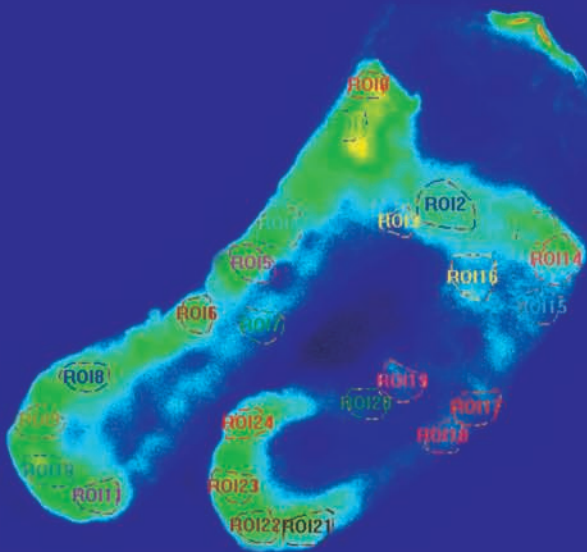


**JULIA STEIDLE**

WIRKUNGEN DES GASOTRANSMITTERS  
KOHLENSTOFFMONOXID AUF DEN  
IONENTRANSPORT AM KOLON DER RATTE



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



*édition scientifique*  
**VVB LAUFFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

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

1. Auflage 2011

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.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

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

**Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener**

**Wirkungen des Gasotransmitters Kohlenstoffmonoxid auf  
den Ionentransport am Kolon der Ratte**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Julia Steidle**

Tierärztin aus Schwedt/Oder

Gießen 2011

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Diener

Prof. Dr. W. Clauss

Tag der Disputation: 30.03.2011

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>I Einleitung</b>	<b>1</b>
1 Anatomische und funktionelle Charakterisierung des Versuchsgewebes – Kolon der Ratte	1
2 Resorption und Sekretion am Kolonepithel	4
2.1 Resorptionsvorgänge am Kolon	5
2.2 Sekretionsvorgänge am Kolon	6
2.3 Regulation der Resorptions- und Sekretionsvorgänge am Kolon	8
2.3.1 cAMP-vermittelte Sekretion	9
2.3.2 cGMP-vermittelte Sekretion	10
2.3.3 Ca <sup>2+</sup> -vermittelte Sekretion	10
3 Einfluss des enterischen Nervensystems auf Transportprozesse am Kolon	11
4 Gasotransmitter	12
5 Kohlenstoffmonoxid	13
6 Eigene Fragestellung	16
<b>II Material und Methoden</b>	<b>17</b>
1 Versuchstiere	17
2 Verwendete Lösungen	17
2.1 Lösungen für Ussingkammer-Versuche	17
2.1.1 Bicarbonat-gepufferte Parsonslösung (Standard)	17
2.1.2 Chloridfreie Parsonslösung	18
2.1.3 Kaliumchloridreiche Parsonslösung	18
2.1.4 Standard-Tyrodelösung	18
2.1.5 Chlorid- und bicarbonatfreie Tyrodelösung	18
2.1.6 Natriumfreie Tyrodelösung	19
2.2 Lösungen für Ca <sup>2+</sup> -Imaging-Versuche	19
2.2.1 Isolationslösung	19
2.2.2 Auffanglösung	19
2.2.3 Standard-Tyrodelösung	19
2.2.4 Fura-2 AM-Lösung	20
2.2.5 Ca <sup>2+</sup> -freie Tyrodelösung	20
2.3 Lösungen für immunhistochemische Markierungen	20
2.3.1 Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung	20
2.3.2 Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung	20
2.3.3 Phosphatpuffer (PB)	20
2.3.4 Fixierungslösung	21
2.3.5 Kresylviolett-Färbelösung	21
2.3.6 Blockinglösung	21

# Inhaltsverzeichnis

---

2.3.7 Primärantikörperlösungen	21
2.3.8 Sekundärantikörperlösungen	22
2.3.9 DAPI-Lösung	22
2.4 Lösungen zur Beschichtung der Glasplättchen	22
2.4.1 Poly-L-Lysin-Lösungen	22
3 Substanzen	23
4 Herstellung von inaktiviertem CORM-2	24
5 Beschichtung der Glasplättchen	24
6 Gewebepreparation	25
6.1 Herstellung eines Mucosa-Submucosa-Präparats	25
6.2 Präparation isolierter Krypten	26
6.3 Herstellung eines Submucosa-Präparats (intaktes Häutchenpräparat des Plexus submucosus)	27
7 Ussingkammer-Versuche	28
7.1 Theorie der Ussingkammer-Technik	28
7.2 Die Messkammer	31
7.3 Versuchsdurchführung und Datenerfassung	33
8 Ca <sup>2+</sup> -Imaging mit Fura-2 AM	34
8.1 Theorie des Ca <sup>2+</sup> -Imagings	34
8.2 Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM	36
8.3 Der Ca <sup>2+</sup> -Imaging-Messstand	38
8.4 Die Imaging-Messkammer mit Perfusionssystem	39
8.5 Ca <sup>2+</sup> -Imaging-Experimente an isolierten Krypten	39
8.5.1 Aufladung der Krypten	39
8.5.2 Versuchsdurchführung	39
8.5.3 Datenerfassung	41
8.6 Ca <sup>2+</sup> -Imaging Experimente am intakten Häutchenpräparat des Plexus submucosus	41
8.6.1 Aufladung der Häutchenpräparate	41
8.6.2 Versuchsdurchführung und Datenerfassung	41
9 Immunfluoreszenz-Analyse	43
9.1 Theorie der Immunfluoreszenz	43
9.2 Die verwendeten Antikörper	44
9.3 Negativkontrollen	47
9.4 Fluoreszenzmarkierung	47
9.4.1 Paraformaldehydfixation	47
9.4.2 Kryofixation	48
9.4.3 Herstellung der Gewebeschnitte	49
9.4.4 Versuchsdurchführung/Färbeprotokolle	49
9.4.4.1 Einfachmarkierung	49
9.4.4.2 Doppelmarkierung	53
9.4.5 Mikroskopie	53
10 Polymerasekettenreaktion (PCR)	55

# Inhaltsverzeichnis

---

10.1 Theorie der PCR	55
10.2 Isolation von mRNA	57
10.3 Quantitative Bestimmung der Gesamt-RNA	58
10.4 Synthese von cDNA	58
10.5 Oligonukleotide (Primer)	59
10.6 Versuchsdurchführung	59
10.6.1 Hämoxygenase I + II	60
10.7 Gelelektrophorese	61
11 Statistik	62
<b>III Ergebnisse</b>	<b>63</b>
1 Kohlenstoffmonoxid-induzierte Veränderungen des intestinalen Ionentransports	63
1.1 CORM-2-induzierter Anstieg des Kurzschlussstroms am distalen Rattenkolon	63
1.2 Desensitivierung des Gewebes durch mehrfache CORM-2-Applikation	65
1.3 Der CORM-2-induzierte $I_{sc}$ wird von einer Anionensekretion getragen	66
1.3.1 Anionensubstitutionsversuche	66
1.3.2 Versuche mit Transportinhibitoren auf der basolateralen Membranseite	68
1.3.3 Versuche mit Transportinhibitoren auf der apikalen Membranseite	68
1.4 CORM-2 induziert Ionenbewegungen an der apikalen Membran	70
1.5 CORM-2 induziert Ionenbewegungen an der basolateralen Membran	73
2 Beteiligung von sekretomotorischen Neuronen am CO-Effekt	75
3 Untersuchung auf endogene Produktion von CO im distalen Rattenkolon	77
3.1 Immunhistochemischer Nachweis der Hämoxygenase I und II	77
3.2 Molekularbiologischer Nachweis der Hämoxygenase I und II	80
3.3 Einfluss endogener CO-Produktion auf den Ionentransport	81
4 Signalkaskade	83
4.1 Kolokalisation von Hämoxygenasen und Stickstoffmonoxid-Synthasen	83
4.2 Der CO-Effekt ist unabhängig von einer sGC-Aktivierung	86
4.3 CORM-2 bewirkt einen Anstieg der cytosolischen $Ca^{2+}$ -Konzentration	87
4.4 Veränderungen der cytosolischen $Ca^{2+}$ -Konzentration an intakten Häutchenpräparaten des Plexus submucosus durch CORM-2	90
4.5 Interaktionen von CORM-2 mit Sekretagogen	91
<b>IV Diskussion</b>	<b>94</b>
1 CORM-2-induzierter Anstieg des Kurzschlussstroms	94
2 CORM-2 induziert eine Anionensekretion am distalen Kolon der Ratte	95
3 Einfluss von CORM-2 auf die apikale Membran	96
4 Einfluss von CORM-2 auf die basolaterale Membran	97
5 Beteiligung von sekretomotorischen Neuronen am CO-Effekt	98
6 Endogene Produktion von CO	99
7 Signalkaskade	100

# Inhaltsverzeichnis

---

7.1 sGC/cGMP-Signalkaskade ist nicht am CO-Effekt beteiligt	100
7.2 CORM-2-induzierte Erhöhung des cytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Spiegels	103
8 Interaktionen mit Sekretagogen	105
9 Zellmodell	107
<b>V Zusammenfassung</b>	<b>108</b>
<b>VI Summary</b>	<b>109</b>
<b>VII Abbildungsverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>VIII Tabellenverzeichnis</b>	<b>111</b>
<b>IX Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>X Danksagung</b>	<b>121</b>
<b>XI Erklärung</b>	<b>122</b>



## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta$	Änderung eines Parameters (Delta)
ADP	Adenosin-3',5'-Diphosphat
AM	Acetoxymethylester
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variances)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-3',5'-Triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Caco-2	Kolon-Karzinom-Zelllinie
CaMK	Calmodulinkinasen
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
CCD	charge coupled device
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
CK	Caseinkinase
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO-Hb	Carboxyhämoglobin
CORM-2	Carbon monoxide releasing molecule 2
CPA	Cyclopiazonsäure
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Dilactat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamino-tetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycol bis-( $\beta$ -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENaC	epithelialer Na <sup>+</sup> -Kanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F <sub>ab</sub>	Antigenbindende Region eines Antikörpers
F <sub>c</sub>	Kristalline Region eines Antikörpers
G <sub>i</sub>	inhibitorisches G-Protein
G <sub>t</sub>	Gewebeleitfähigkeit
GTP	Guanosin-3',5'-Triphosphat
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HO	Hämoxygenase
iCORM-2	inaktiviertes CORM-2
IgG	Immunglobulin G
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom

## Abkürzungsverzeichnis

---

IP <sub>3</sub>	Inositol-1, 4, 5-Trisphosphat
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
KGluc	Kaliumgluconat
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
n	Anzahl
NaGluc	Natriumgluconat
NCX	Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NGS	Ziegenserum
NHE	Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Austauscher
NKCC1	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter
NMDGCl	N-Methyl-D-Glucamin Chlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat
NPY	Neuropeptid Y
ODQ	1H-[1, 2, 4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PB	Phosphatpuffer
Pd	Potentialdifferenz
PDGF	Platelet-derived growth factor
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
ROI	Region of interest
R <sub>t</sub>	Gewebewiderstand
rtPCR	reverse transcription Polymerasekettenreaktion
SCFA	Kurzkettige Fettsäure (Short-Chain Fatty Acid)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Standard error of the mean)
SERCA	sarcoplasmatische-endoplasmatische Retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SITS	4-Acetamido-4'-isothiocyanato-stilben-2,2'-disulfonsäure Natriumsalz
sGC	lösliche Guanylatcyclase (soluble guanylate cyclase)
SOCC	store-operated Ca <sup>2+</sup> -channel
TAE	Tris-Acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
Vol/Vol	Volumenanteil (Volumen/Volumen)
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol
ZnPP	Zink-Protoporphyrin IX

## Abkürzungsverzeichnis

---

ZNS            Zentrales Nervensystem

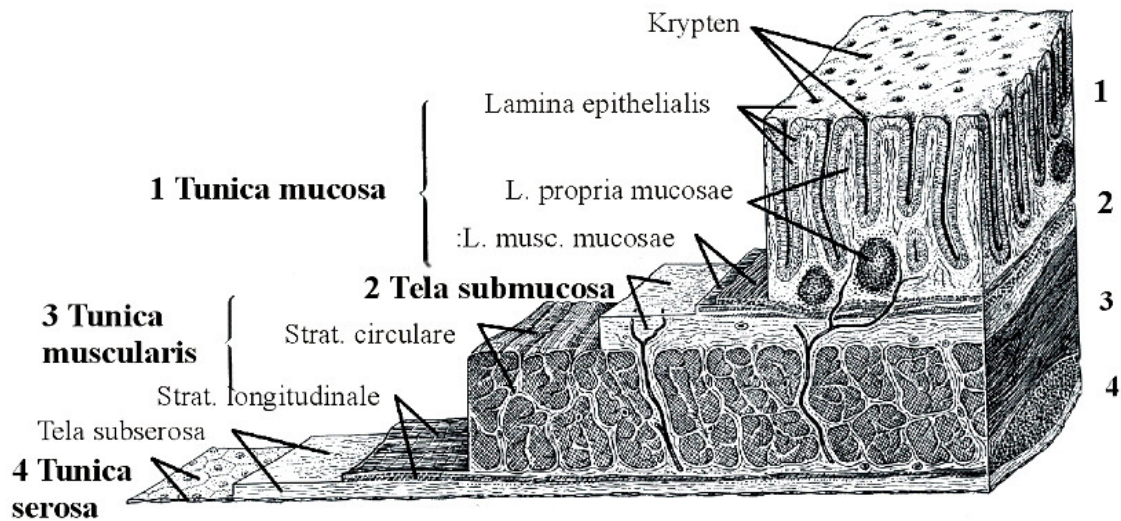


## **I Einleitung**

### **1 Anatomische und funktionelle Charakterisierung des Versuchsgewebes – Kolon der Ratte**

Der Dickdarm des Säugetiers, auch Intestinum crassum genannt, gliedert sich in verschiedene Abschnitte. Dazu gehören von proximal nach distal aufgelistet: der Blinddarm (Caecum), der Grimmdarm (Kolon) und der Enddarm (Rectum) mit Ampulla recti und Analkanal. Im Gegensatz zum Dünndarm besitzt die Dickdarmschleimhaut keine Zotten. Die einzelnen Abschnitte des Dickdarms weisen sowohl tierartige als auch rassespezifische und individuelle anatomische und funktionelle Unterschiede auf. Im Allgemeinen dient dieser Bereich des Gastrointestinaltrakts dem Weitertransport der Ingesta, der bakteriellen Aufspaltung von Strukturkohlenhydraten, der Speicherung der Faeces bis zur Ausscheidung, der Abwehr von Krankheitserregern, der Sekretion von plasmatischer,  $K^+$ -,  $HCO_3^-$ - und mucinhaltiger Flüssigkeit, aber vor allem auch der Resorption von Wasser und Elektrolyten. Etwa 90 % der Flüssigkeit der Faeces, die aus dem Dünndarm in den Dickdarm transportiert wird, wird hier resorbiert (Cooke 1991, Kunzelmann und Mall 2002). Dabei besitzt das Kolon die Fähigkeit, diese Resorptionsleistung noch um das ca. Vierfache zu steigern. Tritt jedoch noch mehr Flüssigkeit aus dem Dünndarm in den Dickdarm ein und überschreitet damit die maximale Resorptionsleistung des Dickdarms, führt dies zur Ausbildung einer klinisch manifesten Diarrhoe (Binder et al. 1991, Binder und Sandle 1994). Alternativ kann eine gesteigerte Sekretion im Kolon ebenso zu Diarrhoe führen (Field und Semrad 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche am Kolongewebe der Ratte durchgeführt. Dieses teilt sich makroskopisch in drei Abschnitte: das proximale Kolon (oder Kolon ascendens), beginnend am Ostium ileale des Caecums, die große Flexur (oder Kolon transversum) und das distale Kolon (oder Kolon descendens), welches in den Enddarm übergeht. Haustren oder Taenien sind bei der Ratte nicht ausgebildet. Der proximale Anteil des Kolons ist durch seine charakteristische Querstreifung leicht von dem distalen Anteil zu unterscheiden (Lindström et al. 1979). Mikroskopisch lässt sich die Wand des Kolons von luminal nach serosal in die Schleimhaut (Tunica mucosa), eine Bindegewebsschicht (Tela submucosa), die Muskelhaut (Tunica muscularis) und den Bauchfellüberzug (Tunica serosa) einteilen (Abb. I-1).

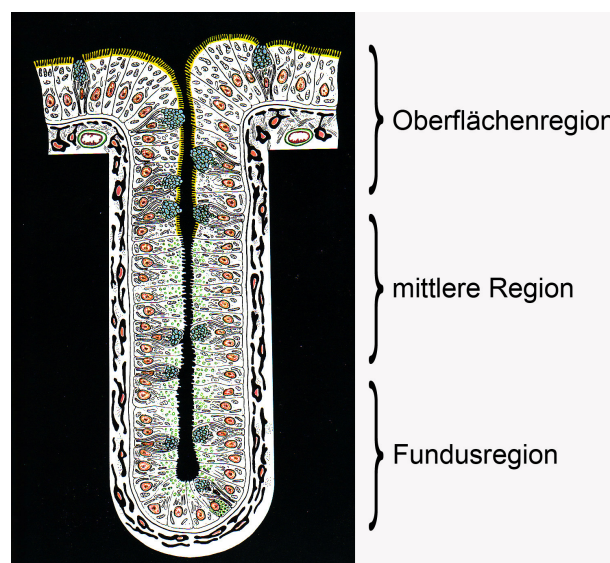


**Abb. I-1: Schematische Darstellung der Kolonwand unter Lupenvergrößerung** (Sobotta und Becher 1972). L. = Lamina; Strat. = Stratum

Die Tunica mucosa setzt sich aus der Lamina epithelialis mucosae, der Lamina propria mucosae und der Lamina muscularis mucosae zusammen. In der Lamina epithelialis mucosae befinden sich dicht nebeneinander lokalisierte, sich in die Tiefe der Lamina propria mucosae einstülpende schlauchförmige Glandulae intestinales (sog. Lieberkühnsche Krypten) (Potten et al. 1997). Die Lamina epithelialis mucosae auf der Darms Oberfläche und innerhalb der Krypten besteht aus verschiedenen hochprismatischen Epithelzellen. Dazu gehören vor allem die Enterozyten, die im Bereich der Oberfläche der Lieberkühnschen Drüsen mit dichtem Bürstensaum (Mikrovilli) besetzte Saumzellen darstellen. Die dadurch erreichte Oberflächenvergrößerung der inneren Darms Oberfläche erhöht die Resorptionskapazität um ein Vielfaches. Neben den Saumzellen befinden sich vor allem im distalen Kolon in steigender Anzahl sog. Becherzellen. Sie dienen der Sekretion plasmaitoner,  $K^+$ ,  $HCO_3^-$  und mucinhaltiger Flüssigkeit und damit dem Weitertransport der Ingesta und dem epithelialen Oberflächenschutz (Potten et al. 1997). Desweiteren sind enteroendokrine Zellen in geringerer Anzahl im Dickdarmepithel lokalisiert. Diese Zellen sezernieren Hormone, wie z.B. Glucagon, Serotonin, Somatostatin und Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) (Specht 1977).

Die Epithelzellschicht des Gastrointestinaltrakts unterliegt einer ständig andauernden Erneuerung. Neue undifferenzierte Epithelzellen werden im Bereich des Fundus der Krypten generiert und wandern im Verlaufe ihrer Reifung vom Fundus über die Mitte bis zur Oberfläche der Krypten. Dabei differenzieren sie sich zu ihrer jeweils spezifischen Funktionalität (Barret und Keely 2000). Nach einer speziesspezifischen Zeit – beim Nager dauert ein Zyklus ca. 2 – 3 Tage (Lipkin 1985) - kommt es zur natürlichen Apoptose und zum Abschilfern der Zellen in das Darmlumen (Potten et al. 1997).

Daher unterteilt man die Zellen der Lieberkühnschen Krypten funktionell und nach ihrem Entwicklungsgrad in drei Bereiche, die des Fundus, der Mitte und der Oberfläche (Abb. I-2) (Greger et al. 1997). Während dieser Reifung kommt es zu einer vermehrten Expression von Transportern, die der Resorption von Elektrolyten dienen, wie etwa dem  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher Typ 3 (NHE3; Bachmann et al. 2004). Man geht dabei im Allgemeinen davon aus, dass die unreifen Kryptenzellen in der Hauptsache Ionen sezernieren und die reifen Oberflächenzellen in der Hauptsache Ionen resorbieren, auch wenn die Unterschiede fließend sind und prinzipiell die Fähigkeit zur Sekretion auch im Oberflächenepithel gefunden wird (Diener et al. 1989, Köckerling und Fromm 1993).



**Abb. I-2: Halbschematische Darstellung einer Lieberkühnschen Krypte**  
Longitudinaler Schnitt (Specht 1977)

Unterhalb der Lamina epithelialis mucosae und der Lamina propria mucosae befindet sich die Lamina muscularis mucosae, welche hauptsächlich von glatten Muskelzellen gebildet wird. Die serosawärts gelegene Tela submucosa enthält vor allem kollagenes Bindegewebe mit elastischen Fasern, Blutgefäßen und Lymphgefäßen. In dieser Schicht befindet sich außerdem ein Nervengeflecht, der Meissnersche Plexus (Plexus submucosus), der einen Teil des enteralen Nervensystems darstellt. Die Ganglienzellen sind durch Axone und Dendriten untereinander und mit den angrenzenden Darmwandschichten verbunden. Ein weiterer Anteil des enterischen Nervensystems wird durch das Nervengeflecht zwischen der zirkulären (Stratum circulare) und der longitudinalen (Stratum longitudinale) Muskelschicht der Tunica muscularis repräsentiert. Hierbei handelt es sich um die großen, meist mehr als 100 Nervenzellen zählenden Ganglien des Auerbach-Plexus (Plexus myentericus). Abgrenzend zur Bauchhöhle folgt an die Muskelschicht die Tunica serosa, ein aus einschichtigen Plattenepithelzellen bestehender Überzug des Darms.

### **2 Resorption und Sekretion am Kolonepithel**

Wie alle intestinalen Epithelien ist auch das des Kolons fähig Wasser und Elektrolyte sowohl zu resorbieren als auch zu sezernieren (Binder und Sandle 1994). Damit ist dieses Gewebe essentiell an der Regulation des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalts des Organismus beteiligt. Kommt es durch verschiedene Faktoren zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen Sekretion und Resorption, kann dies unterschiedliche Krankheitsbilder zur Folge haben. Eine vermehrte Sekretion von Elektrolyten, denen Wasser osmotisch folgt, führt zur Ausbildung einer sekretorischen Diarrhoe, die je nach Ausmaß zu einer mehr oder weniger starken Dehydratation des Organismus führen kann. Vor allem bei Säuglingen und juvenilen Säugern kann diese Erkrankung lebensgefährliche Ausmaße annehmen.

Die Umschaltung zwischen Resorption und Sekretion wird durch verschiedene Signalstoffe bewirkt, welche an membranständige Rezeptoren der Epithelzellen binden. Zu diesen Substanzen zählen klassische Neurotransmitter, hydrophile Hormone und parakrine Substanzen, welche über verschiedene Signalwege die Epithelzellen beeinflussen. Vor wenigen Jahren wurde entdeckt, dass auch gasförmige



Substanzen als Signalstoffe einen Einfluss auf die Regulation epithelialer Funktionen haben können.

### 2.1 Resorptionsvorgänge am Kolon

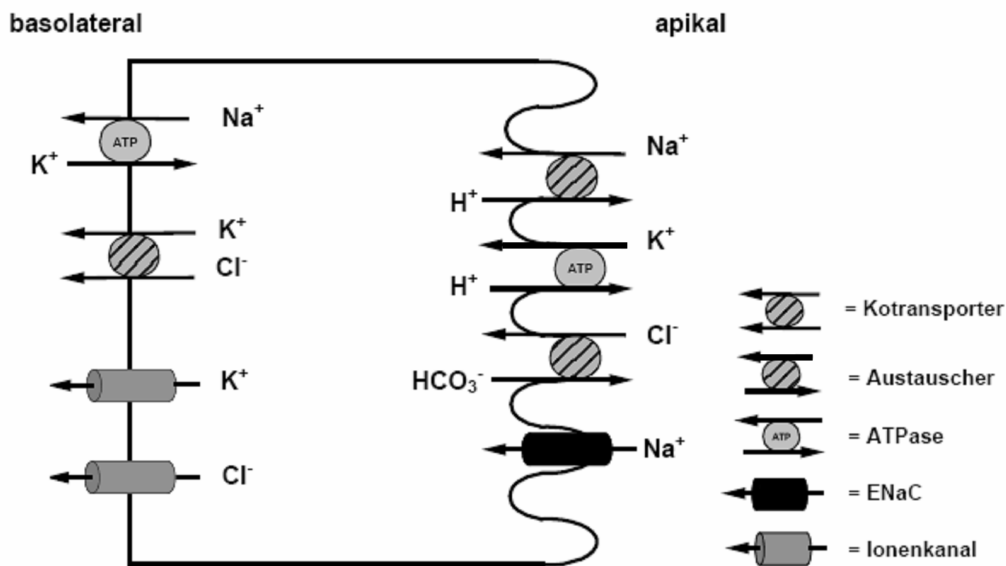
Im Kolon werden, wie bereits erwähnt, große Anteile der noch in den Faeces enthaltenen Flüssigkeit und Ionen, wie z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ , resorbiert (Überblick in Abb. I-3). Dabei ist das Kolon fähig, seine Resorptionsleistung an verschiedene Situationen und vor allem an den Flüssigkeitsgehalt der aus dem Dünndarm übertretenden Faeces anzupassen.

Für die einzelnen Ionen gibt es verschiedene speziesspezifische zelluläre Transportmechanismen. So werden  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen bei der Ratte und der Maus größtenteils über elektroneutrale Wege resorbiert. Dafür befinden sich in der apikalen Membran ein  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher und ein  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, die die Aufnahme von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen in die Zelle vermitteln. Diese Ionen werden auf der basolateralen Seite über die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase bzw.  $\text{Cl}^-$ -Kanäle ausgeschleust (Diener et al. 1992, Übersicht: Kunzelmann und Mall 2002, Ikuma et al. 2003). Gleichzeitig gelangen  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  durch diese Transportmechanismen auf der apikalen Seite in das Darmlumen. Elektrogene Transportmechanismen über apikale amiloridsensitive hochselektive  $\text{Na}^+$ -Kanäle (ENaC = epithelial  $\text{Na}^+$  channel) findet man vor allem im distalen Kolon des Menschen, aber auch beim Kaninchen und Meerschweinchen. Bei Ratte und Maus nimmt dieses Transportsystem - zumindest bei niedrigen Aldosteron-Plasmakonzentrationen - einen geringen Stellenwert ein.

$\text{K}^+$ -Ionen werden im Kolon des Säugetiers aktiv, d.h. unter Verbrauch von ATP, resorbiert. Dafür existieren zwei verschiedene Typen von  $\text{K}^+$ - $\text{H}^+$ -ATPasen, welche sowohl im Bereich des Oberflächen- als auch des Kryptenepithels exprimiert werden. Diese können z.T. auch alternativ als  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase fungieren. Basolaterale  $\text{K}^+$ -Kanäle und ein elektroneutraler KCl-Kotransporter sorgen für einen blutwärtsgerichteten Transport von  $\text{K}^+$ -Ionen aus der Zelle (Übersicht: Kunzelmann und Mall 2002).

Wasser kann über verschiedene Mechanismen resorbiert werden. Es folgt parazellulär dem Elektrolyttransport, gelangt transzellulär per Diffusion durch die Lipidschicht der

Membran bzw. vermittelt über spezielle Wasserkanäle (Aquaporine) durch die Zelle oder wird mittels verschiedenster Substrat-Transportsysteme transportiert.



**Abb. I-3: Mechanismen der  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Resorption**

## 2.2 Sekretionsvorgänge am Kolon

Eine ebenso wichtige Funktion des Säugerkolons ist die Sekretion von Elektrolyten und Wasser im Wechselspiel zur Resorption dieser Stoffe. Sekretorische Prozesse erleichtern den Transport des Mucus aus den Krypten. Verschiedene Sekretagoga oder andere stimulierende Substanzen, wie z.B. Bakterientoxine können zu einer Verschiebung in Richtung einer vermehrten Sekretion und damit zur Ausbildung einer sekretorischen Diarrhoe führen.

Sezerniert werden im Kolon vor allem  $\text{Cl}^-$ -Ionen in Form von  $\text{KCl}$  und  $\text{NaCl}$ . Die Antriebskraft hierfür liefert die basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (Überblick in Abb. I-4). Sie sorgt dafür, dass die cytosolische  $\text{K}^+$ -Konzentration hoch und die cytosolische  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Vergleich zum Extrazellulärmedium niedrig ist. Der resultierende  $\text{Na}^+$ -Gradient dient als Antriebskraft, um, vermittelt über den sekundär aktiven  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC1),  $\text{Cl}^-$ -Ionen über ihrem elektrochemischen Gleichgewicht in der Zelle zu akkumulieren (Übersicht: Kunzelmann und Mall 2002). Da gleichzeitig  $\text{K}^+$ -Ionen hauptsächlich über basolateral

## I Einleitung

gelegene  $K^+$ -Kanäle aus der Zelle ausströmen, baut sich ein negatives Membranpotential auf, das vom  $K^+$ -Diffusionspotential dominiert wird. Sobald sich  $Cl^-$ -Kanäle in der apikalen Membran öffnen, strömen  $Cl^-$ -Ionen, angetrieben durch das Membranpotential, aus der Zelle in das Darmlumen. Darauf folgt ein parazellulärer Ausstrom von  $Na^+$ -Ionen, um einen Ladungsausgleich zu gewährleisten.

Auch  $HCO_3^-$ -Ionen werden vom Kolon des Säugers sezerniert. Dafür existieren sowohl elektrogene als auch elektroneutrale Mechanismen (Übersicht: Kunzelmann und Mall 2002).  $HCO_3^-$  wird von der Blutseite aus über  $Na^+$ -abhängige, elektroneutrale Wege aufgenommen und/oder in der Zelle mit Hilfe der Carboanhydrase generiert. Am Kolon der Ratte wird  $HCO_3^-$  auf der apikalen Seite elektrogen über CFTR- $Cl^-$ -Kanäle (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), den apikalen  $Cl^-$ - $HCO_3^-$ -Austauscher oder einen SCFA $^-$  (Short-Chain Fatty Acid)- $HCO_3^-$ -Austauscher aus der Zelle transportiert. Dabei verläuft der elektroneutrale Transport von  $HCO_3^-$  parallel mit der Aktivität eines  $Na^+$ - $H^+$ -Austauschers (NHE2 oder NHE3). Außerdem sind die apikalen Chloridkanäle mehr oder minder gut auch für  $HCO_3^-$  permeabel und tragen damit auch zur  $HCO_3^-$ -Sekretion bei (Geibel et al. 2000). Wasser folgt den Elektrolyten osmotisch trans- oder parazellulär in das Darmlumen (Barrett und Keely 2000, Übersicht: Kunzelmann und Mall 2002).

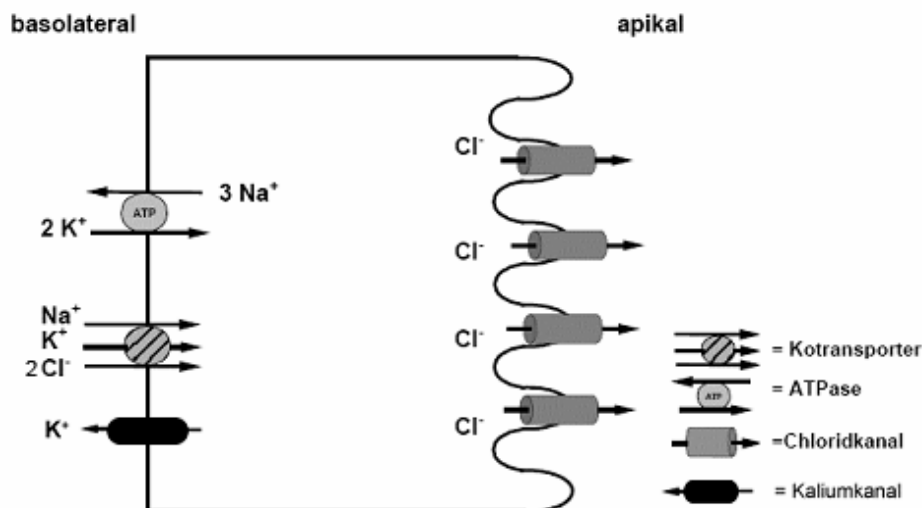


Abb. I-4: Mechanismen der  $Cl^-$ -Sekretion

### 2.3 Regulation der Resorptions- und Sekretionsvorgänge am Kolon

Die Elektrolytresorption und -sekretion am Kolon wird durch unterschiedliche Mechanismen und Substanzen reguliert (Übersicht: Kunzelmann und Mall 2002). Dazu gehören Hormone und Neurotransmitter, aber auch Bestandteile der Nahrung, Gallensäuren und Toxine von Viren und Bakterien, wie z.B. *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* und *Clostridium difficile* (Übersicht: Barret und Keely 2000). Stimulierend auf die Sekretion und damit als Sekretagoga wirken z.B. das Vasoaktive Intestinale Peptid, Acetylcholin, Histamin, Prostaglandine, Leukotriene, Plättchenaktivierender Faktor, Serotonin, Adenosin, Guanylin und Stickstoffmonoxid (NO) (Binder et al. 1991, Singh et al. 1995, Greger 2000), aber auch die Dehnung der Kolonwand (Diener und Rummel 1990). Eine hemmende Wirkung auf die intestinale Sekretion haben Substanzen wie z.B. Neuropeptid Y, Somatostatin und Noradrenalin. Einen Überblick über die klassischen Hormone und Neurotransmitter, die für die Regulation des intestinalen Ionentransports wesentlich sind, gibt Tabelle I-1.

**Tabelle I-1: Stimulatoren und Inhibitoren des intestinalen Ionentransports:**

Hormon/Transmitter	Second messenger	Wirkung
Vasoaktives Intestinales Peptid	cAMP	Stimulation Sekretion
Acetylcholin	Ca <sup>2+</sup> , PKC	Stimulation Sekretion
ATP/ADP	Ca <sup>2+</sup> , PKC	Stimulation Sekretion
Substanz P	Ca <sup>2+</sup> , PKC	Stimulation Sekretion
Prostaglandine	Ca <sup>2+</sup> , PKC, cAMP	Stimulation Sekretion
Leukotriene	Ca <sup>2+</sup> , PKC	Stimulation Sekretion
Histamin	Ca <sup>2+</sup> , PKC, cAMP	Stimulation Sekretion
Guanylin	cGMP	Stimulation Sekretion
Neuropeptid Y	?	Hemmung Sekretion
Somatostatin	Aktivierung G <sub>i</sub>	Hemmung Sekretion
Norepinephrin	Aktivierung G <sub>i</sub>	Hemmung Sekretion

cAMP – cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat, PKC – Proteinkinase C, cGMP – cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat, G<sub>i</sub> – inhibitorisches G-Protein

Einige der Signalstoffe binden als Liganden an membranständige Rezeptoren, welche wiederum an sog. G-Proteine gekoppelt sind. Diese Proteine werden über eine Konformationsänderung aktiviert, infolge dessen es zu einer Aktivierung oder Hemmung von Enzymen kommt, die die Synthese von intrazellulären Botenstoffen katalysieren (Lodish et al. 2001). Dabei handelt es sich z.B. um die Phospholipase C, die letztlich zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt, oder auch die Adenylatcyclase, welche cAMP produziert. Aktivierte G-Proteine können auch die Aktivität von Ionenkanälen beeinflussen und somit das Membranpotential verändern. Andere Signalstoffe, wie z.B. das Guanylin, binden an einen Rezeptor, der selbst eine enzymatische Aktivität – als Guanylatcyclase – besitzt. Aktivierung dieses Enzyms führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration an cGMP (Lodish et al. 2001).  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, cAMP sowie cGMP dienen als intrazelluläre Botenstoffe – sog. second messenger - der Übermittlung von Signalen in der Zelle.

### 2.3.1 cAMP-vermittelte Sekretion

Verschiedene Sekretagoga wie das Vasoaktive Intestinale Peptid vermitteln ihre Funktion über die Aktivierung einer Adenylatcyclase durch die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Zellmembran. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. Dieser second messenger fungiert in erster Linie als Aktivator für die Proteinkinase A (PKA). Folge ist eine Phosphorylierung und damit ein Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit der apikalen CFTR-Chloridkanäle, was in einer Chloridsekretion resultiert. Parallel dazu kommt es zu einer Aktivierung von basolateralen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen, was die elektrische Antriebskraft für die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion steigert (Übersicht: Greger 2000). Außerdem können „neue“ CFTR-Kanäle aus intrazellulären Pools PKA-abhängig in die Zellmembran eingebaut werden und somit die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion über die CFTR-Kanäle noch verstärken (Weber et al. 1999). Zusätzlich wird über cAMP sowohl die elektrogene, über ENaC laufende als auch die elektroneutrale, vom  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher abhängige  $\text{Na}^+$ -Resorption gehemmt (Binder et al. 1991, Mall et al. 1999, Übersicht: Kunzelmann und Mall 2002).

### 2.3.2 cGMP-vermittelte Sekretion

Verschiedene Substanzen die sekretionsauslösend wirken, wie z.B. das Atriale Natriuretische Hormon, vermitteln diese Funktion über die Bindung an einen apikal lokalisierten membrangebundenen Rezeptor, der selbst Teil einer membrangebundenen Guanylatcylase ist. Stickstoffmonoxid dagegen führt über die Bindung an die lösliche, cytosolische Guanylatcylase und eine anschließende Konformationsänderung dieses Enzyms zu einer erhöhten enzymatischen Aktivität (Lodish et al. 2001). Stimulierung von Guanylatcyclasen resultiert in einer gesteigerten intrazellulären cGMP-Produktion aus Guanosintriphosphat (GTP), was wiederum die Aktivierung einer cGMP-abhängigen Proteinkinase G und damit die Phosphorylierung von Proteinen bedingt. Außerdem ist bekannt, dass cGMP eine Phosphodiesterase zu hemmen vermag und so einen Anstieg der cytosolischen cAMP-Konzentration mit entsprechenden Folgen bewirkt (Übersicht: Markert et al. 1995, Greger 2000).

### 2.3.3 Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Sekretion

Veränderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beruhen auf einer Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus intrazellulären Speichern und/oder auf einem Einstrom von extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen. So führen z.B. Acetylcholin oder sein stabiles Derivat Carbachol über eine Aktivierung von cholinergen muscarinischen M3-Rezeptoren zu einer Aktivierung der Phospholipase C. Diese wiederum bewirkt über die Freisetzung von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>), welches durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) neben Diacylglycerol (DAG) entsteht (Abdel-Latif 1986, Lindqvist et al. 1998), eine Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum der Enterozyten und damit einen Anstieg der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Fischer et al. 1992, Frings et al. 1999). IP<sub>3</sub> bindet dabei an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren, die sich auf verschiedenen Ca<sup>2+</sup>-Speicherorganellen der Zelle befinden und als Ca<sup>2+</sup>-Kanal fungieren (Siefjedi et al. 2007).

Diacylglycerol kann über die Aktivierung einer Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Proteinkinase C ebenfalls zur Veränderung verschiedener Zellfunktionen, wie der Aktivierung von Kanälen, Ionenpumpen und Rezeptoren führen (Wilkinson und Hallam 1994, Nishizuka 1995).

Eine niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im endoplasmatischen Retikulum kann zur Öffnung von sog. „store-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -channels“ (SOCCs) und somit zu einem kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum führen (Spassova et al. 2004). So werden die intrazellulären Speicher wieder aufgefüllt und das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal kann über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Desweiteren ist ein  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) bekannt, der im Allgemeinen  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle transportiert. Durch Veränderung des Membranpotentials und/oder der  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Gradienten kann es aber zu einer Umkehrung dieses Transporters kommen. Der Austauscher arbeitet dann im „reverse-modus“ und transportiert  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum in die Zelle hinein (Seip et al. 2001).

Eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol führt zu einer Aktivierung von basolateralen und apikalen  $\text{K}^+$ -Kanälen und damit zu einem Ausstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen aus der Zelle (Schultheiss und Diener 1997, Schultheiss et al. 2003). Dies resultiert in einer Hyperpolarisation der Membran, da sich das Membranpotential dem  $\text{K}^+$ -Gleichgewichtspotential annähert. Außerdem führt das veränderte Membranpotential zu einer erhöhten elektrischen Antriebskraft für den Ausstrom von  $\text{Cl}^-$ -Ionen und somit zu einer forcierten  $\text{Cl}^-$ -Sekretion (Böhme et al. 1991, Strabel und Diener 1995, Bleich et al. 1996, Hartzell et al. 2005).

Eine veränderte cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Calmodulin registriert (Brini und Carafoli 2000, Berridge 2004). Es werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplexe gebildet, die verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Mechanismen anstoßen und Enzyme, wie z.B. die Calmodulinkinasen (CaMK), aktivieren können, die selbst an vielen verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt sind (Ishida et al. 2003).

### **3 Einfluss des enterischen Nervensystems auf Transportprozesse am Kolon**

Das enterische Nervensystem setzt sich, wie bereits erwähnt, aus zwei unterschiedlich lokalisierten (siehe Kap. I.1) Plexus zusammen – dem Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) und dem Plexus submucosus (Meissner-Plexus). Ersterer dient hauptsächlich der Steuerung der Darmmotilität, während der Plexus submucosus, der mit den Epithelzellen der Tunica mucosa des Darms in Verbindung steht, maßgeblich für die Regulierung von Sekretion und Resorption verantwortlich ist. Das enterische

Nervensystem ist in der Lage, alle gastrointestinalen Funktionen weitgehend unabhängig vom Zentralnervensystem zu regulieren (Wood 1994).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sekretomotorische Neurone fähig sind, Kohlenstoffmonoxid (CO), dessen Einfluss auf den Ionentransport im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, zu bilden. So ist z.B. die Expression eines für die endogene CO-Bildung verantwortlichen Enzyms – die Hämoxygenase II (HO-II) - im Plexus myentericus des Menschen (Miller et al. 2001) sowie außerdem in humanen interstitiellen Zellen von Cajal nachgewiesen worden (Miller et al. 1998). Auch im Ileum der Ratte konnte die HO-II sowohl im Plexus myentericus als auch im Plexus submucosus lokalisiert werden (Donat et al. 1999).

### **4 Gasotransmitter**

Seit kurzem weiß man, dass auch gasförmige Substanzen als physiologische Signalstoffe einen Einfluss auf die Regulation verschiedenster Zellfunktionen haben können. Diese Substanzen werden seither als „Gasotransmitter“ bezeichnet. Der erste beschriebene Gasotransmitter war das Stickstoffmonoxid (Waldmann und Murad 1987). Stickstoffmonoxid wird aus der Aminosäure Arginin gebildet, katalysiert durch die drei Isoformen der NO-Synthase (NOS-I, NOS-II und NOS-III). Es vermittelt seine Wirkung vor allem über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclyase und damit der forcierten intrazellulären Produktion des second messengers cGMP (Knowles und Moncada 1994). Stickstoffmonoxid, freigesetzt aus sog. NO-Donoren, steigert im Darm über die Öffnung von apikalen Cl<sup>-</sup>-Kanälen, basolateralen K<sup>+</sup>-Kanälen und die Aktivierung der basolateralen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe (Schultheiss et al. 2002b) die Cl<sup>-</sup>-Sekretion.

Weniger bekannt, aber auch immer mehr im Fokus verschiedener Studien, existieren weitere Gasotransmitter, wie z.B. Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) und Kohlenstoffmonoxid. H<sub>2</sub>S führt unter anderem im Blutkreislauf, vermutlich über die Aktivierung von spannungs- und Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen, zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen und damit zu einer Vasodilatation (Zhao und Wang 2002).



### **5 Kohlenstoffmonoxid**

Kohlenstoffmonoxid ist im Allgemeinen als gasförmiges Atemgift bekannt, dessen toxische Wirkung dabei auf der höheren Affinität zur Sauerstoffbindungsstelle des Hämoglobins im Vergleich zu Sauerstoff selbst beruht. Inzwischen weiß man, dass CO neben der toxischen Wirkung außerdem als potenter Vasodilatator in der Blutzirkulation fungiert (Kanu und Leffler 2007) und als Gasotransmitter in die Regulation verschiedenster Zellfunktionen eingreift. So wirkt Kohlenstoffmonoxid cGMP-abhängig als Neurotransmitter, z.B. in primären olfaktorischen Neuronen der Ratte (Verma et al. 1993) und führt, ebenfalls cGMP-vermittelt, zur Relaxation von glatten Muskelzellen in Präparationen von Kaninchenaorten (Furchgott und Jothianandan 1991). Versuche an glatten Muskelzellen aus Rattenaorten unter hypoxischen Bedingungen ließen ebenso darauf schließen, dass CO als Vasodilatator fungiert (Morita et al. 1995).

Ein weiterer cGMP-abhängiger Effekt von Kohlenstoffmonoxid ist die Hemmung der Plättchenaggregation, was zu einer gestörten Hämostase führt (Brüne und Ullrich 1987). Im Respirationstrakt von Meerschweinchen bewirkt die Inhalation von CO eine cGMP-vermittelte Bronchodilatation (Cardell et al. 1998). Möglicherweise beeinflusst CO auch die Aktivität von sog. Hämoproteinen. Über die Bindung an Cytochrom P450, Cytochrom C Oxidase und andere Häm-haltige Proteine können verschiedene Zellfunktionen beeinflusst werden – wie genau ist derzeit allerdings noch nicht bekannt (Gibbons und Farrugia 2004).

Außerdem kann CO sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen hemmenden Einfluss auf Inflammation, Proliferation aber auch apoptotische Prozesse ausüben (Ryter und Otterbein 2004, Ryter und Choi 2009). In RAW 264.7 Makrophagen hemmt CO in Abhängigkeit von der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) die Expression von durch bakterielles Lipopolysaccharid induzierten proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  und Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$ , während es gleichzeitig die Expression des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10 steigert (Otterbein et al. 2000). Kohlenmonoxid, welches von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird, stimuliert die Bildung von cGMP und führt so zu einer verminderten Expression der Wachstumsfaktoren Platelet-derived growth factor B (PDGF-B) und Endothelin-1, wie in Primärkulturen von

Endothelzellen aus humanen Nabelvenen gezeigt werden konnte (Morita und Kourembanas 1995). In einer anderen Studie konnte ein antiapoptotischer Effekt durch CO oder auch durch eine Überexprimierung der Hämoxigenase-I in Mäuse-Fibroblasten nachgewiesen werden (Petrache et al. 2000). Mit diesen Entdeckungen wurde Kohlenstoffmonoxid zu einem interessanten möglichen Therapeutikum, z.B. im Bereich der Transplantationsmedizin, entzündlichen Lungen-, Leber- und Darm- sowie vaskulären Erkrankungen. Eine antiproliferative Wirkung auf verschiedene Zellarten durch CO könnte ggf. in der Behandlung von Tumoren von Vorteil sein.

Endogen kann CO über den Abbau von Häm von verschiedenen Zellen gebildet werden (Petrides 2003). Diese Reaktion läuft im endoplasmatischen Retikulum der Zellen ab (Gibbons und Farrugia 2004) und wird durch das Enzym Hämoxigenase vermittelt (Maines 1997). Von diesem Enzym existieren drei Isoformen: die induzierbare HO-I, die konstitutiv exprimierte HO-II und eine im Gewebe von Ratten entdeckte HO-III (McCoubrey et al. 1997), wobei die HO-III für die CO-Produktion nur eine untergeordnete Rolle spielt (Hayashi et al. 2004).

Kohlenstoffmonoxid selbst ist ein kleines gasförmiges Molekül und besitzt damit die Eigenschaft, Zellmembranen via Diffusion zu überwinden. Seine Wirkungen vermittelt es mit Hilfe unterschiedlicher Signalwege (Übersicht bei Gibbons und Farrugia 2004). Ähnlich wie Stickstoffmonoxid ist CO in einigen Geweben in der Lage, die lösliche Guanylatcyclase zu aktivieren und somit über eine gesteigerte Bildung von intrazellulärem cGMP seine Effekte auszulösen (Gibbons und Farrugia 2004). Die forcierte cGMP-Produktion kann z.B. eine Aktivierung der Proteinkinase G (De Jonge 1984) oder eine Hemmung von cGMP-sensitiven Phosphodiesterasen (Nobles et al. 1991) zur Folge haben.

So führt CO z.B. in glatten Muskelzellen, isoliert aus Teilen der Schwanz-Arterie von Ratten, über eine Stimulation der löslichen Guanylatcyclase und Erhöhung der cGMP-Produktion zu einer Vasorelaxation (Wang et al. 1997). Desgleichen wurde eine Aktivierung der sGC in primären Zellkulturen von glattem Muskelgewebe der Ratten-Aorta (Ramos et al. 1989, Morita et al. 1995, Morita et al. 1997), sowie in primären olfaktorischen Neuronen und Neuronen des Bulbus olfactorius der Ratte (Verma et al. 1993, Ingi und Ronnet 1995) beschrieben.

Eine andere Möglichkeit der Signalvermittlung von CO liegt in der direkten Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen, infolge dessen es zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran kommt (Kanu und Leffler 2007).

In einer humanen bronchiolaren Epithelzell-Linie, den H441-Zellen, führte CO zu einer Hemmung von  $Na^+$ -Kanälen unabhängig von einer cGMP-Produktion. Versuche mit Diethylpyrocarbonat (DEPC), einer Histidin-modifizierenden Substanz, führten zu der Hypothese, dass dieser Effekt auf einer Beeinflussung des Histidin-Restes des Ionenkanals (oder dessen regulatorischer Faktoren) zu beruhen scheint (Althaus et al. 2009). Außerdem ist von CO bekannt, dass es an  $Fe^{2+}$ -haltige Enzyme wie z.B. Cytochrom P450 binden kann (Gibbons und Farrugia 2004).

Wie bereits erwähnt, sind enterische Neurone im Magen-Darm-Trakt in der Lage, die Enzyme zu exprimieren, die für eine endogene CO-Bildung verantwortlich sind. Diese Neurone spielen eine Schlüsselrolle für die Regulation des intestinalen Ionentransports. Kohlenmonoxid scheint offenkundig als Gasotransmitter des enterischen Nervensystems zu fungieren, also der zentralen Instanz, die die meisten gastrointestinalen Funktionen kontrolliert (Wood 1994).

Die Wirkung von CO auf die gastrointestinale Motilität wurde bereits ausgiebig untersucht (Übersicht bei Gibbons und Farrugia 2004). Im Gegensatz dazu weiß man bisher noch sehr wenig über den möglichen Einfluss des Gasotransmitters auf das intestinale Epithel. In einer humanen Kolon-Tumor-Zell-Linie, den Caco-2-Zellen, führte ein CO-Donor oder auch die Vorbehandlung dieser Zellen mit Häm (zur Stimulierung einer endogenen CO-Bildung) zu einer verstärkten Sekretion von  $Cl^-$ -Ionen (Uc et al. 2005). Allerdings ist bis heute nicht bekannt, welchen Einfluss CO auf das intakte intestinale Epithel haben könnte.

### **6 Eigene Fragestellung**

Aufgrund der bereits vorliegenden Kenntnisse über verschiedene physiologische Wirkungen des Gasotransmitters Kohlenstoffmonoxid sollte es Aufgabe dieser Studie sein, herauszufinden, ob diese Substanz einen Einfluss auf den intestinalen Ionentransport an nativem Darmepithel ausübt und wenn ja, welche Mechanismen an diesem Effekt beteiligt sind. Dazu wurden im Einzelnen folgende Fragen gestellt:

- Hat der Gasotransmitter CO einen Einfluss auf den intestinalen Ionentransport am Modell des Kolons der Ratte?
- Welche Ionen und Transportmechanismen sind an diesem Effekt beteiligt?
- Welchen Einfluss hat CO auf die Membranen der Epithelzelle im Einzelnen?
- Über welche intra- und/oder extrazellulären Signalwege wird ein potentieller CO-induzierter Effekt vermittelt?
- Werden die für die endogene Produktion von CO verantwortlichen Enzyme – die Hämoxygenasen - im Kolon der Ratte exprimiert und wenn ja, um welche Isoformen handelt es sich dabei?

### II Material und Methoden

#### 1 Versuchstiere

Für die Versuche im Rahmen dieses Projekts wurden Wistar-Ratten aus eigener Zucht des Instituts für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen genutzt. Diese Tiere wurden bis vor dem jeweiligen Versuch nach Geschlechtern getrennt in Kleingruppen in den Räumlichkeiten des Instituts in einem ganzjährig klimatisierten Raum bei 22,5 °C Raumtemperatur, 50 – 55 % relativer Luftfeuchtigkeit und 12-Stunden-hell-dunkel-Rhythmus gehalten. Sie erhielten während der gesamten Zeit Standard-Zucht-Futter und Wasser ad libitum.

Die Ussingkammer- und immunhistochemischen Versuche wurden mit männlichen und weiblichen Ratten mit einem Körpergewicht von 200 bis 250 g durchgeführt (Schultheiss et al. 2002b). Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuche wurden ausschließlich weibliche Ratten mit einem Körpergewicht von 110 bis 140 g verwendet.

#### 2 Verwendete Lösungen

##### 2.1 Lösungen für Ussingkammer-Versuche

###### 2.1.1 Bicarbonat-gepufferte Parsonslösung (Standard)

Für die Ussingkammer-Versuche wurde eine Lösung (Parsons und Paterson 1965) mit folgender Zusammensetzung (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) verwendet: 107 NaCl; 4,5 KCl; 25  $\text{NaHCO}_3$ ; 1,8  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 1,25  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgSO}_4$  und 12,2 Glucose. Bei 37 °C wurde der pH-Wert der Lösung mit  $\text{NaHCO}_3$  und HCl auf 7,4 eingestellt. Wie bei allen anderen  $\text{HCO}_3^-$ -gepufferten Lösungen erfolgte die pH-Einstellung unter Begasung mit Carbogen (5 % Kohlendioxid, 95 % Sauerstoff; Vol/Vol); mit diesem Gasgemisch wurden diese Pufferlösungen dann auch kontinuierlich während der Versuche begast.

### 2.1.2 Chloridfreie Parsonslösung

Für Anionen-Substitutionsversuche ohne Chlorid wurde dieses Anion in der Standard-Parsonslösung äquimolar durch das impermeable Anion Gluconat ausgetauscht. Die Lösung enthielt (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): 107 NaGluc; 4,5 KGluc; 25  $\text{NaHCO}_3$ ; 1,8  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 1,25  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgSO}_4$  und 12,2 Glucose und wurde bei Carbogenbegasung mit NaOH/Gluconsäure auf einen pH von 7,4 titriert.

### 2.1.3 Kaliumchloridreiche Parsonslösung

Um die Wirkung von CO auf die apikale Membran der Epithelzellen genauer zu untersuchen, wurde die basolaterale Membran mit einer kaliumchloridreichen Parsonslösung depolarisiert und somit elektrisch ausgeschaltet. Die hierfür verwendete Lösung enthielt (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): 111,5 KCl; 25  $\text{NaHCO}_3$ ; 1,8  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 1,25  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgSO}_4$  und 12,2 Glucose. Sie wurde mit Carbogen begast und mit Hilfe von KOH/HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt.

### 2.1.4 Standard-Tyrodelösung

Für Anionen-Substitutionsversuche ohne Bicarbonat wurde eine bicarbonatfreie HEPES-gepufferte Tyrode verwendet. Die Lösung enthielt (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): 140 NaCl; 5,4 KCl; 1,25  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 10 HEPES [N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure] und 12,2 Glucose. Sie wurde mit NaOH ohne Begasung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### 2.1.5 Chlorid- und bicarbonatfreie Tyrodelösung

Die chlorid- und bicarbonatfreie Tyrode enthielt (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): 140 NaGluc; 5,4 KGluc; 10  $\text{CaGluc}_2$ ; 1  $\text{MgSO}_4$ ; 10 HEPES und 12,2 Glucose. Mittels NaOH und Gluconsäure aber ohne Begasung wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### 2.1.6 Natriumfreie Tyrodelösung

Um die basolaterale Natrium-Kalium-Pumpe auszuschalten und einen Kaliumgradienten anzulegen, wurde auf der mucosalen Seite die 140 NaCl/5.4 KCl (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) der Standard-Tyrode Lösung mit 131 NMDGCl [N-Methyl-D-Glucamin Chlorid]/13.5KCl (Angaben in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ersetzt. Desweiteren enthielt die Lösung (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): 1,25  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 10 HEPES; 140 HCl und 12,2 Glucose. Sie wurde ohne Begasung mit HCl und Tris-Base [Tris(hydroxymethyl)aminomethan] auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### 2.2 Lösungen für $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuche

#### 2.2.1 Isolationslösung

Für die Isolation der Krypten aus dem distalen Kolon der Ratten wurde eine Isolations-Parsonslösung verwendet, die folgende Zusammensetzung (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) hatte: 107 NaCl; 4,5 KCl; 25  $\text{NaHCO}_3$ ; 1,8  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 10 EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure); 12,2 Glucose und 1  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  BSA (Bovines Serumalbumin). Die Lösung wurde mit Carbogen begast, auf einer Temperatur von 37 °C gehalten und der pH-Wert mit Tris-Base auf 7,4 eingestellt.

#### 2.2.2 Auffanglösung

Die Auffanglösung (Böhme et al. 1991; Diener et al. 1991) für die Kryptenisolation bestand aus (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): 100 KGluc; 30 KCl; 20 NaCl; 1,25  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 10 HEPES; 12,2 Glucose; 5 Natriumpyruvat und 1  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  BSA. Die Lösung wurde unbegast mit KOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

#### 2.2.3 Standard-Tyrodelösung

Während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuche wurde das Gewebe mit einer Standard-Tyrodelösung perfundiert. Die Lösung enthielt (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): 140 NaCl; 5.4 KCl; 1  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 10 HEPES und 12,2 Glucose. Sie wurde ohne Begasung mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### **2.2.4 Fura-2 AM-Lösung**

1 mg Fura-2 AM wurde in 1 ml DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Für den jeweiligen Versuch wurde täglich eine frische Lösung zum Aufladen der Krypten hergestellt. Diese basierte auf der Auffanglösung, der  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Fura-2 AM und  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Pluronic acid zugesetzt waren.

### **2.2.5 $\text{Ca}^{2+}$ -freie Tyrodelösung**

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Perfusion wurde eine modifizierte Standard-Tyrodelösung genutzt, bei der kein  $\text{CaCl}_2$  zugegeben wurde; auf den zusätzlichen Einsatz eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators wurde verzichtet.

## **2.3 Lösungen für immunhistochemische Markierungen**

### **2.3.1 Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung**

$5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gelatine (300 bloom; bloom = Indikator für die Festigkeit der erkalteten Form der Gelatine) wurden in Aqua dest. gelöst und erhitzt. Es folgte die Zugabe von  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Chromkaliumsulfat bei 54° C. Nach dem Aufklaren wurde die Lösung auf einer Temperatur von ca. 40 °C gehalten und filtriert.

### **2.3.2 Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung**

Für die Gewebeeinbettung wurden 18 g Speisegelatine in 180 ml Aqua dest. aufgelöst, auf 37 °C erwärmt und durch Filtrieren von Rückständen befreit.

### **2.3.3 Phosphatpuffer (PB)**

Für die immunhistochemischen Experimente wurde ein  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Phosphatpuffer verwendet, der folgende Substanzen enthielt (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ):  $80 \text{ Na}_2\text{HPO}_4$  und  $20 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ . Der pH-Wert wurde mit NaOH/HCl ohne Begasung auf 7,4 eingestellt.



### **2.3.4 Fixierungslösung**

Um das Kolangewebe der Ratte zu fixieren, wurde eine  $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Paraformaldehyd-Lösung hergestellt. Alle Arbeitsschritte hierfür wurden unter dem Abzug durchgeführt. Es wurden 4 g Paraformaldehyd (PFA) in 100 ml Phosphatpuffer unter ständigem Rühren bei  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  gelöst. Im Anschluss an das Aufklaren der Lösung wurde diese filtriert, um eventuelle Rückstände zu entfernen. Die Fixationslösung wurde lichtgeschützt bei  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt und konnte so innerhalb 2 Wochen verwendet werden.

### **2.3.5 Kresylviolett-Färbelösung**

Die Färbelösung enthielt  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Kresylviolettacetat und  $2,5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  Eisessig gelöst in Aqua dest. Der Farbstoff wurde im Wasser unter leichtem Rühren und Erhitzen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde der Eisessig hinzugegeben und die Lösung filtriert. Das fertige Kresylviolett färbt die Schnitte am besten direkt frisch nach der Herstellung. Es ist bei Raumtemperatur für 1 - 2 Monate relativ gut halt- und nutzbar. Je länger die Herstellung zurück lag, desto länger brauchten die Schnitte zum Färben.

### **2.3.6 Blockinglösung**

Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen an den Gewebeschnitten wurde eine Blockinglösung hergestellt. Diese enthielt:  $2 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  Triton-X-100;  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  BSA und  $100 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  NGS (Ziegenserum) in Phosphatpufferlösung.

### **2.3.7 Primärantikörperlösungen**

Der jeweils verwendete primäre Antikörper wurde in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle II-1) einer Lösung zugesetzt, die folgende Substanzen enthielt:  $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  Triton-X-100;  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Milchpulver;  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  BSA und  $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  NGS gelöst in Phosphatpuffer.

### 2.3.8 Sekundärantikörperlösungen

Der jeweils verwendete sekundäre Antikörper wurde in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle II-2) einer Lösung zugesetzt, die folgende Substanzen enthielt (in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ):  $1\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$  Triton-X-100;  $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Milchpulver und  $10\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  BSA gelöst in Phosphatpuffer.

### 2.3.9 DAPI-Lösung

Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat) verwendet. Die Stammlösung ( $10,9\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) wurde aus  $10\text{ mg}$  DAPI und  $2\text{ ml}$  Aqua dest. hergestellt. Durch Mischen von  $6,9\text{ }\mu\text{l}$  DAPI-Stocklösung mit  $250\text{ ml}$  PB erhielt man die Gebrauchslösung (Endkonzentration  $300\text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Die Gebrauchslösung wurde bei  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  im Kühlschrank aufbewahrt und war bei sachgerechter Lagerung ca. ein halbes Jahr verwendbar.

## 2.4 Lösungen zur Beschichtung der Glasplättchen

### 2.4.1 Poly-L-Lysin-Lösungen

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuche an isolierten Krypten des distalen Rattenkolons wurden Glasplättchen mit Poly-L-Lysin ( $0,1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , Molekulargewicht  $> 300.000\text{ D}$ ) beschichtet. Hier wurden  $50\text{ }\mu\text{l}$  der Poly-L-Lysin-Lösung unverdünnt in die Öffnung der auf die Glasplättchen aufgebrauchten Silikonwürfel gegeben und mit Hilfe einer Heizplatte verdampft.

Submucöse Häutchenpräparate für Imaging-Versuche am Plexus submucosus wurden ebenfalls auf Glasplättchen geklebt. Die hierfür verwendete Lösung wurde aus gleichen Volumenanteilen Poly-L-Lysin ( $0,1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) und Aqua dest. hergestellt. Die Lösung wurde möglichst dünn auf die Glasplättchen aufgebracht.

### 3 Substanzen

Bumetanid und Forskolin wurden in Ethanol gelöst (maximale Ethanolkonzentration  $2.5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ). CORM-2 (Tricarbonyldichlorruthenium(II) dimer), Cyclopiazonsäure (Alexis, Grünberg, Deutschland), Glibenclamid (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland), NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat), Nystatin, ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on) und YC-1 (3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol) wurden in Dimethylsulphoxid (DMSO; maximale DMSO-Konzentration  $2.8 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) gelöst. Scillirosid (Sandoz, Basel, Schweiz) wurde in Methanol (Endkonzentration  $2.5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ ) gelöst. Tetrodotoxin war in  $2\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Citratpuffer gelöst. Atropinsulphat, Bariumchlorid, Carbachol, Hexamethonium und SITS (4-Acetamido-4'-isothiocyanato-stilben-2,2'-disulfonsäure Natriumsalz) wurden in wässrigen Stammlösungen angesetzt. Sofern nicht anders angegeben, stammten die Substanzen von Sigma (Taufkirchen, Deutschland).

### **4 Herstellung von inaktiviertem CORM-2**

Um zu untersuchen, ob Wirkungen des CO-Donors durch die Freisetzung des CO und nicht durch den verbleibenden Trägerstoff selbst verursacht wurde, sollten Ussingkammer-Versuche mit inaktiviertem CORM-2 durchgeführt werden. Dazu wurde folgendes von Sun et al. 2008 publiziertes Protokoll verwendet. CORM-2 wurde in DMSO gelöst (Endkonzentration  $2,5 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Anschließend wurden die geöffneten Eppendorfgläser mit dieser Lösung unter Lichtschutz für 18 h in einem Brutschrank (Temperatur von 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre) aufbewahrt. Durch Begasung mit Stickstoff wurde am nächsten Versuchstag das restliche noch enthaltene CO aus der Lösung entfernt. Die erhaltene Lösung wurde in der dem nicht inaktivierten CORM-2 entsprechenden Konzentration ( $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) in Ussingkammern eingesetzt.

### **5 Beschichtung der Glasplättchen**

Mittels Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Versuchen sollten cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Messungen am intakten Häutchenpräparat des Plexus submucosus durchgeführt werden. Daher musste die Oberfläche, auf die das Gewebe aufgebracht werden sollte, für optische Messungen gut geeignet sein. Aufgrund der optischen Eigenschaften eignet sich Glas dazu optimal (Freshney 1990). Die Glasplättchen hatten einen Durchmesser von 13 mm und eine Stärke von 0,16 – 0,19 mm (Plano, Wetzlar, Deutschland). Poly-L-Lysin wurde als Untergrund für das Gewebe verwendet. Es besitzt negative Ladungen und übt daher elektrostatische Kräfte aus, die das Anheften des Gewebes verbessern.

Die in II-2.4.1 beschriebene Poly-L-Lysin-Lösung wurde auf die zuvor in Aqua dest. gereinigten Glasplättchen aufgetropft, bis die ganze Oberfläche bedeckt war. Auf einer Heizplatte wurde die Poly-L-Lysin-Lösung unter leichter Blasenbildung verdampft, bis nur noch eine transparente trockene Schicht zurückblieb. Die so beschichteten Glasplättchen konnten für zwei Tage unter Lichtschutz aufbewahrt werden.

### 6 Gewebepräparation

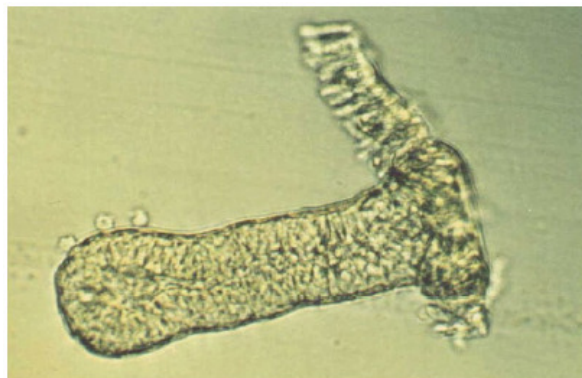
#### 6.1 Herstellung eines Mucosa-Submucosa-Präparats

Die Betäubung der Ratten erfolgte mechanisch per Genickschlag. Zur Tötung der Versuchstiere wurde eine zervikale Dislokation gefolgt von Entbluten durchgeführt (genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen). Anschließend wurde die Bauchhöhle über einen Schnitt an der Linea alba bis in den Thorax eröffnet und zusätzlich ein Herzschnitt durchgeführt. Um das Freilegen des Darmes zu erleichtern, wurde zu beiden Seiten entlang der Rippenbögen ein Entlastungsschnitt angelegt. Das Kolon wurde vorsichtig vorgelagert und am distalen Ende (markiert durch einen großen Lymphknoten; Lindström et al. 1979) mit einer Schere durchtrennt. Der restliche Teil des Kolons wurde freigelegt und das Mesenterium entlang des Darms stumpf abpräpariert. Am Übergang zum Caecum wurde das Kolon mit der Schere abgesetzt.

Anschließend wurde das Kolon in einer eisgekühlten Parsonslösung (Parsons und Paterson 1965) mit Carbogenbegasung gelagert. Hier entspannte sich die Muskulatur des Darmstückes. Mit Hilfe einer Spritze wurde das Darmlumen gespült und damit von Rückständen befreit und auf einen Kunststoffstab mit einem Durchmesser von 5 mm aufgezogen. Am distalen Ende wurde mit einem stumpfen Skalpell vorsichtig eine Inzision gesetzt und die Serosa und Muscularis propria von distal nach proximal abgelöst. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Strippen bezeichnet. Es lagen danach nur noch folgende Zellschichten von serosal nach mucosal vor: Lamina muscularis mucosae, Lamina propriae mucosae und Lamina epithelialis. Das so entstandene Submucosa-Mucosa-Präparat wurde entsprechend der geplanten Versuchsreihe in ca. 3 cm lange Abschnitte unterteilt (Ussingkammer, Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Imaging der isolierten Krypten, Immunhistochemie) oder im ganzen verwendet (Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Imaging des Plexus submucosus), in Längsrichtung am Mesenterialansatz mittels Skalpell aufgetrennt und vom Plastikstab heruntergelöst.

### 6.2 Präparation isolierter Krypten

Intakte Krypten können nur von Ratten mit einem Gewicht von bis zu 180 g und einem Alter von bis zu 9 Wochen isoliert werden (Schultheiss et al. 2002a). Die Krypten wurden nur aus dem distalen Bereich des Kolons isoliert. Dieser ist leicht daran zu erkennen, dass er keine Querstreifung der Schleimhaut aufweist, wie dies im proximalen Kolon der Fall ist (Lindström et al. 1979). Zuerst wurde das Gewebe wie in Kapitel II-6.1 beschrieben präpariert. Zur Isolierung der Krypten wurde dann von dem Mucosa-Submucosa-Präparat ein etwa 1,5 auf 3 cm großes Stück mittels Cyanacrylatkleber auf einen mit einer ovalen Aussparung versehenen Plexiglashalter fixiert (Schultheiss et al. 2002b). Je nach Alter und Gewicht der Tiere erfolgte nun die sechs- bis achtminütige Inkubation des Gewebes in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien EDTA-haltigen Isolationslösung (siehe Kap. II-2.2.1) bei 40 °C unter Carbogenbegasung. Anschließend wurde der Plexiglashalter in einen Vibromischer (Chemap, Volketswil, Schweiz) gespannt; durch die entstehende Vibration wurden die Krypten in die Auffangtyrode geschüttelt. Auf runde Glasplättchen mit einem Durchmesser von 13 mm wurden kleine Silikonwürfel mit einer kreisförmigen Öffnung (Durchmesser ca. 5 mm) durch leichten Druck aufgebracht. In diese Öffnung wurde 50  $\mu\text{l}$  Poly-L-Lysin-Lösung pipettiert und auf einer Heizplatte verdampft. Mit Hilfe einer Mikropipette wurden 30  $\mu\text{l}$  der Kryptensuspension unter optischer Kontrolle (Abb. II-1) aus der Auffangtyrode entnommen und auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen aufgebracht. Die 30  $\mu\text{l}$  Kryptensuspension wurden mit Auffangtyrode auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.



**Abb. II-1: Einzelne Krypte, isoliert aus dem Kolon einer Ratte**

### **6.3 Herstellung eines Submucosa-Präparats (intaktes Häutchenpräparat des Plexus submucosus)**

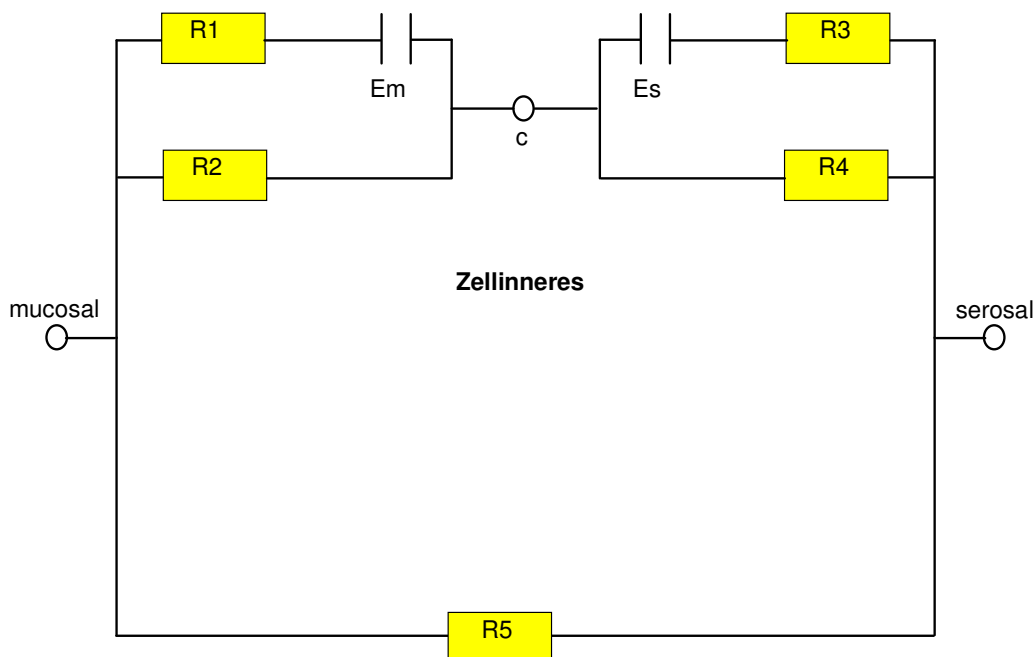
Für Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Versuche wurden Präparate nach II-6.1 hergestellt. Anschließend wurde das Kolongewebe mit der mucosalen Seite nach oben flach auf einer von Standard-Tyrodelösung umspülten Glasplatte ausgebreitet und mit zwei Objektträgern fixiert. Mit der scharfen Kante eines Glasobjektträgers wurde die Mucosa vorsichtig eingeschnitten. Um beide Schichten korrekt voneinander zu trennen, musste bei diesem Schnitt auf die Einhaltung einer bestimmten Schnitttiefe geachtet werden. Bei einem zu tiefen Schnitt konnte leicht das gesamte Gewebe durchtrennt werden, ein zu flacher Einschnitt dagegen führte dazu, dass sich die Mucosa nicht als Ganzes ablösen ließ. An dieser Inzision ansetzend konnte die Mucosa von der darunter liegenden Submucosa abgezogen werden. Dabei wurde das Gewebe leicht gespannt, ohne es größeren Druck- und Zugbelastungen auszusetzen. Dieses Vorgehen hatte sich in vorherigen Arbeiten bewährt, um das Gewebe vor Beschädigung oder dem Einreißen der Submucosa während der Präparation zu schützen.

Die so erhaltene submucöse Schicht, innerhalb derer sich der Plexus submucosus befindet, wurde in ca. 0,5 cm<sup>2</sup> große Stücke zerteilt und bis zum Aufbringen auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen in kalter Tyrodelösung gelagert. Mit Hilfe von zwei Pinzetten konnten die Stücke der Submucosa dann auf den zuvor beschichteten Glasplättchen angedrückt und gespannt werden. Um eine Austrocknung zu verhindern, war das Gewebe bei allen Schritten stets mit Flüssigkeit bedeckt.

## 7 Ussingkammer-Versuche

### 7.1 Theorie der Ussingkammer-Technik

Anfang der 1950er entwickelte der dänische Physiologe Hans H. Ussing die Kurzschlussstrom- oder Ussingkammer-Technik (Ussing und Zerahn 1951). Mit dieser Technik ist es möglich, elektrogene Transportprozesse an Epithelien verschiedener Organe zu messen. Um mit Hilfe der Ussingkammer transepitheliale Potentialänderungen theoretisch zu beschreiben, entwickelten Ussing und Zerahn ein Ersatzschaltkreismodell (Abb. II-2). In diesem System wird das eingespannte Gewebe als Widerstand bzw. Batterie betrachtet. Die Widerstände der basolateralen und der apikalen Membran sind dabei in Reihe geschaltet.



**Abb. II-2: Ersatzschaltkreismodell von Ussing und Zerahn für ein Epithel**

R1 = Innenwiderstand der apikalen Membran [ $\Omega \text{ cm}^2$ ]

R2 = Widerstand der apikalen Membran [ $\Omega \text{ cm}^2$ ]

R3 = Innenwiderstand der basolateralen Membran [ $\Omega \text{ cm}^2$ ]

R4 = Widerstand der basolateralen Membran [ $\Omega \text{ cm}^2$ ]

R5 = parazellulärer Widerstand [ $\Omega \text{ cm}^2$ ]

Em = Potential an der apikalen Membran [mV]

Es = Potential an der basolateralen Membran [mV]



## II Material und Methoden

---

Zwischenzeitlich wurde eine spezielle Software („Winclamp“; Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland) entwickelt, die eine vollständige Steuerung des Systems per Computer ermöglicht und die elektrischen Parameter wie Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ; mit sc = short-circuit), Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$  = Kehrwert des Widerstandes; mit „t“ = tissue) oder transepitheliale Potentialdifferenz (Pd) kontinuierlich erfasst. Hierzu verfügten die Ussingkammern über zwei unterschiedliche Elektrodenpaare, die über eine Agarbrücke ( $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Agar in Parsonslösung) mit den Kammern verbunden waren. Das erste Elektrodenpaar war gewebe nah in nur 1 mm Entfernung von der Schleimhaut angebracht, um Messartefakte, bedingt durch einen Potentialabfall durch den Lösungswiderstand, zu minimieren. Das zweite Elektrodenpaar (Ag/AgCl-Elektroden) diente der Stromapplikation und wurde möglichst weit von dem Gewebe entfernt angebracht, um eine gleichmäßige Stromdichte im Bereich des Gewebes zu erzeugen.

Die Messeinrichtung erlaubte das Umschalten zwischen zwei Mess-Modi (Abb. II-3): „Open-circuit-Modus“ und „Voltage-clamp-Modus“. Damit das Gewebe nach dem Einspannen zuerst unbeeinflusst wieder zu Gleichgewichtsbedingungen finden konnte, wurde bei jedem Versuch anfangs der „Open-circuit-Modus“ gewählt. Bei diesem Modus erfolgt eine direkte Messung der transepithelialen Potentialdifferenz. Beide Seiten der Kammer waren mit 3,5 ml derselben Lösung aufgefüllt. Somit wurden hydrostatischer Druck und chemische Gradienten als Antriebskräfte für Stofftransport ausgeschaltet und es lag lediglich der elektrische Gradient, der durch spontane Ionenbewegungen gebildet wird, vor.

Typisch für das Kolongewebe der Ratte ist eine spontane Sekretion von Anionen, vor allem von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  (Strabel und Diener 1995). Dadurch wird die serosale (basolaterale) Seite gegenüber dem Lumen (mucosale oder apikale Seite genannt) positiv aufgeladen. Nach ca. 1 min wurde dann in den „Voltage-clamp-Modus“ gewechselt. Durch Einspeisen eines Stroms kann hierbei die transepitheliale Potentialdifferenz auf einen beliebigen Wert eingestellt werden. Um passive Ionenbewegungen durch den elektrischen Gradienten zu verhindern, wurde in den für diese Arbeit durchgeführten

## II Material und Methoden

Versuchen eine besondere Form des Voltage-clamps verwendet, der „short-circuit-Modus“. Mit einem kompensatorischen Strom, dem so genannten *Kurzschlussstrom*, wird die Pd auf 0 mV geklemmt. Der  $I_{sc}$  entspricht in seiner Größe somit der Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen am Epithel. Eine unter diesen Bedingungen gemessene Zunahme des  $I_{sc}$  ist damit immer auf einen aktiven Transport zurückzuführen. Dieser entspricht entweder einem Netto-Kationentransport von mucosal nach serosal oder einem Netto-Anionentransport in die entgegengesetzte Richtung. Der  $I_{sc}$  wurde in  $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  (mit  $1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) als Ladungsverschiebung pro Zeit und freier Gewebefläche angegeben.

Zur vollständigen Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften des Gewebes wurden zusätzlich der Gewebewiderstand ( $R_t$ ) und die Gewebeleitfähigkeit ermittelt. Hierzu wirkten während der Messungen im Voltage-clamp-Modus Stromimpulse mit einer Amplitude von  $\pm 50 \mu\text{A}$  für eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe ein. Mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes konnte nun aus der resultierenden Potentialdifferenz der Gewebewiderstand errechnet werden: Spannung ( $U$ ) = Widerstand ( $R$ )\*Strom ( $I$ ) und somit  $R_t = U/I$ . Daraus ergibt sich für die Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$ ):  $G_t = I/U$ ; sie entspricht also dem reziproken Wert des Gewebewiderstandes.

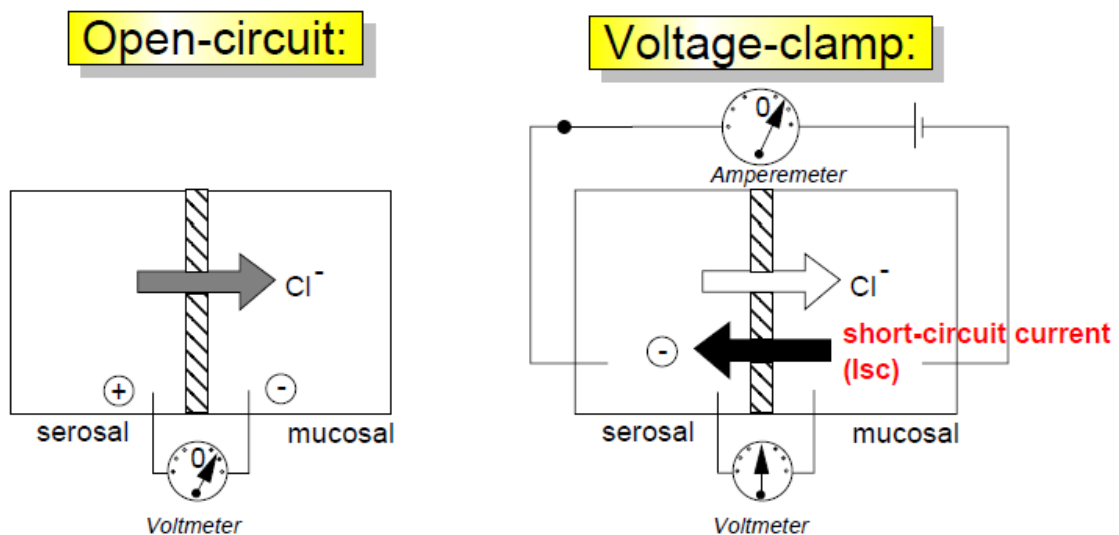


Abb. II-3: a) Open-circuit-modus; b) Voltage-clamp-Modus.

### 7.2 Die Messkammer

Die heutigen Kammern entsprechen im Detail nicht mehr den Originalentwürfen von Ussing, weswegen man auch von „modifizierten Ussingkammern“ spricht (Abb. II-4). In dieser Studie wurden Messkammern eingesetzt, die aus zwei Plexiglaskammerhälften bestanden, die mittels Plexiglasschrauben miteinander verbunden waren. Um einen wasserdichten Verschluss zu erhalten, wurde im Bereich der Kontaktflächen der beiden Kammerhälften ein dünner Silikonfilm aufgetragen. Zwischen beide Hälften wurde ein Gewebestück mit einer Oberfläche von  $1 \text{ cm}^2$  gespannt. Feine Metallstifte an der einen Kammerhälfte fixierten das Gewebe. Es fungierte somit als Grenzfläche zwischen zwei mit Pufferlösung gefüllten Kammerkompartimenten. Das Volumen der Kompartimente betrug jeweils 3,5 ml. An der Oberseite der Kammer war für jede Seite ein Zugang vorhanden, über den die Lösungen getauscht oder Wirkstoffe zugegeben werden konnten. Während der gesamten Versuchsdauer wurden das Gewebe und die Pufferlösungen über einen temperierten Wasserzulauf auf konstanten  $37 \text{ °C}$  gehalten. Eine ständige Begasung über zwei Gasfritten am Boden der Kammern sorgte für eine ausreichende Versorgung des Darmgewebes mit Carbogen oder Sauerstoff und für einen konstanten pH-Wert von 7,4. Unter diesen Bedingungen bleiben die epithelialen Funktionen bis zu sechs Stunden nach Organentnahme erhalten, ohne dass morphologische Veränderungen am Epithel auftreten (Diener et al. 1989).

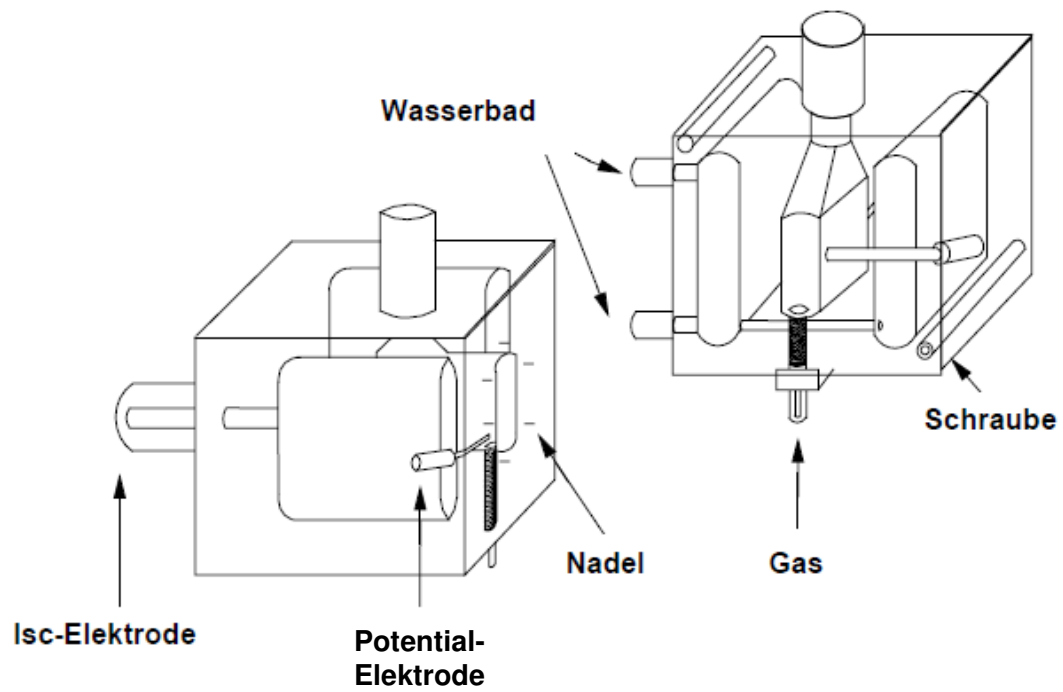


Abb. II-4: Schema einer modifizierten Ussingkammer.

### 7.3 Versuchsdurchführung und Datenerfassung

Nach dem Einspannen des Gewebes wurde die Messkammer mit der unter II-2.1.1 beschriebenen Standard-Parsonslösung befüllt. Um den Gewebewiderstand zu stabilisieren, wurde eine 60 minütige Äquilibrationsphase unter short-circuit-Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden je nach Versuchsreihe in einer oder beiden Kammerseiten die Standard-Parsonslösung mit anderen Pufferlösungen ausgetauscht und/oder verschiedene Substanzen appliziert. Über eine computergestützte automatische Voltage-Clamp-Anlage (Aachen Microclamp, Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland) wurden kontinuierlich Kurzschlussstrom, Gewebeleitfähigkeit und Potentialdifferenz erfasst und gespeichert. Zu Beginn jeder Messung wurde die Potentialdifferenz zwischen den einzelnen Elektroden und der Widerstand der verwendeten Lösungen bestimmt und von den Messdaten abgezogen. Am Ende des Versuchs wurden die Minutenwerte und deren graphische Darstellung ausgedruckt.

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Daten in ein Tabellen-Kalkulations-Programm (Lotus 123) exportiert. Als Basallinie (*Baseline*) galt der Kurzschlussstrom unter basalen Versuchsbedingungen, der vor Substanzzugabe als Durchschnittswert des  $I_{sc}$  aus den letzten drei Minuten ermittelt wurde. Der höchste Wert nach Substanzzugabe wurde als *Peak* gewertet und die Veränderung zwischen *Baseline* und *Peak* als  $\Delta I_{sc}$  berechnet. Im Regelfall diente ein Gewebe dazu, die Antwort von CORM-2 unter Kontrollbedingungen zu messen; ein zweites Gewebe wurde mit Antagonisten vorbehandelt, bevor CORM-2 zugesetzt wurde. Wenn der Antagonist in einem Lösungsmittel gelöst werden musste, wurde zum Kontrollgewebe das entsprechende Lösungsmittel zugesetzt, bevor CORM-2 appliziert wurde.

### 8 Ca<sup>2+</sup>-Imaging mit Fura-2 AM

#### 8.1 Theorie des Ca<sup>2+</sup>-Imagings

Veränderungen der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration vermitteln intrazelluläre Signalübertragung, da Ca<sup>2+</sup>-Ionen als second messenger dienen. Um diese Art von Signalübertragung zu untersuchen, kann man die sich verändernde Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen bildlich darstellen. Die Fluoreszenzfarbstoffe können in zwei Gruppen unterteilt werden, in die wavelength stable dyes (wellenlängen-stabile Farbstoffe) und in die wavelength shifting dyes (wellenlängenändernde Farbstoffe). Bei erstgenannten Fluoreszenzindikatoren ändert sich durch Bindung von Ca<sup>2+</sup> nur die Emissionsintensität, die Anregungs- und Emissionswellenlängen bleiben konstant.

Für die Imagingversuche in dieser Studie wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verwendet, welcher zu den wavelength shifting dyes gehört. Wenn Ca<sup>2+</sup> an den Farbstoff bindet, ändert sich dessen Anregungswellenlänge (siehe Abb. II-5). Der Vorteil dieser wellenlängenändernden Fluoreszenzfarbstoffe ist die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Ca<sup>2+</sup>-freiem und Ca<sup>2+</sup>-gesättigtem Farbstoffanteil – so kann eine Verhältnis-Messung (Ratio-Messung) durchgeführt werden, wobei die Emissionswerte des ionengebundenen Anteils durch die des freien Farbstoffes dividiert werden. Dabei findet zeitlich unmittelbar hintereinander abwechselnd eine Anregung bei 340 nm und 380 nm statt. Die jeweilige Emission bei 510 nm wird gemessen und daraus das Verhältnis gebildet. Für den an Ca<sup>2+</sup> gebundenen Farbstoff liegt das Anregungsmaximum bei 340 nm. Das Anregungsmaximum des ungebundenen Fura-2 liegt bei 362 nm. In der Praxis wird allerdings nicht bei 362 nm gemessen, da dies sehr nah am isoemissiven Punkt des spezifischen Spektralverhaltens von Fura-2 liegt. An diesem Punkt ist die Fluoreszenzintensität von Fura-2 unabhängig von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration immer gleich. Gemessen wird stattdessen bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm. Hier ist die Differenz der Fluoreszenzintensität für Ca<sup>2+</sup>-freies und Ca<sup>2+</sup>-gebundenes Fura-2 am größten. Der Quotient für die Ratio-Messung setzt sich demnach aus der Emission der Anregung bei 340 nm und 380 nm zusammen.

## II Material und Methoden

---

Diese Ratio-Messung bringt gegenüber der Einzelwellenlängenmessung einige Vorteile mit sich. Die erfassten Werte der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sind dabei unabhängig von der absoluten Konzentration an Farbstoff in der Zelle. Auch Faktoren wie Zelldicke und Zellgröße spielen keine Rolle. Zudem werden Fehlermöglichkeiten, die durch Ausbleichen oder Heraustransport des Farbstoffs aus der Zelle entstehen könnten, reduziert, da sie bei beiden Wellenlängen die gleiche Auswirkung haben und so durch Bildung der Ratio entweder ganz wegfallen oder zumindest minimiert werden (Tsien und Poenie 1986).

Aus der im Versuch gemessenen Ratio (Emission [340 nm]/Emission [380 nm]) kann mit Hilfe folgender Gleichung die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration theoretisch errechnet werden (Gryniewicz et al. 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \times \frac{Sf_2}{Sb_2}$$

### Formellegende:

$K_d$  = Dissoziationskonstante des Fura-2 für Kalzium

$R$  = gemessene Ratio (Emission bei 340 nm Anregungswellenlänge/Emission bei 380 nm Anregungswellenlänge)

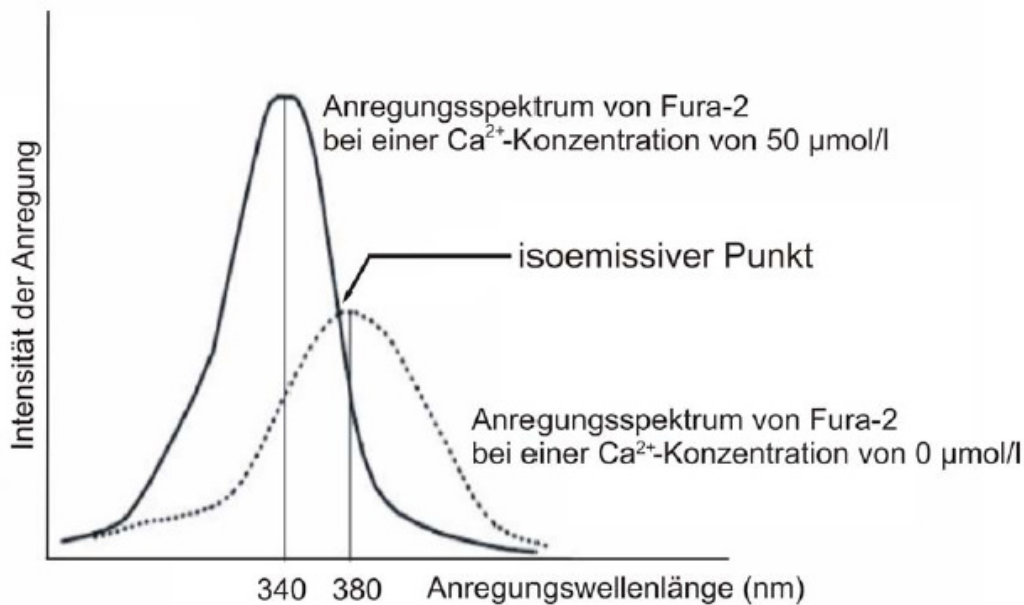
$R_{\min}$  = Ratio bei calciumfreiem Fura-2

$R_{\max}$  = Ratio bei calciumgesättigtem Fura-2

$Sf_2$  = Emissionswerte des calciumfreien Fura-2 bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm

$Sb_2$  = Emissionswerte des calciumgesättigten Fura-2 bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht die genaue  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnet, sondern – wie heute in der Literatur auch meist üblich – ihre relative Änderung über die Veränderung der Ratio protokolliert, da das Fura-2-Signal unter anderem auch von der Anwesenheit cytosolischer Proteine beeinflusst wird, was bei der extrazellulären Kalibrierung des Fura-Signals nicht erfasst wird.



**Abb. II-5: Anregungsspektren von Fura-2 bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen**  
(Die Messung der Emission erfolgt bei 510 nm.)

### 8.2 Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM

Fura-2 ist ein Fluoreszenz-Indikator-Farbstoff mit der Grundstruktur eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators, genauer einer EGTA [Ethylenglycol bis-( $\beta$ -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure]-Grundstruktur (Abb. II-6a). Diese Struktur verleiht dem Farbstoff eine sehr hohe Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, wodurch die Bildung eines Chelator-Komplexes aus Fura-2 und  $\text{Ca}^{2+}$  möglich wird. Die Bindungskurve verläuft sigmoidal und ist in Abb. II-6b in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dargestellt. Die Dissoziationskonstante (Kd) ist der Wert, bei dem 50 % des Fura-2 an  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden ist. Je kleiner der Kd-Wert, desto stärker ist die Affinität des Farbstoffs für das Ziel-Ion. Für Fura-2 liegt der Kd-Wert bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 224  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . In den meisten Zellen liegt die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  unter Ruhebedingungen nur bei etwa 100  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Dieser Bereich ist durch das graue Quadrat in Abb. II-6b gekennzeichnet. Das bedeutet, dass bei einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf einen Stimulus hin noch genug Spielraum nach oben besteht, bevor eine Sättigung des Farbstoffs eintritt.

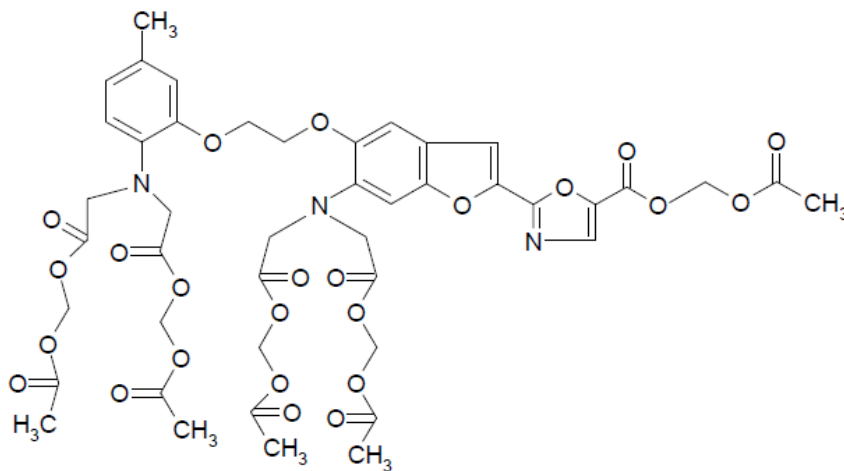
Damit Fura-2 überhaupt in das Cytosol der zu untersuchenden Zellen gelangt, bedient



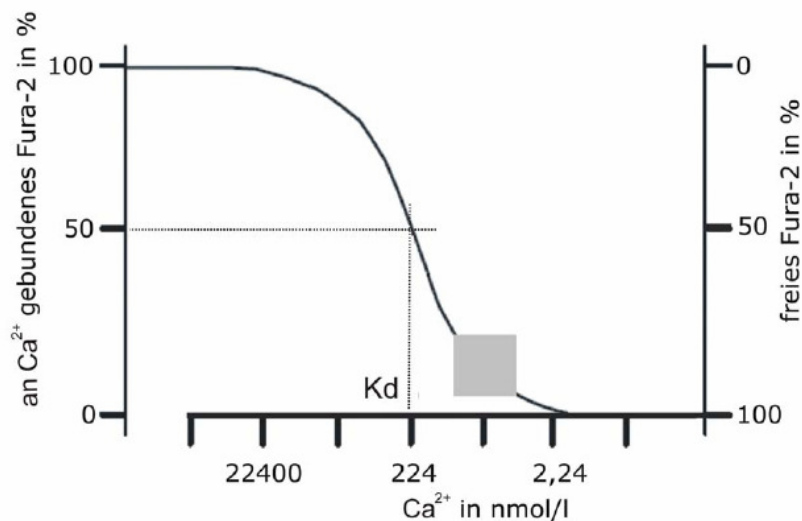
## II Material und Methoden

man sich der AM-Form des Farbstoffs (AM = Acetoxymethylester). Diese Form ist nicht fluoreszierend, ungeladen und damit lipophil, d.h. membranpermeabel, sodass der Farbstoff in das Cytosol der Zelle diffundieren kann. Dort spalten zelleigene, unspezifische Esterasen die Esterbindung auf und es entsteht die freie Säureform des Farbstoffs. Das nun geladene Fura-2 fluoresziert und ist membranimpermeabel, kann also nicht mehr aus der Zelle heraus diffundieren (Tsien und Poenie 1986). Der nicht in die Zellen aufgenommene Farbstoff kann durch Waschen entfernt werden.

a)



b)



**Abb. II-6: a) Strukturformel Fura-2 Acetoxymethylester. b) Bindung von Ca<sup>2+</sup> an den Fluoreszenzindikator Fura-2 in Abhängigkeit von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration**

(Das graue Quadrat zeigt den Bereich, in dem die cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration unter Ruhebedingungen liegt. K<sub>d</sub> = Dissoziationskonstante)

### 8.3 Der $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messstand

Die Fura-2-Messungen wurden mit einem inversen Lichtmikroskop IX 50 von Olympus (Olympus Optical, Tokyo, Japan) durchgeführt, welches mit einem Epifluoreszenz-Setup und einer Imageanalyse-Software (Till-Photonics, Martinsried, Deutschland) ausgestattet war. Als Lichtquelle diente eine Xenonlampe. Die erzeugten Lichtwellen wurden über einen Spiegel in den Lichtleiter gelenkt. Über einen dichromatischen Spiegel wurde das Anregungslicht auf das Objekt geleitet. Durch Anregung des Farbstoffs mit Licht der Wellenlänge 340 bzw. 380 nm wurde eine Emission bei 510 nm erzeugt, die den dichromatischen Spiegel passieren konnte. Das emittierte Licht wurde von einer CCD-Kamera (charge coupled device; Till Photonics, Martinsried, Deutschland) aufgenommen und an einen Computer gesendet. So konnten während der Versuche fortlaufend Veränderungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Form von sog. „live displays“ aufgezeichnet werden. Durch einen beweglichen Spiegel konnte das Licht alternativ zum Auge oder zur Kamera weitergeleitet werden. Abbildung II-7 zeigt den Aufbau des Fura-2-Messstands.

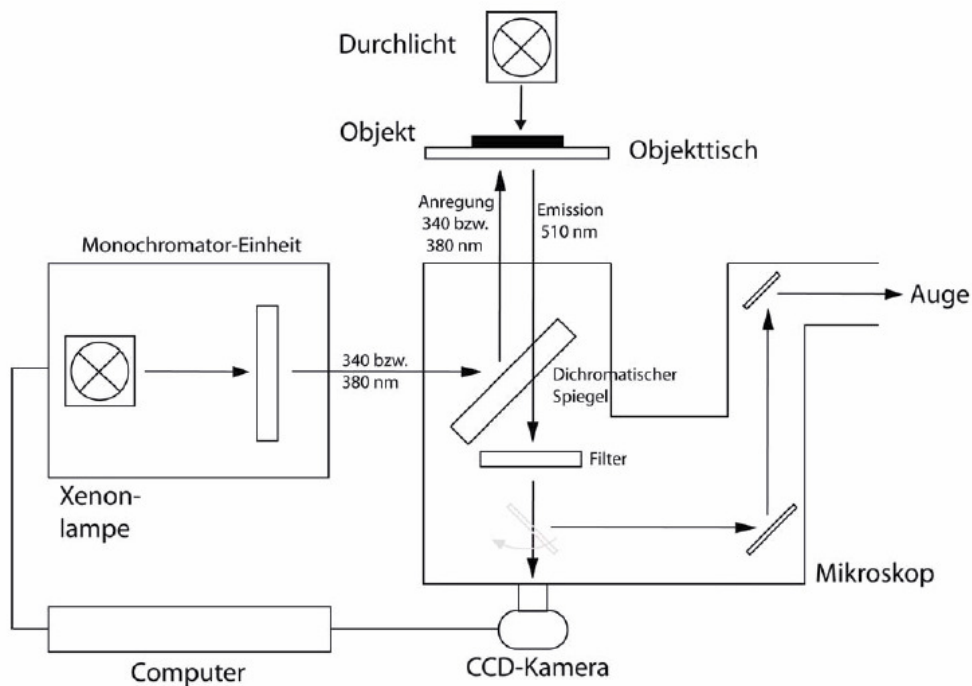


Abb. II-7: Aufbau des  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messstands

### **8.4 Die Imaging-Messkammer mit Perfusionssystem**

Die Messkammer bestand aus einer Metallplatte mit einer kreisrunden, im Durchmesser 1,8 cm großen Aussparung in der Mitte, auf die das Glasplättchen mit dem Gewebestück aufgelegt werden konnte. Zur Befestigung des Glasplättchens wurde ein Teflon-Ring mit gleicher Öffnung auf die Metallplatte aufgesteckt und mit vier Schrauben flüssigkeitsdicht fixiert. Durch die Form des Teflon-Rings konnte oberhalb des Glasplättchens bis zu 3 ml Flüssigkeit zugegeben werden. Die gesamte Vorrichtung konnte nun auf dem Objektisch fixiert und an ein Perfusionssystem angeschlossen werden. Die ständige Perfusion mit frischer Tyrodelösung erfolgte durch einen mittels einer Schlauchpumpe (Typ 11OSC.G18.CH5B, Ole Dich Instrumentsmakres APS, Hvidovre, Dänemark) gesteuerten Zu- und Ablauf über Kanülen und Schläuche. Zu- und Ablaufkanülen wurden hierfür jeweils gegenüberliegend an ca. 2 cm hohen Teflon-Pins befestigt. Somit konnte das Flüssigkeitsvolumen in der Kammer auch während der Perfusion konstant gehalten werden. Die Geschwindigkeit der Perfusion wurde auf  $250 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$  eingestellt. Alle Imaging-Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **8.5 Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Experimente an isolierten Krypten**

#### **8.5.1 Aufladung der Krypten**

Die Mehrheit der Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Versuche wurde an Epithelzellen von isolierten Krypten des distalen Kolons der Ratte durchgeführt. Dazu wurde das Gewebe 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 aufgeladen (siehe II-2.2.4). Pluronic acid ist ein Detergenz, welches die Löslichkeit von Fura-2 AM verbessert. Um den nicht aufgenommenen Farbstoff zu entfernen, folgten bei den isolierten Krypten drei Waschschrte mit Auffangtyrode. Die Inkubation mit Fura-2 sowie alle folgenden Schritte fanden unter Lichtschutz statt.

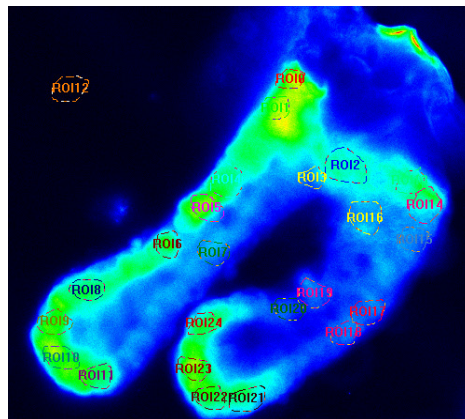
#### **8.5.2 Versuchsdurchführung**

Die Lösung auf den Glasplättchen, auf denen sich die aufgeladenen Krypten befanden, wurde mittels Pipette abgesaugt und die Plättchen anschließend in die Messkammer

## II Material und Methoden

---

eingespannt und auf dem Objektisch befestigt. Durch ein 20x Objektiv wurde bei Durchlicht nach geeigneten Krypten gesucht und diese dann entsprechend justiert. Davon wurde mit Hilfe der Imaging-Software ein so genannter „Snapshot“ erstellt, der auf dem Bildschirm als Falschfarbendarstellung zu sehen war. Geringere Fluoreszenzintensität wurde mit der Farbe Blau, stärkere mit Grün bis Gelb bis hin zu Rot dargestellt. Anhand dieser Darstellung wurden für jede Krypte jeweils vier Zellen der Oberfläche, der Mitte und des Fundus der Krypte manuell als Messbereich (ROI = region of interest) festgelegt (Abb. II-8). Ein „ROI“ außerhalb der Krypte diente als Leerwertmessbereich.



**Abb. II-8: Falschfarbendarstellung zweier mit Fura-2 AM beladener Krypten**  
Kreise bezeichnen die Messbereiche = ROIs

Zu Beginn des Versuchs wurde das Gewebe mit normaler Tyrodelösung superfundiert und einige Minuten lang eine Baseline aufgenommen. Nach Stabilisierung des Fluoreszenz-Signals wurde Tyrodelösung, die den CO-Donor enthielt, appliziert und die Veränderung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beobachtet sowie für die spätere Auswertung aufgezeichnet. Dieser Versuch wurde später ebenso in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Tyrodelösung oder in Anwesenheit von Cyclopiazonsäure durchgeführt.

### 8.5.3 Datenerfassung

Zur Datenerfassung und zur Steuerung des Versuchsablaufs wurde die Imaginganalyse-Software TILLvisION verwendet. Das Protokoll legte fest, dass alle 5 s eine Belichtung mit beiden Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm) vorgenommen und jeweils die Emission aufgezeichnet wurde. Die Belichtungsdauer betrug jeweils 70 ms. Während des gesamten Versuchs konnten die emittierten Fluoreszenzsignale am Computerbildschirm verfolgt werden. Das Programm errechnete zudem gleichzeitig die Ratio aus der Emission beider Anregungswellenlängen, sodass die Wirkung einer Substanzzugabe auf die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration direkt beobachtet werden konnte. Stieg die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an, stieg auch das Ratio-Signal, umgekehrt sank das Signal ab, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration geringer wurde. Alle erfassten Werte wurden gespeichert und danach mit verschiedenen Datenanalyse-Programmen ausgewertet.

### 8.6 $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente am intakten Häutchenpräparat des Plexus submucosus

#### 8.6.1 Aufladung der Häutchenpräparate

Die nach II-6.3 vorbereiteten Häutchenpräparate des Plexus submucosus wurden in einem 1 ml Eppendorfgefäß in Tyrodelösung mit  $12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Fura-2 AM und  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Pluronic acid für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgeladen. Anschließend wurden sie mit Standard-Tyrodelösung einmalig gewaschen und darin bis zum Versuch unter Lichtschutz gelagert.

#### 8.6.2 Versuchsdurchführung und Datenerfassung

Ein Präparat des Plexus submucosus wurde der Tyrodelösung entnommen und vorsichtig auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Glasplättchen aufgebracht. Dieses wurde vorher mit einem Tropfen Tyrodelösung angefeuchtet. Das Gewebe wurde mit Hilfe von zwei Pinzetten leicht gespannt und auf das Glasplättchen angedrückt. Die Glasplättchen mit den aufgeladenen Submucosa-Präparaten wurden in die Messkammer eingespannt und auf dem Objektisch befestigt. Das Auswählen eines geeigneten Ganglions erfolgte am

## II Material und Methoden

---

Mikroskop unter Ultraviolett-Licht, da im Durchlicht keine Neurone bzw. Ganglien erkennbar waren. Der ausgewählte Bereich war auf dem Computerbildschirm in Falschfarben dargestellt. Anhand dieser Darstellung wurde für jedes einzelne Neuron manuell ein Messbereich festgelegt. Der weitere Versuchsablauf und die Datenerfassung glichen dem der Versuche an den isolierten Krypten. Das Protokoll unterschied sich lediglich darin, dass die Belichtung und Emissionsaufzeichnung alle 2 s stattfand und die Belichtungsdauer 60 – 120 ms betrug. Damit Zellen und Farbstoff stets nur mit so viel Licht belastet wurden, wie nötig war, wurde die Belichtungsdauer bei jeder Messung der Fluoreszenzstärke angepasst. Am Ende der Versuche mit dem Plexus submucosus wurde als Vitalitätskontrolle eine Stimulation mit KCl durchgeführt. KCl depolarisiert die Zelle, wodurch es durch Öffnen spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt.

### 9 Immunfluoreszenz-Analyse

#### 9.1 Theorie der Immunfluoreszenz

Voraussetzungen für die immunhistochemischen Fluoreszenz-Markierungen sind das Vorhandensein von antigenen Strukturen auf den zu untersuchenden Geweben oder Zellen und die Verfügbarkeit von hochspezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, meist vom IgG-Typ, die an das gesuchte Antigen binden können. Sie bestehen aus zwei Antigen-bindenden Regionen, auch als  $F_{ab}$  (fragment antigen binding) bezeichnet, und aus einer kristallinen Region ( $F_c$  abgekürzt). Die  $F_{ab}$ -Regionen sind in der Lage, spezielle Determinanten (= Epitope) der Antigene zu erkennen und daran zu binden. Nur ein für das gesuchte Antigen spezifischer Antikörper kann an das Antigen binden, wodurch ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht, der durch multiple, nichtkovalente Bindungen zusammengehalten wird (Harlow und Lane 1988).

Der histologische Nachweis dieser Komplexe kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei dem direkten Nachweis ist der Antikörper mit einem visuell detektierbaren Liganden gekoppelt, meistens einem Fluorophor. Wird dieser fluoreszierende Farbstoff mit Licht bei geeigneter Wellenlänge angeregt, emittiert dieser langwelliges Licht und dient somit der Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes. Bei der indirekten Nachweismethode besitzt der primäre Antikörper keine solche Kopplung mit einem detektierbaren Liganden. In diesem Fall bindet ein sekundärer, an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper an den unmarkierten primären Antikörper. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops kann dieser gesamte Komplex, bestehend aus einem Antigen, dem primären und dem sekundären Antikörper schließlich lokalisiert werden (Abb. II-9) (Coons 1958). Im Gegensatz zum direkten Nachweis ist bei dieser Methode durch die höhere Sensitivität und die geringere Hintergrundfärbung eine Mehrfachmarkierung von verschiedenen Antigenen möglich. Ein Nachteil beider Arten von Fluoreszenzmarkierungen besteht in dem relativ raschen Ausbleichen der Fluorochrome bei Anregung im UV-Bereich. Dies kann durch spezielle Einbettmedien wie z.B. Citifluor® (Newby Castleman, Leicester, England) zeitlich etwas verzögert werden (Janeway und Travers 1997).

In dieser Arbeit wurden mit der indirekten Methode Einfach- und Doppelmarkierungen durchgeführt. Dabei war darauf zu achten, dass die Primärantikörper aus verschiedenen Wirtstieren stammen und die Sekundärantikörper an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind.

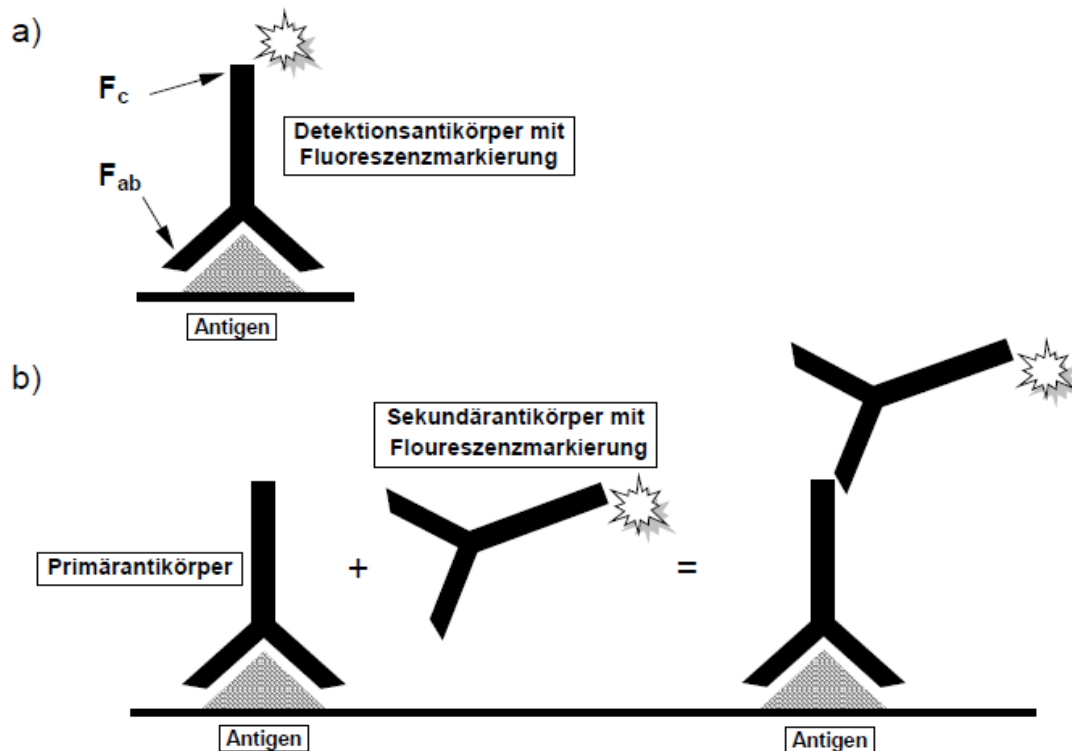


Abb. II-9: a) direkte Immunfluoreszenzmarkierung; b) indirekte Immunfluoreszenzmarkierung  
 $F_c$  = kristallines Fragment;  $F_{ab}$  = antigenbindendes Fragment

### 9.2 Die verwendeten Antikörper

Die verwendeten Antikörper waren zum Teil polyklonalen und zum Teil monoklonalen Ursprungs. Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum von immunisierten Tieren gewonnen. Es handelt sich also um ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern, die nach einer physiologischen Immunreaktion von verschiedenen B-Zellen produziert werden. Zwar erkennen alle gebildeten Antikörper das gleiche gesuchte Protein, aber jeweils an unterschiedlichen Epitopen. Bedingt durch die Heterogenität der polyklonalen Antikörper kann die unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz erhöht sein. Monoklonale Antikörper



## II Material und Methoden

---

dagegen werden nur von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehenden Zelllinie (Zellklon) produziert und richten sich daher alle gegen das gleiche Epitop. Monoklonale Antikörper erreichen dadurch eine größere Spezifität (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Bei der Auswahl der verwendeten Antikörper musste darauf geachtet werden, dass der sekundäre Antikörper gegen das Immunglobulin der Tierart, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde, gerichtet ist. Das heißt, jeder sekundäre Antikörper kann mit jedem primären Antikörper kombiniert werden, solange die Tierart übereinstimmt (Larsson 1988). Bei Doppelmarkierungen musste zusätzlich beachtet werden, dass die sekundären Antikörper jeweils an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt waren. So konnte z.B. Alexa-488, das grün fluoresziert, mit Cy3, das rot fluoresziert, kombiniert werden, nicht jedoch Alexa-488 mit dem ebenfalls grün fluoreszierenden FITC. Bei einer Dreifachmarkierung konnten die beiden Sekundärantikörper mit dem blau erscheinenden Kernfarbstoff DAPI kombiniert werden. DAPI färbt Zellkerne unabhängig von der Zellart an und ermöglicht so eine bessere Orientierung im Gewebe (Kubista et al. 1987). Tabelle II-1 gibt Auskunft über die verwendeten primären Antikörper und Tabelle II-2 über die verwendeten sekundären Antikörper.

## II Material und Methoden

---

**Tabelle II-1: Verwendete primäre Antikörper**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Zielstruktur</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
HO-I Monoklonaler Antikörper	Hämoxygenase I	Maus	1:100	Stressgen, Ann Arbor, USA
HO-II Polyklonaler Antikörper	Hämoxygenase II	Kaninchen	1:500	Stressgen, Ann Arbor, USA
NOS-I Polyklonaler Antikörper	Neuronale Stickstoffmonoxid- Synthase	Kaninchen	1:800	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
NOS-II Polyklonaler Antikörper	Induzierbare Stickstoffmonoxid- Synthase	Kaninchen	1:200	Millipore, Eschborn, Deutschland
NOS-III Polyklonaler Antikörper	Endotheliale Stickstoffmonoxid- Synthase	Kaninchen	1:800	Chemicon International, Hofheim, Deutschland

**Tabelle II-2: Verwendete sekundäre Antikörper**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Zielstruktur</b>	<b>Darstellung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
CY3-goat Anti-mouse IgG	Primärantikörper aus der Maus	rot	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
CY3-donkey Anti-rabbit IgG	Primärantikörper aus dem Kaninchen	rot	1:800	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa-488-goat Anti-rabbit IgG	Primärantikörper aus dem Kaninchen	grün	1:100	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 9.3 Negativkontrollen

Um die Spezifität der verwendeten Sekundärantikörper zu kontrollieren, wurde für jede Fluoreszenzmarkierung eine sog. Negativkontrolle durchgeführt. Hierbei wurden die Gewebestücke mit der Primärantikörperlösung ohne Zusatz des Primärantikörpers inkubiert. So konnte überprüft werden, ob der Sekundärantikörper unspezifische Bindungen mit dem Gewebe eingegangen war. Das Auftreten von Fluoreszenzsignalen in den Negativkontrollen hätte dabei auf unspezifische Bindungen hingewiesen. In einem solchen Fall hätte diese Versuchsreihe nicht ausgewertet werden dürfen, da die erhaltenen Fluoreszenzsignale nicht spezifisch für das gesuchte Antigen gewesen wären.

### 9.4 Fluoreszenzmarkierung

#### 9.4.1 Paraformaldehydfixation

Um das Gewebe für die folgenden immunhistochemischen Versuche zu konservieren, wurde es mittels Paraformaldehydlösung ( $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) fixiert. Hierfür wurde das Kolongewebe grundsätzlich wie unter II-6.1 beschrieben vorbereitet, jedoch nicht gestrippt. Dann wurde jeweils ein ca. 1,5 cm x 3 cm großes Stück distales Kolon mit Cyanacrylatkleber auf einem Plexiglashalter befestigt (Schultheiss et al. 2002b). Anschließend wurde das Gewebe in die nach II-2.3.4 vorbereitete Fixierungslösung

gestellt und im Kühlschrank für 12 h aufbewahrt. Am nächsten Versuchstag folgten drei Waschschrte für jeweils eine Stunde in Phosphatpuffer nach II-2.3.3. Es zeigte sich, dass Versuche mit Paraformaldehyd-fixiertem Gewebe zu einer unspezifischen Hintergrundfluoreszenz führten, sofern es sich bei den Primärantikörpern um Antikörper der Maus handelte. Daher wurde lediglich das Gewebe, welches mit Primärantikörpern von anderen Spezies als der Maus behandelt wurde, mit Paraformaldehydlösung ( $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) fixiert.

### 9.4.2 Kryofixation

Das Gewebe wurde grundsätzlich wie in Kapitel II-6.1 beschrieben vorbereitet, jedoch nicht gestriipt. Die Gewebe wurden mit Paraformaldehyd ( $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) fixiert (nach Kap. II-9.4.1) oder, sofern sie mit Primärantikörpern aus der Maus behandelt werden sollten, direkt weiterverarbeitet. Ein jeweils ca. 1,5 cm x 3 cm großes Stück Kolon wurde mit Cyanacrylatkleber auf Plastikhalter befestigt (Schultheiss et al. 2002b). Die Plastikhalter wurden dann horizontal in flüssiger Gelatine (nach Kapitel II-2.3.2) eingebettet, sodass das Gewebe sowohl von oben als auch von unten mit jeweils ca. 1 cm Gelatine beschichtet wurde. Wie für die Kryptenisolation (siehe Kapitel II-6.2) hatten auch die hierfür eingesetzten Plexiglashalter mittig eine ovale Aussparung. Zur Stabilisierung des Gewebes wurde randständig entlang dieser Aussparung das Gewebe mit einer Kanüle perforiert. Nach Abkühlung und Festigung der Gelatine wurden die Gewebestücke in einer Glasschale auf Eis gelagert und ca. 1 cm x 1 cm große Gewebe-Gelatine-Blöcke mit einem spitzen Skalpell aus der Aussparung herauspräpariert. Mit dem Gefriereinbettmedium Tissue Tec® (Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) wurden die Blöcke auf Kork befestigt und für zwei Minuten in durch flüssigen Stickstoff gekühltes Isopentan (Temperatur ca.  $-160^\circ \text{ C}$ ) eingetaucht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Blöcke bei  $-70^\circ \text{ C}$  aufbewahrt.

### **9.4.3 Herstellung der Gewebeschnitte**

Zur Herstellung der Gewebeschnitte des distalen Kolons der Ratte wurde ein Kryostat der Firma Leica (Leica CM 3050S) verwendet. Bei einer Kühlkammertemperatur von  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  und Objekthaltertemperatur von  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  konnten mit diesem Gefriermikrotom Gewebeschnitte mit einer Schnittdicke von  $6\text{ }\mu\text{m}$  angefertigt werden. Dazu wurde der gefrorene Gewebekblock mit Tissue Tec® auf dem beweglichen Objekthalter fixiert. Die einzelnen Schnitte wurden direkt auf mit Gelatine beschichtete Objektträger übertragen und auf Eis gekühlt aufbewahrt. Zur Überprüfung der Schnittebene wurden jeweils die ersten Objektträger eines Versuchstages für eine Minute in Kresylviolett-Färbelösung getaucht, kurz trocknen gelassen und anschließend unter dem Mikroskop mit einem 10x Objektiv untersucht. Wenn die Schnitte für die immunhistochemischen Markierungen in der richtigen Ebene lagen, wurden mit dieser Mikrotomeinstellung weitere Schnitte für die Versuchsreihe angefertigt.

### **9.4.4 Versuchsdurchführung/Färbeprotokolle**

#### **9.4.4.1 Einfachmarkierung**

Um eine mögliche endogene Produktion von Kohlenstoffmonoxid nachzuweisen, wurden die für den Abbau von Häm verantwortlichen Enzyme Hämoxxygenase I und II immunhistochemisch sichtbar gemacht.

Dazu wurden die Objektträger, auf denen sich die Gewebeschnitte befanden, direkt nach dem Anfertigen in Objektträgerhalter und diese in mit ca. 200 ml Phosphatpufferlösung gefüllte Färbeküvetten überführt. Diese wurden für 3 x 5 Minuten auf einen Schüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Deutschland) gestellt und somit rehydriert. Dabei wurde jeweils nach 5 Minuten der Puffer durch eine frische Lösung ersetzt. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mittels Inkubation für 2 h mit einer Blockinglösung (nach Kap. II-2.3.6) bei Raumtemperatur abgesättigt. Hierzu wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten nach unten weisend auf aus institutseigener Herstellung stammende Inkubationsplatten aus Polycarbonat ausgelegt. Die Auflagefläche für die Objektträger auf den Inkubationsplatten war durch Klebeband geringfügig erhöht,

## II Material und Methoden

---

so dass sich zwischen den Platten und den Gewebeschnitten ein kapillarer Spalt befand. 200 µl der Blockinglösung pro Objektträger wurden jeweils an den Rand dieses Spaltes pipettiert, woraufhin sich die Lösung durch die Kapillarkräfte in den Spalt zog. Die bestückten Inkubationsplatten wurden, um sie vor dem Austrocknen zu schützen, in einer geschlossenen, befeuchteten Metallkammer für die zweistündige Absättigung aufbewahrt. Nach der Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit derselben Technik mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Inkubationszeit hierfür betrug 24 h bei 4 °C. Die entsprechenden Konzentrationen der Primärantikörper sind der Tabelle II-1 zu entnehmen. Am folgenden Tag wurden die Objektträger wiederum für 3 x 5 Minuten in Färbeküvetten auf dem Schüttler in Phosphatpufferlösung gewaschen, um die überschüssigen, ungebundenen Primärantikörper vom Präparat zu entfernen. Nach 5 Minuten wurde die jeweilige Pufferlösung durch frische ersetzt. Danach folgte die Markierung der Primärantikörper mittels konjugierter Sekundärantikörper. Die zweite Antikörperlösung wurde wie für das Blocking und die Primärantikörperinkubation in den Kapillarspalt zwischen Objektträger und Inkubationsplatten pipettiert und in der feuchten Metallkammer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die entsprechenden Sekundärantikörper-Konzentrationen sind der Tabelle II-2 zu entnehmen. Ab diesem Zeitpunkt wurden sämtliche Arbeitsschritte unter Lichtschutz durchgeführt, um ein vorzeitiges Verblässen der Schnitte zu vermeiden.

Nach der Sekundärantikörper-Inkubation wurden die Schnitte wieder in Färbeküvetten überführt und für 3 x 5 Minuten auf dem Schüttler in oben beschriebener Art und Weise in PB gewaschen. Dann wurden für eine spätere bessere Orientierung im Gewebe die Zellkerne der Gewebeschnitte in einer Färbeküvette mit einer 300 nmol·l<sup>-1</sup> DAPI-Lösung (nach Kap. II-2.3.9) für 5 Minuten auf dem Schüttler gefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert vornehmlich in AT-(Adenin und Thymin)-reiche Sequenzen der DNA-Doppelhelix und lässt sich nach Anregung mit Ultraviolett-Licht als cyanblaues Fluorophor in allen Zellkernen nachweisen (Tanious et al. 1992). Im Anschluss folgten vier fünfminütige Waschschrte in Phosphatpufferlösung. Zum Schluss folgte das sog. Eindeckeln der Schnitte. Dazu wurde auf jeden einzelnen Schnitt jeweils ein Tropfen Hydromount

## II Material und Methoden

---

(National diagnostics, Atlanta, Georgia, USA) vorgelegt und darauf vorsichtig und luftblasenfrei ein Deckgläschen aufgelegt, welches mit klarem Nagellack fixiert wurde. Nach dem Trocknen des Nagellacks wurden die Präparate innerhalb der nächsten 12 h ausgewertet. Tabelle II-3 zeigt ein exemplarisches Protokoll einer Einfachmarkierung mit anschließender DAPI-Kernfärbung.

Bei jeder Versuchsreihe wurden Negativkontrollen, wie in Kapitel II-9.3 beschrieben, angefertigt.

## II Material und Methoden

---

**Tabelle II-3: Färbeprotokoll für die einfache Fluoreszenzmarkierung**

	<b>Ausführung</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1	Rehydrierung	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
2	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	Blockinglösung	Raumtemperatur	2 h
3	Inkubation Primärantikörper	Primärantikörperlösung + Primärantikörper	4 °C	24 h
4	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
5	Inkubation Sekundärantikörper	Sekundärantikörperlösung + Sekundärantikörper	Raumtemperatur + Lichtschutz	1 h
6	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur + Lichtschutz	3 x 5 min
7	Kernfärbung	DAPI-Lösung	Raumtemperatur + Lichtschutz	5 min
8	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur + Lichtschutz	4 x 5 min
9	Eindeckeln	1 Tropfen Hydromount/Schnitt	Raumtemperatur + Lichtschutz	
10	Lagerung	unter Lichtschutz	4 °C	bis zu 2 d

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind unter Kapitel II-2.3 beschrieben.



### 9.4.4.2 Doppelmarkierung

Um eine mögliche Kolo-kalisation der Hämooxygenasen mit den Stickstoffmonoxid-Synthasen im distalen Rattenkolon nachzuweisen, wurden Doppelmarkierungen angefertigt. Für die HO-I war dies ohne weiteres möglich, da die jeweiligen Primärantikörper aus verschiedenen Wirtstieren stammten und die Sekundärantikörper an verschiedene fluoreszierende Farbstoffe gebunden waren. So konnten die Primärantikörper HO-I mit jeweils einer der drei NOS-Formen gleichzeitig in der Primärantikörperlösung gelöst werden. Gleiches galt für die Sekundärantikörper.

Da die HO-II jedoch ebenso wie die drei Formen der Stickstoffmonoxid-Synthasen aus dem Kaninchen stammten, war es hier notwendig, das Protokoll der Einfachmarkierung (Kap. II-9.4.4.1) zweimal direkt hintereinander durchzuführen. Beim ersten Durchlauf wurden die HO-II-Antikörper als Primärantikörper mit Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern verwendet und im zweiten Durchlauf die der NOS-I, NOS-II oder NOS-III mit den entsprechenden Alexa Fluor®488-konjugierten Sekundärantikörpern. Auch bei der Doppelmarkierung wurde eine Zellkernfärbung mit DAPI zur besseren Gewebeerorientierung durchgeführt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden in der gleichen Art und Weise durchgeführt, wie im Protokoll der Einfachmarkierung (Tab. II-3) beschrieben. Bei jeder Versuchsreihe wurden Negativkontrollen, wie in Kapitel II-9.3 beschrieben, angefertigt.

### 9.4.5 Mikroskopie

Die Analyse der Gewebeschnitte wurde an einem Eclipse 80i Mikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt. Zur Erzeugung der benötigten Anregungswellenlängen verfügt das Mikroskop über spezielle Filterköpfe. Die Cy3-konjugierten Antikörper wurden mit einer Wellenlänge von 510 – 530 nm angeregt und emittierten Licht mit einer Wellenlänge von 630 – 660 nm. Die Alexa Fluor®488-konjugierten Antikörper konnten durch Licht der Wellenlänge 450 - 490 nm angeregt werden. Die Emission erfolgte bei einer Wellenlänge von 510 - 530 nm. Zur Anregung des Kernfarbstoffs DAPI diente Licht der Wellenlänge 358 nm. Das emittierte Licht hatte

## II Material und Methoden

---

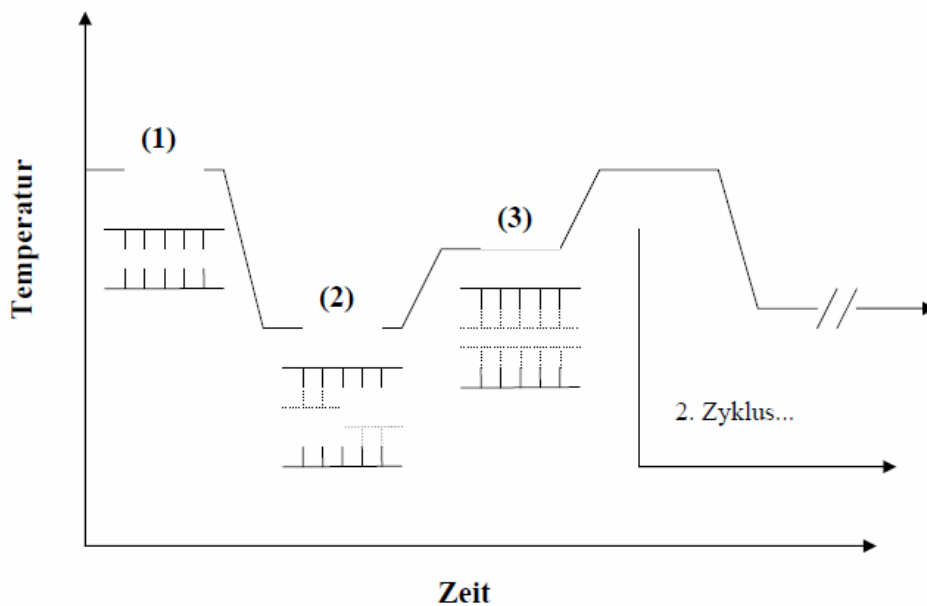
dann eine Wellenlänge von 461 nm. Die Bilddokumentation erfolgte über eine digitale Schwarz/Weiß-Kamera (S/W camera Digital Slight DS 2 M BWc, Nikon). Mit Hilfe des Software-Programms NIS-Elements 2.30 (Nikon) wurden die Schwarzweißbilder entsprechend der emittierten Lichtfarbe eingefärbt. So sind Cy3-Signale immer rot dargestellt, Alexa Fluor®488 immer grün und DAPI-Kernsignale immer blau. Das Fotografieren der betreffenden Gewebeausschnitte mit den entsprechenden Filtern und anschließender Überlagerung der Farbkanäle erleichterte die Lokalisation der Cy3-Signale. Auch in den Versuchsreihen mit zwei verschiedenen Primärantikörpern wurden die drei bei unterschiedlichen Wellenlängen fotografierten Einzelbilder des gleichen Ausschnitts anschließend überlagert. Durch diese Überlagerung wurde untersucht, ob die gefärbten Proteine kolokalisiert waren. Bei einer Kolokalisation mischten sich die roten und grünen Signale der Sekundärantikörper zu einer gelben Farbe. Zur Befunddokumentation, zum Beispiel mittels einer Bildtafel, wurde gegebenenfalls eine Kontrastverstärkung oder ein Farbabgleich notwendig. Dazu wurde die Adobe Photoshop Imaging-Software verwendet.

### 10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 10.1 Theorie der PCR

Kary B. Mullis entwickelte 1983 diese Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren. Sie zählt zu den größten wissenschaftlichen Errungenschaften in den vergangenen Jahren. Die PCR hatte gegenüber den bis dahin bekannten Techniken den Vorteil, dass über eine Vervielfältigung des gewünschten Nukleinsäureabschnittes (sog. Targetamplifikation) eine sehr hohe Sensitivität erlangt werden konnte. Hinzu kommt, dass die Amplifikation exponentiell verläuft – es können also mühelos große Mengen der zu vervielfältigenden DNA entstehen. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR genutzt, um im distalen Kolonepithel der Ratte die bereits immunhistochemisch detektierten, für den Abbau des Häms verantwortlichen Enzyme HO-I und HO-II molekularbiologisch nachzuweisen. Voraussetzung für ein erfolgreiches Durchführen der PCR ist das Vorhandensein eines kurzen Abschnitts doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, das dann entsprechend verlängert werden kann. Mullis fand heraus, dass es möglich war, genau diesen Abschnitt künstlich herzustellen, indem man dem Reaktionsansatz DNA-Fragmente von ca. 20 Nukleotiden Länge hinzufügt – sie werden als Primer bezeichnet. Diese lagern sich an die Matrizen-DNA an (= Annealing) und werden durch ein bestimmtes Enzym, die DNA-Polymerase, entsprechend verlängert (= Elongation). In den hier durchgeführten Versuchen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* eingesetzt, da sie eine hohe Enzymaktivität und eine sehr gute Temperaturstabilität (bei 95 °C) besitzt. Um die Amplifikation zu wiederholen, wird die neu synthetisierte doppelsträngige DNA denaturiert, das heißt durch Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge gespalten. Dadurch wird die Anlagerung neuer Primer ermöglicht, und der Zyklus kann von vorn beginnen. Gibt man zwei solche Primer in jeden PCR-Ansatz – einen, der am *sense*-Strang, und einen, der am *antisense*-Strang bindet - erhält man mit jedem Zyklus eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts.

Ein typischer PCR-Zyklus stellt sich folgendermaßen dar:



**Abbildung II-10: Temperaturverlauf einer Polymerase-Kettenreaktion**

- (1) Denaturierung: Auftrennung der doppelsträngigen DNA
- (2) Primer-Annealing: Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge
- (3) Primer-Elongation: Verlängerung der Primer

Gestartet wird die Reaktion mit der Denaturierung. In diesem Schritt wird die DNA in einem Zeitraum von 5 - 10 min durch Temperaturerhöhung auf 92 - 98 °C in ihre Einzelstränge zerlegt. Im zweiten Schritt wird die Probe auf eine primerspezifische Temperatur abgekühlt, damit diese sich anlagern können (Annealing). Darauf folgt die schnelle Verlängerung der Primer, die Elongation. Diese findet bei 72 °C statt, da bei dieser Temperatur die *Taq*-DNA-Polymerase ihr Aktivitätsoptimum hat. Für Annealing und Elongation genügen im Normalfall Zeiten von jeweils weniger als einer Minute. Pro PCR-Zyklus wird die Anzahl der Zielmoleküle verdoppelt. So liegt meist nach 30 - 35 Zyklen ausreichend DNA-Produkt zur weiteren Analyse vor.

## II Material und Methoden

---

Die Auswahl der Primer ist ausschlaggebend für eine optimale PCR. Sie lassen sich grundsätzlich in vier Gruppen unterteilen:

- 1 Sequenzspezifische Primer
- 2 Degenerierte Primer
- 3 Oligo-(dT)-Primer (nur für RNA)
- 4 Kurze Random-Primer (zumeist für RNA)

In diesen Versuchen wurden sequenzspezifische Primer eingesetzt. Es wird ein „backward“- und ein „forward“-Primer pro Versuch benötigt, um die zu vervielfältigende Sequenz zu bestimmen. Damit diese tatsächlich spezifisch an ihre Zielsequenzen binden können, müssen einige Rahmenbedingungen erfüllt sein: Die Primer sollten mindestens 17 Nukleotide lang sein und einen ausgeglichenen G/C- und A/T-Gehalt haben; der Schmelzpunkt sollte zwischen 55 und 80 °C liegen, und die Schmelzpunkte der beiden verwendeten Primer sollten möglichst gleich sein. Die vier Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sollten in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen, wobei die Konzentration meist zwischen 0,1 und 0,3  $\mu\text{mol l}^{-1}$  liegt.

### 10.2 Isolation von mRNA

Um mRNA zu isolieren, wurden Proben des Kontrollgewebes (Leber; ca. 30 mg) und der intakten Darmwand des distalen Rattenkolons kurz nach dem Töten der Ratte entnommen und mit jeweils 1000  $\mu\text{l}$  RNA Later (Ambion, Huntington, Cambridgeshire, Großbritannien) homogenisiert. Hierfür wurde das Kolonstück wie in Kapitel II-6.1 vorbereitet, allerdings ohne das Gewebe zu stripfen. Es wurde ausschließlich das distale Kolon verwendet, welches sich leicht vom quergestreiften proximalen Teil abgrenzen ließ. Daraus wurde dann jeweils für die einzelnen Gewebe mit Hilfe des RNeasy Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) Gesamt-RNA gewonnen. Anschließend konnte daraus – ebenfalls mit einem Kit der Firma Qiagen (Oligotex™ Kit) – die polyadenylierte mRNA (= Poly-A<sup>+</sup>-RNA) isoliert werden. Sie wurde bis zum Umschreiben in komplementäre DNA (= cDNA) bei -20 °C gelagert.

### 10.3 Quantitative Bestimmung der Gesamt-RNA

Vor Isolation der mRNA wurde die Konzentration der Gesamt-RNA mit einem Spektrophotometer (Biorad, München, Deutschland) bestimmt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 260 nm ( $A_{260}$ ), wobei eine Einheit jeweils  $33 \mu\text{g RNA}\cdot\text{cm}^{-1}$  entsprach (Lottspeich und Zorbas 1998). Proben, deren Messwerte unter 0,1 lagen, konnten nicht zur Gewinnung von mRNA genutzt werden.

### 10.4 Synthese von cDNA

Um cDNA aus der isolierten polyadenylierten mRNA zu gewinnen, wurde eine rtPCR (reverse Transkription) durchgeführt. Hierfür werden üblicherweise T15-Primer verwendet, die aus 15 Thymidylat-Resten bestehen. Sie bilden mit dem Poly-A<sup>+</sup>-Schwanz der mRNA DNA/RNA-Heterohybride. Je Probe wurden 2  $\mu\text{l}$  dieser Oligo dT Primer mit 6  $\mu\text{l}$  Poly-A<sup>+</sup>-RNA gemischt und für fünf Minuten bei 65 °C im Thermomischer (Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland) präinkubiert. In dieser Zeit konnte sich der Primer an die Poly-A<sup>+</sup>-RNA anlagern. Bis der Mastermix (Promega, Mannheim, Deutschland) zum RNA/Primer-Gemisch gegeben wurde, wurde die Probe auf Eis gestellt. Der Mastermix wurde angesetzt aus:

**Tabelle II-4: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese**

Mastermix	Volumen
RNase-freies Wasser	3,5 $\mu\text{l}$
RTplusPCR Buffer ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ )	4 $\mu\text{l}$
dNTPs ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	2 $\mu\text{l}$
cMaster RT Enzym	2 $\mu\text{l}$
Primer RNase Inhibitor	0,5 $\mu\text{l}$
Summe	12 $\mu\text{l}$

12  $\mu\text{l}$  Mastermix wurden dann dem RNA/Primer-Gemisch zugefügt, sodass das Volumen des Reaktionsansatzes 20  $\mu\text{l}$  betrug. Mit einer Pipette wurde der Reaktionsansatz gut

## II Material und Methoden

---

durchmischt, anschließend kurz abzentrifugiert und bei 42 °C für 60 min im Thermocycler (Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die resultierende cDNA wurde im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 10.5 Oligonukleotide (Primer)

Die Primerauswahl wurde durch das Programm Oligo 6.0 (Medprobe, Oslo, Norwegen) unterstützt, z.B. durch die Berechnung der Primer-Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>-Wert). Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Primerpaare, einschließlich ihres Zielmoleküls und der Länge des von ihnen amplifizierten Fragments, sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt (Tab. II-5).

**Tabelle II-5: Sequenzen der verwendeten Primer**

Zielmolekül	Oligonukleotid-Sequenz	bp	Quelle
HO-I	5`-ACAACCCACCAAGTTCAAA- 3`	20	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/61098187">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/61098187</a>
	5`-CCTCTGGCGAAGAACTCTG- 3`	20	
HO-II	5`-ATGGCAGACCTTTCTGAGCTC- 3`	21	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/204626">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/204626</a>
	5`-CTTCATACTCAGGTCCAAGGC- 3`	21	

### 10.6 Versuchsdurchführung

Die synthetisierte cDNA aus den Krypten wurde mittels PCR auf die Existenz eines für die Hämoxygenasen kodierenden Nukleinsäureabschnittes untersucht. Die PCR wurde mit Hilfe eines Thermocyclers (Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Über eine integrierte Software konnte der Ablauf der PCR jeweils spezifisch programmiert werden.

Der Mastermix (2,5 x) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) setzte sich jeweils folgendermaßen zusammen (Tab. II-6):

## II Material und Methoden

---

**Tabelle II-6: Zusammensetzung des Mastermix für die rtPCR**

Mastermix	
Magnesiumchlorid	1,5 mmol·l <sup>-1</sup>
dNTPs	200 µmol·l <sup>-1</sup>
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	1,25 U

### 10.6.1 Hämoxygenase I + II

Die Reaktionsansätze für den Nachweis der HO-I wurden wie in Tabelle II-7. angegeben zusammengestellt.

**Tabelle II-7: PCR-Reaktionsansatz zum Nachweis von HO-I und HO-II**

Substanz	Volumen
cDNA, Kolon	1 µl
cDNA, Leber	1 µl
Primer, (3' → 5')	1 µl
Primer, (5' → 3')	1 µl
Mastermix	10 µl
RNase freies Wasser	12 µl

Das spezifische Thermocycler-Programm für HO-I und HO-II ist in Tabelle II-8 aufgeführt:

**Tabelle II-8: Darstellung des PCR-Protokolls für HO-I und HO-II**

1. Zyklus			2.-50. Zyklus		
Denaturierung	94 °C	10 min			
Denaturierung	94 °C	45 s	Denaturierung	94 °C	45 s
Annealing	60 °C	45 s	Annealing	60 °C	45 s
Elongation	72 °C	1 min	Elongation	72 °C	1 min



Um eine ausreichende Trennung des cDNA-Doppelstranges sicherzustellen, wird im ersten Zyklus eine Denaturierungsphase über 10 min vorgeschaltet. Nach dem 50. Zyklus folgte eine finale Inkubation für 10 min bei 72 °C.

### **10.7 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese diente der Auftrennung der PCR-Amplifikate. Die Proben wurden mit einem Farbstoff gemischt und anschließend auf ein Agarosegel (1,5 g·l<sup>-1</sup>; Agarose in TAE-Puffer; Zusammensetzung des TAE-Puffers in mmol·l<sup>-1</sup>: 40 Tris-Acetat; 1 EDTA (Ethylendiamino-tetraessigsäure) in RNase freiem Wasser; mit Essigsäure und Tris-base [Tris(hydroxymethyl)aminomethan] (pH auf 8 eingestellt) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 50 V bei 750 mA angelegt, die Laufzeit betrug 90 min. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid (10<sup>-5</sup> mol·l<sup>-1</sup> in Aqua dest.) gefärbt, so dass die DNA-Banden mittels Fluoreszenzlicht (Anregungswellenlänge 312 nm) sichtbar wurden. Die Dokumentation erfolgte digital mit Hilfe des Windows-Programms BioCapt 11.03, das mit einem Gel-Dokumentationssystem der Firma Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland) gekoppelt war.

### 11 Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM) oder in Originalkurven. Wurden die Ergebnisse in Form von Messbalken abgebildet, stellt die Höhe der Säule den Mittelwert dar, der Fehlerbalken den SEM. Bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuchen bezeichnet  $n$  die Anzahl der einzelnen gemessenen Kryptenepithelzellen oder Neurone. Bei Ussingkammer- und Immunofluoreszenz-Messungen steht  $n$  für die Anzahl der verwendeten Gewebe. Unabhängig davon wurden die Zellen oder Gewebe für alle Versuche jeweils aus mindestens zwei 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 dieser beiden Methoden angewendet wurde. Um mehrere verschiedene Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit einem anschließenden Post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mit der Statistik Software StatMost<sup>TM</sup> 32 (Dataxiom, Los Angeles, Kalifornien, USA).

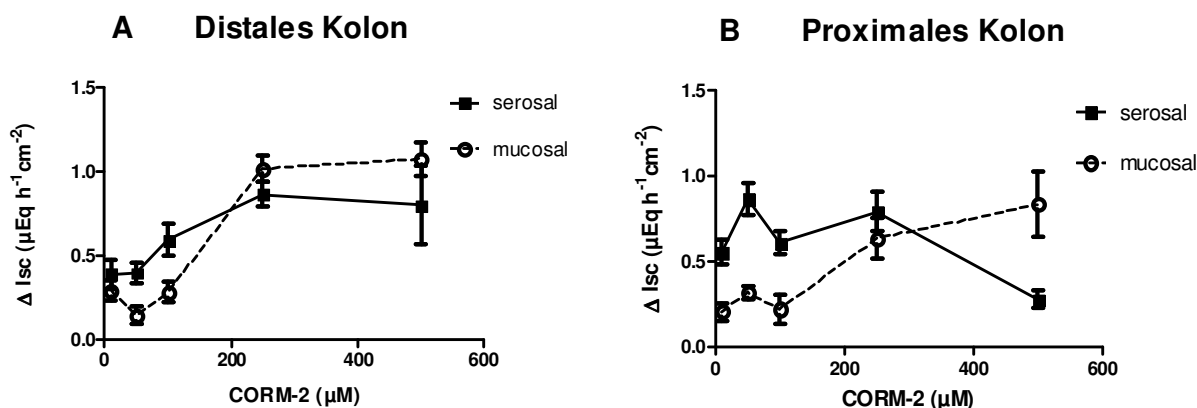
## III Ergebnisse

### 1 Kohlenstoffmonoxid-induzierte Veränderungen des intestinalen

#### Ionentransports

#### 1.1 CORM-2-induzierter Anstieg des Kurzschlussstroms am distalen Rattenkolon

Zu Beginn der Studie wurden Mucosa-Submucosa-Präparate des Rattenkolons angefertigt, um mit Hilfe von Ussingkammer-Experimenten zu klären, ob Kohlenstoffmonoxid einen Einfluss auf den Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) an diesen Gewebepräparationen hat. Für diese Experimente wurde ein CO-Donor in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Dieser CO-Donor wird als CORM-2 („CO releasing-molecule 2“) oder Tricarbonyldichlorruthenium-II-dimer ( $[Ru(CO)_3Cl_2]_2$ ) bezeichnet. In Anlehnung an publizierte Studien (Chae et al. 2006, De Backer und Lefebvre 2007, Dong et al. 2008), die mit diesem CO-Donor arbeiteten, wurde CORM-2 in Konzentrationen von  $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  und  $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  entweder auf der mucosalen oder der serosalen Seite appliziert. Hierfür wurden die unterschiedlichen Konzentrationen an ein und demselben Gewebe, getrennt durch Waschschrte mit dem fünffachen des Kammervolumens an Standard-Parsonslösung (Kap. II-2.1.1), separat zugegeben. Der CO-Donor löste einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Kurzschlussstroms aus (Abb. III-1). Dieser Anstieg war besonders ausgeprägt am distalen Kolon der Ratte zu beobachten. Daher wurde in den folgenden Versuchen nur noch mit dem distalen Part des Kolons gearbeitet.



**Abb. III-1: Konzentrationswirkungskurven für CORM-2**

**A:** CORM-2 führt im Ussingkammer-Experiment zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) an Mucosa-Submucosa-Präparaten des distalen Rattenkolons. Die durchgezogene Linie und die schwarzen Quadrate zeigen die Veränderungen des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) nach Applikation des CO-Donors auf der serosalen Seite des Gewebes. Die leeren Kreise und die gestrichelte Linie stellen den Verlauf für die mucosale Applikation von CORM-2 dar. **B:** Auch am proximalen Kolon der Ratte kommt es zu einem Anstieg des  $I_{sc}$  durch die Gabe des CO-Donors. Die durchgezogene Linie und die Quadrate stehen ebenfalls für die serosale und die gestrichelte Linie mit den Kreisen für die mucosale Applikationsart. Alle Daten stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) über die Baseline direkt vor Zugabe des CO-Donors dar. Die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM);  $n = 7$ .

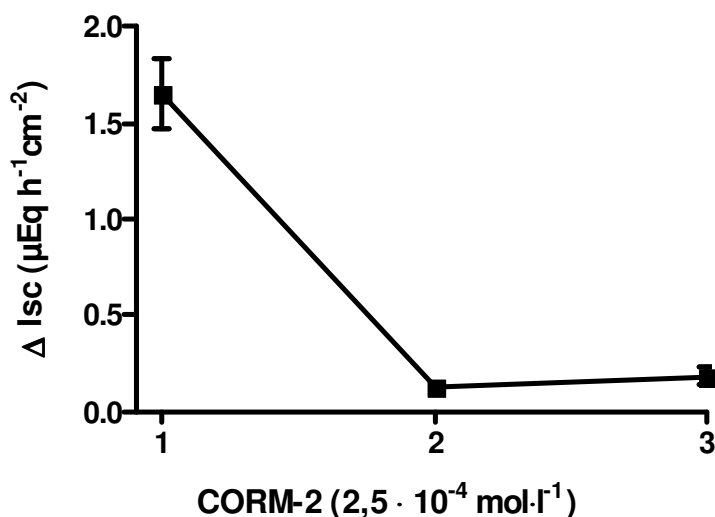
An den Präparaten des distalen Kolons der Ratte konnte bereits nach Zugabe des CO-Donors in einer Konzentration von  $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ein signifikanter Anstieg des  $I_{sc}$  (sowohl bei serosaler als auch mucosaler Zugabe) gemessen werden. Über nichtlineare Regression wurden die erhaltenen Konzentrationswirkungskurven an eine Michaelis-Menten-Kinetik gefittet. Diese zeigte, dass das Gewebe bei serosaler Applikation von CORM-2 eine höhere Sensitivität aufwies im Vergleich zu mucosaler Applikation. Der  $K_m$ -Wert für die serosale Applikation von CORM-2 betrug  $2\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  im Vergleich zu  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  für die mucosale Applikation. Daher wurde der CO-Donor in allen folgenden Ussingkammer-Experimenten auf der serosalen Seite zugegeben.

Eine maximale Reaktion des Kurzschlussstroms auf die Gabe des CO-Donors wurde mit einer Konzentration von  $2,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  beobachtet. Mit dieser Konzentration stieg der  $I_{sc}$  bei serosaler Zugabe des CO-Donors um  $0,86 \pm 0,12 \text{ }\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  am distalen Rattenkolongewebe. Dementsprechend wurde der CO-Donor in den folgenden Versuchen meist in einer Konzentration von  $2,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  verwendet.

Um für die weiteren Versuche mit dem CO-Donor auszuschließen, dass der gemessene Effekt durch den Trägerstoff selbst und nicht oder nicht allein durch das freigesetzte Gas verursacht wurde, wurden Ussingkammer-Experimente mit dem inaktivierten CORM-2 (sog. iCORM-2; Herstellung siehe Kap. II-4) durchgeführt. Die Applikation von iCORM-2 in einer Konzentration von  $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite führte zu keiner wesentlichen Veränderung des gemessenen Kurzschlussstroms: Der gemessene  $\Delta I_{\text{sc}}$  betrug  $0,05 \pm 0,018 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  (nicht signifikant;  $n = 8$ ). Somit ist der von CORM-2 verursachte Effekt auf den Ionentransport ursächlich durch die Freisetzung von CO ausgelöst und nicht durch den Trägerstoff selbst bedingt.

#### **1.2 Desensitivierung des Gewebes durch mehrfache CORM-2-Applikation**

Wiederholte Applikation von CORM-2 ( $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) führte zu einer Desensitivierung des Gewebes (Abb. III-2). Nach der ersten Gabe des CO-Donors wurde das Gewebe auf der serosalen und der mucosalen Seite mit dem fünffachen des Kammervolumens an Standard-Parsonslösung (Kap. II-2.1.1) gewaschen. Anschließend erfolgte eine zweite Applikation von CORM-2 ( $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite). Der gemessene Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  ( $\Delta I_{\text{sc}}$ ) entsprach nur noch  $6,6 \pm 1,2 \%$  ( $n = 11$ ) im Vergleich zur ersten Applikation. Im Anschluss daran erfolgte ein weiterer Waschschrift und eine dritte Applikation von CORM-2 ( $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite). Diese resultierte in einem  $\Delta I_{\text{sc}}$  von  $9,1 \pm 4,1 \%$  ( $n = 11$ ) im Vergleich zur ersten Zugabe des CO-Donors. Aufgrund dieser starken Desensitivierung des Gewebes durch CORM-2 wurde für das weitere Vorgehen in dieser Studie festgelegt, die Mucosa-Submucosa-Präparationen jeweils nur ein Mal mit dem CO-Donor und je nach Protokoll mit entsprechenden anderen Substanzen oder Inkubationsmedien vorzubehandeln. Für jede dieser Versuchsserien wurden parallel Kontrollmessungen ohne die jeweiligen Inhibitoren durchgeführt.



### Abb. III-2: Desensitivierung des Gewebes durch CORM-2

Dreifache Applikation von CORM-2 ( $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) führt zu vermindertem Anstieg des  $I_{sc}$ . Die Symbole stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) über die Baseline direkt vor Zugabe des CO-Donors dar, die vertikalen Linien den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM);  $n = 11$ .

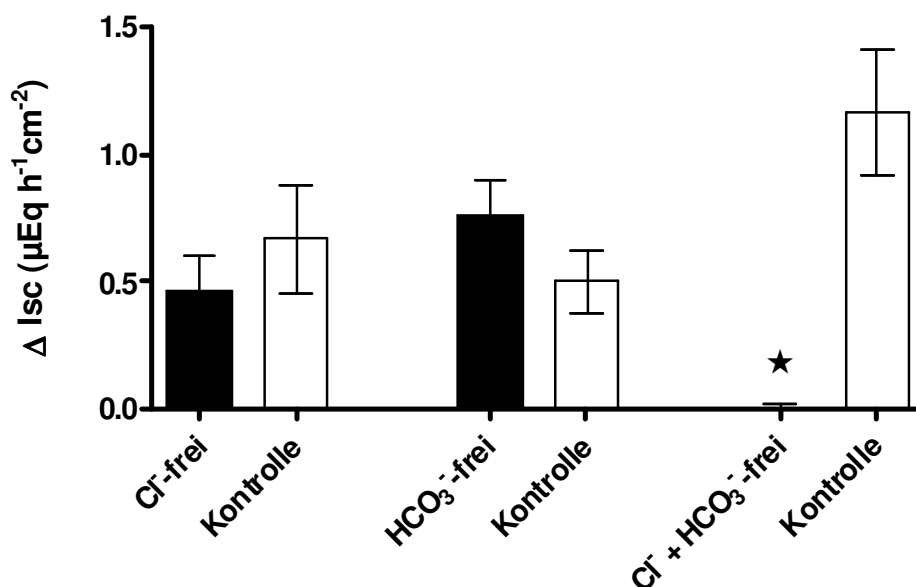
## 1.3 Der CORM-2-induzierte $I_{sc}$ wird von einer Anionensekretion getragen

### 1.3.1 Anionensubstitutionsversuche

Der Anstieg des  $I_{sc}$ , den der CO-Donor auslöst, entspricht entweder einem Netto-Kationentransport von mucosal nach serosal oder einem Netto-Anionentransport in die entgegengesetzte Richtung. Um eine Abhängigkeit des von CORM-2 induzierten Effekts von einer Sekretion von  $\text{Cl}^-$  und/oder  $\text{HCO}_3^-$  abzuklären, wurden Anionen-Substitutionsversuche durchgeführt. Das Ersetzen von  $\text{Cl}^-$  durch das impermeable Anion Gluconat in der Pufferlösung (Kap. II-2.1.2) sowohl auf der mucosalen als auch auf der serosalen Seite führte zu keiner signifikanten Veränderung des von CORM-2 induzierten  $I_{sc}$  (Abb. III-3). Auch in  $\text{HCO}_3^-$ -freier Tyrodelösung (mucosal und serosal; Zusammensetzung des Puffer siehe Kap. II-2.1.4) unterschied sich der  $I_{sc}$ -Anstieg nach CORM-2-Applikation nicht wesentlich von dem in der Standard-Parsonslösung gemessenen (Abb. III-3). Wurden jedoch beide Anionen im Puffer ersetzt bzw. aus dem Puffer entfernt (mucosal und serosal; Kap. II-2.1.5), so konnte durch CORM-2 kein Anstieg des  $I_{sc}$  mehr ausgelöst werden (Abb. III-3). Die Ergebnisse der Anionen-

Substitutionsversuche lassen darauf schließen, dass der CORM-2-Effekt von einer Sekretion sowohl von  $\text{Cl}^-$ -Ionen als auch von  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen abhängig ist.

Da die  $\text{CO}$ -Antwort in den Ussingkammer-Versuchen auch in Anwesenheit von Standard-Parsonslösung eine gewisse Variabilität zeigte, wurden für die Substitutionsversuche jeweils zeitnah eigene Kontrollversuche durchgeführt (weiße Balken in Abb. III-3). Statistische Untersuchungen dieser Kontrollen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kontrollgruppen nachweisen.



#### Abb. III-3: Anionensekretion

Für jede Versuchsreihe wurde die CORM-2-Antwort nach Substitution eines oder mehrerer Anionen im Puffer (schwarze Balken) im Vergleich zu Kontrollversuchen in Standard-Parsonslösung (weiße Balken) untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zur Baseline direkt vor CORM-2-Applikation dar. Die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM);  $n = 7 - 10$ . \*  $P < 0,05$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

#### **1.3.2 Versuche mit Transportinhibitoren auf der basolateralen Membranseite**

Im Anschluss an die Anionensubstitutionsversuche wurden Experimente mit Transporthemmstoffen durchgeführt, um herauszufinden, welche ionalen Transportwege an dem von CORM-2 induzierten  $I_{sc}$ -Anstieg beteiligt sind. Der Haupttransportweg, über den das Kolonepithel basolateral  $Cl^-$ -Ionen aufnimmt, ist der  $Na^+K^+2Cl^-$ -Cotransporter (NKCC1; Binder und Sandle 1994), der durch Bumetanid gehemmt werden kann (Kaplan et al. 1996). In Gegenwart von Bumetanid ( $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) war jedoch die Wirkung des CO-Donors ( $2,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) unverändert im Vergleich zu einer nicht vorbehandelten Kontrollgruppe (Abb. III-4). Auch die Vorbehandlung mit SITS ( $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) beeinträchtigte die Wirkung von CORM-2 ( $2,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) nicht (Abb. III-4). Dieses Stilben-Derivat hemmt den basolateralen  $Cl^-HCO_3^-$ -Austauscher, einen weiteren Transporter, über den das Kolonepithel während der Anionensekretion von basolateral her Anionen aufnehmen kann (Schultheiss et al. 1998). Erst eine kombinierte Blockade beider Transportsysteme mit Bumetanid und SITS auf der serosalen Seite führte zu einer signifikanten Hemmung des CO-induzierten  $\Delta I_{sc}$  (Abb. III-4). Somit scheint der von CORM-2 induzierte Kurzschlussstrom sowohl von der Funktion des basolateralen  $Na^+K^+2Cl^-$ -Cotransporters als auch des auf derselben Membranseite lokalisierten  $Cl^-HCO_3^-$ -Austauschers abhängig zu sein.

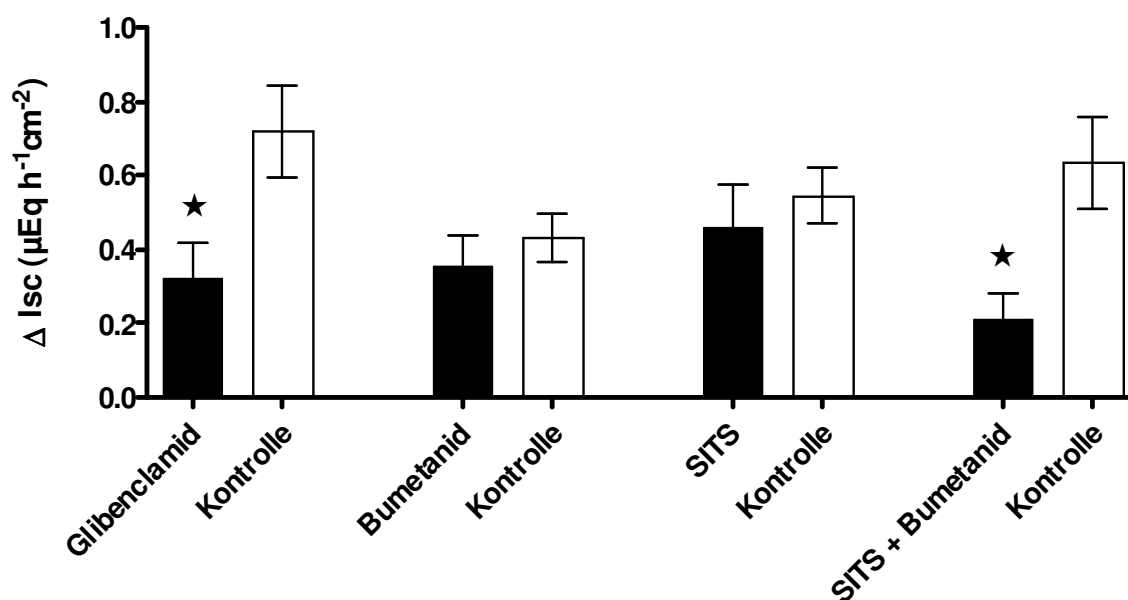
#### **1.3.3 Versuche mit Transportinhibitoren auf der apikalen Membranseite**

Der wichtigste Anionenkanal in der apikalen Membran des Kolonepithels, welcher für die Sekretion insbesondere von  $Cl^-$ -Ionen verantwortlich ist, ist der CFTR-Kanal (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), der sich durch Glibenclamid hemmen lässt (Greger 2000). Die Vorbehandlung der Mucosa-Submucosa-Präparate mit Glibenclamid ( $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der mucosalen Seite), führte zu einer signifikant verringerten Antwort auf CORM-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. III-4). Somit scheint der apikale CFTR-Kanal ebenfalls eine wichtige Rolle für das Auslösen der CO-Antwort zu spielen.

Da die CO-Antwort in den Ussingkammer-Versuchen auch ohne Einsatz von Inhibitoren eine gewisse Variabilität zeigte, wurden sowohl für die Versuche mit



basolateralen als auch apikalen Hemmstoffen jeweils zeitnah eigene Kontrollversuche durchgeführt (weiße Balken in Abb. III-4). Statistische Untersuchungen dieser Kontrollen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kontrollgruppen nachweisen.



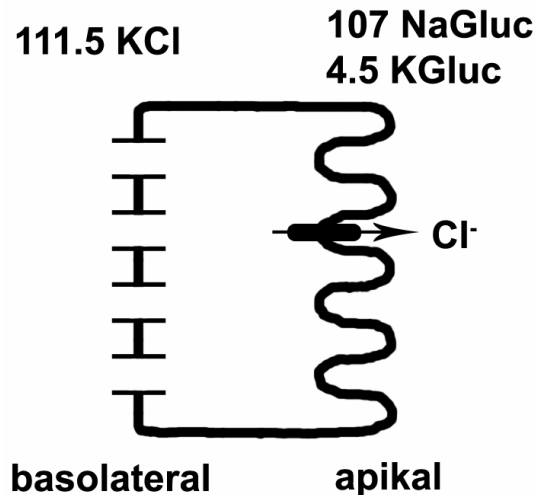
#### Abb. III-4: Transportinhibitorversuche

Sensibilität des von CORM-2-induzierten  $\Delta I_{sc}$  gegen verschiedene Transporthemmstoffe. Der CORM-2-Effekt in Anwesenheit (schwarze Balken) der Substanzen Glibenclamid ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; auf mucosaler Seite), Bumetanid ( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; auf serosaler Seite), SITS ( $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; auf serosaler Seite) und in Kombination Bumetanid und SITS verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zur Baseline direkt vor CORM-2-Applikation dar. Die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM);  $n = 7 - 10$ .

\*  $P < 0,05$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

#### **1.4 CORM-2 induziert Ionenbewegungen an der apikalen Membran**

Änderungen im transepithelialen  $I_{sc}$  können auf geänderte Leitfähigkeiten in der apikalen und/oder in der basolateralen Membran zurückgehen, da beide physikalisch gesehen in Serie geschaltet sind (Abb. II-2). Um die Wirkung des CO-Donors auf die apikale beziehungsweise basolaterale Zellmembran im Einzelnen zu untersuchen, wurde jeweils eine von ihnen ausgeschaltet. Die basolaterale Membran ist durch eine hohe Leitfähigkeit für  $K^+$ -Ionen gekennzeichnet. Sie kann daher elektrisch „ausgeschaltet“ werden, wenn das Gewebe basolateral mit einem Puffer inkubiert wird, der eine hohe  $K^+$ -Konzentration (ähnlich hoch wie im Cytosol; Kap. II-2.1.3) aufweist. Dadurch wird das  $K^+$ -Diffusionspotential, das normalerweise das Potential an der basolateralen Membran bestimmt, auf Werte gegen 0 depolarisiert und gleichzeitig der Membranwiderstand durch das hohe Angebot an permeablen Ionen sehr gering, so dass der  $I_{sc}$  praktisch nur noch vom Ionentransport durch die apikale Membran bestimmt wird (Fuchs et al. 1977). Auf der mucosalen Seite wurde ein Puffer eingesetzt, in dem  $Cl^-$  mit dem impermeablen Anion Gluconat (Kap. II-2.1.2) ausgetauscht worden war. Damit lag an der apikalen Membran ein von serosal nach mucosal gerichteter Konzentrationsgradient für  $Cl^-$ -Ionen an, der als Antriebskraft für einen Chloridstrom durch die apikale Membran dient. Änderungen in der apikalen Chloridleitfähigkeit spiegeln sich somit direkt im gemessenen  $I_{sc}$  wider (Schultheiss und Diener 1997; Abb. III-5).



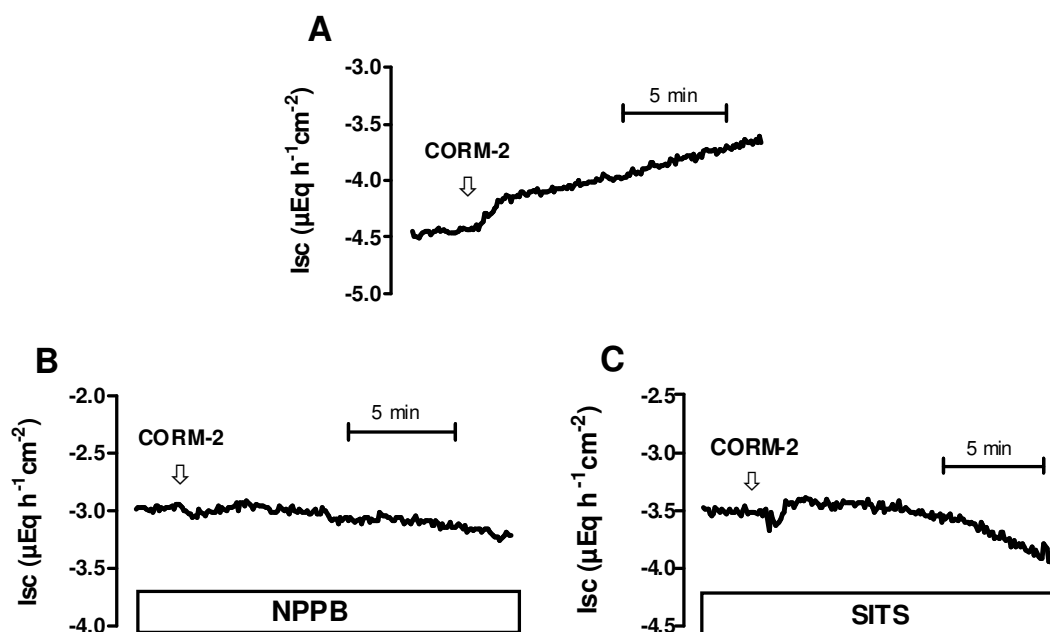
**Abb. III-5: Schematische Darstellung der elektrischen Ausschaltung der basolateralen Zellmembran**

Auf der basolateralen Membranseite wurde eine  $111,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl-Parsonslösung (Zusammensetzung s. Kap. II-2.1.3) und auf der apikalen Seite eine  $107 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaGluconat/ $4,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KGluconat-Parsonslösung (Zusammensetzung s. Kap. II-2.1.2) verwendet. Dies führte zur Depolarisation und damit zur Ausschaltung der basolateralen Membran sowie zur Entstehung eines von serosal nach mucosal orientierten Konzentrationsgradienten für  $\text{Cl}^-$ -Ionen.

Unter diesen Bedingungen fließt basal ein negativer  $I_{\text{sc}}$  (bedingt durch die diffusive Bewegung von  $\text{K}^+$ -Ionen von basolateral nach apikal). CORM-2 ( $3,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) induzierte einen Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  durch die apikale Membran (Abb. III-6A). Fünfzehn Minuten nach der Gabe des CO-Donors stieg der  $I_{\text{sc}}$  von  $-4,45 \pm 0,47 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $-3,51 \pm 0,33 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n = 7, P < 0,05$ ). Um die Abhängigkeit dieser Reaktion von der Aktivität apikaler  $\text{Cl}^-$ -Kanäle nachzuweisen, wurden diese Kanäle mittels Zugabe von NPPB ( $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der mucosalen Seite) gehemmt. NPPB als Inhibitor apikaler  $\text{Cl}^-$ -Kanäle (Diener und Rummel 1989) führte zu einer signifikanten Hemmung des CORM-2-induzierten  $I_{\text{sc}}$ . In Anwesenheit von NPPB stieg der  $I_{\text{sc}}$  lediglich um  $0,32 \pm 0,09 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Abb. III-6B;  $n = 7, P < 0,05$  im Vergleich zu Versuchen in Abwesenheit von NPPB).

Auch die Vorbehandlung des Gewebes mit dem Stilben-Derivat SITS ( $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der mucosalen Seite) reduzierte signifikant die CORM-2-Antwort unter diesen Versuchsbedingungen. Mucosal appliziert hemmt SITS  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Cl}^-$ -Kanäle in der apikalen Membran (Hennig et al. 2008). In Anwesenheit dieses Hemmstoffs stieg

der  $I_{sc}$  lediglich um  $0,32 \pm 0,10 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Abb. III-6C;  $n = 6$ ,  $P < 0,05$  im Vergleich zu Versuchen in Abwesenheit von SITS).

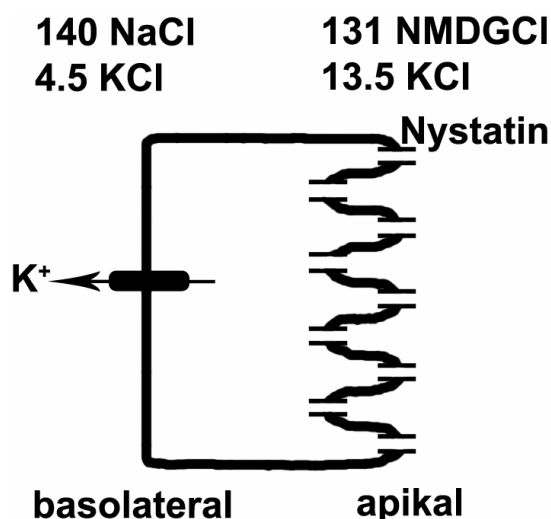


#### Abb. III-6: CORM-2-induzierte apikale $\text{Cl}^-$ -Ströme

$\text{Cl}^-$ -Ströme durch die apikale Membran stimuliert durch den CO-Donor nach basolateraler Depolarisation ( $111,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl auf der serosalen Seite) und in Anwesenheit eines  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationsgradienten ( $107 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{Na}^+$  Gluconat/ $4,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl auf der mucosalen Seite). **A:** CORM-2 ( $3,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite; Pfeil markiert Zeitpunkt der Zugabe) führt zum Anstieg des  $I_{sc}$  an der apikalen Zellmembran. **B:** Nach Vorbehandlung mit dem  $\text{Cl}^-$ -Kanalblocker NPPB ( $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der mucosalen Seite) ist die CORM-2-Antwort (Pfeil markiert Zugabezeitpunkt) signifikant vermindert. **C:** Vorbehandlung mit SITS ( $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der mucosalen Seite) führt zu verringerter CO-Antwort (Pfeil markiert Zugabezeitpunkt von CORM-2). Alle Daten zeigen gemittelte Kurven;  $n = 6 - 8$ .

#### 1.5 CORM-2 induziert Ionenbewegungen an der basolateralen Membran

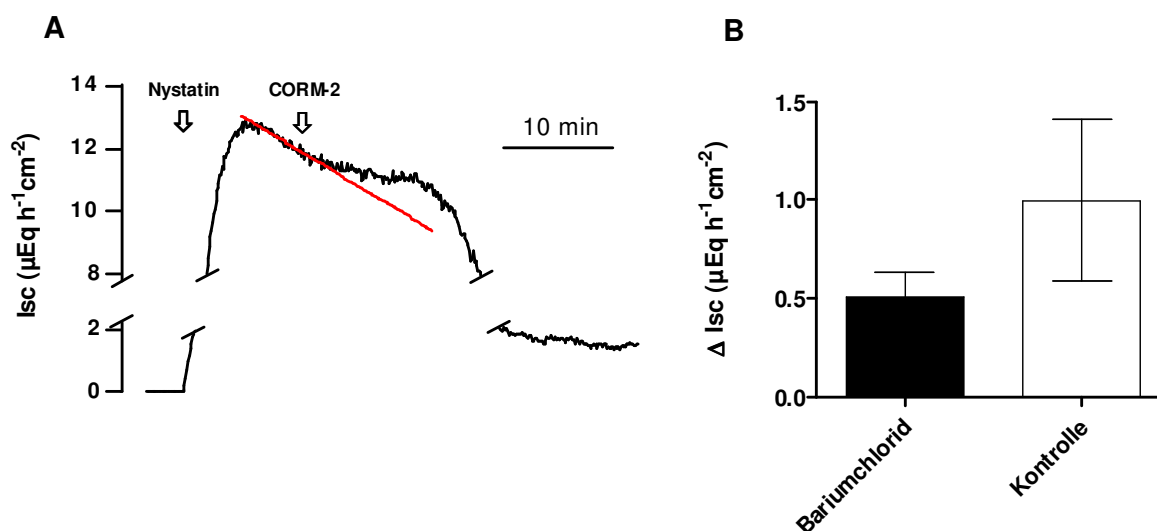
Um die Vorgänge an der basolateralen Seite der Epithelzelle zu untersuchen, wurde die apikale Membran mit dem Ionophor Nystatin ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  auf der mucosalen Seite) permeabilisiert (Abb. III-7). Es sollte bestimmt werden, ob der CO-Donor einen Effekt auf die basolaterale  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit hat, welche die treibende Kraft für die epitheliale Anionen-Sekretion darstellt (Böhme et al. 1991, Strabel und Diener 1995). Diese Versuche wurden in Anwesenheit eines  $\text{K}^+$ -Gradienten, aber in Abwesenheit von mucosalem  $\text{Na}^+$  durchgeführt, um eine Beteiligung der basolateralen  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe an dem gemessenen  $I_{\text{sc}}$  auszuschließen ( $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaCl}/4,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{KCl}$  auf der serosalen Seite,  $131 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NMDGCl}/13,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{KCl}$  auf der mucosalen Seite).



**Abb. III-7: Schematische Darstellung der Permeabilisierung der apikalen Zellmembran**  
 Permeabilisierung der apikalen Membran durch das Ionophor Nystatin ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  auf der mucosalen Seite). Anlegen eines  $\text{K}^+$ -Gradienten durch Verwendung von  $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaCl}/4,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{KCl}$  Standard-Tyrodellösung (Zusammensetzung s. Kap. II-2.1.4) auf der serosalen und  $\text{Na}^+$ -freier  $131 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NMDGCl}/13,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{KCl}$  Tyrodellösung (Zusammensetzung s. Kap. II-2.1.6) auf der mucosalen Seite.

Unter diesen Bedingungen führt Nystatin zu einem schnellen Ansteigen des  $I_{\text{sc}}$ , gefolgt von einem zeitabhängigen spontanen Abfall des  $I_{\text{sc}}$  (Schultheiss und Diener 1997). Zugabe von CORM-2 ( $3,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) führte zu einer Unterbrechung dieses  $I_{\text{sc}}$ -Abfalls durch einen vorübergehenden Anstieg des

Kurzschlussstroms (berechnet durch lineare Regression; Abb. III-8A). Diese Reaktion müsste aufgrund der verwendeten Pufferlösungen, und damit durch die Ausschaltung der basolateralen  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe, von basolateralen  $\text{K}^+$ -Kanälen getragen werden. Diese lassen sich unter anderem durch  $\text{Ba}^{2+}$ -Ionen blockieren (Latorre und Miller 1983). Hemmung dieser Kanäle mit  $\text{Ba}^{2+}$  ( $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) führte dazu, dass der extrapolierte  $I_{\text{sc}}$  in diesen Versuchen von  $1,00 \pm 0,41 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $0,51 \pm 0,12 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  sank (Abb. III-8B). Diese angedeutete Hemmung erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.



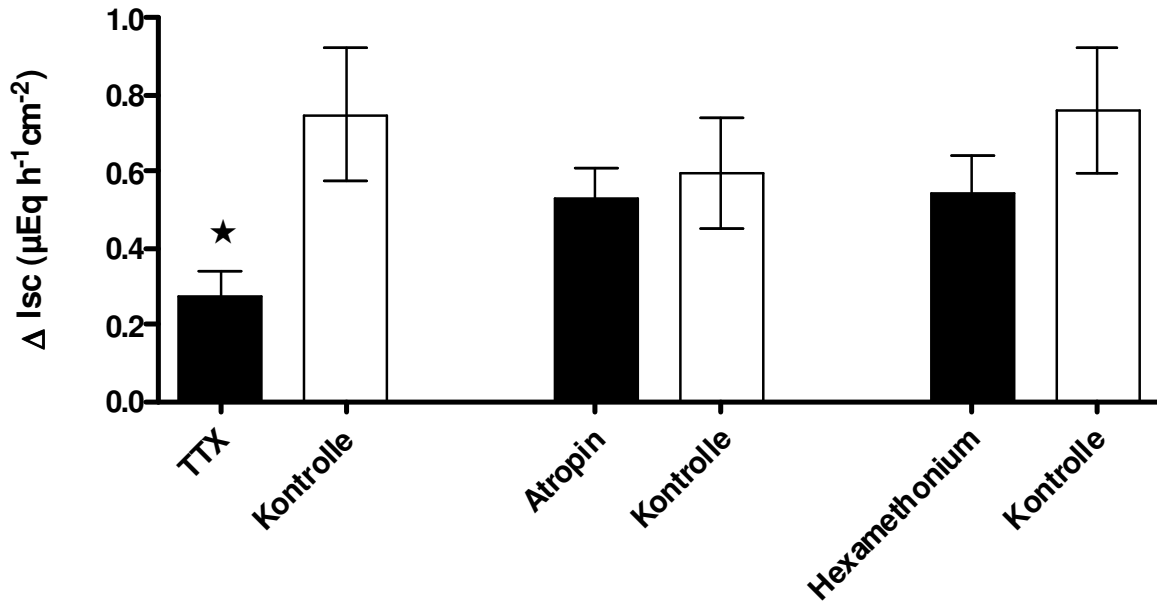
**Abb. III-8: CORM-2-induzierte basolaterale  $\text{K}^+$ -Ströme**

**A:** Vorübergehender Stromanstieg über basolaterale  $\text{K}^+$ -Kanäle durch CORM-2 ( $3,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite; der rechte Pfeil markiert Zeitpunkt der Zugabe von CORM-2) während des Abfalls des Nystatin-induzierten  $I_{\text{sc}}$ . Die apikale Membran wurde vorher mittels Nystatin ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  auf der mucosalen Seite; der linke Pfeil markiert Zeitpunkt der Zugabe) permeabilisiert. Die rote Linie markiert den erwarteten Verlauf der Nystatin-Kurve ohne CORM-2-Zugabe (berechnet über lineare Regression des Stroms während der letzten 3 min direkt vor Zugabe von CORM-2). Der Graph zeigt den Verlauf des  $I_{\text{sc}}$  für einen typischen Versuch. **B:** Der CO-Effekt konnte partiell durch  $\text{Ba}^{2+}$  ( $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) gehemmt werden, ohne dass jedoch diese Hemmung statistische Signifikanz erreichte. Gezeigt sind hier die Mittelwerte (Balken)  $\pm$  SEM (vertikale Linien) für den maximalen Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  über die erwartete Regressionslinie in Anwesenheit (schwarzer Balken) oder in Abwesenheit (Kontrolle; weißer Balken) von  $\text{Ba}^{2+}$ ;  $n = 7 - 9$ .

#### **2 Beteiligung von sekretomotorischen Neuronen am CO-Effekt**

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind enterische Neurone in der Lage, die Enzyme, die für eine endogene CO-Produktion verantwortlich sind, zu exprimieren (Donat et al. 1999, Miller et al. 2001). Außerdem wirken einige Substanzen, die am Darmepithel eine Sekretion auslösen, nicht oder auch nicht ausschließlich an den Darmepithelzellen. Diese Sekretagoga stimulieren enterische, sekretomotorische Neurone und regen damit indirekt das Darmepithel zur Sekretion an (Keast 1987). Um herauszufinden, ob die von CORM-2-induzierten Veränderungen des Kurzschlussstroms auch von der Aktivität sekretomotorischer Neurone abhängig sind, wurden die Gewebe vor der CORM-2-Applikation mit Tetrodotoxin (TTX;  $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) vorbehandelt. Tetrodotoxin ist ein Neurotoxin, welches die Weiterleitung von Aktionspotentialen in enterischen Neuronen durch Blockade spannungsabhängiger  $\text{Na}^+$ -Kanäle unterdrückt (Catterall 1980). In Anwesenheit dieses Toxins war der Stromanstieg, den der CO-Donor ( $3,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) auslöste, signifikant vermindert (Ab. III-9).

Um zu untersuchen, welche Art von Neuronen an dem CO-Effekt beteiligt sind, wurden im Anschluss Versuche mit einem Hemmstoff der muscarinischen Acetylcholinrezeptoren (Atropin) und mit einem nikotinischen Antagonisten (Hexamethonium; Starke 2001) durchgeführt. Jedoch weder die Vorbehandlung des Gewebes mit Atropin ( $5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) noch mit Hexamethonium ( $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) führte zu einer wesentlichen Veränderung des von CORM-2-induzierten  $I_{sc}$ -Anstiegs (Abb. III-9). Die Beteiligung enterischer Neurone in den CO-Effekt scheint somit auf einer Aktivierung nichtcholinergischer Neurone zu beruhen.



**Abb. III-9: Beteiligung enterischer Neurone am CO-Effekt**

Beteiligung enterischer Neurone an dem CO-induzierten Anstieg des  $I_{sc}$ . Gezeigt ist der Anstieg des Kurzschlussstroms durch CORM-2 ( $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) allein oder in Anwesenheit von TTX ( $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite), Atropin ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) oder Hexamethonium ( $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite). Schwarze Balken stehen für Versuche in Anwesenheit der Blocker, weiße für die Kontrollen ohne Blocker. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor CORM-2-Applikation dar. Die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM);  $n = 6 - 7$ , \*  $P < 0,05$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.



## **3 Untersuchung auf endogene Produktion von CO im distalen Rattenkolon**

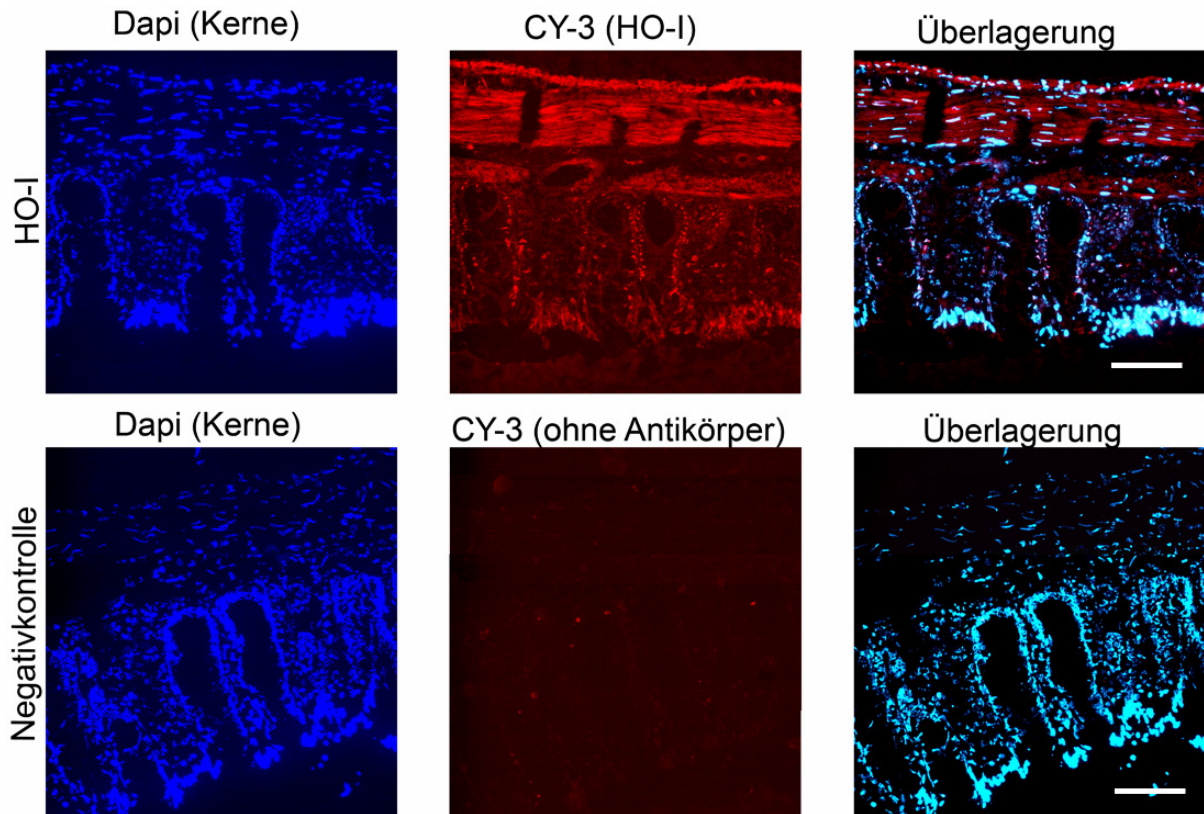
### **3.1 Immunhistochemischer Nachweis der Hämoxigenase I und II**

In verschiedenen Studien wurde, wie oben bereits erwähnt, bestätigt, dass Neurone des enterischen Nervensystems in der Lage sind, Kohlenstoffmonoxid zu bilden. So ist die Expression der für die endogene CO-Bildung verantwortlichen Enzyme – die Hämoxigenasen I und II – z.B. im Plexus myentericus des Menschen (Miller et al. 2001) und in humanen interstitiellen Zellen von Cajal (Miller et al. 1998) nachgewiesen worden. Desweiteren wurde eine Expression der HO-II im Ileum der Ratte in Neuronen des Plexus myentericus und des Plexus submucosus beschrieben (Donat et al. 1999). Um zu untersuchen, ob auch die Zellen in der Wand des distalen Kolons der Ratte in der Lage sind, endogen CO zu produzieren und wenn ja, welche der Isoformen der Hämoxigenasen in diesem Gewebe exprimiert werden, wurden immunhistochemische Markierungen der HO-I und HO-II an Gewebeschnitten des distalen Kolons (Kap. II-9.4.1-3) durchgeführt. Dazu wurden monoklonale HO-I- und polyklonale HO-II-Primärantikörper (Tab. II-1) sowie an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Sekundärantikörper (Tab. II-2) verwendet.

Jede der folgenden immunhistochemischen Aufnahmen zeigt folgende Gewebeabschnitte: im oberen Bereich befindet sich die Serosa gefolgt von der Muscularis propria, im unteren Bildteil sind die Epithelzellen der Mucosa mit den Oberflächenanteilen der Kolon-Krypten zu sehen. Der Fundus der Krypten befindet sich im mittleren Anteil des Bildes. In der oberen Reihe sind die Aufnahmen des jeweiligen Versuches mit den Primärantikörpern zu sehen. Links befindet sich die DAPI-Aufnahme (blau), die als Kernfärbung eine Orientierung im Gewebe ermöglicht. In der Mitte folgt die Cy3-Aufnahme (rot) als Darstellung der entsprechenden Enzym-Expression und rechts folgt eine Überlagerung der DAPI- und der Cy3-Aufnahme. In der unteren Reihe befinden sich Aufnahmen, die nach demselben Protokoll, jedoch ohne die Verwendung von Primärantikörpern angefertigt wurden. Sie dienen als Negativkontrollen.

In den immunhistochemischen Versuchen zeigte sich, dass sowohl die HO-I als auch die HO-II in der Kolonwand exprimiert werden. Besonders im Bereich der Muscularis propria zeigte sich ein deutliches Fluoreszenzsignal für die Hämoxigenase I (Abb. III-10). Im Gegensatz dazu zeigte das gesamte Kolongewebe eine starke Expression von

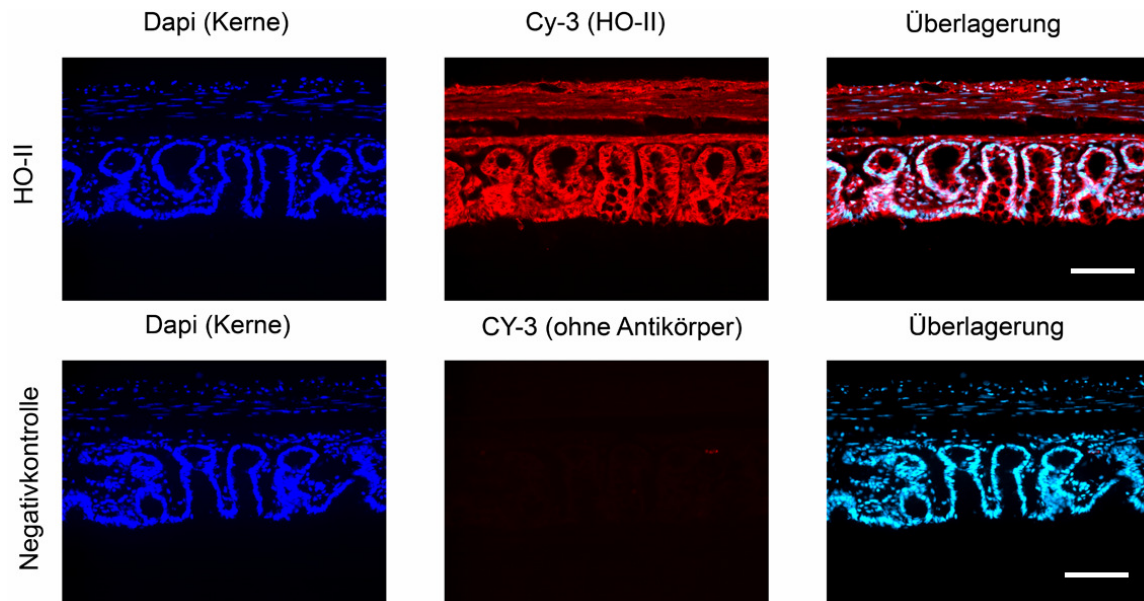
HO-II (Abb. III-11). Der Nachweis dieser beiden Enzyme erlaubt die Schlussfolgerung, dass eine endogene CO-Produktion durch das Kolongewebe der Ratte möglich ist.



**Abb. III-10: Immunhistochemische Markierung der Hämoxigenase I am distalen Kolongewebe der Ratte**

Immunhistochemische Markierung der Hämoxigenase I. *Orientierung im Gewebe: Oben - Serosa + Muscularis Propria. Unten - Mucosa + Oberfläche der Krypten. Mitte - Fundus der Krypten. Obere Reihe:* Versuch mit Primärantikörpern gegen HO-I. *Untere Reihe:* Negativkontrolle ohne Primärantikörper gegen HO-I. **Links:** DAPI-Kernfärbung (blau). **Mitte:** Cy3-Aufnahme für HO-I (rot). **Rechts:** Überlagerung beider Färbungen. Eichbalken = 100 µm. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

### III Ergebnisse

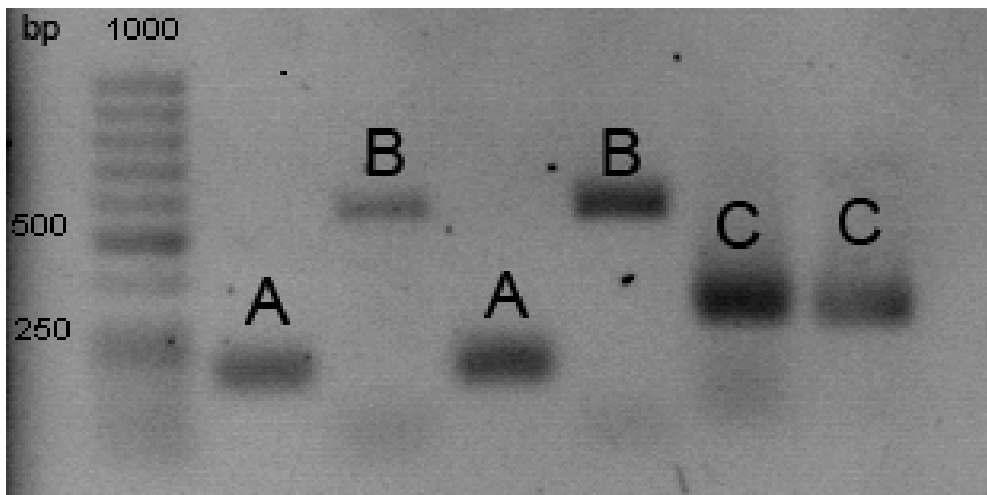


**Abb. III-11: Immunhistochemische Markierung der Hämoxygenase II am distalen Kolongewebe der Ratte**

Immunhistochemische Markierung der Hämoxygenase II. *Orientierung im Gewebe: Oben - Serosa + Muscularis Propria. Unten - Mucosa + Oberfläche der Krypten. Mitte - Fundus der Krypten.* **Obere Reihe:** Versuch mit Primärantikörpern gegen HO-II. **Untere Reihe:** Negativkontrolle ohne Primärantikörper gegen HO-II. **Links:** DAPI-Kernfärbung (blau). **Mitte:** Cy3-Aufnahme für HO-II (rot). **Rechts:** Überlagerung beider Färbungen. Eichbalken = 100  $\mu\text{m}$ . Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 3.2 Molekularbiologischer Nachweis der Hämoxygenase I und II

Um die Spezifität des immunhistochemische Nachweises der Hämoxygenasen mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen, wurde die Existenz beider Enzyme mittels molekularbiologischer Methoden bestätigt. Hierzu wurde die entsprechende mRNA im Rattenkolongewebe detektiert. Das intakte distale Kolon der Ratte wurde für den Nachweis entnommen und aus diesem mittels kommerzieller Kits mRNA gewonnen. Durch eine rtPCR konnte die Expression beider Enzyme bestätigt werden. Sowohl die Hämoxygenase I (Abb. III-12A) mit einer Targetgröße von 200 bp als auch die Hämoxygenase II (Abb. III-12B) mit 540 bp konnten in der intakten distalen Rattenkolonwand nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente hierbei das Enzym GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase; Abb. III-12C) mit einer Targetgröße von 303 bp.

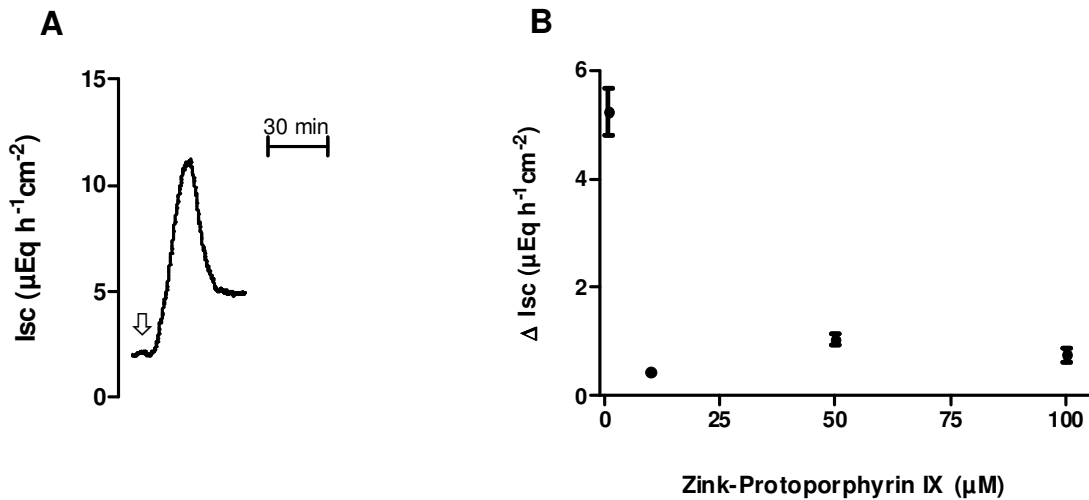


**Abb. III-12: PCR-Nachweis der Hämoxygenase I und II**

rtPCR für HO-I (200 bp; mit „A“ markiert), HO-II (554 bp; mit „B“ markiert) und GAPDH (303 bp; mit „C“ markiert; Kontrolle). Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### **3.3 Einfluss endogener CO-Produktion auf den Ionentransport**

Da in vorangehenden Versuchen das Vorhandensein der Hämoxxygenasen nachgewiesen werden konnte, war es interessant zu ergründen, ob eine endogene Bildung von CO zu der in den Ussingkammer-Versuchen bekannten spontan auftretenden Anionensekretion beitragen könnte. In diesem Fall sollte ein Hemmstoff der Hämoxxygenasen wie z.B. Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP) in der Lage sein, den basalen Kurzschlussstrom abzusenken (Goda et al. 1998). Mit dieser Annahme wurden Versuche durchgeführt, bei denen Zink-Protoporphyrin IX in verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bis  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) appliziert wurde. Hier zeigte sich, dass die Zugabe von Zink-Protoporphyrin IX nicht zu dem erwarteten  $I_{sc}$ -Abfall führte, sondern es im Gegenteil sogar zu einem Anstieg des  $I_{sc}$  kam (Abb. III-13B). Beispielsweise ließ Zink-Protoporphyrin IX in einer Konzentration von  $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  den  $I_{sc}$  signifikant um  $5,24 \pm 0,77 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ansteigen (Abb. III-13A). Diese Reaktion scheint auf einer unspezifischen Wirkung dieses Hemmstoffs auf das Kolongewebe zu beruhen. Daher muss die Frage nach dem Einfluss des endogenen CO auf die spontane Anionensekretion vorerst unbeantwortet bleiben.



**Abb. III-14: Wirkung des HO-Hemmers Zink-Protoporphyrin IX**

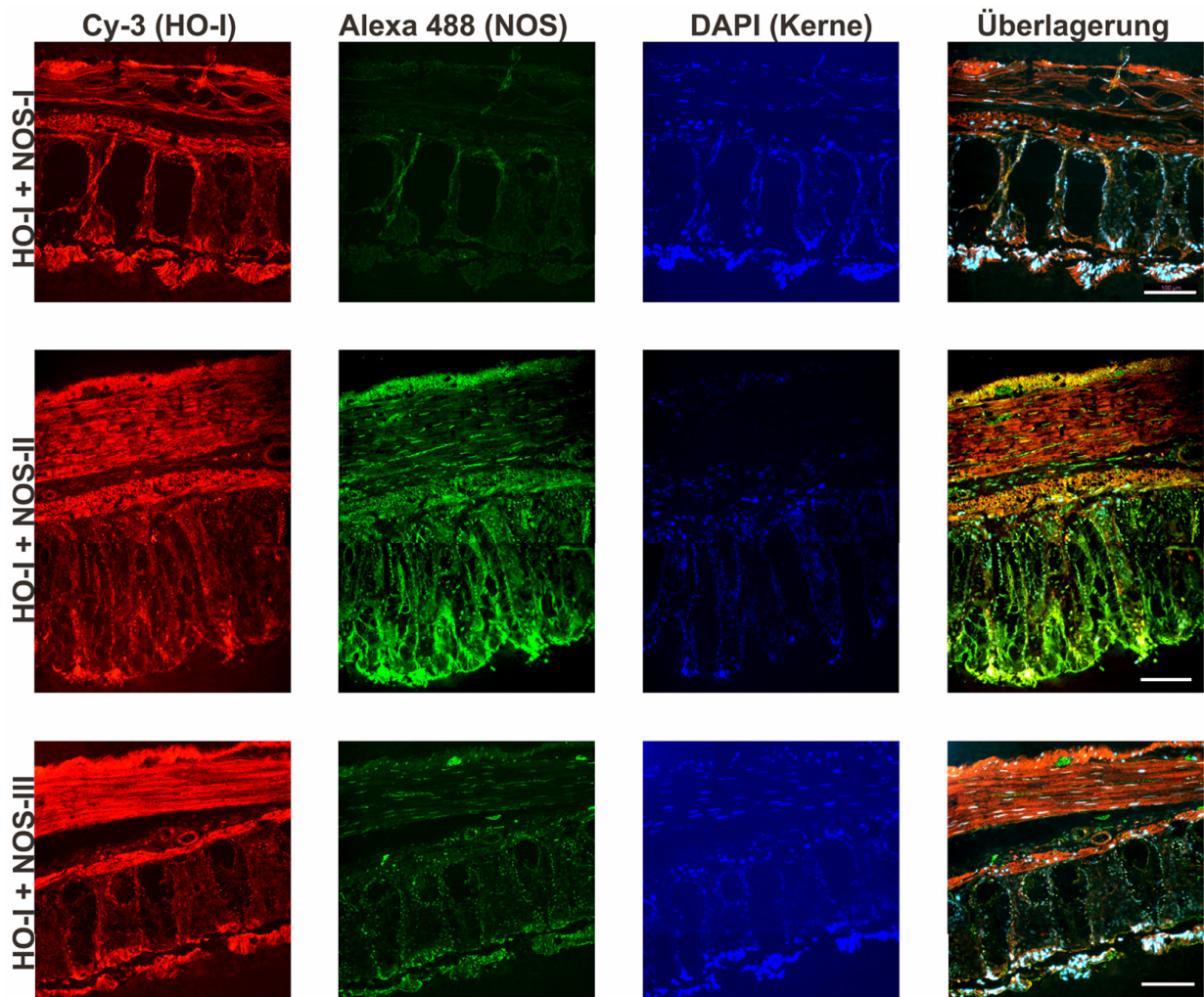
Zink-Protoporphyrin IX als Hemmstoff der Hämoxxygenasen senkt unerwarteter Weise nicht den basalen  $I_{sc}$ , sondern führt zum Anstieg desselben. **A:** Originalkurve für die erste Zugabe von ZnPP der Konzentrationsreihe ( $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von Zink-Protoporphyrin IX (auf der serosalen Seite). **B:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Zink-Protoporphyrin IX. Die Symbole stellen Mittelwerte für die Veränderungen des Kurzschlussstroms ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor der ersten Gabe von Zink-Protoporphyrin IX dar, die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM);  $n = 9$ .

#### 4 Signalkaskade

##### 4.1 Kolokalisation von Hämoxxygenasen und Stickstoffmonoxid-Synthasen

Kohlenstoffmonoxid vermittelt seine Funktion gewebe- und tierartsspezifisch über verschiedene Signalwege, welche bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt sind. Der vermutlich am besten dokumentierte Weg basiert auf seiner Ähnlichkeit zu einem anderen Gasotransmitter, dem Stickstoffmonoxid. Effekte von NO sind hauptsächlich an eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und damit einer gesteigerten Produktion von intrazellulärem cyclischen Guanosin-3',5'-monophosphat gekoppelt (Knowles und Moncada 1994). Diese Beobachtung und dass z.B. im Magen und im Jejunum des Menschen die Hämoxxygenase-II und die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase kolokalisiert sind (Miller et al. 2001), ließ vermuten, dass die in dieser Studie gemessene CO-induzierte Anionensekretion ebenfalls über eine Aktivierung der sGC und eine vermehrte cGMP-Produktion vermittelt wird und bei dieser Reaktion gegebenenfalls CO mit NO interagiert.

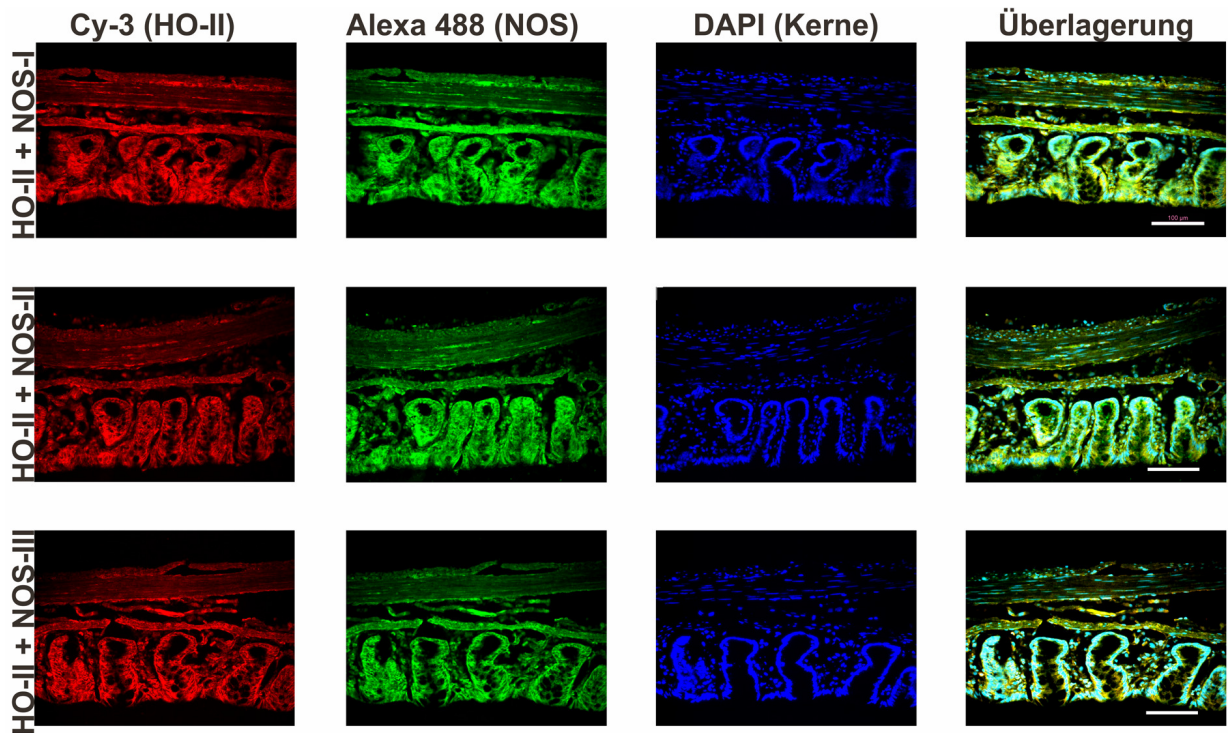
Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden unter anderem immunhistochemische Doppelmarkierungen der Hämoxxygenasen gegen die drei Isoformen der NO-Synthasen durchgeführt (Abb. III-15, 16). Gezeigt werden hier von links nach rechts die Cy3-Färbung für die entsprechende Hämoxxygenase in rot, die Alexa 488-Färbung für die jeweilige NOS-Isoform in grün, die DAPI-Kernfärbung und eine Überlagerung aller Fluoreszenzfarbstoffe. In der Abbildung der Überlagerung ließe eine gelbe Färbung darauf schließen, dass Hämoxxygenase und Stickstoffmonoxid-Synthase in derselben Zelle bzw. an derselben Stelle im Gewebe kolokalisiert sind. Für die HO-I konnte dementsprechend lediglich im Bereich der Serosa des distalen Kolongewebes der Ratte die evtl. Kolokalisation von HO-I und NOS-II ermittelt werden (Abb. III-15). Im Vergleich dazu zeigten die Bilder der HO-II auch für alle drei Isoformen der NOS die mögliche Kolokalisation vor allem im Bereich der Zellen der Muscularis des distalen Rattenkolons, aber auch zu einem geringeren Anteil in Bereich der mucosalen Zellen.



**Abb. III-15: Immunhistochemische Doppelmarkierung von HO-I gegen NOS-I, NOS-II und NOS-III**

Immunhistochemische Doppelmarkierungen der Hämoxygenase I gegen die drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen. *Orientierung im Gewebe: Oben* - Serosa + Muscularis Propria. *Unten* - Mucosa + Oberfläche der Krypten. *Mitte* - Fundus der Krypten. **Obere Reihe:** HO-I gegen NOS-I. **Mittlere Reihe:** HO-I gegen NOS-II. **Untere Reihe:** HO-I gegen NOS-III. **Linke Spalte:** Cy3-Aufnahmen für HO-I (rot). **2. Spalte von links:** Alexa 488-Aufnahmen für NOS-I, NOS-II und NOS-III. **3. Spalte von links:** DAPI-Kernfärbungen (blau). **Rechte Spalte:** Überlagerungen der drei Färbungen. Nur im Bereich der Serosa lässt sich eine Kolokalisation lediglich der HO-I mit der NOS-II vermuten. Eichbalken = 100 µm. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.





**Abb. III-16: Immunhistochemische Doppelmarkierung von HO-II gegen NOS-I, NOS-II und NOS-III**

Immunhistochemische Doppelmarkierungen der Hämoxygenase II gegen die drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen. *Orientierung im Gewebe: Oben* - Serosa + Muscularis Propria. *Unten* - Mucosa + Oberfläche der Krypten. *Mitte* - Fundus der Krypten. **Obere Reihe:** HO-II gegen NOS-I. **Mittlere Reihe:** HO-II gegen NOS-II. **Untere Reihe:** HO-II gegen NOS-III. **Linke Spalte:** Cy3-Aufnahmen für HO-II (rot). **2. Spalte von links:** Alexa 488-Aufnahmen für NOS-I, NOS-II und NOS-III. **3. Spalte von links:** DAPI-Kernfärbungen (blau). **Rechte Spalte:** Überlagerungen der drei Färbungen. Hier lässt sich im Bereich der Muscularis, aber auch der Mucosa eine Kolokalisation der HO-II mit allen drei NOS-Isoformen vermuten. Eichbalken = 100 µm. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

#### 4.2 Der CO-Effekt ist unabhängig von einer sGC-Aktivierung

Seit einiger Zeit weiß man, dass Kohlenstoffmonoxid in manchen Geweben, ähnlich wie Stickstoffmonoxid, seine Wirkung über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und damit einer Stimulation der intrazellulären Produktion von cyclischem Guanosinmonophosphat vermitteln kann (Gibbons und Farrugia 2004). Zu diesen Geweben zählt beispielsweise das Blutgefäßsystem (Ramos et al. 1989, Morita et al. 1995, Morita et al. 1997, Wang et al. 1997) und Neurone des olfaktorischen Nervengewebes (Verma et al. 1993, Ingi und Ronnet 1995).

Ob es sich bei der CORM-2-induzierten Anionensekretion auch um eine Reaktion handelt, die über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und Produktion von cGMP vermittelt wird, wurde in Ussingkammer-Experimenten untersucht. ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on) ist ein Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase (Garthwaite et al. 1995). Applikation von ODQ ( $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen und der mucosalen Seite) führte zu keiner wesentlichen Veränderung des von CORM-2-induzierten ( $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite)  $I_{sc}$ -Anstiegs. Auch die Stimulation dieses Enzyms mit dem NO-unabhängigen Aktivator der löslichen Guanylatcyclase (Wu et al. 1995), YC-1 ( $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen und der mucosalen Seite), hatte keinen Effekt auf den von CORM-2-induzierten  $I_{sc}$ -Anstieg (Tabelle III-1). Daraus schlussfolgernd scheint es für die von Kohlenstoffmonoxid bewirkte Anionensekretion im distalen Kolon der Ratte eine andere Art der Signalvermittlung zu geben.

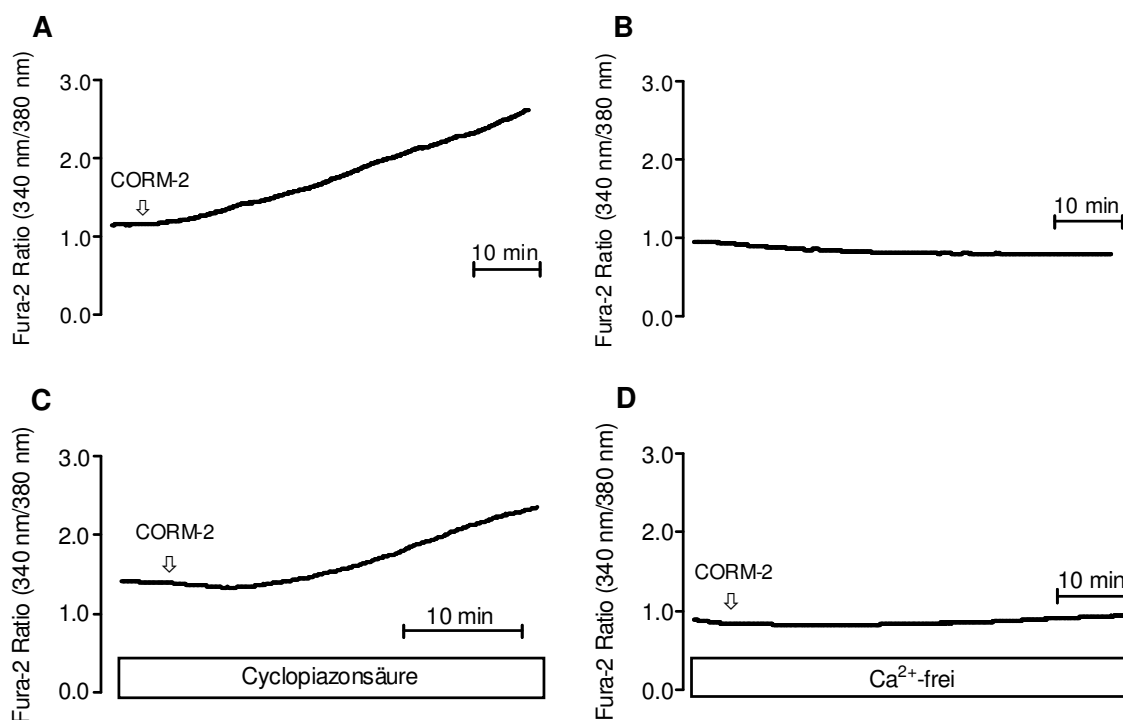
**Tabelle III-1: Sensitivität der CORM-2-Antwort auf Hemmung und Stimulation des cGMP-Weges**

Eingesetzter Hemmstoff	$\Delta I_{sc}$ mit Hemmstoff ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$\Delta I_{sc}$ ohne Hemmstoff ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
ODQ	$0,44 \pm 0,12$	$0,53 \pm 0,073$
YC-1	$1,09 \pm 0,19$	$1,13 \pm 0,21$

Gemessen wurden der  $I_{sc}$ -Anstieg nach CORM-2-Zugabe ( $3,5\cdot 10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> auf der serosalen Seite) in Anwesenheit (mittlere Spalte) oder in Abwesenheit (rechte Spalte) von ODQ ( $2\cdot 10^{-5}$  mol·l<sup>-1</sup> auf der serosalen und der mucosalen Seite) oder YC-1 ( $10^{-5}$  mol·l<sup>-1</sup> auf der serosalen und der mucosalen Seite). Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor der CORM-2-Applikation dar; n = 6 – 7.

#### 4.3 CORM-2 bewirkt einen Anstieg der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Ein second messenger, der zentral an der intrazellulären Regulation des Ionentransports durch das Darmepithel beteiligt ist, ist Ca<sup>2+</sup> (Binder und Sandle 1994). Um zu überprüfen, ob Kohlenstoffmonoxid seine Wirkung über eine Interaktion mit der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration vermittelt, wurden Ca<sup>2+</sup>-Imagingversuche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 durchgeführt. Veränderungen der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration können durch unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten in Imagingversuchen mit Fura-2 sichtbar und messbar gemacht werden. Dafür wurden isolierte Dickdarmkrypten (Kap.II-6.2) mit diesem Fluoreszenzfarbstoff aufgeladen und ihre Reaktion auf die Anwesenheit des CO-Donors im umgebenden Medium untersucht. CORM-2 löste einen Anstieg der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aus (Abb. III-17A). Dreißig Minuten nach der Applikation des CO-Donors ( $2\cdot 10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup>) konnte ein Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals von  $1,16 \pm 0,06$  auf  $1,80 \pm 0,12$  (n = 70, P < 0,05) gemessen werden. Im Vergleich dazu wurden zeitabhängige Kontrollen ohne Applikation des CO-Donors durchgeführt, in denen dieser Anstieg nicht beobachtet wurde (Abb. III-17B).



**Abb.III-17: Veränderungen der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch CORM-2**

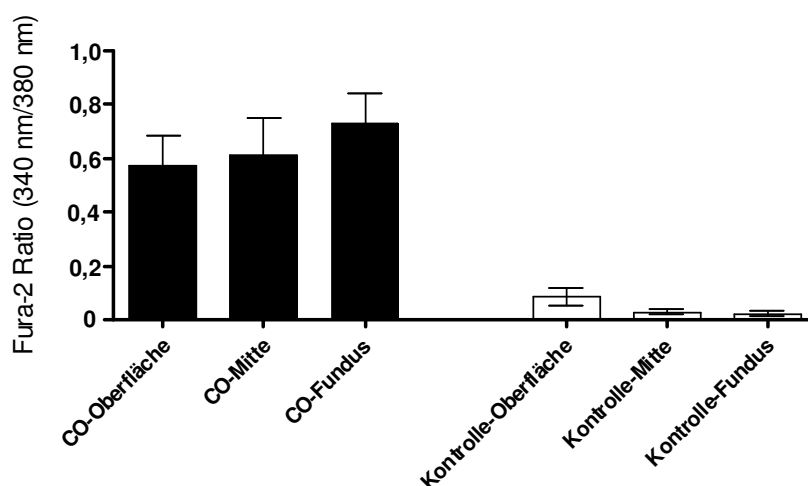
Fura-2-Imaging-Messungen mit Kohlenstoffmonoxid an isolierten Krypten des Dickdarms der Ratte. **A:** Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration induziert von CORM-2 ( $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe). **B:** Zeitabhängige Kontrolle ohne Zugabe von CORM-2. **C:** Wirkung von CORM-2 ( $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe) in Anwesenheit von Cyclopiazonsäure ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) unverändert. **D:** In Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer wird der CORM-2-Effekt auf die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nahezu vollständig gehemmt. Gemessen wurde die Emission mit einer Exzitations-Wellenlänge von 340 nm dividiert durch die Emission mit einer Exzitations-Wellenlänge von 380 nm. Die Daten sind als gemittelte Kurven dargestellt; n = 70 - 72.

Veränderungen der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration können entweder durch eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern oder über einen Einstrom von Ca<sup>2+</sup> aus dem Extrazellularraum bedingt sein. Um diese beiden Möglichkeiten voneinander zu unterscheiden, wurden Versuche mit Cyclopiazonsäure (CPA), einem Hemmer der sarcoplasmatisch-endoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Goeger et al. 1988) oder mit einer Ca<sup>2+</sup>-freien Pufferlösung durchgeführt. In Gegenwart von CPA ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), welches zu einer Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher führt, war die Wirkung von CORM-2 ( $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) auf die cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration unverändert (Abb. III-17C). Das Fura-2-Ratio-Signal stieg in Gegenwart von CPA von  $1,41 \pm 0,08$  auf

$2,40 \pm 0,14$  ( $n = 67$ ,  $P < 0,05$ ), was nicht signifikant geringer war als der Anstieg unter Kontrollbedingungen, d.h. in Abwesenheit von CPA.

Im Gegensatz dazu war die Antwort auf CORM-2 in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer praktisch komplett unterdrückt (Abb. III-17D). Der cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg scheint demnach auf einem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und nicht auf einer Freisetzung aus intrazellulären Speichern zu beruhen.

Betrachtet man die Entwicklung von Epithelzellen im Dickdarm, kann man an Hand von Entwicklungsstadium und Funktion verschiedene Zellstadien unterscheiden. Neue Epithelzellen werden am Fundus der Krypten generiert. Im Verlauf ihrer Evolution wandern diese Zellen vom Fundus über die Mitte zur Oberfläche der Krypten und verändern hierbei gleichzeitig ihre Funktion von anfänglich vorwiegend Sekretion zu überwiegender Resorption (Böhme et al. 1991, Köckerling und Fromm 1993, Köckerling et al. 1993). Daher war es interessant zu untersuchen, ob die Zellen der unterschiedlichen Kryptenbereiche auf die Gabe von Kohlenstoffmonoxid auch unterschiedlich reagieren würden. Für die Zellen des Fundus, der Mitte und der Oberfläche der Krypten konnten in der Intensität der Reaktion jedoch kaum Unterschiede ermittelt werden (Abb. III-18).

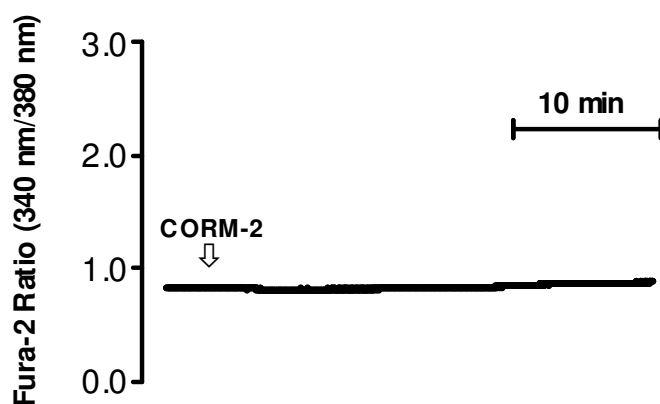


**Abb. III-18: Vergleich CO-Antwort der Zellen entlang der Kryptenachse**

Bestimmung der Fura-2-Ratio der Zellen der Oberfläche (jeweils erster Balken), der Mitte (jeweils mittlerer Balken) und des Fundus (jeweils dritter Balken) nach Applikation von CORM-2 ( $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; schwarze Balken) und in zeitabhängigen Kontrollversuchen ohne CORM-2 (weiße Balken);  $n = 22-24$ .

#### 4.4 Veränderungen der cytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an intakten Häutchenpräparaten des Plexus submucosus durch CORM-2

Die unter Kapitel III-2 beschriebenen Versuche mit dem Neurotoxin Tetrodotoxin führten zu der Annahme, dass enterische Neurone an der Vermittlung der CO-induzierten Anionensekretion beteiligt sind. In  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimenten sollte überprüft werden, ob Kohlenstoffmonoxid auch in enterischen Neuronen Veränderungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auslöst. Dazu wurden intakte Häutchenpräparate des Plexus submucosus angefertigt (Kap. II-6.3) und in Standard-Tyrodellösung (Kap. II-2.2.3) superfundiert, bis sich eine stabile Baseline des Fura-2-Signals einstellte. Daraufhin folgte die Zugabe des CO-Donors ( $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). In verschiedenen Versuchen an insgesamt 43 Neuronen konnte bis 30 min nach Zugabe von CORM-2 keine signifikante Veränderung des Fura-2-Ratio-Signals festgestellt werden (Abb. III-19). Das Fura-2-Ratio-Signal stieg lediglich von  $0,83 \pm 0,02$  auf  $0,91 \pm 0,01$  ( $n = 43$ ; nicht signifikant) an.



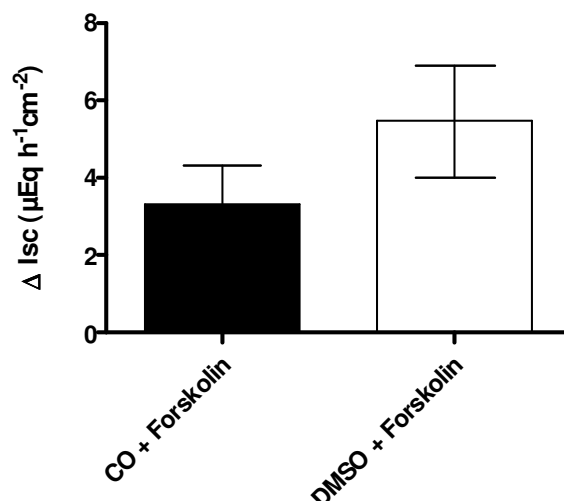
**Abb.III-19: Veränderungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch CORM-2 am Plexus submucosus der distalen Ratten-Kolons**

Fura-2-Imaging-Messungen mit CORM-2 an intakten Häutchenpräparaten des Plexus submucosus des Dickdarms der Ratte. CORM-2 ( $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe) induziert innerhalb 30 min einen unwesentlichen Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals um  $0,08 \pm 0,01$ . Gemessen wurde die Emission mit einer Exzitations-Wellenlänge von 340 nm dividiert durch die Emission mit einer Exzitations-Wellenlänge von 380 nm. Die Daten sind als gemittelte Kurve dargestellt;  $n = 43$ .

#### 4.5 Interaktionen von CORM-2 mit Sekretagogen

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoffmonoxid, freigesetzt aus dem CO-Donor CORM-2 an distalem Rattenkolongewebe eine Sekretion von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  bewirkt. Andere Gasotransmitter, wie z.B. NO können an diesem Gewebe ebenfalls eine Sekretion auslösen (Schultheiss et al. 2002b). Außerdem hat NO einen Einfluss auf den Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und cAMP-abhängigen Sekretagoga, wie z.B. Studien an Kolongewebe von Mäusen zeigen konnten (Freeman und MacNaughton 2004).

Daher war es interessant herauszufinden, ob auch CO in Form von CORM-2 in der Lage ist, mit typischen  $\text{Ca}^{2+}$ - oder cAMP-abhängigen Sekretagogen zu interagieren. Hierfür wurden Ussingkammer-Versuche durchgeführt, bei denen der Applikation von CORM-2 ( $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf serosaler Seite) die Zugabe von Forskolin ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der mucosalen und der serosalen Seite), einem Aktivator der Adenylatcyclase (Seamon et al. 1981), folgte. Nach jeder CORM-2-Zugabe bzw. der DMSO-Zugabe in den Kontrollversuchen wurde das Erreichen einer über 3 Minuten stabilen Baseline abgewartet und ohne Waschschrift Forskolin appliziert. Der Abstand zwischen CORM-2- und Forskolin-Gabe betrug dabei ca. 30 Minuten. Forskolin verursachte nach CORM-2 einen Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  von  $3,32 \pm 1,01 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  im Vergleich zur vorher ermittelten dreiminütigen Baseline ( $n = 13$ ). In Kontrollversuchen ohne CORM-2 (mit DMSO) führte Forskolin zu einem Ansteigen des  $I_{\text{sc}}$  von  $5,48 \pm 1,46 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  im Vergleich zur vorher ermittelten dreiminütigen Baseline ( $n = 12$ ) (Abb. III-20). Der Unterschied zwischen Versuch und Kontrolle war nicht signifikant. Somit scheint CORM-2 keinen nennenswerten Einfluss auf die durch cAMP- ausgelöste Sekretion zu haben.

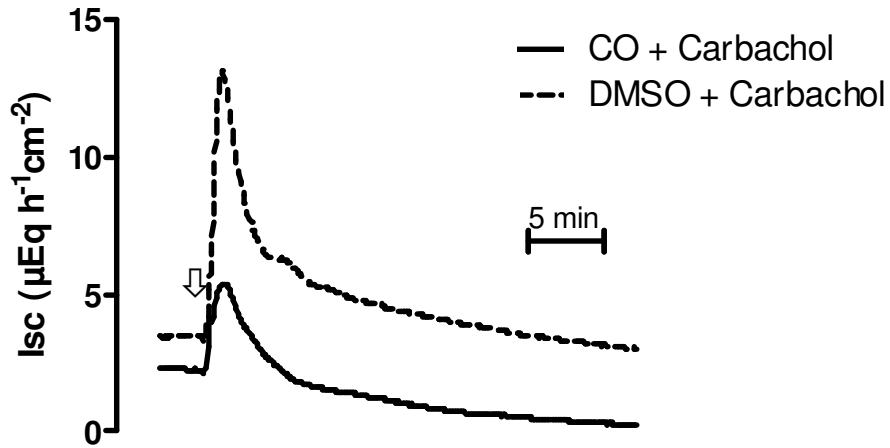


**Abb. III-20: Einfluss von CORM-2 auf Forskolin-induzierte Sekretion**

Die vorherige Applikation von CORM-2 ( $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf serosaler Seite) am distalen Rattenkolon hat keinen signifikanten Effekt auf die durch Forskolin ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der mucosalen und der serosalen Seite) induzierte Sekretion. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor der Forskolin-Applikation dar. Die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM);  $n = 12$ .

Um den Einfluss von CORM-2 auf  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Sekretagoga zu untersuchen, wurde Carbachol ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite), ein stabiles Acetylcholinderivat (Lindqvist und Sharp 1998, Starke 2001), nach CORM-2 eingesetzt. In diesen Versuchen führte Carbachol zu einem Anstieg des  $I_{sc}$  von  $3,61 \pm 0,33 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  nach CORM-2 im Vergleich zu einem  $I_{sc}$ -Anstieg von  $10,06 \pm 1,27 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  in den Kontrollversuchen ohne CORM-2 ( $n = 7$ ;  $P < 0,05$ ) (Abb. III-21). Diese hemmende Wirkung von CORM-2 war nicht unerwartet, da CORM-2 wie in den Versuchen mit isolierten Krypten gezeigt einen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auslöst (Abb. III-17). Aus anderen Studien weiß man, dass es nach wiederholter Applikation von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Sekretagogen zu einer Down-Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs kommen kann (Schultheiss und Diener 2005). Die Mechanismen, die zu dieser Down-Regulation führen, sind bis heute noch nicht vollständig bekannt.





**Abb. III-21: Einfluss von CORM-2 auf die Carbachol-induzierte Sekretion**

Anstieg des Kurzschlussstroms infolge Carbacholapplikation ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite) mit und ohne Vorbehandlung mit CORM-2 ( $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  auf der serosalen Seite). Die durchgezogene Linie steht für den Versuch mit dem CO-Donor, die gestrichelte Linie für den Kontrollversuch, indem lediglich das Lösungsmittel DMSO appliziert wurde. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von Carbachol. Die Daten sind als gemittelte Kurven dargestellt;  $n = 7$ .

### IV Diskussion

#### 1 CORM-2-induzierter Anstieg des Kurzschlussstroms

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der CO-Donor CORM-2 (Tricarbonyldichlorruthenium-II-dimer) einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ), einem Maß für den Netto-Ionentransport durch das Epithel, an Mucosa-Submucosa-Präparaten des distalen und proximalen Rattenkolons verursacht (Abb. III-1). Besonders ausgeprägt war der Anstieg des  $I_{sc}$  an Präparaten aus dem distalen Kolon. Daher beziehen sich alle folgenden Experimente auf das distale Kolon. Die statistische Analyse mit Hilfe nonlinearer Regression ergab eine höhere Sensitivität für die serosale Applikation von CORM-2 im Vergleich zur mucosalen Applikation, weshalb die serosale Applikationsart für alle nachfolgenden Experimente verwendet wurde.

Ein maximaler CORM-2-Effekt wurde mit einer Konzentration von  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  erreicht. Motterlini et al. konnten 2002 zeigen, dass der in meiner Studie verwendete CO-Donor in der Lage ist, etwa 0,7 mol CO pro mol CORM-2 freizusetzen. Damit ähnelt die in meiner Arbeit verwendete Konzentration an CO derjenigen in Studien, in denen mit gasförmigen CO gearbeitet wurde. So führte CO in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  CO zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^{+}$ -Kanälen in glatten Gefäßmuskelzellen isoliert aus der Schwanzarterie von Ratten (Wang und Wu 1997). In thorakalen Kaninchen-Aorten induzierte die Applikation von  $2 - 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  CO eine maximale Vasodilatation (Furchgott und Jothianandan 1991).

Ein Vergleich dieser Konzentrationen mit physiologisch im Körper auftretenden CO-Konzentrationen scheitert an der hohen Affinität dieses Gases, an Häm zu binden. Dies wird besonders durch Messungen deutlich, die an Hämoglobin vorgenommen wurden. Bei gesunden männlichen Nichtrauchern liegen z.B. bereits 0,4 – 0,7 % der 8 – 11  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Hämoglobin des Blutes in Form von Carboxyhämoglobin (CO-Hb) vor (Stewart 1975). Im Gegensatz dazu sind es bei Rauchern 5 – 6 % CO-Hb, abhängig von der Intensität des Rauchens sogar bis zu 20 % CO-Hb (Turner et al. 1977). Dadurch ist es praktisch unmöglich, freies CO in vivo im Plasma oder auch lokal im Gewebe, also beispielsweise in der Kolonwand, zu messen und mit den von mir eingesetzten Konzentrationen zu vergleichen.

Die hier erhobenen Daten weisen einen Einfluss von CORM-2 auf den Ionentransport im Kolon nach. Um auszuschließen, dass dieser Effekt nicht vom Trägerstoff selbst ausgelöst wurde, wurden Versuche mit inaktiviertem bzw. „CO-freiem“ CORM-2 durchgeführt. Das Prozedere für die Inaktivierung des CO-Donors (siehe Kap. II-4) wurde 2008 von Sun et al. beschrieben. Mit dem „CO-freien“ CO-Donor konnten keine signifikante Veränderung des  $I_{sc}$  ausgelöst werden. Somit ist der von CORM-2 verursachte Effekt auf den Ionentransport ursächlich durch die Freisetzung von CO ausgelöst und nicht durch den Trägerstoff selbst bedingt.

### **2 CORM-2 induziert eine Anionensekretion am distalen Kolon der Ratte**

CORM-2 induziert einen Anstieg des  $I_{sc}$ , dem sowohl eine Sekretion von  $Cl^-$  als auch von  $HCO_3^-$ -Ionen unterliegt. Substitution jeweils eines dieser Ionen mit einem impermeablen Ion (Substitution von  $Cl^-$  durch Gluconat bzw. von  $HCO_3^-$  durch HEPES) führte zu keinen wesentlichen Veränderungen des CO-Effekts. Erst durch den Ersatz von sowohl  $Cl^-$  als auch  $HCO_3^-$  mit Hilfe von impermeablen Anionen wurde der von CORM-2-induzierte Effekt nahezu vollständig aufgehoben (Abb. III-3). Die Tatsache, dass die Sekretion von  $Cl^-$ -Ionen und von  $HCO_3^-$ -Ionen getragen wird, war insofern nicht unerwartet, da apikale Anionenkanäle wie z.B. der CFTR-Kanal, einer der wichtigsten Anionenkanäle der apikalen Zellmembran, in der Lage sind, sowohl  $Cl^-$ -Ionen als auch  $HCO_3^-$ -Ionen aus der Zelle zu transportieren (Greger 2000). Der CFTR-Kanal ist an der von CORM-2-induzierten Anionensekretion beteiligt, wie Versuche mit Glibenclamid, einem Blocker des CFTR, belegen (Abb. III-4). Inhibitionsversuche mit Blockern von Ionentransportern in der basolateralen Membran bestätigten, dass die gemessene Anionensekretion von der Aufnahme von  $Cl^-$ - und von  $HCO_3^-$ -Ionen abhängig ist. Bumetanid, ein Blocker des basolateralen  $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporters (NKCC1; Kaplan et al. 1996), das ist der Haupttransportweg für die basolaterale  $Cl^-$ -Ionenaufnahme (Binder und Sandle 1994), erwies sich allein appliziert als praktisch unwirksam auf den CO-Effekt. Ebenso konnte SITS – ein Hemmer des basolateralen  $Cl^-HCO_3^-$ -Austauschers (Schultheiss et al. 1998) - die CORM-2-Antwort allein appliziert kaum beeinflussen. Wurden diese beiden Transportmechanismen jedoch zusammen ausgeschaltet, so war der CO-induzierte  $I_{sc}$  signifikant vermindert (Abb. III-4). Sowohl der  $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporter als auch

der  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Austauscher spielen demnach eine tragende Rolle für die Auslösung der CORM-2-Antwort, indem sie für eine Aufnahme von Anionen auf der basolateralen Seite sorgen.

### **3 Einfluss von CORM-2 auf die apikale Membran**

Der Anstieg des Kurzschlussstroms, den der CO-Donor verursacht, kann prinzipiell auf Veränderungen von Ionenleitfähigkeiten in der apikalen und/oder der basolateralen Membran beruhen, da diese wie bereits erwähnt (Kap. II-7.1; Abb. II-2) in Reihe geschaltet sind. Um zu untersuchen, welche Wirkungen CORM-2 auf die Membranen im Einzelnen hat, wurde jeweils eine von ihnen in den weiterführenden Experimenten ausgeschaltet.

Da die basolaterale Membran eine hohe  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit besitzt, kann diese durch die Verwendung eines Puffers mit einer hohen Konzentration an  $\text{K}^+$ -Ionen auf der basolateralen Seite elektrisch ausgeschaltet werden. Dadurch wird das  $\text{K}^+$ -Diffusionspotential, das normalerweise das Potential an der basolateralen Membran dominiert, auf Werte gegen null depolarisiert und gleichzeitig der Membranwiderstand durch das hohe Angebot an permeablen Ionen sehr gering, so dass der  $I_{sc}$  praktisch nur noch vom Ionentransport durch die apikale Membran bestimmt wird (Fuchs et al. 1977). Gleichzeitig ermöglichte die Verwendung eines  $\text{Cl}^-$ -freien Puffers auf der apikalen Seite die Errichtung eines von serosal-zu-mucosal-gerichteten  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationsgradienten, der als Antriebskraft für einen apikal gerichteten  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom diente (Schultheiss und Diener 1997). So konnten direkte Messungen von transepithelialen  $\text{Cl}^-$ -Strömen über die apikale Membran durchgeführt werden.

Der CO-Donor CORM-2 stimulierte unter diesen Bedingungen  $\text{Cl}^-$ -Ströme durch die apikale Membran (Abb. III-6A). Diese Ströme wurden durch NPPB, einem Anionenkanalblocker (Diener und Rummel 1989), signifikant gehemmt (Abb. III-6B). Ebenso führte die Blockade von apikalen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Kanälen (Hennig et al. 2008) durch das Stilbenderivat SITS zur Reduzierung der CORM-2-Antwort (Abb. III-6C). Zusammenfassend kann man sagen, dass der in dieser Studie von CORM-2-induzierte Anstieg des  $I_{sc}$  von einer Anionensekretion über apikale Anionenkanäle getragen wird, welche den Ausstrom sowohl von  $\text{Cl}^-$ - als auch von  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen ermöglichen. Beteiligt sind hierbei sowohl der CFTR-Kanal, der dominierende  $\text{Cl}^-$ -

Kanal der apikalen Membran (Greger 2000), als auch wahrscheinlich apikale, Stilbensensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Cl}^-$ -Kanäle.  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Cl}^-$ -Kanäle sind in der apikalen Membran des Rattenkolons funktionell nachgewiesen (Hennig et al. 2008). Ihr physiologischer Beitrag zur  $\text{Cl}^-$ -Sekretion ist allerdings im Vergleich zum CFTR-Kanal als eher gering einzustufen, da  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Cl}^-$ -Ströme nur dann gemessen werden können, wenn die vorherrschende Wirkung von cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  auf  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Ströme durch die Verwendung von hohen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen im umgebenden Puffer gehemmt wird (Schultheiss et al. 2005). Interessanterweise wird die Aktivierung dieser Leitfähigkeit von einem Blocker der NO-Synthasen gehemmt (Hennig et al. 2008).

#### **4 Einfluss von CORM-2 auf die basolaterale Membran**

Um zu ergründen, ob CORM-2 auch auf Ionenkanäle in der basolateralen Membran Einfluss nimmt, wurde die apikale Membran durch das Ionophor Nystatin permeabilisiert und somit ausgeschaltet. Nystatin ist ein Polyen-Makrolacton, welches aus dem Actinobacterium *Streptomyces noursei* gewonnen wird und als Antimykotikum Anwendung findet. Durch Anlagerung von Polyen-Makrolactonen an Cholesterin in der Lipidmembran von Säugerzellen oder Ergosterin in der Zellwand von Pilzen kommt es zu einer Auflockerung des Phospholipidverbands und damit zur Erhöhung der Permeabilität dieser Membranen (Stahlmann und Lode 2001). Je nach Anwendungsseite und -dauer von Nystatin verursacht es daher an Epithelien in der Ussingkammer die Permeabilisierung der apikalen und/oder der basolateralen Membran. Im Ussingkammer-Experiment löst es dadurch einen schnellen Anstieg des  $I_{sc}$  aus, dem ein zeitabhängiger spontaner Abfall folgt (Schultheiss und Diener 1997). Unter diesen Versuchsbedingungen führte die Applikation von CORM-2 zu einer kurzzeitigen Unterbrechung des erwarteten  $I_{sc}$ -Abfalls durch einen vorübergehenden Anstieg des  $I_{sc}$  (berechnet durch lineare Regression; Abb. III-8A). Da diese Versuche in Anwesenheit eines  $\text{K}^+$ -Gradienten und in Abwesenheit von mucosalem  $\text{Na}^+$  durchgeführt wurden, konnte eine Beteiligung der basolateralen  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe an dem ermittelten Effekt ausgeschlossen werden. Daher muss dieser Effekt von basolateralen  $\text{K}^+$ -Kanälen getragen werden. Hemmung derselben mit  $\text{Ba}^+$ -Ionen führt zwar zu einem verringerten  $I_{sc}$ -Anstieg (Abb. III-8B), jedoch erwies sich dieses

Ergebnis als statistisch nicht signifikant. Ba<sup>+</sup>-Ionen wirken als Blocker von sehr vielen verschiedenen Typen von K<sup>+</sup>-Kanälen (Latorre und Miller 1983).

### **5 Beteiligung von sekretomotorischen Neuronen am CO-Effekt**

Von enterischen Neuronen, welche nahezu alle Funktionen des gastrointestinalen Traktes unabhängig vom ZNS regulieren können, weiß man, dass sie in der Lage sind, CO endogen herzustellen. So wurde z.B. die Hämoxxygenase II im menschlichen Plexus myentericus (Miller et al. 2001) sowie im Plexus myentericus und Plexus submucosus des Ileums von Ratten (Donat et al. 1999) nachgewiesen. Es wird vermutet, dass die Aktivität der HO-II in den Neuronen an die cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gekoppelt ist. Die HO-II-Aktivität steigt bei neuronaler Erregung über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der Caseinkinase 2 (CK2), welche eine Phosphorylierung von HO-II an einem Serin-Rest zur Folge hat (Boehning und Snyder 2003). Daher wäre es möglich, dass neuronal produziertes CO Einfluss auf epitheliale Prozesse nimmt.

Der hier beschriebene CO-Effekt und die mögliche endogene CO-Produktion ließen die Frage aufkommen, ob CO auch als Modulator von neuronalen Funktionen unter physiologischen Bedingungen fungiert. Daher wurde die Antwort von CORM-2 in Gegenwart von Tetrodotoxin untersucht. Dieses Neurotoxin hemmt spannungsabhängige Na<sup>+</sup>-Kanäle und damit die Ausbildung von Aktionspotentialen (Catterall 1980). In Gegenwart von Tetrodotoxin war die CO-Antwort um mehr als 50 % vermindert (Abb. III-9). Allerdings ließ sich die Hemmung, die Tetrodotoxin verursachte, nicht durch eine Blockade von muscarinergen Acetylcholinrezeptoren mittels Atropin oder von nikotinergen Rezeptoren mittels Hexamethonium (siehe Starke 2001 für die verwendeten Inhibitoren) nachahmen. Daher scheint die Beteiligung der enterischen Neurone an der CORM-2 induzierten Anionensekretion auf einer Aktivierung von nicht cholinergen Neuronen zu beruhen. Enterische Neurone scheinen also nicht nur als Produzenten von CO zu fungieren, sondern können zusätzlich auch als Ziele für diesen Gasotransmitter dienen.

Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Versuche mit Fura-2 ergaben, dass die Beteiligung von sekretomotorischen Neuronen am CO-Effekt nicht durch Interaktionen mit der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in Neuronen verursacht wird (Abb. III-19).

Aktionspotentiale von Neuronen lösen durch das Öffnen spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aus. Da dies nicht beobachtet wurde (Abb. III-19), kommt es demnach in Gegenwart von CO nicht zu einer vermehrten Ausbildung von Aktionspotentialen. Als Erklärung für die partielle Tetrodotoxin-Sensitivität käme daher eine prä- oder postsynaptische Beeinflussung sekretomotorischer Neurone durch CORM-2 in Frage. Genaue Kenntnisse über die Art und Weise dieses Mechanismus fehlen jedoch bislang.

### **6 Endogene Produktion von CO**

Diverse Studien konnten bislang die Möglichkeit der endogenen CO-Bildung in verschiedenen Geweben nachweisen. Für den Prozess der CO-Bildung sind die sog. Hämoxygenasen verantwortlich. Sie katalysieren den Abbau des Häms und lassen dabei CO, Biliverdin und Eisen entstehen (Maines 1997, Gibbons und Farrugia 2004). Häme sind eisenhaltige Porphyrinkomplexe mit zentralem Eisenion, die sich anhand ihrer funktionellen Gruppen unterscheiden lassen. Im allgemeinen Sprachgebrauch wird das Fe-Protoporphyrin IX als Häm b oder auch nur als Häm bezeichnet. Dieser Komplex existiert in Verbindung mit verschiedenen Proteinen in Form von Hämoproteinen in allen Zellen und Geweben des Säugetier-Organismus, inklusive des Nerven- und Immunsystems, des kardiovaskulärem Gewebes und des Gastrointestinaltrakts (Maines 1997). Zu den Hämoproteinen gehören das als roter Blutfarbstoff bekannte Hämoglobin, das Myoglobin, aber auch Enzyme wie Katalase, Succinat-Dehydrogenase, Cytochrom-c-Reduktase, Cyclooxygenase und Cytochrom P450. Freies Häm findet man nicht in normalem Gewebe, es wird nur unter pathologischen Bedingungen angereichert (Maines 1997). Der Begriff des „freien Häms“ wird jedoch für den Zustand des Moleküls verwendet, bevor es mit den entsprechenden Proteinen einen Komplex bildet. Alle Hämoproteine können als „Quelle“ von Häm dienen, welches mit Hilfe der Hämoxygenasen in seine Bestandteile zerlegt wird.

Es existieren drei Isoformen der Hämoxygenasen (HO-I, HO-II, HO-III), die den Häm-Abbau katalysieren, wobei die HO-III nur eine untergeordnete Rolle für die endogene CO-Produktion spielt (Hayashi et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression der Hämoxygenase I und II am Rattenkolon nachgewiesen

werden. Beide Enzyme konnten sowohl mit Hilfe von immunhistochemischen Markierungen als auch molekularbiologisch mittels PCR im distalen Kolon der Ratte nachgewiesen werden (Abb. III-10, 11, 12). In der immunhistochemischen Darstellung scheint die HO-II dabei im gesamten Kolongewebe exprimiert zu werden, wohingegen die HO-I vor allem in der Muscularis lokalisiert ist. Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass eine endogene Produktion von CO im Kolongewebe der Ratte möglich ist.

Die isolierte Mucosa des Rattenkolons zeigt *in vitro* eine spontane Cl<sup>-</sup>-Sekretion (Strabel und Diener 1995), ausgelöst durch eine spontane Aktivität von submucösen sekretomotorischen Neuronen (Andres et al. 1985) oder auch eine spontane Freisetzung von Prostaglandinen, die wiederum in der direkten Beeinflussung des Epithels oder indirekt in einer Aktivierung der sekretomotorischen Neurone resultiert (Diener et al. 1988). Um zu überprüfen, inwieweit eine endogene Produktion des prosekretorisch wirkenden Gasotransmitters CO am Zustandekommen dieser spontanen Sekretion beteiligt ist, wurden Versuche mit Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP) durchgeführt. Diese Substanz ist in der Lage, die Hämoxxygenasen zu hemmen (Goda et al. 1998) und sollte so zu einer Absenkung des basalen I<sub>sc</sub> im Ussingkammer-Experiment führen. Ergebnis der Applikation verschiedener Konzentration von ZnPP war jedoch nicht die Absenkung, sondern sogar ein Anstieg des I<sub>sc</sub> (Abb. III-13), was vermutlich auf einer unspezifischen Wirkung des Hemmstoffs selbst beruht. Somit kann zum derzeitigen Zeitpunkt keine Aussage über die mögliche Beteiligung einer endogenen CO-Produktion an der spontanen Anionensekretion getroffen werden.

### **7 Signalkaskade**

#### **7.1 sGC/cGMP-Signalkaskade ist nicht am CO-Effekt beteiligt**

Für die Vermittlung der verschiedenen Funktionen von Kohlenmonoxid in und an den unterschiedlichen Organen sind bislang mehrere mögliche Signalwege bekannt (Gibbons und Farrugia 2004). Einer der am detailliertesten dokumentierten Wirkmechanismen basiert auf seiner Ähnlichkeit zu einem anderen Gasotransmitter – dem Stickstoffmonoxid. Dessen Wirkung beruht im Allgemeinen auf der Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und damit der vermehrten Produktion des intrazellulären second messengers cGMP (Knowles und Moncada 1994). Im Kolon der



Ratte führt NO zu einer starken Cl<sup>-</sup>-Sekretion durch das Öffnen von apikalen Cl<sup>-</sup>-Kanälen und basolateralen K<sup>+</sup>-Kanälen sowie zu einer Stimulation der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe (Schultheiss et al. 2003).

Über CO weiß man inzwischen, dass es über eine Aktivierung der sGC und verstärkte cGMP-Produktion in isolierten glatten Gefäßmuskelzellen von Schwanzarterien der Ratte zu einer Vasorelaxation führt (Wang et al. 1997). Genauso ist CO in der Lage, in Primärkulturen von glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten den intrazellulären cGMP-Spiegel zu erhöhen (Ramos et al. 1989, Morita et al. 1995, Morita et al. 1997). Außerdem vermittelt CO seine Wirkung auch in neuronalem Gewebe, wie z.B. olfaktorischen Neuronen und im olfaktorischen Bulbus der Ratte über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und Produktion von cGMP (Verma et al. 1993, Ingi und Ronnet 1995). Obschon die Stimulation der intrazellulären cGMP-Produktion in Geweben ausgelöst durch CO eindeutig nachgewiesen werden konnte, ist die Aktivierung dieses Signalweges durch NO um mehr als dreißigfach stärker als die durch CO, wenn man die isolierte cGC betrachtet (Stone und Marletta 1994). Versuche, in denen die sGC aus Rinderlungen isoliert wurde, wiesen eine 130fache Aktivierung dieses Enzyms in Form einer messbaren gesteigerten cGMP-Produktion in Gegenwart von NO auf. Im Vergleich dazu erreichte CO lediglich eine 4,4fache Aktivierung der sGC. Es erscheint fraglich, dass ein so geringer Einfluss unter physiologischen Bedingungen einen Effekt von CO durch Aktivierung der sGC vermitteln kann. Dennoch zeigten diverse Untersuchungen an Zellkulturen und Geweben, wie z.B. am Gehirn (Verma et al. 1993) und im Gefäßsystem (Furchgott und Jothianandan 1991), dass CO-Wirkungen über diese Signalkaskade vermittelt werden und dies durchaus auch mit niedrigeren Konzentrationen des Gasotransmitters. Dieser Widerspruch lässt sich vielleicht dadurch erklären, dass es sich in den einzelnen Studien einmal um Versuche mit dem isolierten Enzym der sGC und zum anderen um Versuche an lebenden Zellen und Geweben, wo andere Cofaktoren möglicherweise die Sensitivität der sGC auf CO heraufsetzen könnten, handelt. Eine vollständige Aufklärung dieser Diskrepanzen fehlt allerdings bis heute.

In einigen Geweben wurde eine gewisse Interaktion der beiden Gasotransmitter CO und NO vermutet. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass unter anderem im menschlichen Magen und im Jejunum die Schlüsselenzyme für die Produktion dieser

Gasotransmitter – die HO-II und die nNOS – kolokalisiert sind (Miller et al. 2001). Weiterhin ist bekannt, dass CO in einigen Geweben seine Wirkung über die Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen vermittelt. So führt die Exposition von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Schwanzarterie von Ratten mit CO zu der bereits erwähnten Relaxation der Zellen infolge der Aktivierung der sGC, aber auch über die direkte Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -abhängigen Large-Conductance  $K^+$ -Kanälen (Wang et al. 1997, Wang und Wu 1997). Ebenso konnte in Rattennieren eine Vermittlung der Wirkung von CO über  $K^+$ -Kanäle, in diesem Fall über Intermediate-Conductance Kanäle, nachgewiesen werden (Liu et al. 1999).

Völlig unabhängig vom cGMP-Signalweg wird hingegen die  $Na^+$ -Resorption in alveolären Epithelzellen gehemmt. Althaus et al. fanden 2009 heraus, dass CO in isolierten Kaninchenlungen und an der humanen Bronchiolarepithel-Zelllinie H441 über eine Blockade des apikalen epithelialen  $Na^+$ -Kanals (ENaC) die Resorption von  $Na^+$  verhindert. Dieser Prozess scheint auf einer Interaktion mit Histidin-Resten, die einen Teil des Ionenkanals darstellen, zu beruhen, was Versuche mit dem Histidin-modifizierenden Agens Diethylpyrocarbonat (DEPC) belegen.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher herausgefunden werden, ob auch im Bereich des distalen Kolons der Ratte eine Kolokalisation der Enzyme für die CO- und die NO-Bildung vorliegt und es dementsprechend gegebenenfalls zu Interaktionen zwischen den beiden Gasotransmittern kommen könnte. Dazu wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen der Hämoxygenasen I und II mit den drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen durchgeführt (Abb. III-15, 16). Für die HO-I besteht lediglich im Bereich der Serosa eine Kolokalisation mit der NOS-II. Im Gegensatz dazu konnte für die HO-II eine Kolokalisation mit allen drei Isoformen der NOS vor allem im Bereich der Muscularis des distalen Rattenkolons, aber z.T. auch im Bereich der mucosalen Zellen dieses Gewebes beobachtet werden. Dementsprechend wäre eine Vermittlung der CO-Wirkung über den sGC/cGMP-Signalweg und eine mögliche Interaktion mit NO für die CO-induzierte Anionensekretion im distalen Kolon durchaus denkbar.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden Versuche mit ODQ, einem Hemmer der löslichen Guanylatcyclase (Garthwaite et al. 1995), und YC-1, einem NO-unabhängigen Aktivator dieses Enzyms (Wu et al. 1995), durchgeführt. Hierbei zeigte

sich, dass die Anionensekretion im distalen Rattenkolon durch CO nicht von einer Aktivierung der sGC und der Produktion von cGMP abhängig ist. Weder die Hemmung des cGMP-Signalwegs durch ODQ noch die Vorstimulation dieses Signalwegs durch YC-1 konnten den CO-induzierten Effekt beeinflussen (Tab. III-1). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von Beobachtungen, die an humanen Kolonkarzinomzellen (Caco-2 Zellen) gemacht wurden, bei welchen CO eine Sekretion auslöste, die bei Blockade der sGC durch ODQ erheblich vermindert wurde (Uc et al. 2005). Die Ursache für diese Differenzen könnte in der Verschiedenheit der einzelnen Spezies – Mensch und Ratte – oder aber auch auf Unterschieden zwischen der Tumorzelllinie und dem nativen Kolongewebe beruhen. Schlussfolgernd scheint es für die Auslösung der Anionensekretion durch CO am intakten Kolongewebe einen anderen Signalweg als den cGMP-Weg zu geben.

### **7.2 CORM-2-induzierte Erhöhung des cytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels**

Eine bis dato unbekannt Rolle scheint dagegen ein anderer second messenger – das  $\text{Ca}^{2+}$  - bei der Vermittlung der CO-Antwort am Kolonepithel zu spielen. Einige Neurotransmitter, wie z.B. Acetylcholin oder auch parakrine Substanzen, wie z.B. Histamin wirken am Gastrointestinaltrakt als Sekretagoga über einer Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Epithelzellen. Diese wiederum führt zu einer Aktivierung von basolateralen und apikalen  $\text{K}^+$ -Kanälen (Schultheiss und Diener 1997, Schultheiss et al. 2003), infolge dessen es zu einer Hyperpolarisation der Membran kommt. Diese Veränderung des Membranpotentials dient als Antriebskraft für einen Ausstrom von  $\text{Cl}^-$ -Ionen über apikale  $\text{Cl}^-$ -Kanäle (Böhme et al. 1991, Bleich und Sandle 1994, Strabel und Diener 1995, Hartzell et al. 2005).

Imagingversuche mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 zeigten, dass der CO-Donor CORM einen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an isolierten Kolonkrypten auslöst (Abb. III-17). Bezüglich der morphologisch und funktionell unterschiedlichen Zellen entlang der Kryptenachse konnte kein signifikanter Unterschied für die Reaktion auf den CO-Donor festgestellt werden. Die CO-Antwort scheint demnach unabhängig vom jeweiligen Differenzierungsgrad der Zellen zu sein, da sowohl unreife Zellen am Boden der Krypte wie auch ausgereifte Oberflächenzellen die gleiche Antwort auf den CO-Donor aufwiesen.

Der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle war unabhängig von dem Freisetzen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern, wie die Versuche mit Cyclopiazonsäure belegen (Abb. III-17). Das endoplasmatische Retikulum ist einer der wichtigsten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Ashby und Tepikin 2001). Werden diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher entleert, dienen die SERCAs (sarcoplasmic/endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases), die in den Membranen des endoplasmatische Retikulums sitzen (Gélébart et al. 2002), dazu, diese wieder aufzufüllen. Cyclopiazonsäure ist ein Mykotoxin, welches von verschiedenen Pilzen wie z.B. Aspergillus- und Penicilliumarten produziert wird und als potenter, hochspezifischer und reversibler Hemmstoff der sarkoplasmatisch-endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wirkt (Goeger et al. 1988, Plenge-Tellechea et al. 1997). Entleerung intrazellulärer Speicher durch Hemmung von deren Wiederauffüllung mittels Cyclopiazonsäure hatte keinen Einfluss auf die CO-Antwort, was belegt, dass CO nicht durch eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern wirkt.

Stattdessen war die Antwort auf den CO-Donor an den isolierten Krypten komplett von der Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig (Abb. III-17). Mit anderen Worten, der CO-Donor induziert einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Über welche Transportwege die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nach Exposition mit CO in die Zelle gelangen, ist bisher noch ungeklärt. Denkbar wäre ein kapazitiver Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über nichtselektive Kationenkanäle dieser Zellen (Frings et al. 1999) oder auch die Beteiligung des  $\text{Na}^+$ -  $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, gesetzt den Fall, dass dieser als  $\text{Ca}^{2+}$ -ladender Mechanismus im Reversmodus arbeiten würde (Seip et al. 2001). Böhme et al. konnten 1991 nachweisen, dass ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer Aktivierung von basolateralen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen führen kann. Durch bereits erwähnte Versuche an apikal permeabilisiertem Gewebe konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung von basolateralen  $\text{K}^+$ -Kanälen an der CORM-2-induzierten Anionensekretion vermutet werden (Kap. IV-4, Abb. III-8).

### **8 Interaktionen mit Sekretagogen**

Da CORM-2 in dieser Studie eine Sekretion von  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen induziert, stellte sich die Frage, ob dieser Gasotransmitter eventuell auch einen Einfluss auf die Wirkung anderer Sekretagoga ausüben könnte. Von dem Gasotransmitter Stickstoffmonoxid ist bekannt, dass er zwar die cAMP-abhängige Sekretion hemmt, nicht jedoch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige. Das belegen Studien am Kolongewebe von Mäusen (Freeman und MacNaughton 2004) und Ratten (Schultheiss et al. 2000b). Hier führte die vorherige Applikation eines NO-Donors zu einer abgeschwächten Sekretion induziert durch Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase (Seamon et al. 1981), im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch bestand kaum ein Unterschied zwischen der Reaktion des Gewebes auf Carbachol, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Sekretagog (Lindqvist und Sharp 1998), mit der des jeweiligen Kontrollgewebes.

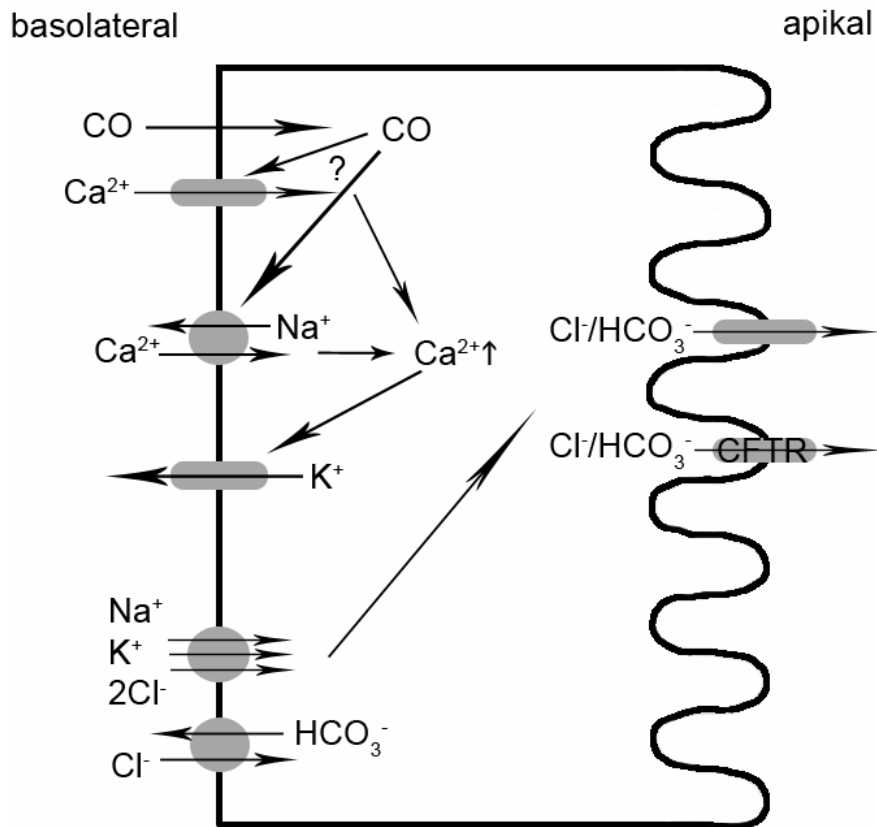
In meiner Studie stellte sich heraus, dass CO keinen signifikanten Einfluss auf die cAMP-abhängige Sekretion, die durch Forskolin ausgelöst wurde, hat. Im Gegensatz dazu bewirkte Carbachol nach CO-Applikation einen deutlich verringerten Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  (Abb. III-21). Somit hemmt Kohlenmonoxid die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Sekretion, was allerdings nicht gänzlich unerwartet war, da CORM-2 in den Versuchen an isolierten Krypten einen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auslöste (Abb.III-17). Ursache könnte eine Down-Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Sekretagoga wie z.B. CO sein, wie sie bereits in anderen Studien publiziert wurde (Schultheiss und Diener 2005). Die dabei beteiligten Mechanismen sind bisher allerdings noch nicht vollständig bekannt. Im Vergleich zu Studien an einer Tumorzelllinie aus dem menschlichen Kolon (T84-Zellen; Keely et al. 1998) konnte am Kolongewebe der Ratte keine Beteiligung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) an dem Prozess der Down-Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweges durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Sekretagoge festgestellt werden (Schultheiss und Diener 2005). Eine Möglichkeit für die Vermittlung dieser Down-Regulation bietet die Beteiligung von Fettsäuren. Carbachol, ein typischer Vertreter der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Sekretagoga, löst nicht nur eine Sekretion von Anionen aus, sondern initialisiert auch einen Mechanismus, der diese Sekretion limitiert (Schultheiss et al. 2001). Die durch Carbachol erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytoplasma führt einerseits zu der Aktivierung von basolateralen  $\text{K}^+$ -Kanälen und andererseits vermutlich auch zu einer

erhöhten Produktion von Fettsäuren, was wiederum zu einer Hemmung von apikalen Cl<sup>-</sup>-Kanälen und basolateralen K<sup>+</sup>-Kanälen führen kann (Devor und Frizzell 1998). Da die Hemmung der cytoplasmatischen Phospholipase A<sub>2</sub>, einem Enzym, das zur Freisetzung von Fettsäuren aus Membran-Phospholipiden führt, den Carbachol-induzierten Kurzschlussstrom nicht vollständig unterbindet, scheinen zusätzlich andere Signalwege eine Rolle zu spielen. So wurde die Beteiligung von Inositol-Metaboliten, wie das Inositol-1,3,4,5-Tetrakisphosphat in der Down-Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Signalwegs durch Ca<sup>2+</sup>-abhängige Sekretagoga vermutet. In der humanen Kolon-Epithelzelllinie T84 wurde gezeigt, dass dieser Inositolmetabolit zu der Abkopplung des Mechanismus der Cl<sup>-</sup>-Sekretion von der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt (Vajanaphanich et al. 1994). Ob diese Hypothesen für die Down-Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Signalweges auch für CO zutreffen, ist bisher ungeklärt und bedarf in der Zukunft weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CO am distalen Kolon der Ratte als Gasotransmitter eine Sekretion von Anionen auslöst, an der verschiedene Transportsysteme in der apikalen und der basolateralen Membran beteiligt sind. Vermittelt wird der CO-Effekt direkt an den Epithelzellen durch einen Anstieg der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den Kolonepithelzellen über den Einstrom extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Unterstützend kommt eine Stimulation sekretomotorischer Neurone in der Darmwand hinzu. Die Enzyme Hämoxxygenase I und II, die für eine endogene CO-Produktion durch das Kolongewebe selbst verantwortlich sind, konnten immunhistologisch und molekularbiologisch nachgewiesen werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass CO auch unter physiologischen Bedingungen als Modulator des intestinalen Ionentransports fungiert.

**9 Zellmodell**

In Abb. IV-1 wurden die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie anhand eines Zellmodells schematisch noch einmal zusammengefasst.



**Abb. IV-1: Zellmodell der CO-Wirkung am distalen Kolon**

CO führt in den Epithelzellen des distalen Rattenkolons zu einer Sekretion von  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen. Dieser Ionentransport hängt von verschiedenen Transportmechanismen in der basolateralen und apikalen Zellmembran ab. Dazu gehören auf der basolateralen Seite der  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Kotransporter sowie  $\text{K}^+$ -Kanäle und auf der apikalen Seite Anionenkanäle, wie vor allem der CFTR-Kanal. Vermittelt wird der CO-Effekt über einen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über den Einstrom extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen möglicherweise durch nichtselektive Kationenkanäle oder den im Revers-Modus arbeitenden  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher.

### V Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob der Gasotransmitter Kohlenstoffmonoxid (CO) den Ionen transport am distalen Kolon der Ratte beeinflusst und die zugrunde liegenden Mechanismen zu identifizieren. In Ussingkammer-Experimenten induzierte der CO-Donor Tricarbonyldichlorruthenium(II)dimer (CORM-2) einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ), einem Maß für den Netto-Ionen transport durch das Epithel. Eine maximale Antwort war bei einer Konzentration von  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  messbar. Bei mehrfacher Gabe von CORM-2 war eine ausgeprägte Desensitivierung des Gewebes zu beobachten.

Anionen-Substitutionsexperimente ergaben, dass eine Sekretion von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen die Ursache für den CORM-2-induzierten Strom darstellt. Glibenclamid, ein Blocker des apikalen CFTR-Anionenkanals, hemmte den durch den CO-Donor ausgelösten  $I_{sc}$ . Eine ähnliche Hemmung wurde beobachtet, wenn der basolaterale  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-2Cl}^-$ -Cotransporter durch Bumetanid und gleichzeitig der basolaterale  $\text{Cl}^- \text{-HCO}_3^-$ -Austauscher durch SITS gehemmt wurden. In Experimenten, in denen jeweils die apikale oder die basolaterale Membran permeabilisiert wurden, zeigte sich eine Aktivierung von basolateralen  $\text{K}^+$ - und apikalen  $\text{Cl}^-$ -Kanälen durch CORM-2. Offenkundig werden auch sekretomotorische Neurone aktiviert, da ein Teil der CORM-2-Antwort durch das Neurotoxin Tetrodotoxin gehemmt wurde.

In  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuchen an mit Fura-2 aufgeladenen Krypten löste CORM-2 einen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aus. Diese Antwort basierte komplett auf einem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ , war aber unabhängig von der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. Die beiden Schlüsselenzyme für die CO-Bildung, die Hämoxygenase I und II, werden in der Kolonwand exprimiert, wie entsprechende immunhistochemische Versuche bzw. rtPCR Daten zeigen. Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass endogenes CO auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle bei der Regulation des intestinalen Ionen transports spielt.



### VI Summary

The aim of the present study was to investigate whether carbon monoxide (CO) induces changes in ion transport across the distal colon of rats and to study the mechanisms involved. In Ussing chamber experiments, tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer (CORM-2), a CO donor, evoked a concentration-dependent increase in short-circuit current ( $I_{sc}$ ) indicating a change in net ion transport across the epithelium. A maximal response was achieved at a concentration of  $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Repeated application of CORM-2 resulted in a pronounced desensitization of the tissue.

Anion substitution experiments suggest that a secretion of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  underlie the CORM-2-induced current. Glibenclamide, a blocker of the apical CFTR channel, inhibited the  $I_{sc}$  induced by the CO donor. Similarly, bumetanide, a blocker of the basolateral  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-2Cl}^-$  cotransporter, combined with SITS, an inhibitor of the basolateral  $\text{Cl}^- \text{-HCO}_3^-$  exchanger, inhibited the CORM-2-induced  $I_{sc}$ . Membrane permeabilisation experiments indicated an activation of basolateral  $\text{K}^+$  and apical  $\text{Cl}^-$  channels by CORM-2. A partial inhibition by the neurotoxin, tetrodotoxin, suggests the involvement of secretomotor neurons in this response.

In  $\text{Ca}^{2+}$  imaging experiments at fura-2 loaded colonic crypts, CORM-2 induced an increase of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. This increase depended on the influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  but not on the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores. Both enzymes for CO production, heme oxygenase I and II, are expressed in the colon as observed immunohistochemically and by RT-PCR. Consequently, endogenous carbon monoxide might be a physiological modulator of colonic ion transport.

### VII Abbildungsverzeichnis

Abb. I-1: Schematische Darstellung der Kolonwand unter Lupenvergrößerung	2
Abb. I-2: Halbschematische Darstellung einer Lieberkühnschen Krypte	3
Abb. I-3: Mechanismen der Na <sup>+</sup> -, Cl <sup>-</sup> - und K <sup>+</sup> -Resorption	6
Abb. I-4: Mechanismen der Cl <sup>-</sup> -Sekretion	7
Abb. II-1: Einzelne Krypte, isoliert aus dem Kolon einer Ratte	26
Abb. II-2: Ersatzschaltkreismodell von Ussing und Zerahn für ein Epithel	28
Abb. II-3: a) Open-circuit-modus; b) Voltage-clamp-Modus	30
Abb. II-4: Schema einer modifizierten Ussingkammer	32
Abb. II-5: Anregungsspektren von Fura-2 bei verschiedenen Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen	36
Abb. II-6: a) Strukturformel Fura-2 Acetoxymethylester. b) Bindung von Ca <sup>2+</sup> an den Fluoreszenzindikator Fura-2 in Abhängigkeit von der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	37
Abb. II-7: Aufbau des Ca <sup>2+</sup> -Imaging-Messtands	38
Abb. II-8: Falschfarbendarstellung zweier mit Fura-2 AM beladener Krypten	40
Abb. II-9: a) direkte Immunfluoreszenzmarkierung; b) indirekte Immunfluoreszenzmarkierung	44
Abb. II-10: Temperaturverlauf einer Polymerase-Kettenreaktion	56
Abb. III-1: Konzentrationswirkungskurven für CORM-2	64
Abb. III-2: Desensitivierung des Gewebes durch CORM-2	66
Abb. III-3: Anionensekretion	67
Abb. III-4: Transportinhibitorversuche	69
Abb. III-5: Schematische Darstellung der elektrischen Ausschaltung der basolateralen Zellmembran	71
Abb. III-6: CORM-2-induzierte apikale Cl <sup>-</sup> -Ströme	72
Abb. III-7: Schematische Darstellung der Permeabilisierung der apikalen Zellmembran	73
Abb. III-8: CORM-2-induzierte basolaterale K <sup>+</sup> -Ströme	74
Abb. III-9: Beteiligung enterischer Neurone am CO-Effekt	76
Abb. III-10: Immunhistochemische Markierung der Hämoxygenase I am distalen Kolongewebe der Ratte	78
Abb. III-11: Immunhistochemische Markierung der Hämoxygenase II am distalen Kolongewebe der Ratte	79
Abb. III-12: PCR-Nachweis der Hämoxygenase I und II	80
Abb. III-14: Wirkung des HO-Hemmers Zink-Protoporphyrin IX	82
Abb. III-15: Immunhistochemische Doppelmarkierung von HO-I gegen NOS-I, NOS-II und NOS-III	84
Abb. III-16: Immunhistochemische Doppelmarkierung von HO-II gegen NOS-I, NOS-II und NOS-III	85
Abb. III-17: Veränderungen der cytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration durch CORM-2	88
Abb. III-18: Vergleich CO-Antwort der Zellen entlang der Kryptenachse	89
Abb. III-19: Veränderungen der cytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration durch CORM-2 am Plexus submucosus der distalen Ratten-Kolons	90
Abb. III-20: Einfluss von CORM-2 auf Forskolin-induzierte Sekretion	92
Abb. III-21: Einfluss von CORM-2 auf Carbachol-induzierte Sekretion	93
Abb. IV-1: Zellmodell der CO-Wirkung am distalen Kolon	107

### VIII Tabellenverzeichnis

Tabelle I-1: Stimulatoren und Inhibitoren des intestinalen Ionentransports	8
Tabelle II-1: Verwendete primäre Antikörper	46
Tabelle II-2: Verwendete sekundäre Antikörper	47
Tabelle II-3: Färbeprotokoll für die einfache Fluoreszenzmarkierung	52
Tabelle II-4: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese	58
Tabelle II-5: Sequenzen der verwendeten Primer	59
Tabelle II-6: Zusammensetzung des Mastermixes für die rtPCR	60
Tabelle II-7: PCR-Reaktionsansatz zum Nachweis von HO-I und HO-II	60
Tabelle II-8: Darstellung des PCR-Protokolls für HO-I und HO-II	60
Tabelle III-1: Sensitivität der CORM-2-Antwort auf Hemmung und Stimulation des cGMP-Weges	87

### IX Literaturverzeichnis

- Abdel-Latif, A.A.** Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol Rev* 38: 227-272, 1986.
- Althaus, M., Fronius, M., Buchäckert, Y., Vadasz, I., Clauss, W.G., Seeger, W., Motterlini, R., Morty, R.E.** Carbon monoxide rapidly impairs alveolar fluid clearance by inhibiting epithelial sodium channels. *Am J Resp Cell Mol Biol* 41: 639-650, 2009.
- Andres, H., Bock, R., Bridges, R.J., Rummel, W., Schreiner, J.** Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa. *J Physiol* 364: 301-312, 1985.
- Ashby, M.C., Tepikin, A.V.** ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Semin Cell Dev Biol* 12: 11-17, 2001.
- Bachmann, O., Riederer, B., Rossmann, H., Groos, S., Schultheis, P.J., Shull, G.E., Gregor, M., Manns, M.P., Seidler, U.** The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 2 is the predominant NHE isoform in murine colonic crypts and its lack causes NHE3 upregulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G125-G133, 2004.
- Barrett, K.E., Keely, S.J.** Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62: 535-572, 2000.
- Baylor, S.M., Hollingworth, S.** Measurement and interpretation of cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>] signals from calcium-indicator dyes. *New Physiol Sci* 15: 19-26, 2000.
- Berridge, M.J.** Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. *Biochim Biophys Act* 1742: 3-7, 2004.
- Binder, H.J., Sandle, G.J.** Electrolyte transport in the mammalian colon. *Physiology of the gastrointestinal tract, 3. ed., Ed. by: Johnson L.R., New Yourk, Raven Press* pp.: 2133-2171, 1994.
- Binder, H., Sandle, G., Rajendran, V.M.** Colonic fluid and electrolyte transport in health and disease. *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease, Ed. By S.F. Phillips, J.H. Hermberton, R.G. Shorter, Raven Press, New York* pp: 141-168, 1991.
- Bleich, M., Riedemann, N., Warth, R., Kerstan, D., Leipziger, J., Hor, M., Driessche, W.V., Greger, R.** Ca<sup>2+</sup> regulated K<sup>+</sup> and non selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 432: 1011-1022, 1996.
- Boehning, D., Snyder, S.H.** Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci* 26: 105-131, 2003.
- Böhme, M., Diener, M., Rummel, W.** Calcium- and cyclic AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 419: 144-151, 1991.
- Brini, M., Carafoli, E.** Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci* 57: 354-370, 2000.
- Brüne, B., Ullrich, V.** Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 32: 497-504, 1987.

**Cardell, L.O., Ueki, I.F., Stjarne, P., Agusti, C., Takeyama, K., Linden, A., Nadel, J.A.** Bronchodilatation in vivo by carbon monoxide, a cyclic GMP related messenger. *Brit J Pharmacol* 124: 1065-1068, 1998.

**Catterall, W.A.** Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20: 15-43, 1980.

**Chae, H.J., Chin, H.Y., Lee, G.Y., Park, H.R., Yang, S.K., Chung, H.T., Pae, H.O., Kim, H.M., Chae, S.W., Kim, H.R.** Carbon monoxide and nitric oxide protect against tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in osteoblasts: HO-I is necessary to mediate the protection. *Clin Chim Acta* 365: 270-278, 2006.

**Cooke, H.J.** Regulation of the colonic transport by the autonomic nervous system. *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease*, Ed. By S.F. Phillips, J.H. Hermberton, R.G. Shorter, Raven Press, New York pp: 169-179, 1991.

**Coons, A.H.** Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1: 399-422, 1958.

**Cukiernik, M., Mukherjee, S., Downey, D., Chakabarti, S.** Heme oxygenase in the retina in diabetes. *Curr Eye Res* 27: 301-308, 2003.

**De Backer, O., Lefebvre, R.A.** Mechanisms of relaxation by carbon monoxide-releasing molecule-2 in murine gastric fundus and jejunum. *Eur J Pharmacol* 572: 197-206, 2007.

**De Jonge, H.R.** Cyclic nucleotide-dependent protein phosphorylation in intestinal epithelium. *Mechanism of intestinal electrolyte transport and regulation by calcium*, Ed. By Donowitz M., Sharp GWG, Alan R. Liss, New York, 1984.

**Devor, D.C, Frizell, R.A.** Modulation of K<sup>+</sup> channels by arachidonic acid in T84 cells. I. Inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: 138-148, 1998.

**Diener, M., Bridges, R.J., Knobloch, S.F., Rummel, W.** Neuronally mediated and direct effects of prostaglandins on ion transport in rat colon descendens. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 337: 74-78, 1988.

**Diener, M., Eglème, C., Rummel, W.** Phospholipase C-induced anion secretion and its interaction with carbachol in the rat colonic mucosa. *Eur J Pharmacol* 200: 267-276, 1991.

**Diener, M., Nobles, M., Rummel, W.** Activation of basolateral Cl<sup>-</sup> channels in the rat colonic epithelium during regulatory volume decrease. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 421: 530-538, 1992.

**Diener, M., Rummel, W.** Actions of the Cl<sup>-</sup> channel blocker NPPB on absorptive and secretory transport processes of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in rat descending colon. *Acta Physiol Scand* 137: 215-222, 1989.

**Diener, M., Rummel, W.** Distension-induced secretion in the rat colon: mediation by prostaglandins and submucosal neurons. *Eur J Pharmacol* 178: 47-57, 1990.

**Diener, M., Rummel, W., Mestres, P., Lindemann, B.** Single chloride channels in colon mucosa an isolated colonic enterocytes of the rat. *J Membr Biol* 108: 21-30, 1989.

**Donat, M.E., Wong, K., Staines, W.A., Krantis, A.** Heme oxygenase immunoreactive neurons in the rat intestine and their relationship to nitrergic neurons. *J Auton Nerv Syst* 77: 4-12, 1999.

**Dong, D.-L., Chen, C., Huang, W., Chen, Y., Zhang, X.-L., Li, Z., Li, Y., Yang, B.-Y.** Tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer (CORM2) activates non-selective cation current in human endothelial cells independently of carbon monoxide releasing. *Eur J Pharmacol* 590: 99-104, 2008.

**Field, M., Semrad, C.E.** Toxicogenic diarrheas, congenital diarrheas and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. *Annu Rev Physiol* 55: 631-655, 1993.

**Fischer, H., Illek, B., Negulescu, P.A., Clauss, W., Machen, T.E.** Carbachol-activated calcium entry into HT-29 cells is regulated by both membrane potential and cell volume. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1438-1442, 1992.

**Freeman, S.L., MacNaughton, W.K.** Nitric oxide inhibitable isoforms of adenylate cyclase mediate epithelial secretory dysfunction following exposure to ionising radiation. *Gut* 53: 214-221, 2004.

**Freshney, R.I.** Tierische Zellkulturen – Ein Methoden-Handbuch. *De Gruyter, Berlin*, 1990.

**Frings, M., Schultheiss, G., Diener, M.** Electrogenic  $\text{Ca}^{2+}$  entry in the rat colonic epithelium. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 439: 39-48, 1999.

**Fuchs, W., Larsen, E.H., Lindemann, B.** Current-voltage curve of sodium channels and concentration dependence of sodium permeability in frog skin. *J Physiol* 267: 137-166, 1977.

**Furchgott, R.F., Jothianandan, D.** Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28: 52-61, 1991.

**Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Nielsen, E.B., Schmidt, K., Mayer, B.** Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48: 184-188, 1995.

**Geibel, J.P., Singh, S., Rajendran, V.M., Binder, H.J.**  $\text{HCO}_3^-$  secretion in the rat colonic crypts is closely linked to  $\text{Cl}^-$  secretion. *Gastroenterology* 118: 101-107, 2000.

**Gélébart, P., Kovác, T., Brouland, J.P., van Gorp, R., Grossmann, J., Rivard, N., Panis, Y., Martin, V., Bredoux, R., Enouf, J., Papp, B.** Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem* 277: 26310-26320, 2002.

**Gibbons, S.J., Farrugia, G.** The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 556: 325-336, 2004.

**Goda, N., Suzuki, K., Naito, M., Takeoka, S., Tsuchida, E., Ishimura, Y., Tamatani, T., Suematsu, M.** Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 101: 604-612, 1998.

**Goeger, D.E., Riley, R.T., Dorner, J.W., Cole, R.J.** Cyclopiazonic acid inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem Pharmacol* 37: 978-981, 1988.

**Greger, R.** Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol* 62: 467-491, 2000.

**Greger, R., Bleich, M., Leipziger, J., Ecke, D., Mall, M., Kunzelmann, K.** Regulation of ion transport in colonic crypts. *News Physiol Sci* 12: 62-66, 1997.

**Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y.** A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.

**Harlow, E., Lane, D.** Antibodies – A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York*, 1988.

**Hartzell, C., Putzier, I., Arreola, J.** Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67: 719-758, 2005.

**Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y., Noguchi, M.** Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 336: 241-250, 2004.

**Hennig, B., Schultheiss, G., Kunzelmann, K., Diener, M.**  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Cl}^-$  efflux at rat distal colonic epithelium. *J Membrane Biol* 221: 61-72, 2008.

**Ikuma, M., Geibel, J., Binder, H.J., Rajendran, V.M.** Characterization of  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  exchange in basolateral membrane of rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: 912-921, 2003.

**Ingi, T., Ronnet, G.V.** Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 15: 8214-8222, 1995.

**Ishida, A., Shigeri, Y., Taniguchi, T., Kameshita, I.** Protein phosphatases that regulate multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Ther* 100: 291-305, 2003.

**Janeway, C.A., Travers, P.** Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford*, 1997

**Kanu, A., Leffler, C.W.** Carbon monoxide and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in cerebral arteriolar response to glutamate and hypoxia in newborn pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3193-H3200, 2007.

**Kaplan, M.R., Mount, D.B., Delpire, E., Gamba, G., Hebert, S.C.** Molecular mechanisms of  $\text{NaCl}$  cotransport. *Annu Rev Physiol* 58: 649-668, 1996.

**Keast, J.R.** Mucosal innervation and control of water and ion transport in the intestine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 109: 1-59, 1987.

- Keely, S.J., Uribe, J.M., Barrett, K.E.** Carbachol stimulates transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T<sub>84</sub> cells. *J Biol Chem* 273: 27111-27117, 1998.
- Knowles, R.G., Moncada, S.** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258, 1994.
- Köckerling, A., Fromm, M.** Origin of cAMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion from both crypts and surface epithelium of rat intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 264: C1294-1301, 1993.
- Köckerling, A., Sorgenfrei, D., Fromm, M.** Electrogenic Na<sup>+</sup> absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium: a voltage-scanning study. *Am J Physiol Cell Physiol* 264: C1285-1293, 1993.
- Kubista, M., Akermann, B., Nordén, B.** Characterization of interaction between DNA and 4'-6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry* 26: 4545-4553, 1987.
- Kunzelmann, K., Mall, M.** Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 82: 245-289, 2002.
- Larsson, L.** Immunocytochemistry: Theory and practice. *CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida*, 1988.
- Latorre, R., Miller, C.** Conduction and selectivity of potassium channels. *J Membrane Biol* 71: 11-30, 1983.
- Lindqvist, S.M., Sharp, P., Johnson, I.T., Satoh, Y., Williams, M.R.** Acetylcholine-induced calcium signalling along the rat colonic crypt axis. *Gastroenterology* 115: 1131-1143, 1998.
- Lindström, C.G., Rosengren, J.E., Fork, F.T.** Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn* 20: 523-536, 1979.
- Lipkin, M.** Growth and development of gastrointestinal cells. *Annu Rev Physiol* 47: 175-197, 1985.
- Liu, H., Mount, D.B., Nasjletti, A., Wang, W.** Carbon monoxide stimulates the apical 70-pS K<sup>+</sup> channel of the rat thick ascending limb. *J Clin Invest* 103: 963-970, 1999.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.** Signalübertragung zwischen Zellen: Hormone und Rezeptoren. *Molekulare Zellbiologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*, 2001.
- Lottspeich, F., Zorbas, H.** Bioanalytik. *Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, 1998.
- Maines, M.D.** The heme oxygenase system; a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554, 1997.



- Mall, M., Bleich, M., Kuehr, J., Brandis, M., Greger, R., Kunzelmann, K.** CFTR-mediated inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277: G709-716, 1999.
- Markert, T., Vaandrager, A.B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., De Jonge, H.R., Jarchau, T., Lohmann, S.M.** Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest* 96: 822-830, 1995.
- McCoubrey, W.K. Jr., Huang, T.J., Maines, M.D.** Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725-732, 1997.
- Miller, S.M., Farrugia, G., Schmalz, P.F., Ermilov, L.V., Maines, M.D., Szurszewski, J.H.** Heme oxygenase 2 is present in interstitial cell networks of the mouse small intestine. *Gastroenterology* 114: 239-244, 1998.
- Miller, S.M., Reed, D., Sarr, M.G., Farrugia, G., Szurszewski, J.H.** Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol Motil* 13: 121-131, 2001.
- Morita, T., Kourembanas, S.** Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 96: 2676-2682, 1995.
- Morita, T., Mitsialis, S.A., Koike, H., Liu, Y., Kourembanas, S.** Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272: 32804-32809, 1997.
- Morita, T., Perrella, M.A., Lee, M., Kourembanas, S.** Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular sGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1475-1479, 1995.
- Motterlini, R., Clark, J.E., Foresti, R., Sarathchandra, P., Mann, B.E., Green, C.J.** Carbon monoxide-releasing molecules. Characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res* 90: e17-e24, 2002.
- Mullis, K.** Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum der Wissenschaft* 6: 60-67, 1990.
- Nishizuka, Y.** Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9: 484-496, 1995.
- Nobles, M., Diener, M., Rummel, W.** Segment-specific effects of the heat-stable enterotoxin of *E. coli* on electrolyte transport in the rat colon. *Eur J Pharmacol* 202: 201-211, 1991.
- Noll, S., Schaub-Kuhnen, S.** Praxis der Immunhistochemie. *Urban und Fischer, München, 1. Ed.*, 2000.
- Otterbein, L.E., Bach, F.H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R.J., Flavell, R.A., Choi, A.M.** Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6: 422-428, 2000.

**Parsons, D.S., Paterson, C.R.** Fluid and solute transport across rat colonic mucosa. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 50: 220-231, 1965.

**Petrache, I., Otterbein, L.E., Alam, J., Wiegand, G.W., Choi, A.M.** Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L312-L319, 2000.

**Petrides, P.E.** Häm und Gallenfarbstoffe. *Biochemie und Pathobiochemie*, G. Löffler, P.E. Petrides, 7. Aufl Springer Verlag, Berlin pp: 649-668, 2003.

**Plenge-Tellechea, F., Soler, F., Fernandez-Belda, F.** On the inhibition mechanism of sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase by cyclopiazonic acid. *J Biol Chem* 272: 2794-2800, 1997.

**Potten, C.S., Booth, C., Pritchard, D.M.** The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* 78: 219-243, 1997.

**Ramos, K.S., Lin, H., McGrath, J.J.** Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochem Pharmacol* 38: 1368-1370, 1989.

**Ryter, S.W., Choi, A.M.K.** Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 251-260, 2009.

**Ryter, S.W., Otterbein, L.E.** Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 26: 270-280, 2004.

**Schultheiss, G., Diener, M.** Regulation of apical and basolateral K<sup>+</sup> conductances in the rat colon. *Brit J Pharmacol* 122: 87-94, 1997.

**Schultheiss, G., Diener, M.** The epidermal growth factor-pathway is not involved in down-regulation of Ca<sup>2+</sup>-induced Cl<sup>-</sup> secretion in rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 512: 67-71, 2005.

**Schultheiss, G., Hörger, S., Diener, M.** The bumetanide-resistant part of forskolin-induced anion secretion in rat colon. *Acta Physiol Scand* 164: 219-228, 1998.

**Schultheiss, G., Kocks, S.L., Diener, M.** Methods for the study of ionic currents and Ca<sup>2+</sup>-signals in isolated colonic crypts. *Biol Proced Online* 3: 70-78 (<http://www.biologicalprocedures.com/>), 2002a.

**Schultheiss, G., Ribeiro, R., Diener, M.** Fatty acids inhibit anion secretion in rat colon: apical and basolateral action sites. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 442: 603-613, 2001.

**Schultheiss, G., Ribeiro, R., Schäfer, K.H., Diener, M.** Activation of apical K<sup>+</sup> conductance by muscarinic receptor stimulation in rat distal colon: fast and slow components. *J Membr Biol* 195: 183-196, 2003.

**Schultheiss, G., Seip, G., Kocks, S.L., Diener, M.** Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent Cl<sup>-</sup> secretion stimulated by the nitric oxide donor, GEA 3162, in rat colonic epithelium. *Eur J Pharmacol* 444: 21-30, 2002b.

- Schultheiss, G., Siefjediers, A., Diener, M.** Muscarinic receptor stimulation activates a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  conductance in rat distal colon. *J Membrane Biol* 204: 117-127, 2005.
- Seamon, K.B., Padgett, W., Daly, J.W.** Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3363-3367, 1981.
- Seip, G., Schultheiss, G., Kocks, S.L., Diener M.** Interaction between store-operated nonselective cation channels and  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger during secretion in the rat colon. *Exp Physiol* 86: 461-468, 2001.
- Siefjediers, A., Hardt, M., Prinz, G., Diener, M.** Characterization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP(3)) receptor subtypes at rat colonic epithelium. *Cell Calcium* 41: 303-315, 2007.
- Singh, S.K., Binder, H.J., Boron, W.F., Geibel, J.P.** Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. *J Clin Invest* 96: 2373-2379, 1995.
- Sobotta, J., Becher, H.** Verdauungsapparat. *Atlas der Anatomie des Menschen, 2. Ed.* By H. Ferner, J. Staubesand, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien pp: 61-143, 1972.
- Spassova, M.A., Soboloff, J., He, L.P., Hewavitharana, T., Xu, W., Venkatachalam, K., van Rossum, D.B., Patterson, R.L., Gill, D.L.** Calcium entry mediated by SOCs and TRP channels: variations and enigma. *Biochim Biophys Acta* 1742: 9-20, 2004.
- Specht, W.** Morphology of intestinal wall. *Intestinal permeation, Ed. By F. Lauterbach, Amsterdam, Oxford: Excerpta medica* pp: 4-40, 1977.
- Stahlmann, R., Lode, H.** Antibiotika und Chemotherapeutika. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 3.Aufl., Ed. By W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann and K. Starke, Urban & Fischer, München, Jena* pp: 874-877, 2001.
- Starke, K., Freiburg, I.B.** Pharmakologie cholinergischer Systeme. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 3.Aufl., Ed. By W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann and K. Starke, Urban & Fischer, München, Jena* pp: 147-174, 2001.
- Stewart, R.D.** The effect of carbon monoxide in humans. *Annu Rev Pharmacol* 15: 409-423, 1975.
- Stone, J.R., Marletta, M.A.** Soluble guanylyl cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33: 5636-5640, 1994.
- Strabel, D., Diener, M.** Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 274: 181-191, 1995.
- Sun, B., Sun, Z., Jin, Q., Chen, X.** CO-releasing molecules (CORM-2)-liberated CO attenuates leukocytes infiltration in the renal tissue of thermally injured mice. *Int J Biol Sci* 4: 176-183, 2008.

**Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Ratmeyer, L.S., Wilson, W.D.** DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minorgroove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31: 3103-3112, 1992.

**Tsien, R.Y., Poenie, M.** Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling. *Trends Biochem Sci* 11: 450-455, 1986.

**Turner, J.A., Sillett, R.W., McNicol, M.W.** Effect of cigar smoking on carboxyhemoglobin and plasma nicotine concentrations in primary pipe and cigar smokers and in cigarette smokers. *Brit Med J* 2: 1387-1389, 1977.

**Uc, A., Husted, R.F., Giriappa, R.L., Britigan, B.E., Stokes, J.B.** Hemin induces active chloride secretion in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G202-G208, 2005.

**Ussing, H.H., Zerahn, K.** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23: 110-127, 1951.

**Vajanaphanich, M., Schultz, C., Rudolf, M.T., Wassermann, M., Enyedi, P., Craxton, A., Shears, S.B., Tsien, R.Y., Barrett, K.E., Traynor-Kaplan, A.** Long-term uncoupling of chloride secretion from intracellular calcium levels by Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>. *Nature* 371: 711-714, 1994.

**Verma, A., Hirsch, D.J., Glatt, C.E., Ronnett, G.V., Snyder, S.H.** Carbon monoxide: a putative neuronal messenger. *Science* 259: 381-384, 1993.

**Wang, R., Wang, Z., Wu, L.** Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Brit J Pharmacol* 121: 927-934, 1997.

**Wang, R., Wu, L.** The chemical modification of K<sub>Ca</sub> channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cell. *J Biol Chem* 272: 8222-8226, 1997.

**Waldmann, S.A., Murad, F.** Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39: 163-196, 1987.

**Weber, W.M., Cuppens, H., Cassiman, J.J., Clauss, W., Van Driessche, W.** Capacitance measurements reveal different pathways for the activation of CFTR. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 438: 561-569, 1999.

**Wilkinson, S.E., Hallam, T.J.** Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation overstated? *Trends Pharmacol Sci* 15: 53-57, 1994.

**Wood, J.D.** Physiology of the enteric nervous system. *Physiology of the gastrointestinal tract, 3. Aufl., Ed. By Johnson L.R., Raven Press, New York* pp.: 423-482, 1994.

**Wu, C.C., Ko, F.N., Kuo, S.C., Lee, F.Y., Teng, C.M.** YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Brit J Pharmacol* 116: 1973-1978, 1995.

**Zhao, W., Wang, R.** H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H474-H480, 2002.

### **X Danksagung**

Ein großes Dankeschön an die vielen Menschen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Diener für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung bedanken. Er sorgte mit seiner Geduld, mit wertvollen Ratschlägen und seiner ständigen Bereitschaft, Fragen und Probleme schnell aus der Welt zu schaffen, für das Gelingen dieser Arbeit.

Herzlichen Dank an Brigitta Brück, Eva-Maria Haas, Bärbel Schmidt und Alice Stockinger für die geduldige Einführung in die Laborarbeit und die Arbeitsgruppenphilosophie. Danke vor allem an Michael Haas für die gewissenhafte Versorgung der Versuchstiere und die immer wieder amüsante Zusammenarbeit bei der medizinischen Betreuung dieser Tiere. Ebenso danke ich dem Team der Werkstatt: Alexander Heinrich, Gerd Herber und Karl-Hermann Maurer für die schnelle Lösung technischer Probleme.

Einen großen Anteil meiner Motivation für diese Doktorarbeit verdanke ich meinen Kollegen, in erster Linie Dr. Janine Avemary, Sandra Bader und Lisa Würner. Ebenso richte ich einen ganz besonders herzlichen Dank an Daniela Ott für die ständige arbeitsgruppenübergreifende Hilfsbereitschaft. Sie hatte in jeder Lebenslage ein offenes Ohr und ein gutes Wort für mich – danke dafür.

Außerdem möchte ich mich bei allen weiteren Doktoranden und Mitarbeitern der AG-Diener und der AG-Gerstberger für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre im Institut bedanken. Danke für die tollen fachlichen und privaten Gespräche und Aktivitäten, die für vielfältige Abwechslung sorgten, vor, während und nach der Arbeit.

Ein großes Dankeschön an meine Eltern und meinen Bruder für Ihre Unterstützung und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Mann – Gunnar Steidle und meinem Sohn – Fabrice Pascal Steidle. Sie waren immer für mich da, bestärkten mich und hielten mir den Rücken frei, wenn auch unsere gemeinsame Zeit dafür so manches Mal sehr knapp wurde. Daher möchte ich diese Arbeit meiner Familie widmen.

### **XI 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.“

Julia Steidle



*schön gemacht*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5743-5



9 783835 195743 5