auch Kapitel I.2.6.2). Änderungen in der Konzentration an intrazellulären freien Thiolen, von denen das Glutathion die Hauptform darstellt, können mit dem Fluoreszenzfarbstoff ThiolTracker™ Violet Stain gemessen werden (Mandavilli und Janes 2010). Dieser dringt schnell in die Zelle ein, seine Fluoreszenz wurde bei 380 nm angeregt und die Emmission bei > 510 nm gemessen.

6.4 Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX™ Red Superoxid Indikator

Zur Erforschung einer möglichen Beteiligung der mitochondrialen Superoxid-Dismutase wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX™ Red (s. Abbildung II-6) verwendet. Ein wichtiges Enzym um die ROS abzufangen ist die mitochondriale Superoxid-Dismutase (SOD) (Mukhopadhyay et al. 2007, Kowaltowski et al. 2009; s. auch Kapitel I.2.6.1). SOD ist in der Lage, Superoxid in Form von $O_2^{\bullet-}$ zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu konvertieren. Der Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX™ Red ist ein Kationen-Derivat von Hydroethidin (Zielonka und Kalyanaraman 2010). Um mitochondriale Superoxide anzufärben, wurde die chemische Struktur des Hydroethidin durch eine Konjugation mit Triphenylphosphonium modifiziert (s. Abbildung II-7).

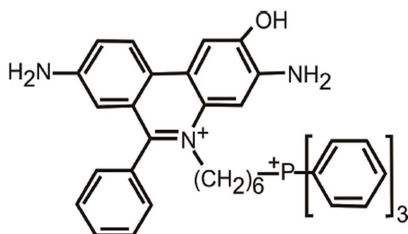


Abbildung II-6 – Strukturformel Fluoreszenzfarbstoffes MitoSOX™ Red

Die Abbildung zeigt den mitochondrialen Superoxid-Farbstoff in oxidiertem Zustand (Abbildung aus Held (2015))

Dieser Substituent ist verantwortlich für die Aufnahme des Farbstoffs in die Mitochondrien. Dabei wird das Reagenz spezifisch von Superoxiden oxidiert und nicht von anderen ROS- oder reaktiven Stickstoff (RNS)-generierenden Systemen (Zielonka und Kalyanaraman 2010). Die intrazelluläre Oxidation des Indikators führt schließlich zu einer Bindung an Nucleinsäuren.

II. Material und Methoden

Das so entstandene 2-Hydroxyethidium (s. Abbildung II-7) hat ein Anregungsmaximum von ca. 400 nm, dieses Spektrum ist spezifisch für die Reaktion mit Superoxid.

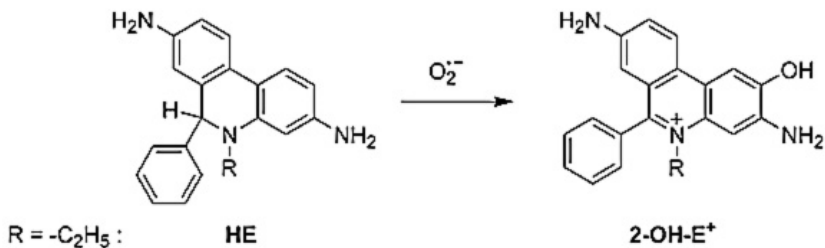


Abbildung II-7 – Bildung des 2-Hydroxyethidium (HE) durch Superoxid (O₂^{•-}) zu 2-Hydroxyethidium (2-OH-E⁺)

(Abbildung modifiziert nach Zielonka und Kalyanaraman (2010))

Eine Anregung zwischen 380 nm und 590 nm ist demnach optimal um Superoxid-Reaktionen von denen anderer oxidativen Radikal-Reaktionen zu unterscheiden. Gemessen wurde die MitSOX™-Fluoreszenz in dieser Arbeit bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emission von > 580 nm.

6.5 Der Messstand

Alle Imaging-Messungen wurden mit einem inversen Lichtmikroskop IX50 (Olympus Optical; Tokyo, Japan) durchgeführt, dieses ist ausgestattet mit einem Epifluoreszenz-Setup und einer Imageanalyse-Software (Till Photonics, Martinsried, Deutschland; s. Abbildung II-8).

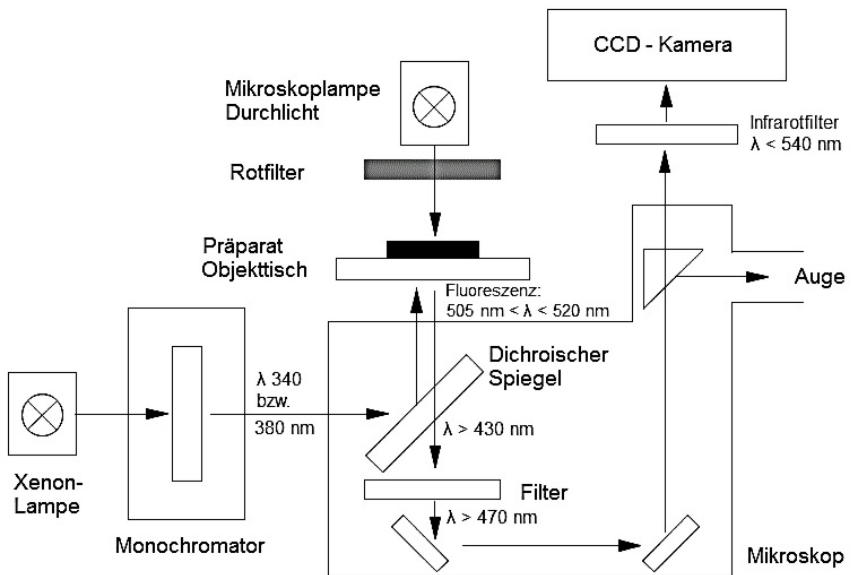


Abbildung II-8 – Schematischer Aufbau des Imaging-Messstandes

Die angegebenen Wellenlängen beziehen sich auf die Fura-2-Messungen.

(Verwendung der Grafik mit freundlicher Genehmigung von Prof. M. Diener)

II. Material und Methoden

Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wurde eine Monochromatoreinheit (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) verwendet, als Lichtquelle diente eine Xenon-Lampe. Über einen Spiegel werden die erzeugten Lichtwellen in den Lichtleiter gelenkt, der über einen Epifluoreszenz-Kondensor mit dem Mikroskop verbunden ist. Die Anregungswellen werden anschließend über einen dichromatischen Spiegel auf das Objekt gelenkt. Das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht (340 – 390 nm) kann durch den Spiegel treten und mithilfe einer CCD-Kamera (charge-coupled-Device; Till Photonics, Martinsried, Deutschland) detektiert werden. Diese Daten werden in Echtzeit an den Computer gesendet, so konnten die Veränderungen in den Krypten in Form von sog. „live-displays“ aufgezeichnet und am Bildschirm verfolgt werden.

6.6 Die Hypoxiekammer mit Perfusionssystem

Wie in Abbildung II-9 dargestellt, bestand die Messkammer aus einer Metallbasisplatte mit einer runden, im Durchmesser 18 mm großen Aussparung in der Mitte. Auf diese Aussparung wurde ein Poly-L-Lysin-beschichtetes Deckgläschen, (s. Kapitel II.2.3.4) mit der aufgeladenen Kryptensuspension gelegt. Zur Befestigung dieses Deckgläschens wurde ein erster Teflonring mit gleichgroßer Öffnung aufgesteckt und mit vier Schrauben verschraubt. Dieser erste Teflonring war mit zwei Edelstahlkapillaren (Durchmesser 1 mm) ausgestattet, die als Pufferzu- bzw. Pufferablauf dienten. Über den Zulauf wurde mit einer Spritze die in Kapitel II.2.2.1 beschriebene Tyrodelösung vorsichtig eingefüllt. Das Volumen der Kammer betrug 2 ml. Im Anschluss daran wurde ein zweites, sauberes Deckgläschen (ebenfalls im Durchmesser 22 mm) auf den Flüssigkeitsspiegel aufgelegt um das Innere der Kammer luftdicht zu verschließen. Ein zweiter Teflonring sicherte das obere Deckgläschen und wurde mit vier Rändelschrauben befestigt. Die gesamte Vorrichtung konnte nun auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert und an ein Perfusionssystem angeschlossen werden. Die ständige Perfusion mit Puffer erfolgte über Edelstahlkapillaren, die über ein Schraubventil mit der Kammer verbunden wurden.

Über eine Membranpumpe wurde Raumluft in eine Weithalsglasflasche mit dem entsprechenden Puffer geleitet, in einer zweiten fand die Stickstoff-Begasung statt. Dieses Gefäß war mit einem Latexhandschuh verschlossen um Gasverlust zu vermeiden. Die Perfusion erfolgte mithilfe der Schwerkraft, die Geschwindigkeit der Perfusion betrug dabei $280 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. Alle Imaging-Experimente wurden in einem lichtgeschützten Labor bei Raumtemperatur durchgeführt.

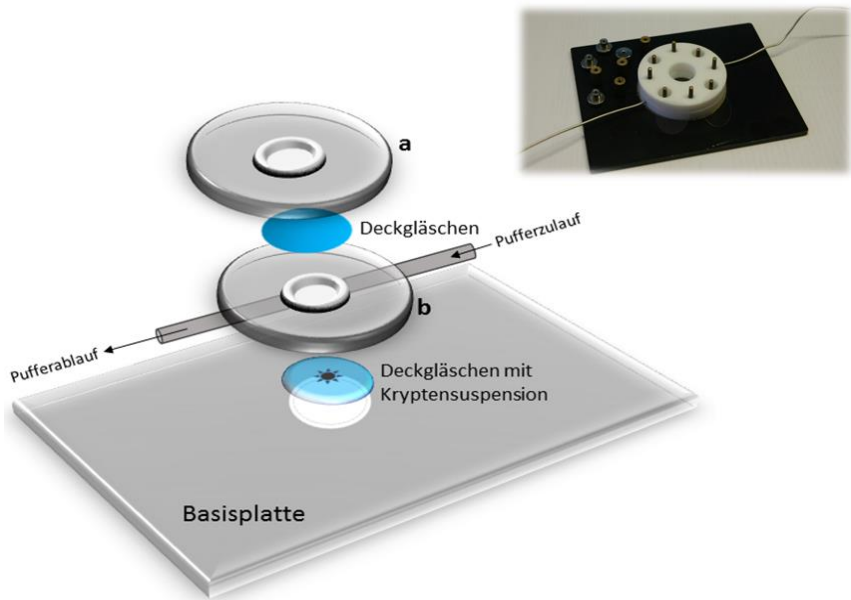


Abbildung II-9 – Schematischer Aufbau und ein Originalfoto (kleines Bild) der Hypoxiekammer

Großes Bild (Schema) a = oberer Teflonring, b = unterer Teflonring; beide Ringe werden über Schrauben fest miteinander verbunden, diese wurden aufgrund der Übersichtlichkeit im Schema weggelassen. Im kleinen Bild oben rechts ist ein Originalfoto der Hypoxiekammer mit den zugehörigen Schrauben zu sehen.

6.7 Imaging-Experimente an isolierten Krypten

6.7.1 Aufladung der Krypten

Für das Ca^{2+} -Imaging wurde die Kryptensuspension mit Fura-2 AM ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Pluronic acid für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert (siehe Kapitel II.6.2). Zur Untersuchung der Radikalbildung wurden die Krypten mit ThiolTracker™ Violet Stain ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) oder mit MitoSOX™ Red ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in gleicher Weise inkubiert (s. Kapitel II.6.3 und II.6.4 und Tabelle II-1). Nicht aufgenommener Fluoreszenzfarbstoff wurde durch zweimaliges Waschen mit Auffangtyrode entfernt.

6.7.2 Versuchsdurchführung

6.7.2.1 Fura-2

Die Deckgläschen mit den aufgeladenen Krypten wurden in die Messkammer gespannt, welche auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert wurde. Mit Hilfe der Imaging-Software TillVision (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) wurde ein Bild („Snapshot“) von einer geeigneten Krypte erstellt. Die Intensität der Fluoreszenz stellte sich durch Falschfarben auf dem Bildschirm dar: die Bereiche, in denen die Krypte am geringsten fluoreszierte, waren blau, die etwas stärker fluoreszierenden Bereiche waren grün und gelb und den am stärksten fluoreszierenden Bereichen wurde rot zugeordnet. Anhand dieser Darstellung wurden einzelne Zellen bzw. Bereiche manuell als Messbereiche (region of interest „ROI“; s. Abbildung II-10) definiert. Um festzustellen, ob die Krypten entlang der Kryptenachse unterschiedlich auf die Hypoxie und Reoxygenierung reagieren, wurden die ROIs entsprechend so gewählt, dass sich immer die gleiche Anzahl in der Fundus-, der mittleren und der Oberflächenregion befanden (Übersicht s. Kapitel I.2.2). Ein weiterer ROI-Messpunkt wurde extrazellulär im „leeren Raum“ platziert, damit er als Leerwert-Kontrolle herangezogen werden konnte.

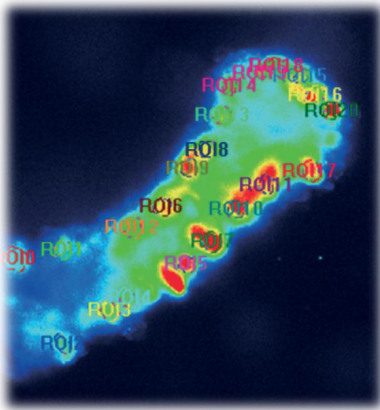


Abbildung II-10 – Falschfarbendarstellung einer mit Fura-2 AM beladenen isolierten Krypte
Kreise bezeichnen die Messfelder (=ROIs)

Zu Beginn jedes Imaging-Versuches wurde das Präparat mit Tyrodelösung unter Raumluftbegasung superfundiert um eine stabile Baseline zu erhalten. Dann erfolgte die Perfusion mit dem Stickstoffbegasten Puffer (*Hypoxiephase*). Im Anschluss daran wurde die Tyrodelösung mit Raumluftbegasung superfundiert (*Reoxygenierung*).

Bei der Fura-2 AM Reihe fand am Ende jedes Versuches eine Vitalitätskontrolle mit Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) statt. Dies ist ein Mykotoxin, welches die Wiederaufnahme von zytosolischen Calciumionen in das endoplasmatische Reticulum (ER) hemmt. Das Zellgift blockiert die dort lokalisierte Calcium-ATPase SERCA (= sarco-plasmatic-endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase). Dadurch entsteht unabhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration ein Anstieg der Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Zytosol (Moncoq et al. 2007).

II. Material und Methoden

6.7.2.2 *ThiolTracker™ Violet Stain und MitoSOX™ Red*

Die Intensität der Fluoreszenz wurde auch hier durch Falschfarben auf dem Bildschirm (s. Abbildung II-10) dargestellt. Am Ende jeden Versuches wurde eine Vitalitätskontrolle mit $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durchgeführt. H_2O_2 entsteht physiologischerweise durch die Dismutation von Superoxid, diese verläuft entweder spontan oder wird durch die SOD, welche in den Mitochondrien und dem Zytosol lokalisiert ist, enzymatisch katalysiert (s. auch Kapitel I.2.5.3).

6.7.3 *Datenerfassung*

6.7.3.1 *Fura-2*

Alle 5 Sekunden wurden die Krypten mit zwei Lichtpulsen von 340 nm und 380 nm (je 20 ms appliziert im Abstand von 5 ms) belichtet und daraus das Fura-2 Ratio-Signal errechnet. Analog zum Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration stieg auch das Signal der Ratio und umgekehrt sank das Signal, wenn sich die Konzentration der Ca^{2+} -Ionen im Zytosol verringerte.

6.7.3.2 *ThiolTracker™ Violet Stain und MitoSOX™ Red*

Da es sich nicht um Ratio-Farbstoffe handelte, wurde im Versuchsprotokoll festgelegt, dass alle 5 Sekunden ein 20 ms andauernder Lichtpuls von 380 nm (ThiolTracker™) bzw. 390 nm (MitoSOX™) appliziert werden sollte. Farbstoffspezifisch resultierte aus der Oxidation des Glutathion ein sinkendes Signal beim ThiolTracker™-Imaging und analog zum Anstieg der mitochondrialen Superoxide ein steigendes Signal beim MitoSOX™-Imaging.

II. Material und Methoden

Alle erfassten Werte wurden auf der Computerfestplatte gespeichert und anschließend mit verschiedenen Datenanalyse-Programmen ausgewertet. Als Basalwert (*Baseline*) galt die Fura-2-Ratio bzw. das ThiolTracker™- oder MitoSOX™-Signal unter basalen Versuchsbedingungen. Dazu wurde die *Baseline* als Durchschnittswert aus den letzten drei Minuten vor Hypoxie bzw. vor Lösungswechsel berechnet. Die maximalen Änderungen im Fluoreszenzsignal während Hypoxie bzw. Reoxygenierung wurden als Differenz zu dieser *Baseline* in den entsprechenden Tabellen angegeben.

7. Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Mittelwerten \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) oder in Originalkurven. Wurden die Ergebnisse als Messbalken abgebildet, stellt die Höhe der Säule den Mittelwert dar und der Fehlerbalken den SEM. Bei den Imaging-Versuchen bezeichnet n die Anzahl der einzelnen gemessenen Kolonepithelzellen, bei den Ussingkammer-Versuchen stellt n die Anzahl der eingespannten Gewebe dar.

Unabhängig davon wurden die Zellen oder Gewebe für alle Versuche von mindestens drei verschiedenen Tieren gewonnen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde entweder ein Student's t-Test oder ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt; ein F-Test legte fest, welche der beiden Methoden angewendet wurde. Um mehrere Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit einem anschließenden Post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Hypoxie löst eine Sekretion am Kolonepithel aus

In Vorversuchen wurde getestet, für welche Zeitdauer eine durch N₂-Begasung erzeugte Hypoxie zu Veränderungen am Mukosa-Submukosa-Präparat des distalen Rattenkolons im Kurzschlussstrom führt, welche nach Reoxygenierung noch reversibel sind. Getestet wurde dabei eine 15, 30, 45 und 60 minütige Hypoxie. Diese Vorversuche (Daten nicht gezeigt) ergaben, dass die Hypoxie nicht länger als 15 Min dauern darf, da danach irreversible Gewebeschäden auftreten. Daher wurde für alle Experimente eine Hypoxiedauer von 15 Min, gefolgt von einer Reoxygenierungsphase von ebenfalls 15 Min, gewählt.

Während der viertelstündigen Hypoxie kam es zu einer triphasischen Änderung des I_{sc} (s. Abbildung III-1 A). Zunächst fiel der Strom (*Dec1*) um $-0,91 \pm 0,20 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Diesem folgte ein rascher Anstieg (*Peak*) von $0,57 \pm 0,17 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ und schließlich ein lang anhaltender Abfall (*Dec2*) von $-1,26 \pm 0,19 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Tabelle III-1, Kapitel III.1.2.1; $n = 8$; $p < 0,05$ versus *Baseline* für alle 3 Phasen). Die anschließende Reoxygenierung (Begasung mit Raumluft) führte zu einer biphasischen Änderung des I_{sc} (s. ebenfalls Abbildung III-1 A): nach einer Verzögerung von ca. 7 Min stieg der Strom dezent an; ein Effekt, der sich ca. 10 Min später nochmals beschleunigte (s. Tabelle III-1). Nach ungefähr 30 Min hatte sich der Strom mit einem Wert von $1,69 \pm 1,38 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ wieder an die ursprüngliche *Baseline* vor der Hypoxie ($1,55 \pm 0,98 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 8$) angenähert.

In der zeitabhängigen Kontrolle (s. Abbildung III-1 B, $n = 8$) hingegen, welche permanent mit Raumluft begast wurde, stieg der Kurzschlussstrom nur marginal um $0,35 \pm 0,2 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$.

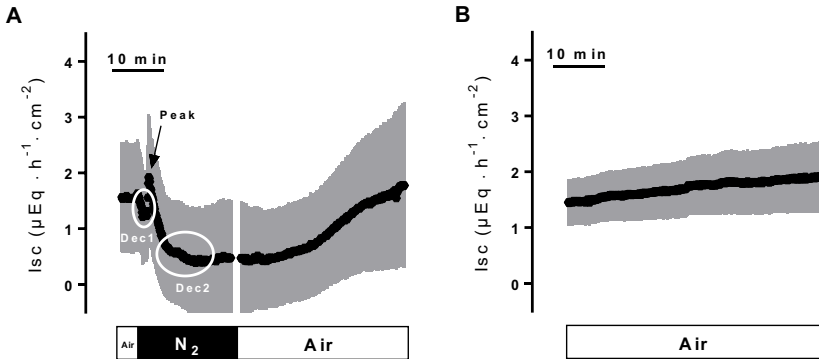


Abbildung III-1 – Gemittelter Kurvenverlauf des I_{sc} im Ussingkammer-Versuch

(A) Triphasische Änderung des I_{sc} während der Hypoxie (schwarzer Balken) bestehend aus initialem Abfall (*Dec1*), unmittelbar darauffolgendem *Peak* (Pfeil) und anschließend, lang andauernden Abfall (*Dec2*). Während der Reoxygenierung (weißer Balken „Air“) zeigt sich ein biphasischer Anstieg. Im Vergleich dazu (B) die zeitabhängige Kontrolle mit durchgehender Raumluftegung. Dargestellt sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 8$.

Bei der Gewebeleitfähigkeit (G_t) zeigte sich während der Hypoxie (s. Abbildung III-2 A) ein rascher, biphasischer Anstieg von $28,6 \pm 3,4 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ unter normoxischen Bedingungen auf $42,5 \pm 7,2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 8$) am Ende der Hypoxiephase. Nach dem Wechsel auf Raumluf stieg die Leitfähigkeit langsam auf $47,3 \pm 10,9 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 8$) an und erreichte hier ein stabiles Plateau. Wurde die Reoxygenierungsphase auf 30 Min verlängert, war ein weiterer Anstieg der G_t auf $60,5 \pm 15,7 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 8$) zu beobachten. Dies spricht für deutliche Schäden der Integrität des Epithels zum Ende der Reoxygenierungsphase.

III. Ergebnisse

In zeitabhängigen Kontrollen blieb die Gewebeleitfähigkeit weitgehend stabil (s. Abbildung III-2 B).

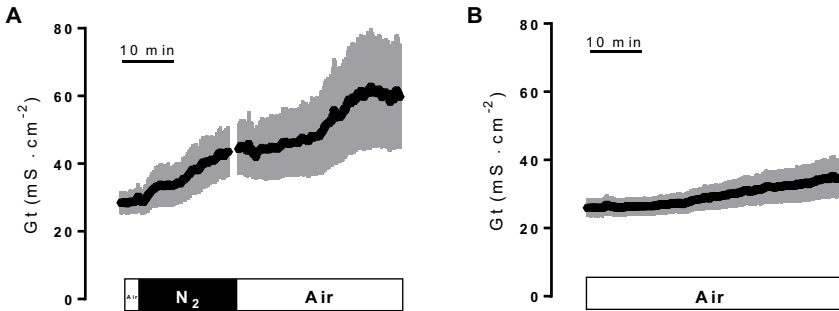


Abbildung III-2– Gemittelter Kurvenverlauf der Gewebeleitfähigkeit.

(A) biphasischer Anstieg der G_t während Hypoxie (schwarzer Balken) und anschließender Reoxygenierung (weißer Balken „Air“) im Vergleich (B) zu einer zeitabhängigen Kontrolle mit durchgehender Raumluftbegasung („Air“).

Die Daten sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 8$.

1.1 Beteiligung basolateraler Kaliumkanäle

Zunächst sollte eine generelle Beteiligung von Kaliumkanälen an der Hypoxie-vermittelten Stromantwort untersucht werden. Dazu wurden die Gewebe serosal mit Ba^{2+} ($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), einem nichtselektiven Kaliumkanalblocker (Cook 1988, Cook und Quast 1990), für 15 Minuten inkubiert. Bei der anschließend erzeugten Hypoxie war der *Peak* praktisch vollständig verschwunden (s. Abbildung III-3 und Abbildung III-4; $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe ohne Ba^{2+}). Der initiale Abfall (*Dec1*) war zwar um 40 % vermindert und auch *Dec2* fiel deutlich schwächer aus, als im Vergleich zum Hypoxie-Experiment unter Kontrollbedingungen, allerdings erreichten diese letzteren Effekte keine statistische Signifikanz (s. Tabelle III-1).

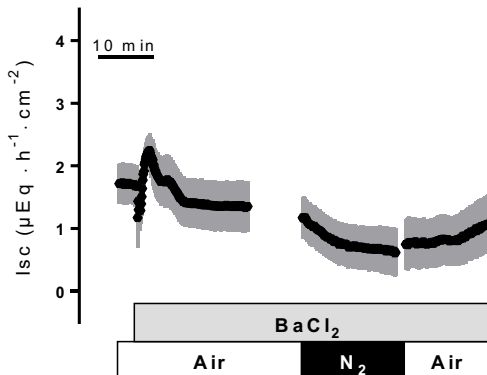


Abbildung III-3 – Hemmung der Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} durch Ba^{2+} ($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal)

Dargestellt sind gemittelte Werte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 10$.
Statistik s. Abbildung III-4 und Tabelle III-1, Kapitel III.1.2.1.

III. Ergebnisse

Auch in der Gewebeleitfähigkeit (Kurve nicht abgebildet) konnte mit Ba^{2+} der Effekt der Hypoxie deutlich reduziert werden. So zeigte sich während der Stickstoffbegasung nur ein moderater Anstieg von $2,0 \pm 3,0 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 10$). Weiter war während der Reoxygenierungsphase ein erneuter, aber geringerer Anstieg um $3,0 \pm 3,2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 10$) zu beobachten.

Dies lässt vermuten, dass basolaterale Kaliumkanäle an den Hypoxie-vermittelten Änderungen im Ionentransport beteiligt sind.

1.2 Sind K_{ATP} -Kanäle an der Hypoxie-Antwort des Darmes beteiligt?

Nachdem die Beteiligung basolateraler Kaliumkanäle nachgewiesen war, wurde überprüft, ob eine Aktivierung von ATP-sensitiven K^+ -Kanälen während der Hypoxie-Antwort stattfindet. Dazu wurden die Gewebe mit Glibenclamid ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal), einem Sulfonylharnstoffderivat, das K_{ATP} -Kanäle blockiert (Maguire et al. 1999), vorbehandelt. Die I_{sc} -Antwort auf die Hypoxie erwies sich jedoch als vollständig resistent gegenüber diesem Inhibitor (s. Abbildung III-4 und Tabelle III-1, Kapitel III.1.2.1). Im Gegensatz zum Experiment mit Ba^{2+} war unter Glibenclamid-Einfluss sogar wieder ein deutlicher Peak im I_{sc} zu sehen.

Die Gewebeleitfähigkeit blieb in Gegenwart von Glibenclamid während der Hypoxie praktisch konstant und zeigte nur einen leichten Anstieg um $3,8 \pm 3,0 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) während der Reoxygenierung (Daten nicht gezeigt).

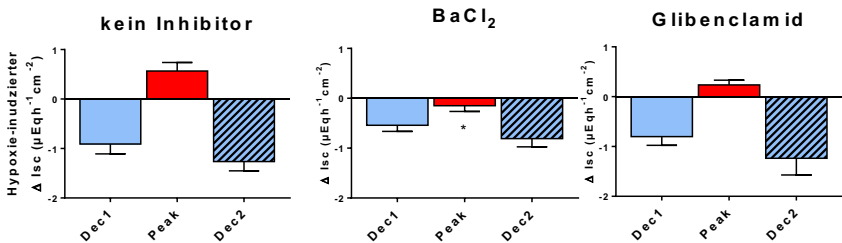


Abbildung III-4 – Wirkung einer Hypoxie unter Kontrollbedingungen und nach Blockade basolateraler Kaliumkanäle

Dargestellt sind Änderungen im Kurzschlussstrom (I_{sc}) in Abwesenheit (links) oder Anwesenheit der K^+ -Kanalblocker Ba^{2+} ($10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) bzw. Glibenclamid (K_{ATP} -Kanal-Blocker; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal). Angegeben sind: *Dec1* (blauer Balken): kleinster Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Peak* (roter Balken): maximaler Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Dec2* (Blau-gestreifter Balken): kleinster Wert des I_{sc} während Minute 5 - 15 der Hypoxiephase. Alle Daten stellen Änderungen des I_{sc} (ΔI_{sc}) verglichen zur Baseline vor der Hypoxie dar und sind Mittelwerte \pm SEM. $n = 6-8$. * $p < 0,05$ versus Hypoxie-Antwort in Abwesenheit von K^+ -Kanalblockern.

III. Ergebnisse

1.2.1 Stimulation mit Pinacidil zeigte ebenfalls keinen Effekt

Da sich die Blockade der ATP-sensitiven Kaliumkanäle mittels Glibenclamid als unwirksam herausgestellt hatte, sollte geprüft werden, ob eine Stimulation dieser Kanäle die Antwort auf Hypoxie bzw. Reoxygenierung beeinflusst. Dazu wurde der K_{ATP} -Öffner Pinacidil ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) eingesetzt. Ähnlich wie die Blockade dieser Kanäle mit Glibenclamid erwies sich allerdings auch deren Aktivierung als komplett unwirksam (s. Abbildung III-5 und Tabelle III-1).

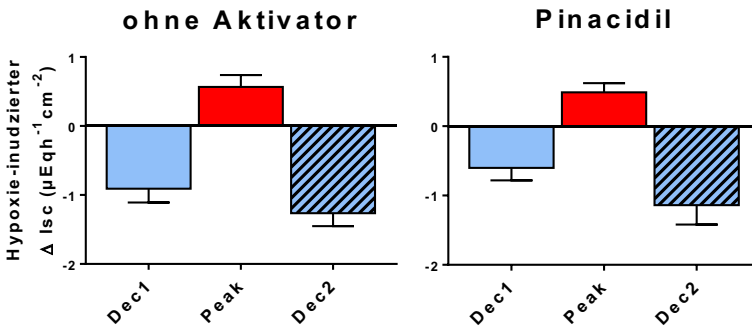


Abbildung III-5 – Voraktivierung der K_{ATP} -Kanäle verändert nicht die Wirkung der Hypoxie auf den I_{sc}

Dargestellt ist die Wirkung einer Hypoxie in Abwesenheit (links) und nach Vorbehandlung mit Pinacidil ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal; rechts). Dargestellt sind: *Dec1*: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Peak* Hypoxie: maximaler Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Dec2*: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 5 - 15 der Hypoxiephase. Alle Daten stellen Änderungen des I_{sc} (ΔI_{sc}) verglichen zur Baseline kurz vor Hypoxie dar und sind Mittelwerte \pm SEM. $n = 5 - 8$. * $p < 0,05$ versus Hypoxie-Antwort in Abwesenheit des K^+ -Kanalkaktivators.

III. Ergebnisse

Die Gewebeleitfähigkeit (Kurve nicht dargestellt) stieg während der Hypoxie in Anwesenheit von Pinacidil von $28,4 \pm 4,5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ unter normoxischen Bedingungen auf $34,7 \pm 4,3 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 5$) an. Anschließend folgte ein weiterer Anstieg auf $37,0 \pm 5,1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 5$) während der Reoxygenierung.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass K_{ATP} -Kanäle an den Änderungen im Ionentransport während Hypoxie und nachfolgender Reoxygenierung nicht beteiligt sind.

III. Ergebnisse

Tabelle III-1 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte in Gegenwart von Aktivatoren und Inhibitoren von Kaliumkanälen

Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte im Kurzschlussstrom					
ΔI_{sc} ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)					
Hypoxie				Reoxygenierung	
Substanz	Dec1 (Initialer Abfall)	Peak Hypoxie	Dec2 (2. Abfall)	Peak Reoxygenierung	n
	0 – 5 Min	0 – 5 Min	5 – 15 Min	3 – 15 Min	
Keine	-0,91 ± 0,20	0,57 ± 0,17	-1,26 ± 0,19	0,37 ± 0,91	8
BaCl ₂	-0,54 ± 0,12	-0,15 ± 0,11*	-0,81 ± 0,16	0,47 ± 0,15	10
Glibenclamid	-0,80 ± 0,18	0,24 ± 0,09	-1,24 ± 0,33	0,78 ± 0,55	6
Pinacidil	-0,60 ± 0,18	0,49 ± 0,13	-1,14 ± 0,28	0,54 ± 0,14	5

Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den Kurzschlussstrom (I_{sc}) in Ab- oder Anwesenheit verschiedener K⁺-Kanalblocker bzw. Stimulatoren. *Dec1*: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Peak Hypoxie*: maximaler Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Dec2*: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 5 - 15 der Hypoxiephase; *Peak Reoxygenierung*: maximaler Wert des I_{sc} während Minute 3 - 15 der Reoxygenierungsphase. Eingesetzt wurden: Ba²⁺ (10^{-2} mol·l⁻¹ serosal), Glibenclamid ($5\cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ serosal) und Pinacidil ($5\cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ serosal). Alle Daten stellen Änderungen des I_{sc} (ΔI_{sc}) verglichen zur Baseline kurz vor Hypoxie dar und sind Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der verwendeten Gewebe.

* $p < 0,05$ entsprechende Phase der Hypoxie-Antwort in Abwesenheit jeglicher Hemmstoffe bzw. Aktivatoren.

2. Verantwortlich für die I_{sc} -Veränderungen sind Änderungen in der Chloridsekretion

Um herauszufinden welche Ionenbewegungen für die Kurzschlussstrom-Veränderungen während einer Hypoxie und nachfolgender Reoxygenierung verantwortlich sind, wurden Anionensubstitutionsversuche durchgeführt. Dazu wurde Chlorid durch das impermeable Anion Gluconat (s. Kapitel II.2.2.2) ersetzt.

Unter diesen Bedingungen waren alle drei Phasen der I_{sc} -Antwort auf Hypoxie signifikant vermindert. Obwohl der Stromanstieg während der Reoxygenierung um 54% verringert war, im Vergleich zum Hypoxieversuch unter Normalbedingungen, erreichte dieser Effekt keine statistische Signifikanz (s. Abbildung III-6 und Tabelle III-2).

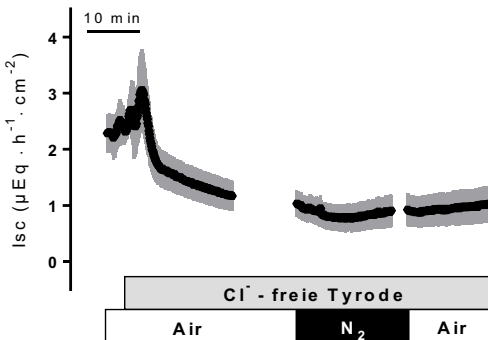


Abbildung III-6 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} unter chloridfreien Bedingungen

Dargestellt sind gemittelte Werte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 8$.
Statistik s. Tabelle III-2.

III. Ergebnisse

Die Gewebeleitfähigkeit (Kurve nicht abgebildet) stieg unter chloridfreien Bedingungen von basal $10,5 \pm 1,6 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $13,2 \pm 2,1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 8$) am Ende der hypoxischen Phase an. Dieser Anstieg setzte sich auch während der Reoxygenierung fort und endete bei $15,7 \pm 1,9 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 8$).

Zur weiteren experimentellen Überprüfung der Hypothese, dass es während einer Hypoxie/Reoxygenierung zu Veränderungen im Cl^- -Transport kommt, wurden Transportinhibitoren eingesetzt. Bumetanid verhindert über eine Blockade des $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-2Cl}^-$ -Cotransporters (NKCC1) die Aufnahme von Chloridionen in die Zelle (Kaplan et al. 1996, Greger 2000) und hemmt darüber die Cl^- -Sekretion. Eine Vorbehandlung des Gewebes mit diesem Blocker reduzierte signifikant alle drei Phasen der I_{sc} -Änderung während der Hypoxie; die Phase des Stromanstieges (*Peak*) war mit einer Hemmung um 93 % sogar fast vollständig verschwunden. Auch der Stromanstieg in der Reoxygenierungsphase war praktisch vollständig unterdrückt (s. Abbildung III-7, Abbildung III-9 und Tabelle III-2).

III. Ergebnisse

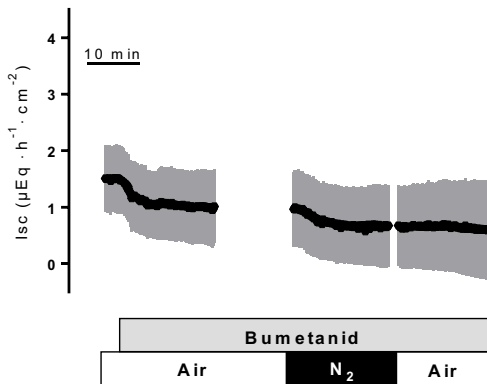


Abbildung III-7 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} in Gegenwart von Bumetanid ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal)

Die Daten sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 8$.

Statistik s. Abbildung III-9 und Tabelle III-2.

Auch der Anstieg der G_t von $19,0 \pm 2,8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf $19,2 \pm 2,9 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ am Ende der Hypoxie sowie der nachfolgende weitere Anstieg auf $22,1 \pm 3,8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 8$) zum Ende der Reoxygenierungsphase fielen im Vergleich zu Kontrollantwort deutlich schwächer aus (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Abklärung der Hypothese, dass Änderungen in der Cl^- -Sekretion für die gemessenen Stromänderungen verantwortlich sind, wurden Hypoxie- und Reoxygenierungsexperimente nach Blockade apikaler CFTR-Kanäle (s. Kapitel I.2.3.1) durchgeführt. Dazu wurde das Gewebe mit NPPB ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf der mukosalen Seite) vorbehandelt. NPPB blockiert eine Reihe von Chloridkanälen, darunter auch den CFTR-Kanal (Greger 2000, Verkman und Galiotta 2009). Unter dessen Einfluss zeigte sich eine ähnliche Wirkung wie in den Experimenten mit Bumetanid.

III. Ergebnisse

NPPB verminderte den basalen Kurzschlussstrom und unterdrückte die Antwort der nachfolgenden Hypoxie praktisch vollständig (s. Abbildung III-8, Abbildung III-9 und Tabelle III-2). Während der Reoxygenierung zeigte sich eine Reduzierung der Stromantwort im *Peak* um ca. 56 % im Vergleich zum Experiment ohne Blockerzugabe.

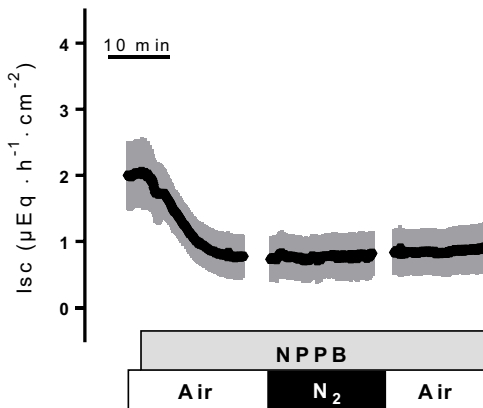


Abbildung III-8 – Hemmung der Hypoxie-induzierten Sekretion auf den I_{sc} in Gegenwart von NPPB ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ mukosal)

Die Daten sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 9$.

Statistik s. Abbildung III-9 und Tabelle III-2.

Die Gewebeleitfähigkeit (Kurve nicht dargestellt) stieg in Gegenwart von NPPB ab Beginn der Hypoxie von $22,8 \pm 3,0 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf $32,1 \pm 6,0 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ am Ende der Hypoxie an. Während der Reoxygenierung stieg die G_t – nach einem vorübergehenden Abfall – auf $35,7 \pm 6,0 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n=9$) am Ende der Reoxygenierungsphase weiter an.

III. Ergebnisse

Im folgenden Balkendiagramm (Abbildung III-9) und in Tabelle III-2 ist die statistische Auswertung dieser Versuchsreihen zusammengefasst. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die durch Hypoxie hervorgerufenen Effekte – verglichen zum Hypoxie-Versuch ohne Blockerzugabe – deutlich gehemmt waren.

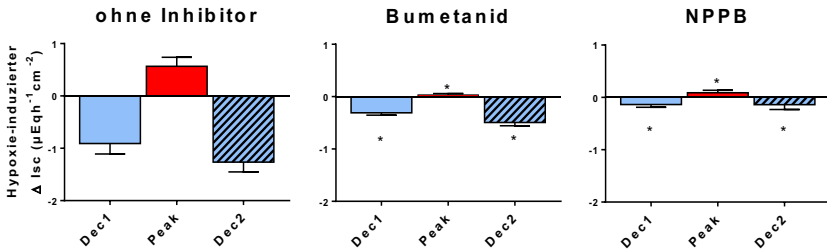


Abbildung III-9 – Wirkung einer Hypoxie unter Kontrollbedingungen und nach Chloridsekretion-Blockade

Dec1: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Peak*: maximaler Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Dec2*: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 5 - 15 der Hypoxiephase. Blockerkonzentrationen: Bumetanid (10^{-3} mol·l⁻¹ serosal), NPPB (10^{-4} mol·l⁻¹ mukosal). Alle Daten sind Änderungen des I_{sc} (ΔI_{sc}) verglichen zur Baseline kurz vor Hypoxie und sind Mittelwerte \pm SEM. n = 8 -10.

* $p < 0,05$ versus Hypoxie-Antwort in Abwesenheit der Inhibitoren.

III. Ergebnisse

Tabelle III-2 – Abhängigkeit der Hypoxie/Reoxygenierung-induzierten I_{sc} -Veränderungen von der Anwesenheit von Cl^- -Ionen und der Sensitivität gegenüber Chloridsekretions-Inhibitoren

Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte im Kurzschlussstrom					
ΔI_{sc} ($\mu Eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$)					
Hypoxie				Reoxygenierung	
Bedingung	Dec1 (Initialer Abfall)	Peak Hypoxie	Dec2 (2. Abfall)	Peak Reoxygenierung	n
	0 – 5 Min	0 – 5 Min	5 – 15 Min	3 – 15 Min	
Mit Cl^-	$-0,91 \pm 0,20$	$0,57 \pm 0,17$	$-1,26 \pm 0,19$	$0,37 \pm 0,91$	8
Cl^- -frei	$-0,39 \pm 0,07^*$	$-0,08 \pm 0,06^*$	$-0,47 \pm 0,01^*$	$0,17 \pm 0,07$	8
Bumetanid	$-0,31 \pm 0,05^*$	$0,04 \pm 0,02^*$	$-0,49 \pm 0,06^*$	$0,12 \pm 0,12$	8
NPPB	$-0,14 \pm 0,06^*$	$0,09 \pm 0,05^*$	$-0,14 \pm 0,09^*$	$0,17 \pm 0,07$	9

Die Tabelle zeigt Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den Kurzschlussstrom (I_{sc}) unter Kontrollbedingungen („Mit Cl^- “), in Cl^- -freien Puffer oder in Anwesenheit von Bumetanid ($10^{-3} \text{ mol} \cdot l^{-1}$ serosal) bzw. NPPB ($10^{-4} \text{ mol} \cdot l^{-1}$ mukosal). *Dec1*: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Peak Hypoxie*: maximaler Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Dec2*: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 5 - 15 der Hypoxiephase; *Peak Reoxygenierung*: maximaler Wert des I_{sc} während Minute 3 - 15 der Reoxygenierungsphase. Zur besseren Orientierung ist die Kontrollantwort („Mit Cl^- “) auf Hypoxie/Reoxygenierung aus Tabelle III-1 erneut gezeigt. Werte sind Mittelwerte \pm SEM. n = Anzahl der verwendeten Gewebe. * $p < 0,05$ entsprechende Phase der Hypoxie-Antwort unter Kontrollbedingungen.

Somit scheinen Änderungen in der Chloridsekretion den Effekten während einer Hypoxie und der anschließenden Reoxygenierung zugrunde zu liegen.

3. Wenn nicht der Mangel an $[ATP]_i$, was löst dann den Chloridausstrom aus?

3.1 Extrazelluläres Calcium moduliert Sekretionsantwort

Da bereits an Endothelien gezeigt wurde, dass Calcium als second messenger in die Hypoxie- und Reoxygenierungsantwort involviert ist (Schäfer et al. 2003), stellte sich die Frage, ob auch die Hypoxie-induzierte Chloridsekretion am Kolonepithel der Ratte calciumabhängig verläuft.

Zunächst wurde überprüft, welche Rolle extrazelluläres Calcium beim transepithelialen Chloridtransport während der Hypoxie und Reoxygenierung einnimmt. Wurden im serosalen Puffermedium die Ca^{2+} -Ionen weggelassen, erreichte der Hypoxie-induzierte *Peak* im Kurzschlussstrom nur noch eine Höhe von ca. $\frac{1}{3}$ der Kontrollantwort ($p < 0,05$). Die beiden anderen Phasen der Hypoxie-Antwort (*Dec1* und *Dec2*) waren jedoch weitgehend unverändert (s. Abbildung III-10 und Tabelle III-3). Nach ungefähr sieben Minuten der N_2 -Begasung erreichte der Kurzschlussstrom ein stabiles Plateau und stieg während der Reoxygenierung wieder leicht an (s. Abbildung III-10).

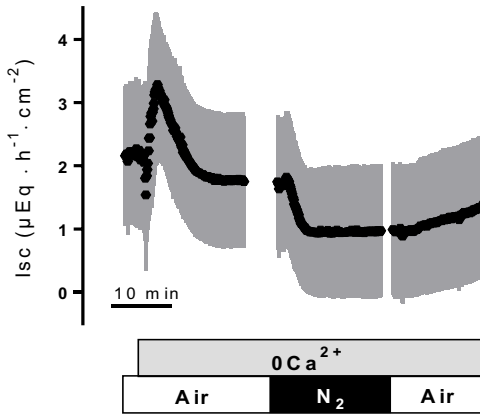


Abbildung III-10 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} unter serosal Ca^{2+} -freien Bedingungen

Dargestellt sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 13$.

Auch der Anstieg der Gewebeleitfähigkeit (s. Abbildung III-12 A) war unter calciumfreien Bedingungen verringert. Während der Hypoxie stieg (verglichen zur *Baseline* vor der hypoxischen Phase) die G_t um $1,3 \pm 1,5 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ bzw. während der Reoxygenierung um $1,8 \pm 1,3 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 13$) an.

III. Ergebnisse

Dies lässt vermuten, dass extrazelluläres Calcium am Hypoxie-induzierten transepithelialen Chloridtransport beteiligt ist. Blockierte man nun zusätzlich die IP_3 -Rezeptoren – welche eine intrazelluläre Bereitstellung von Calcium aus Speicherorganellen wie dem ER vermitteln – mittels 2-APB ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal), war der Hypoxie-Effekt auf den I_{sc} fast vollständig unterdrückt (s. Abbildung III-11). Auch der Wiederanstieg des I_{sc} in der Reoxygenierungsphase betrug nur ca. 45 % der Antwort unter Standardbedingungen.

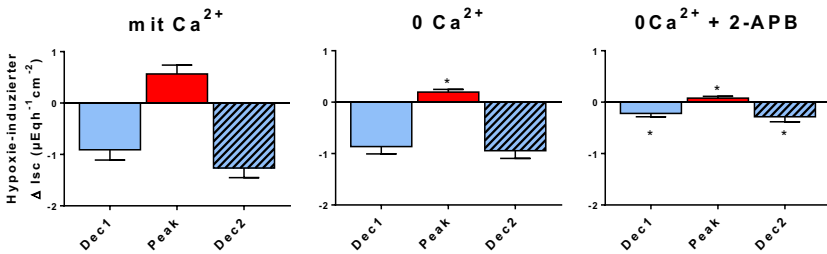


Abbildung III-11 – Effekt von Hypoxie auf den I_{sc} unter Kontrollbedingungen (links), in der Abwesenheit von serosalem Ca^{2+} allein ($0 Ca^{2+}$; Mitte) oder in Kombination mit 2-APB ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal)

Dec1 (blauer Balken): kleinster Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Peak (roter Balken):* maximaler Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Dec2 (blau-gestreifter Balken):* kleinster Wert des I_{sc} während Minute 5 - 15 der Hypoxiephase. Alle Daten stellen Änderungen des I_{sc} (ΔI_{sc}) verglichen zur Baseline kurz vor Hypoxie dar und sind Mittelwerte \pm SEM. $n = 8 - 13$. * $p < 0,05$ versus Antwort auf Hypoxie unter Kontrollbedingungen.

III. Ergebnisse

Allerdings trat unter IP_3 -Rezeptorblockade ein deutlicher Anstieg der Gewebeleitfähigkeit auf (s. Abbildung III-12 B). Während der Stickstoffbegasung nahm diese um maximal $13,7 \pm 4,6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ zu. Der Anstieg erreichte während der Reoxygenierung nach ca. 6 Min seinen Höhepunkt und fiel zum Ende der Phase wieder leicht ab.

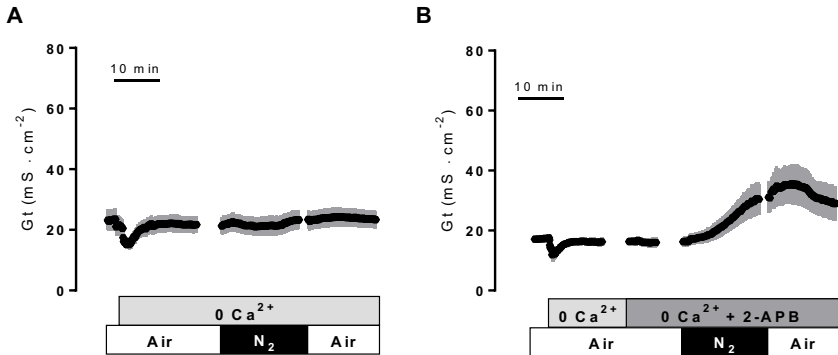


Abbildung III-12 – Wirkung von Hypoxie und Reoxygenierung auf die G_t (A) unter serosal Ca^{2+} -freien Bedingungen und (B) mit zusätzlicher IP_3 -Rezeptor-Blockade durch 2-APB ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal)

Dargestellt sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 8 - 13$.

Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass sowohl extra- als auch intrazelluläres Calcium an den durch Hypoxie ausgelösten Veränderungen im transepithelialen Chloridtransport beteiligt ist.

III. Ergebnisse

Tabelle III-3 – Änderungen am Kurzschlussstrom nach Calciumzug

Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte im Kurzschlussstrom					
ΔI_{sc} ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)					
Hypoxie				Reoxygenierung	
Bedingung	Dec1 (Initialer Abfall)	Peak Hypoxie	Dec2 (2. Abfall)	Peak Reoxygenierung	n
	0 – 5 Min	0 – 5 Min	5 – 15 Min	3 – 15 Min	
Mit Ca ²⁺	-0,91 ± 0,20	0,57 ± 0,17	-1,26 ± 0,19	0,37 ± 0,91	8
0 Ca ²⁺	-0,86 ± 0,14	0,20 ± 0,05*	-0,94 ± 0,15	0,50 ± 0,07	13
0 Ca ²⁺ + 2-APB	-0,20 ± 0,06*	0,05 ± 0,02*	-0,28 ± 0,10*	0,21 ± 0,05	8

Die Tabelle zeigt Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den Kurzschlussstrom (I_{sc}) unter Kontrollbedingungen („Mit Ca²⁺“), in Abwesenheit von serosalem Ca²⁺ alleine (mittlere Zeile) bzw. in Kombination mit der Gabe von 2-APB (10^{-4} mol · l⁻¹ serosal). *Dec1*: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Peak Hypoxie*: maximaler Wert des I_{sc} während Minute 0 - 5 der Hypoxiephase; *Dec2*: kleinster Wert des I_{sc} während Minute 5 - 15 der Hypoxiephase; *Peak Reoxygenierung*: maximaler Wert des I_{sc} während Minute 3 - 15 der Reoxygenierungsphase. Zur besseren Orientierung ist die Kontrollantwort („Mit Ca²⁺“) auf Hypoxie/Reoxygenierung aus Tabelle III-1 erneut gezeigt. Werte sind Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der verwendeten Gewebe. * $p < 0,05$ entsprechende Phase der Hypoxie-Antwort unter Kontrollbedingungen.

3.2 Beteiligte intrazelluläre Botenstoffe

3.2.1 Fura-2 Imaging

Um Änderungen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der Kolonepithelzellen direkt zu messen, wurden Ca^{2+} -Imaging-Versuche an isolierten Kolonkrypten durchgeführt, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 (s. Kapitel II.6.2.) aufgeladen wurden. Wie bereits in Kapitel II.6.6 beschrieben, wurden die Imaging-Versuche mit einer speziell für diese Studie entwickelten Hypoxie-Kammer durchgeführt.

Abbildung III-13 zeigt am Beispiel einer Originalkurve den typischen Verlauf des Hypoxie-Experiments mit anschließender Reoxygenierung. Nach einer kurzen Stabilisierungsphase in Standard-Tyrode wurde eine ca. 20 minütige Hypoxie simuliert, in dem der mit Stickstoff begaste Puffer in die luftdichte Kammer eingeleitet wurde. Im Anschluss daran wurde eine Reoxygenierung der Epithelzellen herbeigeführt (Standard-Tyrode mit Raumluft begast). Da die Lösung ca. 5 Minuten benötigte, um das Kammervolumen vollständig auszutauschen, umfassten in allen Imaging-Experimenten die Hypoxie- und Reoxygenierungsphasen mind. 20 Minuten.

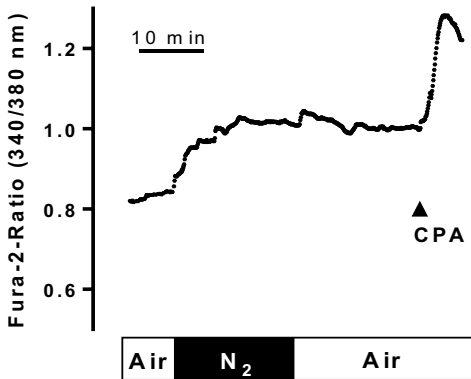


Abbildung III-13 – Hypoxie/Reoxygenierungs-induzierte Änderung des Fura-2-Ratio Signals an isolierten Kolonkrypten

Am Ende der Messung wurde Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) als Vitalitätskontrolle appliziert. Originalkurve. Für den gemittelten Kurvenverlauf, s. Abbildung III-14.

Unmittelbar nach Einleiten des mit Stickstoff-begasten Puffers erfolgte ein deutlicher Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration, erkennbar am steigenden Fura-2-Ratio-Signal (s. Abbildung III-13 und Abbildung III-14 A). Der Anstieg des Fluoreszenzsignals setzte sich nach einem transienten Abfall auch während der Reoxygenierung weiter fort. Am Ende jedes Imaging-Experimentes wurde eine Vitalitätskontrolle der Krypten mit Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) durchgeführt, einem Blocker von Calciumpumpen am Sarko- und endoplasmatischen Reticulum (Plenge-Tellechea et al. 1997), was zu einer plötzlichen Ca^{2+} -Freisetzung ins Zytosol führt. Anhand dieser prompten Reaktion konnte man ausschließen, dass die Krypte während der Hypoxie einen irreversiblen Schaden erlitten hatte.

III. Ergebnisse

In zeitabhängigen Kontrollexperimenten mit durchgehender Raumluftbegasung blieb das Fura-2-Signal stabil (s. Abbildung III-14 B).

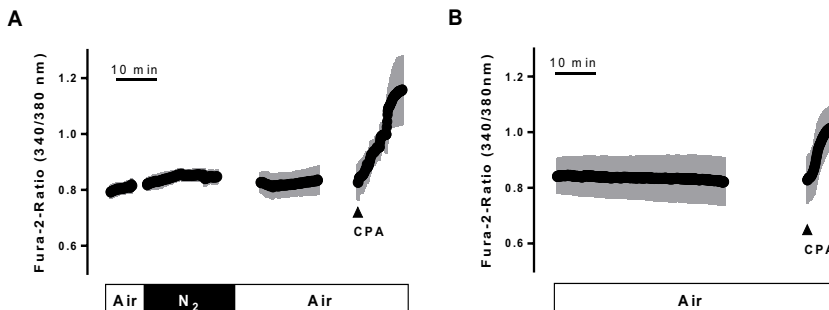


Abbildung III-14 – Hypoxie/Reoxygenierungswirkung auf die zytosolische Ca²⁺-Konzentration (A) im Vergleich zu einer zeitabhängigen Kontrolle (B)

Bei beiden Versuchsreihen wurde eine Vitalitätskontrolle mit CPA ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) am Ende des Experiments durchgeführt. Die Daten zeigen Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 40 - 54$. Statistik: s. Abbildung III-17.

3.2.2 Ein Einstrom von extrazellulärem Calcium ist an der Änderung des Fura-2 Signals beteiligt

Um die Rolle von extrazellulärem Ca^{2+} an dem durch Hypoxie induzierten Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals weiter zu untersuchen, wurden die Krypten mit einem Ca^{2+} -freien Puffer superfundiert. Dies führte zu einem Abfall des basalen Fura-2-Signals, d.h. zu einem Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Wurde im Anschluss der N_2 -begaste Puffer eingeleitet, unterblieb der Anstieg des Fura-2 Signals komplett (s. Abbildung III-15). Während der Reoxygenierung stellte sich ein stabiles Plateau ein, bei dem nur geringe Änderungen des Calciumspiegels im Zytosol auftraten. Die positive Vitalitätskontrolle mit CPA bewies auch diesem Fall, dass die Krypte am Ende des Experimentes noch intakt war.

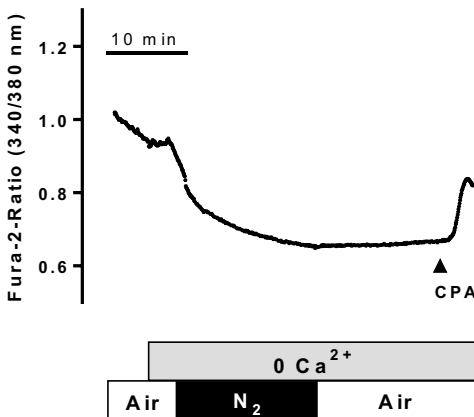


Abbildung III-15 – Wirkung von Hypoxie/Reoxygenierung auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration unter calciumfreien Bedingungen

Am Ende der Messung wurde Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) als Vitalitätskontrolle appliziert. Typische Originalkurve von $n = 60$ Zellen. Statistik: s. Abbildung III-17.

III. Ergebnisse

Am Kolonepithel erfolgt der Calciumeinstrom von extrazellulär durch nichtselektive Kationenkanäle, die durch Lanthanide wie z.B. Gadolinium (Gd^{3+}) gehemmt werden (Frings et al. 1999). Wie in Abbildung III-16 am Beispiel eines Originalkurvenverlaufes zu sehen ist, hatte Gd^{3+} ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) keinen Effekt auf die basale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Jedoch wurde der Hypoxie-induzierte Anstieg des Fura-2 Signals durch Gd^{3+} komplett unterdrückt. Wurde anschließend auf Raumluftbegasung umgeschaltet, wurde zwar ein transienter Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet, der Trend der Kurve war jedoch stetig abfallend. Die Vitalitätskontrolle mit CPA bewies, dass kein irreversibler Schaden verursacht worden war. Die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen durch CPA war, verglichen mit dem Hypoxie-Versuch ohne Gadolinium-Blockade, sogar mit einem um 36 % stärkeren Ratio-Signal erhöht. In der zeitabhängigen Kontrolle (Daten nicht dargestellt) wurden keine auffallenden Veränderungen festgestellt.

Somit scheint eine intrazelluläre Ca^{2+} -Beteiligung an dem Hypoxie-bedingten Chloridausstrom sehr wahrscheinlich, da sich auch unter Gadolinium-Blockade ähnliche Effekte darstellten, wie im Experiment mit calciumfreier Tyrode.

III. Ergebnisse

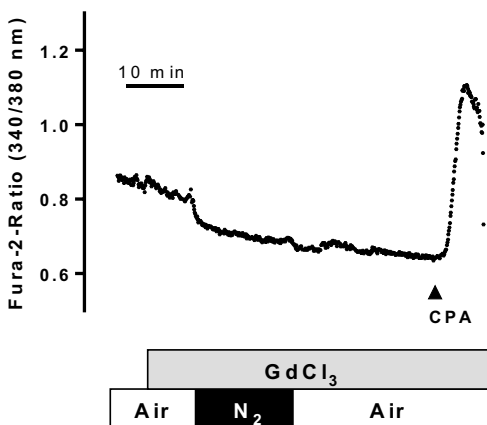


Abbildung III-16 – Kationenkanalblockade durch Gadolinium ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) unterdrückt den Hypoxie-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

Am Ende der Messung wurde Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) als Vitalitätskontrolle appliziert. Typische Originalkurve von $n = 57$ Zellen. Statistik: s. Abbildung III-17.

In der folgenden Abbildung III-17 sind die Veränderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration dieser Versuchsreihen während der Hypoxie zusammenfassend dargestellt:

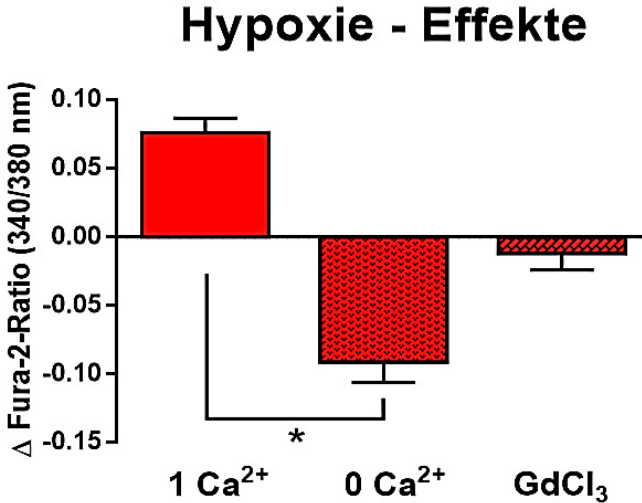


Abbildung III-17 – Änderung des Fura-2-Signals während der Hypoxie unter Kontrollbedingungen (links), in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (0 Ca^{2+} , Mitte) und in Anwesenheit von Gd^{3+} ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Dargestellt ist die maximale Änderung des Fluoreszenzsignals in Bezug zur *Baseline* in den letzten drei Minuten vor Hypoxie (n = 40 - 60).

* $p < 0,05$ versus Antwort auf Hypoxie unter Kontrollbedingungen.

III. Ergebnisse

Nachdem sich in Ussingkammer-Experimenten gezeigt hatte, dass eine IP_3 -Rezeptorblockade Einfluss auf die hypoxie- bzw. reoxygenierungsbedingten Änderungen im I_{sc} hat, wurde in einer weiteren Imaging-Versuchsserie zu dem Ca^{2+} -freien Perfusionsmedium zusätzlich 2-APB ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) appliziert. Auf die 2-APB-Zugabe wurde zunächst ein Anstieg des Fluoreszenzsignals verzeichnet. Als sich dieses stabilisiert hatte, begann die Hypoxie. Abbildung III-18 zeigt exemplarisch den Kurvenverlauf einer gemessenen Kolonepithelzelle. Hierbei ist gut der dezente Abfall als Reaktion auf die Hypoxie zu erkennen. Bei einem Teil der Zellen konnte in der Spätphase der Hypoxie ein vorübergehender Anstieg im Ratio-Signal beobachtet werden, welcher aber im Folgenden nicht weiter untersucht wurde.

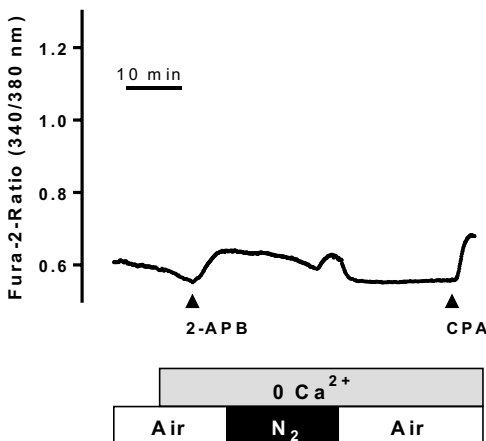


Abbildung III-18 – Wirkung einer Hypoxie auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration unter Ca^{2+} -freien Bedingungen kombiniert mit IP_3 -Rezeptor-Blockade durch 2-APB ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
Am Ende der Messung wurde Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) als Vitalitätskontrolle appliziert. Typische Originalkurve von $n = 36$ Zellen.

4. Radikale als intrazelluläre Botenstoffe

4.1 Erste Hinweise auf Radikalbildung in Ussingkammer-Experimenten

Wird nach einer Hypoxie die Sauerstoffversorgung wiederhergestellt, kommt es oft zu Reperfusionsschäden durch freie Radikale (Kowaltowski et al. 2009), die besonders über den Xanthin-Oxidase-Mechanismus (Nagler und Vartanyan 1976, Harrison 2002), aber auch den NADPH-Oxidase-Mechanismus (Babior 1999) gebildet werden (s. Kapitel I.2.5). Darüber hinaus können ROS als intrazelluläre Signalmoleküle wirken (Dröge 2002, Kowaltowski et al. 2009).

Um die Beteiligung von freien Radikalen an den Veränderungen der Cl⁻-Sekretion während der Hypoxie/Reoxygenierung zu untersuchen, wurde Trolox C (s. Kapitel I.2.6.3) eingesetzt. Dieses hydrophile Derivat von α -Tocopherol (Vitamin E) fungiert als Radikalfänger (Giulivi und Cadenas 1993, Vergauwen et al. 2015) bzw. Antioxidans (Lee et al. 2014) und vermag eine Schädigung durch ROS zu verlangsamen bzw. zu verhindern. Die Vorbehandlung mit Trolox C ($2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) verminderte den triphasischen Effekt einer Hypoxie auf den Kurzschlussstrom. Im I_{sc} (s. Abbildung III-19) zeigte sich eine Reduzierung im *Dec1* um 43 % ($-0,40 \pm 0,12 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), der *Peak* war um etwa $\frac{1}{4}$ reduziert ($0,15 \pm 0,10 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) und *Dec2* ($-0,55 \pm 0,14 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$; $n = 9$; * $p < 0,05$ für *Dec2* versus Hypoxie-Kontrolle) um fast 60 %, jeweils im Vergleich zum Experiment unter Normalbedingungen, reduziert.

III. Ergebnisse

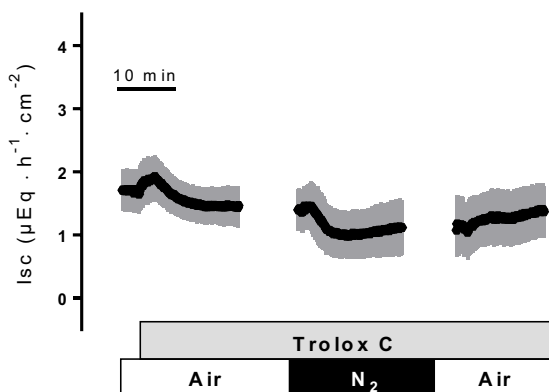


Abbildung III-19 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} in Gegenwart von Trolox C ($2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal)

Dargestellt sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 6$.

Betrachtete man die Gewebeleitfähigkeit (Kurve nicht abgebildet) unter dem Einfluss des Radikalfängers, zeigte sich in der Hypoxiephase ein deutlicher Anstieg um $13,6 \pm 3,8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 9$), welcher in der Reoxygenierung nach einem vorübergehenden Anstieg wieder abfiel.

4.2 Trolox C hat auch Einfluss auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration

Basierend auf diesen Ussingkammerdaten wurden die isolierten Kolonkrypten mit Trolox C ($2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) vorbehandelt. Unter diesen Bedingungen konnte kaum noch ein Anstieg des Fura-2 Signals während der Hypoxie beobachtet werden (s. Abbildung III-20); allerdings erreichte im Schnitt ($n = 46$ Zellen) der Unterschied zum Hypoxie-Effekt unter Kontrollbedingungen keine statistische Signifikanz.

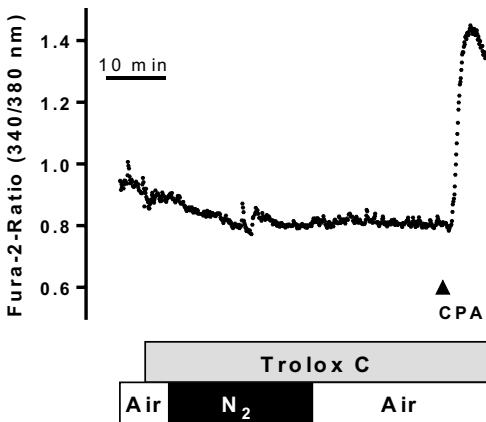


Abbildung III-20 – Wirkung von Hypoxie/Reoxygenierung auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Gegenwart von Trolox C ($2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
Am Ende der Messung wurde Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) als Vitalitätskontrolle appliziert. Typische Originalkurve von $n = 46$ Zellen.

4.3 Rolle des Glutathion

Im Zytosol sorgt das Tripeptid Glutathion für die Aufrechterhaltung reduzierender Bedingungen (Aslund et al. 1997). Reduziertes Glutathion besitzt eine freie Thiol-Gruppe, diese lässt sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff ThiolTracker™ Violet Stain (Mandavilli und Janes 2010; s. Kapitel II.6.3) spezifisch anfärben. Ein Abfall der Konzentration an reduziertem Glutathion, also dessen Oxidation, stellt sich als Abfall des Fluoreszenzsignales des ThiolTracker™-Farbstoffs dar. Wie in Abbildung III-21 dargestellt, führte die Hypoxie nicht zu einem Abfall des ThiolTracker™-Signals. Während der Reoxygenierung sank das Fluoreszenz-Signal anfänglich leicht, bevor sich ein stabiles Plateau einstellte, das sich bis zum Schluss dieser Phase kaum veränderte. Am Ende des Versuchs wurde H_2O_2 ($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zur Überprüfung der Methode appliziert. Wie zu erwarten, löste dieses Oxidans einen prompten Abfall des ThiolTracker™-Fluoreszenzsignals aus.

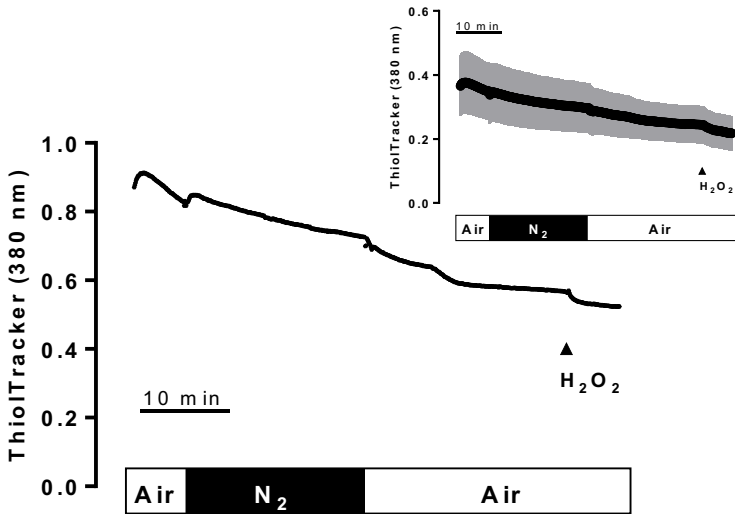


Abbildung III-21 – Wirkung einer Hypoxie auf die Glutathionkonzentration im Zytosol in Thiol-Tracker™-Imaging-Experimenten

Zu sehen ist sowohl der gemittelte Kurvenverlauf (kleines Bild) als auch exemplarisch der Verlauf einer gemessenen Zelle (großes Bild). Als Vitalitätskontrolle wurde H₂O₂ (10⁻² mol·l⁻¹) eingesetzt. Die in der gemittelten Kurve dargestellten Daten sind Mittelwerte (Symbole) ± SEM (graue Fläche), n = 90. Statistik: s. Tabelle III-4.

In zeitabhängigen Kontrollexperimenten (Ergebnisse nicht dargestellt) zeigte sich während der gesamten Versuchsdauer nur ein marginaler Abfall der Kurve, was aller Wahrscheinlichkeit nach auf das Ausbleichen des Farbstoffes zurückzuführen ist.

III. Ergebnisse

Tabelle III-4 – Änderungen des ThiolTracker™-Fluoreszenz-Signals

Fluoreszenz-Signal ThiolTracker™ (390 nm)				
Puffer	Maximale Änderung Fluoreszenz-Signal			n
	Δ max Änderung Baseline Hypoxie <i>Letzte 3 Min</i>	Δ max Änderung Baseline Reoxygenierung <i>Letzte 3 Min</i>	Δ Decrease H ₂ O ₂	
Mit Hypoxie	-0,06 ± 0,009	-0,11 ± 0,01	-0,03 ± 0,004	90
Ohne Hypoxie	-0,07 ± 0,005	-0,09 ± 0,006	-0,04 ± 0,005	75

Änderungen in der ThiolTracker™-Fluoreszenz (arbiträre Einheiten) bei Hypoxie und Reoxygenierung (1. Zeile) im Vergleich zu einer zeitabhängigen Kontrolle ohne Hypoxie (2. Zeile). Am Ende des Experiments wurde H₂O₂ (10⁻² mol·l⁻¹) als Vitalitätskontrolle appliziert. Die Werte stellen Änderungen des Fluoreszenzsignals (erfasst am Maximum der Antwort) verglichen zur *Baseline* kurz vor Hypoxie dar und sind Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen.

4.4 Mitochondriale Superoxide

Nachdem sich im Zytosol nur eine geringe Radikalbildung während Hypoxie/Reoxygenierung herausgestellt hatte, sollte in einer nächsten Imaging-Versuchsreihe die ROS-Bildung in den Mitochondrien untersucht werden. Die Bildung von Oxidantien in den Mitochondrien beginnt mit der Umwandlung des Superoxid-Anions ($O_2^{\bullet-}$) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese Reaktion wird durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert (Mukhopadhyay et al. 2007, Kowaltowski et al. 2009, Held 2015). Daher sollte mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX™ (s. Kapitel II.6.4) die Bildung von Oxidantien in den Mitochondrien während der Hypoxie und anschließender Reoxygenierung gemessen werden.

Bei der Aufladung mit diesem Farbstoff färbte sich der Oberflächenbereich der Krypte deutlich stärker an als der Fundusbereich. Wie aus Abbildung III-22 ersichtlich, ergaben sich auch bei den mit MitoSOX™-aufgeladenen isolierten Krypten während der Hypoxie keine substantiellen Veränderungen. Während der Reoxygenierungsphase zeigte sich ebenfalls kaum eine Änderung im Fluoreszenzsignal, obwohl vor allem in dieser Phase eine Radikalbildung in den Mitochondrien zu erwarten gewesen wäre. Dass die Methode an sich funktionierte, zeigte die Vitalitätskontrolle mit $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} H_2O_2$. Was im live-Video auf die Gabe von H_2O_2 sofort ins Auge fiel, war ein deutlicher Gradient der Reaktion der SOD. Dieser fing an der Oberfläche der Krypte an und setzte sich fort bis in den mittleren Bereich der Krypte, während im Fundus kaum eine Reaktion auf das Wasserstoffperoxid zu sehen war.

III. Ergebnisse

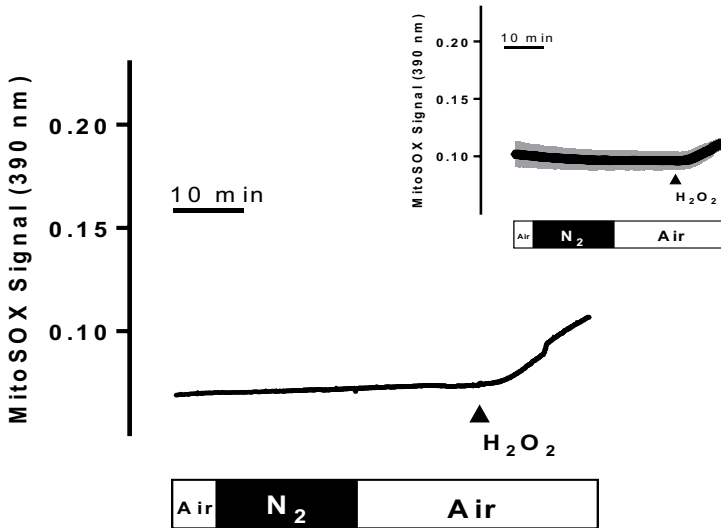


Abbildung III-22 – Wirkung einer Hypoxie auf die mitochondriale Bildung von Radikalen in MitoSOX™-Imaging-Experimenten

Zu sehen ist sowohl der gemittelte Kurvenverlauf aller Zellen (kleines Bild) als auch exemplarisch der Verlauf einer gemessenen Zelle (großes Bild). Als Vitalitätskontrolle wurde H_2O_2 ($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) eingesetzt. Die in der gemittelten Kurve dargestellten Daten sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (graue Fläche), $n = 50$. Statistik: s. Tabelle III-5.

III. Ergebnisse

Tabelle III-5 – Änderungen des MitSOX™-Fluoreszenz-Signals

Fluoreszenz-Signal MitoSOX™ (380 nm)				
Puffer	Maximale Änderung Fluoreszenz-Signal			n
	Δ max Änderung Baseline Hypoxie <i>Letzte 3 Min</i>	Δ max Änderung Baseline Reoxygenierung <i>Letzte 3 Min</i>	Δ Decrease H ₂ O ₂	
Mit Hypoxie	-0,065 ± 0,001	-0,005 ± 0,002	-0,02 ± 0,002	50
Ohne Hypoxie	-0,004 ± 0,002	-0,005 ± 0,003	-0,03 ± 0,003	44

Änderungen in der MitoSOX™-Fluoreszenz (arbiträre Einheiten) bei Hypoxie/Reoxygenierung (1. Zeile) im Vergleich zu einer zeitabhängigen Kontrolle ohne Hypoxie (2. Zeile). Am Ende des Experiments wurde H₂O₂ (10⁻² mol·l⁻¹) als Vitalitätskontrolle appliziert. Die Werte stellen Änderungen des Fluoreszenzsignals (erfasst am Maximum der Antwort) verglichen zur Baseline kurz vor Hypoxie dar und sind Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen.

Diese Messungen zeigen, dass in den Kryptenzellen lediglich eine geringe Radikalbildung sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien während der Hypoxie und anschließender Reoxygenierung stattfindet.

IV. Diskussion

1. Hypoxie-Effekte

Das Kolonepithel nimmt eine zentrale Rolle bei der Resorption bestimmter Nahrungsbestandteile ein, dies sind v.a. Ionen (wie Na^+ , Cl^-), kurzkettige Fettsäuren und Wasser. Dadurch wird der Flüssigkeitshaushalt des Körpers im Gleichgewicht gehalten (Kunzelmann und Mall 2002). Weiter ist das Epithel für wichtige Sekretionsvorgänge verantwortlich, die dafür sorgen, dass die Ingesta problemlos weiter transportiert und mögliche Pathogene ausgeschieden werden. Diese Funktionen sind abhängig von einer kontinuierlichen Sauerstoffversorgung des Epithels, um dessen Energiebedarf decken zu können. Deshalb ist das Kolonepithel sehr empfindlich gegenüber einer Hypoxie (Saraví et al. 1995, Ward et al. 2014) und einer sich möglicherweise anschließenden Reoxygenierung (Dröge 2002, Kowaltowski et al. 2009). Der zelleigene Metabolismus findet vorwiegend aerob statt; so stammen ca. 80 % der ATP-Bereitstellung für die Aufrechterhaltung der Na^+ - K^+ -ATPase-Aktivität aus oxidativer Phosphorylierung (Del Castillo et al. 1991).

Das primäre Ziel dieser Arbeit war heraus zu finden, weshalb das Kolonepithel bei einer Energiemangelsituation Sekretionsvorgänge in Gang setzt, die zunächst Energie verbrauchen. Zu diesem Zweck wurde an isolierten Kolonpräparaten der Ratte sowohl eine metabolische Hypoxie über 2-Desoxyglucose (2-DOG; Daten nicht gezeigt) als auch eine Hypoxie mittels Stickstoff-Begasung simuliert. In beiden Versuchsreihen ergaben sich in Ussingkammer-Experimenten sehr ähnliche Effekte auf den Kurzschlussstrom. Anhand dieser Tatsache entschied ich mich, die folgenden Versuchsreihen hauptsächlich aufgrund der deutlich geringeren Versuchsdauer (jeweils 15 Minuten Hypoxie und Reoxygenierung unter N_2 versus 2 Stunden mit 2-DOG mit N_2 fortzuführen (s. Abbildung III-1).

Während der ersten fünf Minuten der Hypoxie kam es zu einer triphasischen Veränderung des I_{sc} (s. Abbildung III-1 A), die sich in einem initialen Abfall (*Dec1*) gefolgt von einem deutlichen *Peak* darstellte, wonach der Strom schließlich im weiteren Verlauf der Hypoxie bis weit unterhalb der initialen Baseline abfiel (*Dec2*).

1.1 Hypoxie löst eine Chloridsekretion aus

Am Kolonepithel wird der Kurzschlussstrom in der Hauptsache durch die Sekretion von Anionen getragen. Dabei wird in erster Linie Chlorid über die basolaterale Membran mittels $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Kotransporter (NKCC1) aufgenommen und verlässt die Zelle apikal hauptsächlich über den CFTR-Kanal (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) (Böhme et al. 1991, Greger 2000). Der Hauptantrieb für den Chloridausstrom aus den Zellen besteht im negativen Membranpotential, welches durch Kaliumionendiffusion über basolaterale Kaliumkanäle erzeugt wird (Strabel und Diener 1995, Warth und Barhanin 2003, Heitzmann und Warth 2008; s. auch Kapitel I.2.3.1).

Um herauszufinden, ob Änderungen im Cl^- -Transport während einer Hypoxie für die Veränderungen des I_{sc} verantwortlich sind, wurden Anionen-Substitutionsexperimente und Experimente mit Transportinhibitoren durchgeführt. Sowohl die Reduktion der extrazellulären Chloridkonzentration als auch die Blockade des NKCC1 mit Bumetanid – einem Sulfonyl-Derivat (Kaplan et al. 1996, Greger 2000) um die Bereitstellung der Cl^- -Ionen zu verhindern – verminderten die Effekte von Hypoxie und nachfolgender Reoxygenierung deutlich (s. Abbildung III-6 und Abbildung III-7). Der vorübergehende Anstieg (*Peak*) im Kurzschlussstrom repräsentiert somit eine kurzanhaltende Stimulation einer Anionen-Sekretion. Aber auch der nachfolgende Abfall (*Dec2*) sowie der Wiederanstieg bei der Reoxygenierung waren nahezu verschwunden, so dass davon auszugehen ist, dass diese I_{sc} -Änderungen ebenfalls durch Änderungen in der Chloridsekretion (Hemmung in der Spätphase der Hypoxie und Wiederanstieg bei der

Reoxygenierung) getragen werden. Bestätigt werden konnte diese These durch eine weitere Versuchsreihe, in der mittels NPPB apikale Chloridkanäle blockiert wurden und sich ähnliche Effekte ergaben (s. Abbildung III-9).

1.1.1 Die Chloridsekretion ist Calciumabhängig

Die Chloridsekretion durch Epithelien unterliegt der Kontrolle intrazellulärer Botenstoffe wie z.B. Ca^{2+} , cAMP oder cGMP (Binder et al. 1997). An Endothelien konnte gezeigt werden, dass Calcium als second messenger in die Hypoxie- und Reoxygenierungsantwort involviert ist (Schäfer et al. 2003). Der Botenstoff ist außerdem in der Lage, die intestinale Chlorid-Sekretion zu stimulieren, indem Ca^{2+} -abhängige, basolaterale K^+ -Kanäle geöffnet werden. Dies führt über eine Hyperpolarisation der Membran zu einem Cl^- -Ausstrom über spontan offene apikale Cl^- -Kanäle, v.a. vom Typ CFTR (Böhme et al. 1991, Greger 2000). Dieser Vorgang wird unterstützt durch die vorübergehende Öffnung Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanäle (Hennig et al. 2008; s. auch Kapitel I.2.3.2).

Tatsächlich war die Stimulation des I_{sc} in der Frühphase der Hypoxie (*Peak*), also die transiente Cl^- -Sekretion, in calciumfreiem Puffer unterdrückt (s. Abbildung III-10). Dieser Effekt wurde sogar noch verstärkt, wenn die Gewebe zusätzlich mit 2-APB vorbehandelt wurden (s. Abbildung III-11). 2-APB verhindert konzentrationsabhängig die intrazelluläre Bereitstellung von Calcium, indem die IP_3 -Rezeptoren am ER blockiert werden. Diese Ergebnisse lassen den ersten Schluss zu, dass die durch Hypoxie ausgelöste transiente Chloridsekretion Calcium-vermittelt abläuft.

1.1.2 Fura-2 Imaging bestätigt Calcium-Beteiligung

Um die in der Ussingkammer nachgewiesene Calcium-Beteiligung an der Hypoxie-Antwort am Kolonepithel der Ratte zu bestätigen, wurden Imaging-Experimente mit dem Indikatorfarbstoff Fura-2 AM durchgeführt. Die ersten Vertreter dieser Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe stammen von Roger Tsien (Tsien 1980), der durch chemische Modifikation des Ca^{2+} -Chelators EGTA (Ethylenglycol bis-[β -aminoethylether] N,N,N',N'-tetraessigsäure) das Vorläufermolekül 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA) entwickelte (Baylor und Hollingworth 2000). Diese Struktur verleiht dem Farbstoff eine hohe Selektivität für Calciumionen, es bildet einen Chelator-Komplex mit diesem Kation und ändert dabei seine Fluoreszenzeigenschaften. In der Tat unterstützen meine Imaging-Ergebnisse die Theorie der Calcium-vermittelten Chloridsekretion in der Frühphase der Hypoxie-Antwort. Setzte man die isolierten Krypten dem hypoxischen Milieu aus, führte dies zu einem moderaten, aber beständigen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration (s. Abbildung III-13).

Tatsächlich konnte auch an menschlichen Kolonepithelzellen durch eine chemisch induzierte „Hypoxie“ (erzeugt durch Blockade der mitochondrialen Atmungskette) eine Aktivierung calciumabhängiger K^+ -Kanäle vom IK_{Ca} -Typ gezeigt werden (Loganathan et al. 2011). Ein Anstieg in der zytosolischen Calciumkonzentration stimuliert demnach Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle in der apikalen Membran, welche ebenfalls in der Bürstensaummembran des Kolonepithels der Ratte nachgewiesen werden konnten (Schultheiss und Diener 1997). So ist dieser calciumabhängige Kaliumstrom eine mögliche Erklärung für den initialen Abfall (*Dec1*), den ich in der triphasischen Veränderung während der Hypoxie beobachten konnte, welcher unmittelbar vor der Chloridsekretion (*Peak*) auftaucht. Wie diese Änderungen im Ionentransport im Detail initiiert werden, ist allerdings weiterhin noch unbekannt.

IV. Diskussion

Darüber hinaus konnte bereits an T84 Zellen – einer gut etablierten menschlichen Tumor-Zell Linie des Kolons – gezeigt werden, dass die Epithelzellen während einer Hypoxie Adenosin frei setzen (Matthews et al. 1995). Bei steigendem Energiebedarf, wie es bei einer Hypoxie der Fall ist, wird zunehmend ATP abgebaut. Dies wiederum führt zu einem Anstieg der Konzentration an Adenosin, welches vorübergehend die Glykolyse stimuliert um den steigenden Energiebedarf zu decken. An Niere (Miller et al. 1978) und Herz (Berne 1963) konnte schon früh gezeigt werden, dass Adenosin über Vasodilatation eine schützende Wirkung vor Ischämie- und Reperfusionsschäden entfaltet. Weiterhin ist Adenosin dafür bekannt, dass es im distalen Kolon und Ileum eine Chloridsekretion auslösen kann (Barrett et al. 1990). Da Adenosin schnell durch das ubiquitär vorkommende Enzym Adenosin-Deaminase abgebaut wird, wird angenommen, dass im Gastrointestinaltrakt Adenosin vorwiegend als parakriner oder autokriner Botenstoff und nicht als Hormon fungiert (Bruns 1990). Demnach könnte Adenosin auch in der vorliegenden Arbeit als parakriner Mediator in die Kontrolle der epithelialen Ionenkanal-Aktivität während der Hypoxie und anschließender Reoxygenierung involviert sein.

2. Die Rolle der Kaliumkanäle

Eine zentrale Beteiligung von Kaliumkanälen an der Hypoxie-Antwort konnte durch den Einsatz von Bariumchlorid (BaCl_2) gezeigt werden. Die negative Membranspannung führt dazu, dass das zweiwertige Kation Barium (Ba^{2+}) in die Pore von Kaliumkanälen gezogen wird und somit der Kaliumstrom durch diese Kanäle blockiert wird (Hille 2001). Nach Vorbehandlung mit Ba^{2+} waren der initiale Abfall des Stroms (*Dec1*) tendenziell und der Stromanstieg (*Peak*) während der Hypoxie signifikant gehemmt (s. Abbildung III-3).

Das Kolonepithel exprimiert neben anderen Kaliumkanälen auch Kanäle aus der Familie der ATP-sensitiven K^+ -Kanäle (Pouokam et al. 2013). Diese Kanäle werden bei ausreichender Energieversorgung einer Zelle durch zytosolisches ATP gehemmt, sind also geschlossen wie in Kapitel I.2.3.3 bereits beschrieben. Reduziert sich jedoch die ATP-Konzentration (z.B. bei einer Hypoxie), öffnen sich die K_{ATP} -Kanäle und die Membran wird hyperpolarisiert, was letztlich dazu führt, dass der Energiebedarf der Zelle zumindest bei erregbaren Zellen wie Neuronen oder Myokardzellen durch Verminderung der Erregbarkeit heruntergeschraubt wird (Hibino et al. 2010).

Jeder K_{ATP} -Kanal besteht – neben den porenbildenden K_{ir} -Einheiten – aus vier regulatorischen SUR-Untereinheiten, von denen mehrere Subtypen bekannt sind (Hund und Mohler 2011; s. ebenfalls Kapitel I.2.3.3). Diese dienen auch als Angriffsorte von Pharmaka wie z.B. Sulfonylharnstoffderivaten, die zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden können. Dabei besitzen die SUR-Untereinheiten ATP-Bindungsstellen und fungieren gleichzeitig als Rezeptor für Kaliumkanalöffner und -blocker. Die Kaliumkanalöffner, z.B. Pinacidil (ein Cyanoguanidin; Babenko et al. 1998), welches ich in meinen Experimenten eingesetzt habe (s. Abbildung III-5), binden fest an die SUR-Untereinheit und erhöhen dadurch die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle (Friedel und Brogden 1990).

IV. Diskussion

Blockieren hingegen lässt sich die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle durch Sulfonylharnstoffe. Glibenclamid (s. Abbildung III-4), wie es in dieser Arbeit Verwendung fand, wird oft als typischer Blocker der K_{ATP} -Kanäle eingesetzt; seine Wirkung an der basolateralen Membran des Kolonepithels des Menschen ist bereits 1999 (Maguire et al. 1999) und 2009 am distalen Kolon der Ratte beschrieben worden (Hennig und Diener 2009). Sulfonylharnstoffe binden ebenfalls an die SUR-Untereinheiten und simulieren eine erhöhte ATP-Konzentration in der Zelle, somit können die ATP-sensitiven K^+ -Kanäle nicht mehr geöffnet werden. Obwohl auch am distalen Kolonepithel der Ratte K_{ATP} -Kanäle nachgewiesen wurden (Pouokam et al. 2013), konnte überraschenderweise weder eine Blockade der K_{ATP} -Kanäle noch eine vorhergehende Aktivierung dieser Kanäle irgendeinen Effekt auf die elektrische Antwort während der Hypoxie- oder Reoxygenierungsphase hervorrufen (s. Abbildung III-4 und Abbildung III-5). Obgleich es durch einen Sauerstoffmangel zu einer Hemmung der Atmungskette kommt und sich dadurch die ATP-Konzentration im Zytosol verringert (Kowaltowski et al. 2009, Carra et al. 2013), scheinen K_{ATP} -Kanäle an den Änderungen im Ionentransport während der Hypoxie nicht beteiligt zu sein. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu erregbaren Geweben dar, bei denen diese Kanäle eine wichtige Schutzfunktion ausüben (Hibino et al. 2010). Daraus folgt, dass die K_{ATP} -Kanäle im Kolonepithel andere Funktionen erfüllen müssen, möglicherweise dienen sie als Sensor für den Gasotransmitter H_2S (Pouokam und Diener 2011). Gasotransmitter sind gasförmige Signalmoleküle wie NO , CO oder H_2S . Diese sind in die Regulation des Wasser- und Salztransportes im Kolon involviert, welcher zwischen Resorption und Sekretion umgeschaltet werden kann.

Die finale Antwort des Epithels in der Spätphase der Hypoxie resultiert in einem langanhaltenden Abfall im Kurzschlussstrom (*Dec2*, s. Abbildung III-1), was einer Inhibition der Anionen-Sekretion entspricht. Mehrere Mechanismen könnten diese Reduktion im transepithelialen Strom verursachen. In T84-Zellen beispielsweise ist unter hypoxischen Bedingungen ein Abfall des intrazellulären Gehaltes von cGMP und cAMP beschrieben worden (Taylor et al. 1998b). Da diese second messenger Moleküle

IV. Diskussion

physiologischerweise die transepitheliale Chloridsekretion stimulieren, führt ein Abfall ihrer zytosolischen Konzentration zu einer Hemmung der Anionen-Sekretion. Weiterhin ist bekannt, dass unter Hypoxie die AMP-Kinase aktiviert wird, um speziell cAMP-vermittelte Anionen-Sekretionsprozesse herunter zu regulieren (Collins et al. 2011). AMP-Kinasen kommen in allen eukaryontischen Zellen vor und erkennen Änderungen des zytosolischen ATP-Spiegels. Durch die Aktivierung dieser Kinasen werden wiederum energieaufwändige Prozesse wie z.B. eine Chloridsekretion reduziert.

Darüber hinaus hemmt schon allein eine Reduktion der zytosolischen ATP-Konzentration die Öffnung von CFTR-Kanälen, welche die dominante Gruppe der Chloridkanäle in der apikalen Membran darstellen (Greger 2000). Als Vertreter der ABC (ATP-binding-cassette)-Protein-Familie braucht dieser Cl⁻-Kanal eine Phosphorylierung für seine Aktivierung und zusätzlich eine ATP-Hydrolyse für seine Öffnung (Gadsby et al. 2006). Dauert die Hypoxie länger an, scheint es sogar eine Down-Regulation dieser Kanäle zu geben, welche über den HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor-1)-Stoffwechselweg induziert wird. Dieser Mechanismus konnte bereits an den Kolonzelllinien T84 und Caco-2 gezeigt werden (Zheng et al. 2009). Das Protein HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wesentliche Rolle bei der Reaktion auf Hypoxie auf zellulärer Ebene spielt. Dieses Protein stellt ein Heterodimer dar, welches aus einer sauerstoffabhängig regulierten α -Untereinheit und einer β -Untereinheit besteht (Zheng et al. 2015). Unter normoxischen Bedingungen hat das hydroxylierte Protein HIF-1 α eine sehr kurze Halbwertszeit, da es kontinuierlich durch Proteasen abgebaut wird (Ziello et al. 2007). Bei einer Hypoxie wird die Hydroxylase gehemmt, HIF-1 wandert in den Zellkern ein und kann dadurch über Genexpression verschiedene Signalwege in Gang setzen. So wird z.B. die anaerobe Glykolyse stimuliert (Ziello et al. 2007) um ATP zu gewinnen, die Bildung neuer Gefäße durch den VEGF (vascular endothelial growth factor) oder die Erythropoetin (EPO)-Bildung in der Niere angeregt (Zheng et al. 2015) um die Sauerstoffaufnahmekapazität zu steigern.

3. Veränderungen in der Gewebeleitfähigkeit

Neben den Änderungen im I_{sc} tritt ein starker Anstieg in der Gewebeleitfähigkeit bei einer Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung auf. Genauer gesagt handelt es sich dabei um eine erhöhte Ionen-Durchlässigkeit des Epithels während der Hypoxie, welche sogar – nach einer kurzen Verzögerung – während der Reoxygenierungsphase noch weiter steigt (s. Abbildung III-2). In der zeitabhängigen Kontrolle konnte ebenfalls ein leichter Anstieg in der G_t beobachtet werden. Dies könnte vermutlich am Versuchsmodell liegen, da ich mich bei der „Normoxie“ für eine Begasung mit Raumluft entschieden habe, welche nur 20,9 % (v/v) Sauerstoff enthält anstelle von purer O_2 -Begasung, wie es sonst bei in vitro Experimenten mit der Ussingkammer üblich ist. Der Wechsel von 20,9 % O_2 auf reine N_2 -Begasung sollte besser der in vivo Situation einer Ischämie entsprechen als es bei Wechsel von 100 % O_2 auf 100 % N_2 der Fall wäre. Nachteil dieses Vorgehens war allerdings eine verkürzte „Lebensdauer“ der Gewebe bei den in vitro Versuchen; zum einen wahrscheinlich durch das im Vergleich zur Begasung mit 100 % O_2 verringerte Sauerstoffangebot und zum anderen durch die im Vergleich zu physiologischen HCO_3^- -gepufferten Lösungen (in meinen Versuchen wurde HEPES als Puffer eingesetzt) verringerte intrazelluläre Pufferkapazität.

An T84 Zellen wurde in Cokulturrexperimenten beobachtet, dass unter Hypoxie eine Interaktion zwischen dem Epithel und neutrophilen Granulocyten stattfindet, welche eine Produktion und basolaterale Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8), einem proinflammatorischen Zytokin, bewirkt (Colgan 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei einem Anstieg in der Gewebeleitfähigkeit auch die Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF- α) – ein weiteres epitheliales Zytokin – eine zentrale Rolle spielt. Dieses Zytokin bewirkt eine erhöhte Durchlässigkeit der tight junctions (Taylor et al. 1998a). Dies wäre auch bei meinen Experimenten eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Gewebeleitfähigkeit. Allerdings scheint der Anstieg der Epithelpermeabilität nicht nur eine unspezifische Schädigung des Epithels durch die

IV. Diskussion

Hypoxie/Reoxygenierung zu sein, sondern stellt offenbar einen regulierten Prozess dar. So wurde an menschlichen Kolonbiopsien gezeigt, dass eine Blockade Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanäle den Anstieg der parazellulären Permeabilität während einer Energiemangelsituation deutlich vermindert (Loganathan et al. 2011). Worin genau allerdings der Zusammenhang zwischen Hypoxie, Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen und der Integrität der tight junctions besteht, ist weiterhin unklar.

4. Reperfusion und Beteiligung von Radikalen

Wenngleich die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung für das Gewebe essentiell ist, um die Gewebefunktion und -integrität zu erhalten, kann durch die Reoxygenierung selbst ein zusätzlicher enormer Schaden verursacht werden (Turer und Hill 2010). Dabei kommt es bereits während der Hypoxie in den Mitochondrien zur ROS-Bildung, deren Produktion schließlich durch das plötzliche Sauerstoffangebot explodiert. Diese freien Radikale führen zu erheblichen Zell- und Gewebeschäden bis hin zur Nekrose (s. Kapitel I.2.7). Körper eigene „Radikalfänger“ sind in der Lage, diese ROS unschädlich zu machen. Ein wichtiges unter ihnen ist das Tocopherol α (Vitamin E). Trolox C ist ein wasserlösliches Derivat von diesem natürlichen Antioxidans und lässt sich gut experimentell einsetzen. Erste Ussingkammer-Versuche mit Trolox C suggerierten, dass bei der lang andauernden Inhibierung des I_{sc} während der späten Hypoxiephase (*Dec2*) ROS beteiligt sind (s. Abbildung III-19). Da gleichzeitig die Veränderungen im Ionentransport während Hypoxie/Reoxygenierung eine Calciumabhängigkeit aufwiesen (s. Abbildung III-11), habe ich Imaging-Experimente durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Radikalbildung und der Calcium-vermittelten Chloridsekretion weiter zu erforschen. Zunächst führte ich eine Versuchsreihe mit dem Thiol-sensitiven Farbstoff ThiolTracker™ (s. Kapitel II.6.3) durch, der dazu dienen sollte, Änderungen in der zytosolischen Konzentration an Glutathion zu erfassen. Da Glutathion ein wichtiges Antioxidans darstellt, war es von großem Interesse, ob eine Radikalbildung im Zytosol die Glutathionkonzentration senkt und darüber möglicherweise Einfluss auf den Ionentransport nimmt. Doch überraschenderweise konnte während der Hypoxiephase nur eine marginale Veränderung der intrazellulären Konzentration dieses Tripeptides festgestellt werden und auch während der Reoxygenierung war keine Veränderung des Fluoreszenzsignales im Vergleich zu einer zeitabhängigen Kontrolle zu beobachten (s. Abbildung III-21).

IV. Diskussion

Daraufhin wurde die Radikal-Bildung in den Mitochondrien untersucht. Dazu verwendete ich den Superoxid-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX™ Red (s. Kapitel II.2.3.3).

Bei der Aufladung fiel auf, dass sich der Oberflächenbereich der Krypten deutlich stärker anfärbte als der Fundusbereich. Wie in Kapitel II.6.4 bereits beschrieben, werden mit diesem Fluoreszenzfarbstoff die mitochondrialen Superoxide angefärbt, was den Schluss zulässt, dass im Oberflächenbereich mehr oxidativer Stress für die einzelnen Zellen besteht als im Fundusbereich. Erstaunlicherweise zeigte sich während der Hypoxie und anschließender Reoxygenierung keine nennenswerte Änderung des MitoSOX™-Signals (s. Abbildung III-22). Selbst in der Reoxygenierungsphase, in der eigentlich eine gesteigerte Radikalbildung stattfinden sollte, blieb der erwartete Anstieg im Fluoreszenzsignal aus. Dass die Mess-Methode an sich funktionierte und in den Mitochondrien eine ROS-Bildung stattfand, zeigte der deutliche Anstieg im MitoSOX™-Signal auf H₂O₂-Zugabe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Anstieg der Superoxid-Anionen-Konzentration oder ein kompensatorischer Abfall der zytosolischen Glutathion-Konzentration unterhalb der Messschwelle der verwendeten Methode lagen und letztlich sehr viel kleiner ausfielen, verglichen zu den Veränderungen die durch ein starkes Oxidans wie H₂O₂ verursacht wurden.

In vivo allerdings stellt sich diese Situation sehr viel komplexer dar. So kommt es z.B. (wie oben bereits erwähnt) bei einer Hypoxie zu einer Infiltration der Darmwand mit neutrophilen Granulocyten. Diese stellen eine bedeutende Quelle für Oxidantien dar (Colgan et al. 1996, Gonzalez et al. 2015). Hierbei entstehen die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) v.a. durch die in den Granula der neutrophilen Granulocyten enthaltenen Myeloperoxidasen (Dröge 2002).

Andererseits zeigten morphologische Studien am Rattendarm, dass eine Ischämie nur eine mäßige histologische Schädigung am Kolon verursacht, während am Dünndarm diese Schäden sehr viel beträchtlicher ausfallen. Zudem wurden die mukosalen

IV. Diskussion

Schäden am Kolon – im Unterschied zum Dünndarm – nicht durch die Reperfusion verstärkt (Leung et al. 1992). Dies korreliert möglicherweise mit dem niedrigen Level der Xanthin-Oxidase-Aktivität im Kolon, die nur ca. 10 % im Vergleich zu derjenigen im Dünndarm beträgt. Demnach findet in diesem Segment des Darms eine geringere ROS-Produktion statt (Leung et al. 1992). Dies und auch meine Ergebnisse unterstützen die Theorie der sog. „physiologischen Hypoxie“, die kürzlich von anderen Arbeitsgruppen (Zheng et al. 2009, Ward et al. 2014, Zheng et al. 2015) beschrieben wurde. So ist bekannt, dass im Kolon von Mäusen der Sauerstoffpartialdruck (p_{O_2}) schon physiologisch relativ niedrig ist (< 10 mm Hg). Vergleicht man dies mit anderen Werten, z.B. den Alveolaren der Lunge, liegt hier der p_{O_2} bei 100 - 110 mm Hg (Schaible et al. 2010). Das wiederum könnte bedeuten, dass auch das distale Kolon der Ratte gegenüber einer Hypoxie sehr viel toleranter ist als bisher angenommen, worauf die kaum vorhandene Radikalbildung während der Hypoxie und v.a. während der Reoxygenierung stark hindeutet.

5. Fazit

Das Kolonepithel ist neben der täglichen Fluktuation von Nahrungsbestandteilen auch einer Mikroflora ausgesetzt und wird über die mesenteriale Blutzirkulation mit Sauerstoff versorgt. Das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf kann allerdings durch verschiedene Einflüsse, wie beispielsweise einer Hypoxie, schnell gestört werden. Es drohen mukosale Schäden, wodurch Bakterien in das Körperinnere eindringen können und zu lokalen Entzündungsprozessen bis hin zur Sepsis führen können. Auch bei entzündlichen Darmerkrankungen, die häufig von einer Hypoxie begleitet werden, kommt es oft zu einer Diarrhoe (Zheng et al. 2009, Hefaiiedh et al. 2014, Ward et al. 2014). Die in meiner Arbeit gezeigte Ca^{2+} -vermittelte Chloridsekretion zu Beginn einer Hypoxie könnte eine sinnvolle Abwehrreaktion des Darmepithels sein, da dadurch Keime praktisch „weggespült“ werden und somit das Risiko des Eindringens von Bakterien durch die gestörte Epithelbarriere verringert wird.

V. Zusammenfassung

Eine Ischämie des Gastrointestinaltraktes führt zu schwerwiegenden Schäden. Daher war es Ziel dieser Arbeit, herauszufinden wie sich die Barriere- und Transportfunktionen des intestinalen Epithels bei einer Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung verändern. Die Hypoxie induzierte eine triphasische Veränderung im Kurzschlussstrom (I_{sc}): einen initialen Abfall (*Dec1*), einen deutlichen Anstieg (*Peak*) und schließlich einen lang-anhaltenden Abfall (*Dec2*) bis weit unter die initiale Basallinie. Während der Reoxygenierungsphase stieg der I_{sc} wieder langsam an und erreichte nahezu den Ausgangswert vor der hypoxischen Phase. In der Gewebeleitfähigkeit (G_t) war ein biphasischer Anstieg zu beobachten, sowohl während der Hypoxie- als auch der Reoxygenierungsphase. Unter chloridfreien Bedingungen oder einer Vorbehandlung der Gewebe mit Inhibitoren von Cl^- -Transportern, offenbarte sich eine Cl^- -Abhängigkeit dieser Veränderungen im I_{sc} . Eine Inkubation des Gewebes mit dem Radikalfänger Trolox C reduzierte deutlich die Hypoxie-Antwort, konnte aber nicht den Anstieg während der Reoxygenierungsphase unterdrücken. Darüber hinaus waren alle Änderungen des I_{sc} Ca^{2+} -abhängig. Fura-2 Experimente an isolierten Krypten zeigten einen leichten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während der Hypoxie/Reoxygenierung, welche v. a. durch einen extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom verursacht wurde. Überraschenderweise konnten keine sichtbaren Veränderungen im Fluoreszenzsignal mit dem Superoxid-Anion-sensitiven Farbstoff MitoSOX™, bzw. dem Thiol-sensitiven Farbstoff ThiolTracker™ festgestellt werden, was vermuten lässt, dass im Kolonepithel nur eine moderate Radikalbildung während einer Hypoxie/Reoxygenierung stattfindet (bereits unter physiologischen Bedingungen hat das Gewebe nur einen geringen pO_2). So könnte die Cl^- -Sekretion einen Schutzmechanismus der Epithelzellen darstellen, da sie regelmäßig schädigenden Stimuli ausgesetzt sind – z.B. eine Entzündung infolge einer Hypoxie – welche oftmals assoziiert ist mit einer klinischen Diarrhoe. Das Ziel dieser Sekretion könnte also sein, Pathogene vom Epithel abzuschwemmen, um eine mikrobielle Invasion zu vermeiden.

VI. Summary

Ischemia causes severe damage in the gastrointestinal tract. Therefore, it was interesting to study how the barrier and transport functions of intestinal epithelium change under hypoxia and subsequent reoxygenation. Experimental hypoxia induced a triphasic change in short-circuit current (I_{sc}): a transient decrease, a strong increase and finally a long-lasting fall below the initial baseline. During the reoxygenation phase, I_{sc} slightly rose to values above the initial baseline. Tissue conductance (G_t) showed a biphasic increase during both the hypoxia and the reoxygenation phases. Omission of Cl^- or preincubation of the tissue with transport inhibitors revealed that the observed changes in I_{sc} represented changes in Cl^- secretion. The radical scavenger trolox C reduced the I_{sc} response during hypoxia, but failed to prevent the rise of I_{sc} during reoxygenation. All changes in I_{sc} were Ca^{2+} -dependent. Fura-2 experiments at isolated colonic crypts revealed a slow increase of the cytosolic Ca^{2+} concentration during hypoxia and the reoxygenation phase, mainly caused by an influx of extracellular Ca^{2+} . Surprisingly, no changes could be detected in the fluorescence of the superoxide anion-sensitive dye MitoSOX™ or the thiol-sensitive dye thiol tracker, suggesting there is only a moderate radical production during hypoxia/reoxygenation (with its low O_2 partial pressure even under physiological conditions). Thus chloride secretion may be a “priming” consequence of epithelial cells which are regularly exposed to stimuli like inflammation correlated with hypoxia, which often is associated clinically with diarrhea. The goal of this secretion could be “flushing” pathogens from the epithelium as if a microbial assault was running.

VII. Verzeichnisse

1. Abkürzungsverzeichnis

Δ	Änderung eines Parameters
[ATP] _i	Intrazelluläre ATP-Konzentration
2-APB	2-Aminoethoxy-diphenylborat
2-DOG	2-Desoxyglucose
Abb	Abbildung
AgCl	Silberchlorid
AM	Acetoxymethylester
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosin-3',5'-triphosphat
BaCl ₂	Bariumchlorid
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CaCC	Calcium aktivierter Chloridkanal
CaGluc	Calcium-Gluconat
CaMKII	Calcium-Modulin-Kinase II
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPA	Cyclopiazonsäure
d. h.	das heißt
Dec	Abfall (Decrease)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum

VII. Verzeichnisse

evtl.	eventuell
GdCl	Gadoliniumchlorid
Glc	Glucose
Gluc	Gluconat
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid (Dimer)
G _t	Gewebeleitfähigkeit
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HBSS	Hanks balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor -1
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
I _{sc}	Kurzschlussstrom, Nettoionenstrom
Kap.	Kapitel
K _{ATP} -Kanäle	ATP-sensitiver Kaliumkanal
K _D	Dissoziationskonstante
KGluc	Kaliumgluconat
Kir	porenformende Untereinheit des K _{ATP} -Kanals
max	maximal
Min	Minute
mind.	mindestens
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl
N ₂	Stickstoff
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Reduzierte Form des NAD
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

VII. Verzeichnisse

NADPH	Reduzierte Form des NADP
NaGluc	Natriumgluconat
NaOH	Natronlauge
NKCC1	Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ -Cotransporter
NO	Stickstoffmonoxid
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenyl-propyl-amino)-benzoesäure
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Anion
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
Pd	Potentialdifferenz
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Messfeld (region of interest)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
R _t	Gewebewiderstand
s.	siehe
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	Sarkoplasmatische-endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SOD	Superoxid-Dismutase
SUR	Regulatorische Untereinheit des K _{ATP} -Kanals (Sulfonylurea receptor)
Tab.	Tabelle
TNF-α	Tumor-Nekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
Vol/Vol	Volumenanteil (Volumen/Volumen)
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
XO	Xanthin-Oxidase
XOR	Xanthin-Oxidoreduktase
z. B.	zum Beispiel

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung I-1 – Schichten des Gastrointestinaltrakts.....	- 3 -
Abbildung I-2 – Halbschematischer Schnitt einer Lieberkühn’schen Krypte (links) und ein Originalbild (rechts).....	- 5 -
Abbildung I-3 – (A) Schematische Darstellung der Transport- bzw. Resorptionsvorgänge und (B) Zellreifung an den Lieberkühn’schen Krypten.....	- 6 -
Abbildung I-4 – Wichtige Transportproteine am Kolonepithel.....	- 8 -
Abbildung I-5 – Wichtigste Schritte der Calcium-vermittelten Chloridsekretion.....	- 9 -
Abbildung I-6 – Schematische Darstellung K_{ATP} -Kanal.....	- 11 -
Abbildung I-7 – Vereinfachte Darstellung des XOR-Enzyms.....	- 15 -
Abbildung I-8 – Fenton-Reaktion.....	- 16 -
Abbildung I-9 – Enzymatischer Abbau des Superoxid-Anion-Radikals.....	- 18 -
Abbildung I-10 – (A) Strukturformel Glutathion und (B) Reaktionsschema des GSH zum GSSG.....	- 19 -
Abbildung I-11 – Übersicht über die wichtigsten Schritte der Schäden verursacht durch Hypoxie.....	- 21 -
Abbildung II-1 – Originalbild einer isolierten Krypte.....	- 29 -
Abbildung II-2 – Schaltbild für (A) den Open-Circuit-Modus und (B) den Voltage-clamp-Modus.....	- 31 -
Abbildung II-3 – Schema einer modifizierten Ussingkammer.....	- 33 -
Abbildung II-4 – (A) Strukturformel Fura-2 (B) Strukturformel Fura-2-AM.....	- 36 -
Abbildung II-5 – Exzitationsspektrum von Fura-2 bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen.....	- 37 -
Abbildung II-6 – Strukturformel Fluoreszenzfarbstoffes MitoSOX™ Red.....	- 39 -
Abbildung II-7 – Bildung des 2-Hydroxyethidium (HE) durch Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) zu 2-Hydroxyethidium (2-OH-E ⁺).....	- 40 -
Abbildung II-8 – Schematischer Aufbau des Imaging-Messstandes.....	- 41 -

VII. Verzeichnisse

Abbildung II-9 – Schematischer Aufbau und ein Originalfoto (kleines Bild) der Hypoxiekammer	- 44 -
Abbildung II-10 – Falschfarbendarstellung einer mit Fura-2 AM beladenen isolierten Krypte	- 46 -
Abbildung III-1 – Gemittelter Kurvenverlauf des I_{sc} im Ussingkammer-Versuch	- 51 -
Abbildung III-2 – Gemittelter Kurvenverlauf der Gewebeleitfähigkeit.	- 52 -
Abbildung III-3 – Hemmung der Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} durch Ba^{2+} (10^{-2} mol·l ⁻¹ serosal).....	- 53 -
Abbildung III-4 – Wirkung einer Hypoxie unter Kontrollbedingungen und nach Blockade basolateraler Kaliumkanäle	- 55 -
Abbildung III-5 – Voraktivierung der K_{ATP} -Kanäle verändert nicht die Wirkung der Hypoxie auf den I_{sc}	- 56 -
Abbildung III-6 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} unter chloridfreien Bedingungen.....	- 59 -
Abbildung III-7 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} in Gegenwart von Bumetanid (10^{-3} mol·l ⁻¹ serosal).....	- 61 -
Abbildung III-8 – Hemmung der Hypoxie-induzierten Sekretion auf den I_{sc} in Gegenwart von NPPB (10^{-4} mol·l ⁻¹ mukosal).....	- 62 -
Abbildung III-9 – Wirkung einer Hypoxie unter Kontrollbedingungen und nach Chloridsekretion-Blockade	- 63 -
Abbildung III-10 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} unter serosal Ca^{2+} -freien Bedingungen.....	- 66 -
Abbildung III-11 – Effekt von Hypoxie auf den I_{sc} unter Kontrollbedingungen (links), in der Abwesenheit von serosalem $0 Ca^{2+}$ allein ($0 Ca^{2+}$; Mitte) oder in Kombination mit 2-APB (10^{-4} mol·l ⁻¹ serosal)	- 67 -
Abbildung III-12 – Wirkung von Hypoxie und Reoxygenierung auf die G_t (A) unter serosal Ca^{2+} -freien Bedingungen und (B) mit zusätzlicher IP_3 -Rezeptor-Blockade durch 2-APB (10^{-4} mol·l ⁻¹ serosal)	- 68 -

VII. Verzeichnisse

Abbildung III-13 – Hypoxie/Reoxygenierungs-induzierte Änderung des Fura-2-Ratio Signals an isolierten Kolonkrypten	- 71 -
Abbildung III-14 – Hypoxie/Reoxygenierungswirkung auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration (A) im Vergleich zu einer zeitabhängigen Kontrolle (B)	- 72 -
Abbildung III-15 – Wirkung von Hypoxie/Reoxygenierung auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration unter calciumfreien Bedingungen.....	- 73 -
Abbildung III-16 – Kationenkanalblockade durch Gadolinium ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) unterdrückt den Hypoxie-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.....	- 75 -
Abbildung III-17 – Änderung des Fura-2-Signals während der Hypoxie unter Kontrollbedingungen (links), in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (0 Ca^{2+} , Mitte) und in Anwesenheit von Gd^{3+} ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$).....	- 76 -
Abbildung III-18 – Wirkung einer Hypoxie auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration unter Ca^{2+} -freien Bedingungen kombiniert mit IP_3 -Rezeptor-Blockade durch 2-APB ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	- 77 -
Abbildung III-19 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte auf den I_{sc} in Gegenwart von Trolox C ($2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal).....	- 79 -
Abbildung III-20 – Wirkung von Hypoxie/Reoxygenierung auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Gegenwart von Trolox C ($2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	- 80 -
Abbildung III-21 – Wirkung einer Hypoxie auf die Glutathionkonzentration im Zytosol in Thiol-Tracker™-Imaging-Experimenten.....	- 82 -
Abbildung III-22 – Wirkung einer Hypoxie auf die mitochondriale Bildung von Radikalen in MitoSOX™-Imaging-Experimenten.....	- 85 -

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle II-1 – Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe..... - 26 -

Tabelle III-1 – Hypoxie- und Reoxygenierungseffekte in Gegenwart von
Aktivatoren und Inhibitoren von Kaliumkanälen - 58 -

Tabelle III-2 – Abhängigkeit der Hypoxie/Reoxygenierung-induzierten I_{sc} -
Veränderungen von der Anwesenheit von Cl^- -Ionen und der
Sensitivität gegenüber Chloridsekretions- Inhibitoren - 64 -

Tabelle III-3 – Änderungen am Kurzschlussstrom nach Calciumentzug - 69 -

Tabelle III-4 – Änderungen des ThiolTracker™ Fluoreszenz-Signals - 83 -

Tabelle III-5 – Änderungen des MitSOX™-Fluoreszenz-Signals - 86 -

VIII. Literaturverzeichnis

- Amoroso, S.; Schmid-Antomarchi, H.; Fosset, M.; Lazdunski, M.** (1990) Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release. Role of ATP-sensitive K⁺ channels. *Science* 247: 852–854
- Amulic, B.; Cazalet, C.; Hayes, G.; Metzler, K.; Zychlinsky, A.** (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology* 30: 459–489
- Aslund, F.; Berndt, K. D.; Holmgren, A.** (1997) Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *Journal of Biological Chemistry* 272: 30780–30786
- Attard, J. A.; Raval, M. J.; Martin, G. R.; Kolb, J.; Afrouzian, M.; Buie, W. D.; Sigalet, D. L.** (2005) The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: an animal model. *Diseases of the Colon & Rectum* 48: 1460–1470
- Babenko, A. P.; Aguilar-Bryan, L.; Bryan, J.** (1998) A view of sur/KIR6.X, K_{ATP} channels. *Annual Review of Physiology* 60: 667–687
- Babior, B. M.** (1999) NADPH Oxidase: An update. *Blood* 93: 1464–1476
- Bader, S.** (2014) Das non-neuronale cholinerge System des Kolons der Ratte. Dissertationsschrift. *Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen* http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2014/11250/pdf/BaderSandra_2014_11_12.pdf
- Barrett, K. E.; Cohn, J. A.; Huott, P. A.; Wasserman, S. I.; Dharmasathaphorn, K.** (1990) Immune-related intestinal chloride secretion. II. Effect of adenosine on T84 cell line. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 258: C902-C912
- Barrett, K. E.; Keely, S. J.** (2000) Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annual Review of Physiology* 62: 535–572

- Barrett K. E.; Ghisha, F.K.; Merchant, J. L.; Hamid, M. S.; Wood, J. D. (Hg.)** (2006) Physiology of the gastrointestinal tract. 4th edition. Volume 1. Burlington: Academic Press
- Baumgärtner, W.; Gruber, A. (Hg.)** (2015) Spezielle Pathologie für die Tiermedizin. 1. Aufl. *Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co KG*: 50-61
- Baylor, S. M.; Hollingworth, S.** (2000) Measurement and interpretation of cytoplasmic [Ca²⁺] signals from calcium-indicator dyes. *Physiology* 15: 19–26
- Berne, R. M.** (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *American Journal of Physiology* 204: 317–322
- Binder, H.J.; Singh, S.K; Geibel, J.P; Rajendran, V.M** (1997) Novel transport properties of colonic crypt cells. Fluid absorption and Cl-dependent Na-H exchange. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 118: 265–269
- Böhme, M.; Diener, M.; Rummel, W.** (1991) Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 419: 144–151
- Brigelius-Flohe, R.** (2009) Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radical Biology & Medicine* 46: 543–554
- Bruns, R. F.** (1990) Adenosine Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 603: 211–225
- Carra, G. E.; Ibanez, J. E.; Saravi, F. D.** (2013) The effect of acute hypoxia on short-circuit current and epithelial resistivity in biopsies from human colon. *Digestive Diseases & Sciences* 58: 2499–2506
- Christensen, J.** (1991) Gross and microscopic anatomy of the large intestine. The large intestine: Physiology, pathophysiology and disease, ed. SF Phillips, *JH Pemberton & RG Shorter*: 13–35

- Cole, S.; Deeley, R. G.** (2006) Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends in Pharmacological Sciences* 27: 438–446
- Colgan, S. P.** (1996) Epithelial exposure to hypoxia modulates neutrophil transepithelial migration. *Journal of Experimental Medicine* 184: 1003–1015
- Collins, D.; Kopic, S.; Bachlechner, J.; Ritter, M.; Winter, D. C.; Geibel, J. P.** (2011) Hypoxia inhibits colonic ion transport via activation of AMP kinase. *Annals of Surgery* 254: 957–963
- Cook, D. L.; Hales, N.** (1984) Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311: 271–273
- Cook, N.** (1988) The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends in Pharmacological Sciences* 9: 21–28
- Cook, N. S.; Quast, U. (Hg.)** (1990) Potassium channels. Structure, classification, function and therapeutic potential. *Ellis Horwood series in pharmaceutical technology Chichester*
- Del Castillo J.R.; Ricabarra, B.; Sulbaran-Carrasco, M. C.** (1991) Intermediary metabolism and its relationship with ion transport in isolated guinea pig colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology* 260: C626-34
- Diener, M.; Eglème, C.; Rummel, W.** (1991) Phospholipase C-induced anion secretion and its interaction with carbachol in the rat colonic mucosa. *European Journal of Pharmacology* 200: 267–276
- Diener, M.; Nobles, M.; Rummel, W.** (1992) Activation of basolateral Cl⁻ channels in the rat colonic epithelium during regulatory volume decrease. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 421: 530–538
- Diener, M.; Rummel, W.** (1990) Distension-induced secretion in the rat colon. Mediation by prostaglandins and submucosal neurons. *European Journal of Pharmacology* 178: 47–57

- Dietz, O.; Huskamp, B.** (2005) Handbuch Pferdepraxis. 3., völlig neu bearbeitete Auflage, *Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co KG*: 433-511
- Dröge, W.** (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47–95
- Engelhardt, W.; Breves, G.; Diener, M.; Gäbel, G. (Hg.)** (2015) Physiologie der Haustiere, 5. Aufl., *Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co KG*
- Enroth, C.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Pai, E. F.** (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. Structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 10723–10728
- Friedel, H. A.; Brogden, R. N.** (1990) Pinacidil. *Drugs* 39: 929–967
- Frings, M.; Schultheiß, G.; Diener, M.** (1999) Electrogenic Ca²⁺ entry in the rat colonic epithelium. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 439: 39–48
- Gadsby, D. C.; Vergani, P.; Csanady, L.** (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440: 477–483
- Giulivi, C.; Cadenas, E.** (1993) Inhibition of protein radical reactions of ferrylmyoglobin by the water-soluble analog of vitamin E, trolox C. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303: 152–158
- Goldstein, S.; Meyerstein, D.; Czapski, G.** (1993) The Fenton reagents. *Free Radical Biology and Medicine* 15: 435–445
- Gonzalez, L.; Moeser, A.; Blikslager, A.** (2015) Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury. Progress and promise for translational research. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 308: G63-G75
- Greger, R.** (2000) Role of CFTR in the colon. *Annual Review of Physiology* 62: 467–491
- Grosse-Brockhoff, F.** (1969) Pathologische Physiologie. Zweite Auflage. Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*

- Haglund, U.; Bergqvist, D.** (1999) Intestinal ischemia – the basics. *Langenbeck's Archives of Surgery* 384: 233–238
- Harrison, R.** (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase. Where are we now? *Free Radical Biology and Medicine* 33: 774–797
- Harrison, R.** (2004) Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metabolism Reviews* 36: 363–375
- Haugland, R. P.** (2010) Indicators for Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and other metal ions. The Handbook. A guide to fluorescent probes and labeling. In *MTZ Spence (Ed.) Molecular Probes Handbook* (11th Ed.), ch. 19; 829 – 881
- Hefaiedh, R.; Sabbah, M.; Ennaifer, R.; Romdhane, H.; Attaoui, A.; Bel Hadj, N.; Gharbi, L.; Khalfallah M. T.** (2014) Ischemic colitis in five points: an update 2013. *Tunisie Medicale* 92: 299–303
- Heitzmann, D.; Warth, R.** (2008) Physiology and pathophysiology of potassium channels in gastrointestinal epithelia. *Physiological Reviews* 88: 1119–1182
- Held, P.** (2015) An introduction to reactive oxygen species. Measurement of ROS in cells. *BioTek USA*; <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>
- Hennig, B.; Diener, M.** (2009) Actions of hydrogen sulphide on ion transport across rat distal colon. *British Journal of Pharmacology* 158: 1263–1275
- Hennig, B.; Schultheiss, G.; Kunzelmann, K.; Diener, M.** (2008) Ca²⁺-induced Cl⁻ efflux at rat distal colonic epithelium. *Journal of Membrane Biology* 221: 61–72
- Hibino, H.; Inanobe, A.; Furutani, K.; Murakami, S.; Findlay, I.; Kurachi, Y.** (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews* 90: 291–366
- Hille, B.** (2001) Ion channels of excitable membranes. (3rd Edition) *Sinauer Associates Inc, Sunderland USA*: 131-162

- Hund, T. J.; Mohler, P. J.** (2011) Differential roles for SUR subunits in K_{ATP} channel membrane targeting and regulation. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 300: H33-H35
- Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G.** (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 9265–9269
- Kaplan, M. R.; Mount, D. B.; Delpire, E.; Gamba, G.; Hebert, S. C.** (1996) Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annual Review of Physiology* 58: 649–658
- Kirkinezos, I. G.; Moraes, C. T.** (2001) Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12: 449–457
- Kowaltowski, A. J.; Souza-Pinto, N. C. de; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E.** (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 47: 333–343
- Kunzelmann, K.; Mall, M.** (2002) Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiological Reviews* 82: 245–289
- Lee, J.-H.; Kim, B.; Jin, W. J.; Kim, J.-W.; Kim, H.-H.; Ha, H.; Lee, Z. H.** (2014) Trolox inhibits osteolytic bone metastasis of breast cancer through both PGE2-dependent and independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology* 91: 51–60
- Leung, F. W.; Su, K. C.; Passaro, E.; Guth, P. H.** (1992) Regional differences in gut blood flow and mucosal damage in response to ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 263: G301-G305
- Lindstroem, C. G.; Rosengren, J.-E.; Fork, F.-T.** (1979) Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiologica* 20: 523–536
- Lipkin, M.** (1985) Growth and development of gastrointestinal cells. *Annual Review of Physiology* 47: 175–197

- Loganathan, A.; Linley, J. E.; Rajput, I.; Hunter, M.; Lodge, J. P. A.; Sandle, G. I.** (2011) Basolateral potassium (IK_{Ca}) channel inhibition prevents increased colonic permeability induced by chemical hypoxia. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 300: G146-53
- Maguire, D.; MacNamara, B.; Cuffe, J. E.; Winter, D.; Doolan, C. M.; Urbach, V.; O'Sullivan, G.C.; Harvey, B.J.** (1999) Rapid responses to aldosterone in human distal colon. *Steroids* 64: 51-63
- Mandavilli, B. S.; Janes, M. S.** (2010) Detection of intracellular glutathione using ThiolTracker™ violet stain and fluorescence microscopy. *Current protocols in cytometry* 53: 9.35.1-9.35.8.
- Matthews, J. B.; Tally, K. J.; Smith, J. A.; Zeind, A. J.; Hrnjez, B. J.** (1995) Activation of Cl^- secretion during chemical hypoxia by endogenous release of adenosine in intestinal epithelial monolayers. *Journal of Clinical Investigation* 96: 117–125
- MEDI-LEARN Skript Histologie 3** - Wandschichten des Darmtraktes <http://www.medi-learn.de/histo3-1>
- Meier, R.; Tomizaki, T.; Schulze-Briese, C.; Baumann, U.; Stocker, A.** (2003) The molecular basis of vitamin E retention. Structure of human α -tocopherol transfer protein *Journal of Molecular Biology* 331: 725–734
- Miller, W. L.; Thomas, R. A.; Berne, R. M.; Rubio, R.** (1978) Adenosine production in the ischemic kidney. *Circulation Research* 43: 390–397
- Moncoq, K.; Trieber, C. A.; Young, H. S.** (2007) The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Journal of Biological Chemistry* 282: 9748–9757
- Müller-Wieland, K.; Bläker, F.; Mohr, L.; Bergmann, G. von (Hg.)** (1982) Dickdarm. 5. Aufl. Handbuch der inneren Medizin Krankheiten der Verdauungsorgane, Teil 4; Berlin: Springer

- Mukhopadhyay, P.; Rajesh, M.; Haskó, G.; Hawkins, B. J; Madesh, M.; Pacher P.** (2007) Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols* 2: 2295–2301
- Nagler, L. G.; Vartanyan, L. S.** (1976) Subunit structure of bovine milk xanthine oxidase. Effect of limited cleavage by proteolytic enzymes on activity and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 427: 78–90
- Noma, A.** (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147–148
- Olds, R. J.; Olds, J.R.** (1984) Farbatlas der Anatomie der Ratte. Sektionsanleitung. *Hengersberg: Schober*
- Parsons, D. S.; Paterson, C. R.** (1965) Fluid and solute transport across rat colonic mucosa. *Experimental Physiology* 50: 220–231
- Plenge-Tellechea, F.; Soler, F.; Fernandez-Belda, F.** (1997) On the inhibition mechanism of sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases by cyclopiazonic acid. *Journal of Biological Chemistry* 272: 2794–2800
- Potten, C. S.; Booth, C.; Pritchard, D. M.** (1997) The intestinal epithelial stem cell. The mucosal governor. *International Journal of Experimental Pathology* 78: 219–243
- Pouokam, E.; Bader, S.; Brück, B.; Schmidt, B.; Diener, M.** (2013) ATP-sensitive K⁺ channels in rat colonic epithelium. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 465: 865–877
- Pouokam, E.; Diener, M.** (2011) Mechanisms of actions of hydrogen sulphide on rat distal colonic epithelium. *British Journal of Pharmacology* 162: 392–404
- Robinson, M.; Ahn, M.; Rounds, J.; Cook, J.; Jacobs, D.; Wilmore, D.** (1992) Parenteral glutathione monoester enhances tissue antioxidant stores. In: *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 16: 413–418

- Sagone, A. L., Jr; Husney, R. M.; O'Dorisio, M. S.; Metz, E. N.** (1984) Mechanisms for the oxidation of reduced glutathione by stimulated granulocytes. *Blood* 63: 96–104
- Saraví, F. D.; Saldeña, T. A.; Cincunegui, L. M.** (1995) Colon epithelial electrical responses to acute hypoxia and reoxygenation in vitro. *Acta Gastroenterol Latinoam* 26: 159–165
- Schäfer, C.; Alther, S.; Schäfer, M.; Dietrich, L.; Kasseck, S.; Abdallah, Y.; Piper, H.** (2003) Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation. *Cardiovascular Research* 58: 149–155
- Schaible, B.; Schaffer, K.; Taylor, C. T.** (2010) Hypoxia, innate immunity and infection in the lung. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 174: 235–243
- Schubert, G. E.; Bethke, B. A.** (1987) Lehrbuch der Pathologie und Antwortkatalog zum GK2; 2. Auflage, Berlin/New York, *De Gruyter*: S.496
- Schultheiss, G.; Diener, M.** (1997) Regulation of apical and basolateral K⁺ conductances in rat colon. *British Journal of Pharmacology* 122: 87–94
- Schultheiss, G.; Diener, M.** (1998) K⁺ and Cl⁻ conductances in the distal colon of the rat. *General Pharmacology* 31: 337–342
- Schultheiss, G.; Kocks, S.; Diener, M.** (2001) Methods for the study of ionic currents and Ca²⁺-signals in isolated colonic crypts. *Biol Proced Online* 3: 70–78
- Schultheiss, G.; Seip, G.; Kocks, S. L.; Diener, M.** (2002) Ca²⁺-dependent and -independent Cl⁻ secretion stimulated by the nitric oxide donor, GEA 3162, in rat colonic epithelium. *European Journal of Pharmacology* 444: 21–30
- Seino, S.** (1999) ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annual Review of Physiology* 61: 337–362
- Specht W.** (1977) Morphology of intestinal wall. *F Lauterbach (Ed.), Intestinal permeation*, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford: 4-40

- Standen, N.; Quayle, J.; Davies, N.; Brayden, J.; Huang, Y.; Nelson, M.** (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 245: 177–180
- Strabel, D.; Diener, M.** (1995) Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *European Journal of Pharmacology* 274: 181–191
- Striebel, H. W.** (2008) Operative Intensivmedizin. Sicherheit in der klinischen Praxis. *Stuttgart: Schattauer*
- Taylor, C. T.; Dzus, A. L.; Colgan, S. P.** (1998a) Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia. Role for polarized release of tumor necrosis factor α . *Gastroenterology* 114: 657–668
- Taylor, C. T.; Lisco, S. J.; Awtrey, C. S.; Colgan, S. P.** (1998b) Hypoxia inhibits cyclic nucleotide-stimulated epithelial ion transport: Role for nucleotide cyclases as oxygen sensors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284: 568–575
- Thadhani, R.; Pascual, M.; Bonventre, J. V.** (1996) Acute renal failure. *The New England Journal of Medicine* 334: 1448–1460
- Tsien, R. Y.** (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons. Design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19: 2396–2404
- Tsien, R.Y.; Poenie, M.** (1986) Fluorescence ratio imaging. A new window into intracellular ionic signaling. In: *Trends in Biochemical Sciences* 11: 450–455
- Turer, A. T.; Hill, J.** (2010) Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *American Journal of Cardiology* 106: 360–368

- Turrens, J. F.; Freeman, B. A.; Levitt, J. G.; Crapo, J. D.** (1982) The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 217: 401–410
- Turrens, J. F.** (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* 552: 335–344
- Ussing, H. H.; Zerhahn K.** (1950) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*: 110–127
- Vergauwen H.; Tambuyzer B.; Jennes K.; Degroote J.; Wang W.; De Smet S.; Michiels J.; Van Ginneken C.** (2015) Trolox and ascorbic acid reduce direct and indirect oxidative stress in the IPEC-J2 cells, an in vitro model for the porcine gastrointestinal tract. *PLoS ONE* 10: e0120485
- Verkman, A. S.; Galletta, L.** (2009) Chloride channels as drug targets. *Nature Reviews. Drug Discovery* 8: 153–171
- Ward, J. B. J.; Keely, S. J.; St. Keely, J.** (2014) Oxygen in the regulation of intestinal epithelial transport. *Journal of Physiology* 592: 2473–2489
- Warth, R.; Barhanin, J.** (2003) Function of K⁺ channels in the intestinal epithelium. *Journal of Membrane Biology* 193: 67–78
- Zheng, L.; Kelly, C. J.; Colgan, S. P.** (2015) Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A review in the theme cellular responses to hypoxia. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 309: C350-C360
- Zheng W.; Kuhlicke J.; Jäckel K.; Eltzhig H. K.; Singh A.; Sjöblom M.; Riederer B.; Weinhold C.; Seidler U.; Colgan S. P.; Karhausen J.** (2009) Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-mediated repression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the intestinal epithelium. *FASEB Journal* 23: 204–213

Ziello, J. E.; Jovin, I. S.; Huang, Y. (2007) Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 80: 51–60

Zielonka, J.; Kalyanaraman, B. (2010) Hydroethidine- and MitoSOX™-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radical Biology & Medicine* 48: 983–1001

IX. Anhang

1. Publikation

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind in folgender Arbeit erschienen:

Schindele, S.; Pouokam, E.; Diener, M. (2016) Hypoxia/reoxygenation effects on ion transport across rat colonic epithelium. *Frontiers in Physiology* 7, Art. 247.

2. Danksagung

Da ist es also – das „Opus“, das „Werk“, mein „Baby“ – über drei Jahre hat es mich nun begleitet. Doch ohne die Unterstützung vieler hilfreicher Menschen wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Bei euch allen möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Martin Diener für die Überlassung und Mitgestaltung dieses spannenden Themas und seine hervorragende Betreuung bedanken. Mit seiner schier unendlichen Geduld und Bereitschaft Fragen und Probleme schnell und effektiv aus der Welt zu schaffen, war er die beste Unterstützung für die Anfertigung dieser Dissertation, die man sich wünschen kann. Danke Martin für die vielen konstruktiven Diskussionen und auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Versuchsplanung und -durchführung.

Ein weiterer großer Dank geht an meinen Betreuer Ervice Pouokam Ph. D., der mir geduldig geholfen hat, mich in die Welt der Wissenschaft einzuarbeiten. Danke für deine (oft sehr unterhaltsame) Unterstützung im Labor und beim Kampf mit Lotus oder Excel.

Ohne die Heldinnen im Labor wäre die Durchführung der Experimente undenkbar gewesen. Danke an: Eva-Maria Haas, Bärbel Schmidt, Brigitta Brück und Alice Stockinger. Jederzeit konnte ich mich auf eure bewährten Erfahrungen, technischen Fertigkeiten und prompte Hilfsbereitschaft verlassen. Ohne Euch wäre ich manches Mal im Labor verzweifelt. Vielen Dank für das unglaublich tolle Engagement, egal wo es gerade nötig war! Danke auch an Michael Haas, für die gute Betreuung der Labortiere und seine stets gute Laune, die er immer gern weiter trägt.

Ebenso danke ich dem Team der Campus-Werkstatt: Gerd Herber, Alexander Heinrich und Norbert Wagner – zum einen für die gewissenhafte Herstellung der Hypoxie-Kammer, zum anderen für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei sämtlichen technischen Problemen.

Meine Kollegin Dr. Sandra Bader hat nicht nur das Büro mit mir geteilt, sondern auch die Höhen und Tiefen der Promotionszeit. Sie hat mich manches Mal (auch recht unsanft 😊) auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt. Trotzdem wusste sie mich zu bestärken, diese Arbeit fertig zu stellen und dafür bin ich ihr sehr dankbar. Danke für die vielen Frust-Gespräche bei Kaffee und Nervennahrung, das „Kopf-Lüften“ und deine Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit - immer und überall.

Danken möchte ich auch allen anderen bestehenden und ehemaligen Mitarbeitern und Doktoranden für die abwechslungsreiche Zeit, die ich am Institut verbringen durfte.

Allen meinen Freunden und Freundinnen, im besonderen Joana, Lara, Rebecca und Vivien, außerdem meinen Bandkollegen Nani, Guido und Wolfgang von „*Simply 4 friends*“ und allen von „*Al Dente*“ mitsamt Thomas danke ich für die Ablenkung, wenn ich sie brauchte; die vielen aufmunternden Worte, wenn mal wieder „alles Mist“ war und einfach dafür, dass ihr immer für mich da seid, wenn ich euch brauche!

Ein sehr besonderer und lieber Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, weil ihr mich immer und in allem unterstützt und mich immer bestärkt, dass ich alles schaffen kann, egal was ich mir vornehme. Ich liebe Euch!

Mein größter Dank gilt meinem Mann Christian und meinem Sohn Tobias. Denn ohne eure Liebe, Geduld und Unterstützung wäre so vieles, unter anderem auch diese Arbeit, nicht möglich gewesen. Ihr habt mir wo es ging den Rücken frei gehalten, auch wenn unsere gemeinsame Zeit dadurch so manches Mal sehr begrenzt wurde. Daher möchte ich diese Arbeit meiner Familie widmen. Ich liebe euch über alles!

DANKE!

3. Erklärung

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

Sabine Schindele



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6564-5



9 783835 196564 5