

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

**Kapazitiver Calcium-Einstrom am
Kolonepithel der Ratte**

Inaugural-Dissertation

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

Eingereicht von

Monika Frings

Gießen 2000

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

**Kapazitiver Calcium-Einstrom am
Kolonepithel der Ratte**

Inaugural-Dissertation

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

Eingereicht von

Monika Frings

Tierärztin aus Bonn-Beuel

Gießen 2000

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Hartwig Bostedt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Diener

2. Berichterstatter: PD Dr. Georgios Scheiner-Bobis

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2000

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungen	
I. EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT	1
1. Das Kolon der Säugetiere	1
2. Die Entdeckung von Ca^{2+} als second messenger	3
3. Ca^{2+} -Kanäle an erregbaren Strukturen	4
4. Ca^{2+} -Kanäle an nicht-erregbaren Strukturen	6
5. Ionentransporter und -leitfähigkeiten am Kolonepithel	9
6. Wirkung von intrazellulärem Ca^{2+} auf Ionenkanäle der Kolonepithelzellen	11
7. Eigene Fragestellung	12
II. MATERIAL UND METHODEN	13
1. Versuchstiere	13
2. Lösungen und Chemikalien	13
2.1 Lösungen für die Präparation	13
2.2 Bad- bzw. Perfusionslösungen	14
2.3 Pipettenlösungen	14
2.4 Lösungen für die FURA-2-Messungen	15
2.5 Chemikalien	16
3. Gewebepräparation	16
3.1 Präparation der Darmschleimhaut	16
3.2 Präparation der isolierten Krypten	17
4. Elektrische Messungen mittels Patch-Clamp-Technik	18
4.1 Patch-Clamp-Konfigurationen	18
4.1.1 Vorzeichenkonventionen	19
4.2 Der Patch-Clamp-Meßstand	21
4.2.1 Mikroskop	21
4.2.2 Meßkammer und Perfusionssystem	21
4.2.3 Meßtisch und mechanische Komponenten	22
4.2.4 Elektronische Komponenten	23

4.2.5 Elektroden und Patchpipette	24
4.3 Datenerfassung	25
4.4 Ablauf eines Patch-Clamp-Experimentes und Erläuterung der Meßverfahren	26
4.4.1 Sealbildung	26
4.4.2 Membranpotential	27
4.4.3 Membranstrom	27
4.4.4 Strom-Spannungskurven	27
4.5 Berechnungen	28
4.5.1 Delta-Strom-Kurven	28
4.5.2 Umkehrpotentiale	28
4.5.3 Leitfähigkeit	29
5. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit FURA-2	30
5.1 Der FURA-2-Meßstand	32
5.1.1 Mikroskop und elektronische Komponenten	32
5.1.2 Meßkammer und Perfusionssystem	34
5.2 Meßprinzip und Datenerfassung	34
5.3 Messung und Eichung	34
5.4 Berechnungen	36
6. Elektrische Messungen mit der Ussingkammer-Technik	37
6.1 Versuchsaufbau	37
6.2 Datenerfassung und Berechnung	39
7. Statistik	40
III. ERGEBNISSE	41
1. Patch-Clamp Untersuchungen an isolierten Krypten	41
1.1 Effekte einer hohen intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkapazität	41
1.2 Wirkung von La^{3+} auf die Kryptenzellen	43
1.3 Wirkung von Gd^{3+} auf die Kryptenzellen	47
1.4 Wirkung von Flufenamat auf die Kryptenzellen	50
1.5 Flufenamat-Wirkung unter chloridfreien Bedingungen	53
1.6 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	54
1.7 Kationenselektivität	55

1.8 Abhängigkeit des Kationenstromes von extrazellulärem Na ⁺	57
1.9 Abhängigkeit des Kationenstromes von extrazellulärem Ca ²⁺	58
1.10 Effekt von Carbachol auf die Kryptenzellen	60
1.11 Hemmung des Carbacholeffektes durch La ³⁺	62
2. FURA-2-Messungen an isolierten Krypten	64
3. Ussingkammer-Experimente am intakten Epithel	66
IV. DISKUSSION	69
1. Methodenkritik	69
1.1 Patch-Clamp-Messungen	69
1.2 Ussingkammer-Technik	70
1.3 FURA-2-Technik	70
2. Nichtselektive Kationenleitfähigkeit an isolierten Krypten	72
3. Vergleich der Leitfähigkeit am Rattenkolon mit anderen Spezies	74
4. Physiologische Bedeutung der Kationenleitfähigkeit	76
5. Kommunikation zwischen intrazellulären Ca ²⁺ -Speichern und Plasmamembran	78
6. Modell zur Ca ²⁺ -Homöostase am Kolonepithel	80
7. Pathophysiologie	81
V. Zusammenfassung	83
VI. Summary	84
VII. Literaturverzeichnis	85
Danksagung	92

ABKÜRZUNGEN

AM	:	Acetoxymethylester
ATP	:	Adenosintriphosphat
BAPTA	:	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
cAMP/ cGMP	:	cyclisches 3',5'-Adenosin / Guanosin-Monophosphat
CIF	:	Calcium Influx Factor
DAG	:	Diacylglycerol
DMSO	:	Dimethylsulfoxid
EGTA	:	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
G_c / G_t	:	zelluläre / transepitheliale Leitfähigkeit [S]
Gd^{3+}	:	Gadolinium
G-Protein	:	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HEPES	:	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
I_{in} / I_{out}	:	Einwärtsstrom / Auswärtsstrom [pA]
IP_3	:	Inositol 1,4,5-trisphosphat
I_{sc}	:	Kurzschlußstrom
IV-Kurve	:	Strom-Spannungskurve
K_D	:	Dissoziationskonstante
La^{3+}	:	Lanthan
NMDG	:	N-Methyl-D-Glucamin
PD	:	Potentialdifferenz
PIP_2	:	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	:	Proteinkinase A
PLC	:	Phospholipase C
SEM	:	standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	:	Sarkoplasmatische / Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase
$t_{1/2}$:	Halbwertszeit
TRIS	:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

I. EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT

1. Das Kolon der Säugetiere

Eine der Hauptaufgaben des Kolons der Säugetiere liegt in der Beteiligung an der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes des Gesamtorganismus.

Die Zellen des Kolonepithels sind in der Lage, je nach Bedarf des Organismus, Wasser und Elektrolyte zu resorbieren oder ins Darmlumen abzugeben. Die Umschaltung zwischen Resorption und Sekretion erfolgt mit Hilfe verschiedener second messenger.

Während man früher dachte, daß die Kolonkrypten der Ort der Sekretion und das Oberflächenepithel der Mukosa der Ort der Resorption seien (Welsh et al., 1982), weiß man mittlerweile, daß die Krypten selber in der Lage sind, sowohl zu resorbieren als auch zu sezernieren (Diener et al., 1989, Köckerling & Fromm, 1993, Singh et al., 1995).

Die Kolonkrypten setzen sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Man unterscheidet Becherzellen, Stammzellen, enteroendokrine Zellen und die eigentlichen Enterozyten. All diese Zellen erfüllen verschiedene Funktionen: Die Becherzellen produzieren Schleim, die enteroendokrinen Zellen Hormone, aus den Stammzellen gehen neue Zellen hervor und die Enterozyten im eigentlichen Sinne sind für den epithelialen Transport von Wasser und Elektrolyten verantwortlich.

Eine schematisch-plastische Darstellung der Schleimhaut des Kolons zeigt Abb. 1. Aufgrund der Lokalisation einer Kryptenzelle unterscheidet man Zellen aus dem Fundus-, Mittel- und Oberflächenbereich (s. Abb. 9, Material und Methoden). Im Fundusbereich werden ständig neue, undifferenzierte Zellen gebildet, die im Verlauf ihrer Entwicklung und Differenzierung entlang der Kryptenachse vom Fundus- zum Oberflächenbereich hin wandern (Lipkin, 1985). Im Verlauf dieser Wanderung und Differenzierung ändern die Kryptenzellen ihre Eigenschaften und Fähigkeiten, so daß Zellen einer bestimmten Kryptenregion auch bestimmte Eigenschaften zugeschrieben werden können, allerdings sind hier die Übergänge fließend (Greger et al., 1997). So sezernieren z.B. undifferenzierte Kryptenzellen aus der Fundusregion NaCl. Im Laufe ihrer Differenzierung ändert sich diese Fähigkeit, und Kryptenzellen aus der Oberflächenregion zeigen vor allem eine NaCl-Resorption. Zellen aus dem mittleren Bereich der Krypte können NaCl sowohl resorbieren als auch sezernieren. Sie müssen also einen Mechanismus besitzen, der jeweils den einen Weg blockiert, während der andere aktiviert ist. Für diese Vorgänge spielen verschiedene second messenger eine wichtige Rolle.

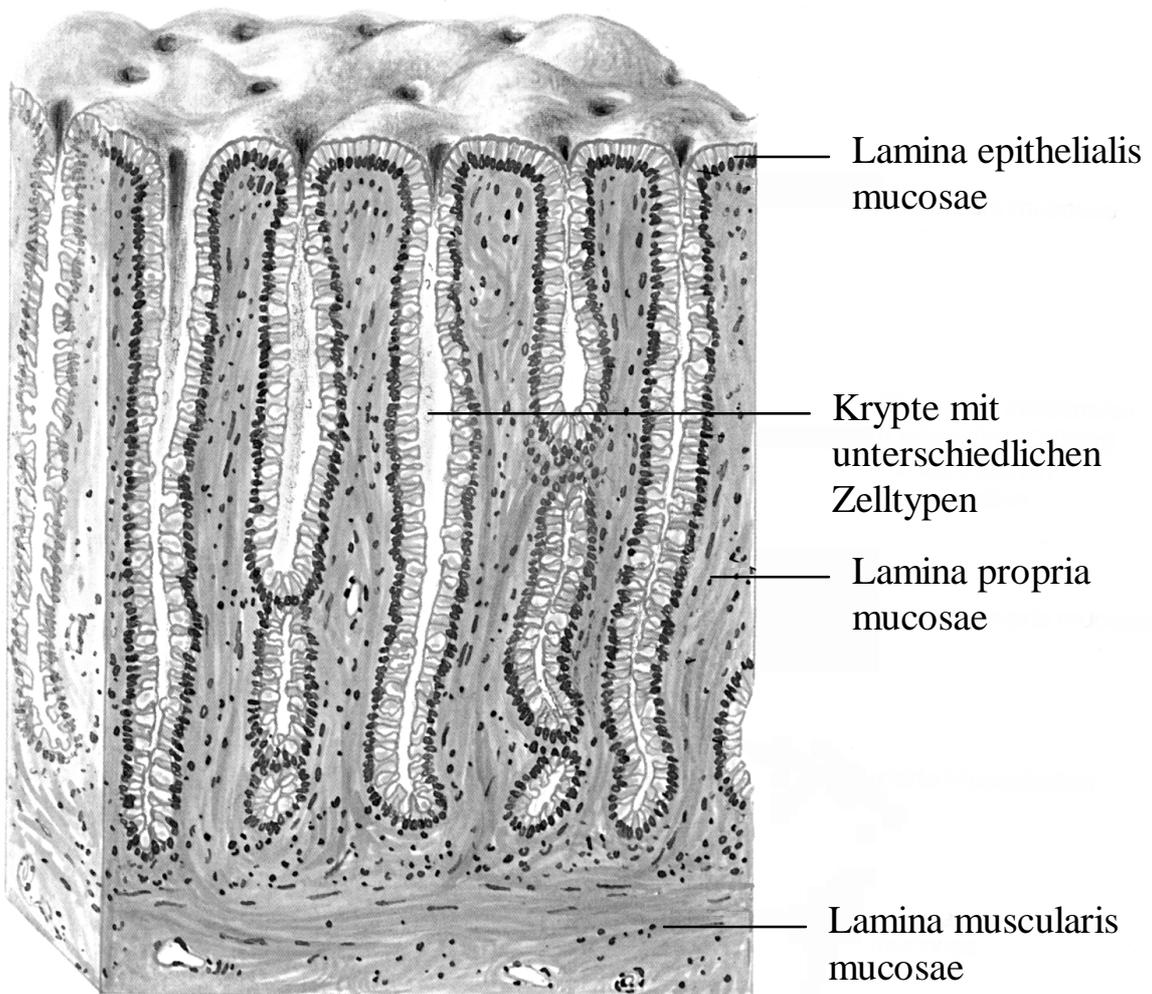


Abb. 1: Schematisch-plastische Darstellung des Kolonepithels (nach Liebich, 1990).

2. Die Entdeckung von Ca^{2+} als second messenger

Calcium ist einer der wichtigsten second messenger bei allen bekannten Lebensformen. Die Bedeutung von Ca^{2+} -Ionen für die Signaltransduktion und die Aufrechterhaltung biologischer Funktionen wurde erstmals von Sydney Ringer erkannt. Dieser beobachtete, daß isolierte Froschherzen sich in Salzlösungen mit Leitungswasser länger spontan kontrahierten als in Salzlösungen, die er mit destilliertem Wasser angesetzt hatte. Er führte dies auf die im Leitungswasser enthaltenen Ca^{2+} -Ionen zurück (Ringer, 1883). Diese Beobachtung bildete die Grundlage für die Entdeckung der elektromechanischen Kopplung, die heute in der Muskelphysiologie eine zentrale Rolle spielt.

Etwa 70 Jahre später beschrieb Heilbrunn seine „Theorie der Zellstimulation“ (Heilbrunn, 1958). Er sagte, daß die normalerweise niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bei Stimulation der Zellen drastisch ansteigen und wies darauf hin, daß Ca^{2+} bei vielen wichtigen Vorgängen in der Zelle beteiligt ist, wie z.B. Regulation von Enzymaktivitäten, Zellstoffwechsel, interzelluläre Kommunikation, Permeabilität der Zellmembran, Zellteilung und Zelltod.

In den 60-er Jahren führte Douglas Experimente durch, mit denen er zeigen konnte, daß - ähnlich der elektromechanischen Kopplung in der Muskelphysiologie - Ca^{2+} ebenfalls ausschlaggebend ist für die Regulation von Sekretionsvorgängen (Douglas 1974).

Mit der in den 70-er Jahren einsetzenden Entwicklung von Gewebe- und Zellkulturen einerseits und der Entwicklung von Ca^{2+} -Ionophoren auf der anderen Seite war es nun möglich, die zentrale Rolle des Ca^{2+} für die vielfältigen Zellfunktionen näher zu untersuchen. Einer der ersten Übersichtsartikel zu diesem Thema stammt von Rasmussen (1970).

In Eukaryontenzellen ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mit $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ etwa 1.000- bis 10.000-fach niedriger als extrazellulär (bei Säugetieren beträgt die extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration z.B. ca. $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Dieser Konzentrationsgradient wird von den Zellen aktiv aufrechterhalten und ausgenutzt, um Informationen oder Signale über die Plasmamembran hinweg zu vermitteln. So können kleine, kontrollierte Mengen an Ca^{2+} , die in die Zellen eingeführt werden, als Botenstoffe dienen.

Die niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen werden durch verschiedene Mechanismen aufrechterhalten. An der Zelloberfläche gibt es Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher, die freies Ca^{2+} aus der

Zelle schaffen. Angetrieben wird dieser Austauscher durch die Triebkraft für Na^+ , entlang seinem chemischen und elektrischen Gradienten in die Zellen zu strömen. Diese Triebkraft, welche auf Na^+ einwirkt, wird wiederum durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aufrechterhalten. Intrazelluläre Organellen wie z.B. das endoplasmatische oder das sarkoplasmatische Retikulum besitzen ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpen, die das freie intrazelluläre Ca^{2+} aktiv in diese Speicherorganellen pumpen und somit ebenfalls dazu beitragen, daß die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration niedrig bleibt (Hille, 1992).

Die Frage stellte sich nun, wie Ca^{2+} zur Signaltransduktion in die Zellen gelangen kann.

3. Ca^{2+} -Kanäle an erregbaren Strukturen

Für erregbare Zellen wie Muskel- und Nervenzellen ist seit langem bekannt, daß sie spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle exprimieren (Hille, 1992; s. Abb. 2). Es gibt verschiedene Typen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, die von ihrer Struktur her allerdings gleich aufgebaut sind. Sie bestehen aus verschiedenen Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ), von denen $\alpha 1$ die zentrale Untereinheit darstellt. Diese Untereinheit besteht aus vier transmembranären Domänen, die gemeinsam die eigentliche Pore bilden. Jede der vier Domänen ist aus sechs gleichen Segmenten zusammengesetzt. Die S4-Segmente jeder Domäne stellen die Spannungssensoren dar. Sie reagieren auf Membranpotentialänderungen mit Torsion und üben dadurch eine „Torfunktion“ aus. Depolarisiert die Membran, wird die Pore geöffnet und Calcium kann nun entlang seinem elektrischen und chemischen Gradienten in die Zelle strömen. Die verschiedenen Typen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen unterscheiden sich bezüglich ihres Aktivierungs- und Inaktivierungsverhaltens sowie durch ihre pharmakologischen Eigenschaften. So unterscheidet man z.B. sogenannte L-Typ und T-Typ Ca^{2+} -Kanäle. L-Typ Kanäle (für large conductance and long lasting current) haben eine große Leitfähigkeit und die gemessenen Ströme durch diese Kanäle sind groß und langanhaltend. Dem gegenüber stehen die T-Typ Kanäle (für tiny and transient); die Ströme durch diese Kanäle sind klein und transient (Hille, 1992).

Abbildung 2 zeigt ein Modell eines spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanals.

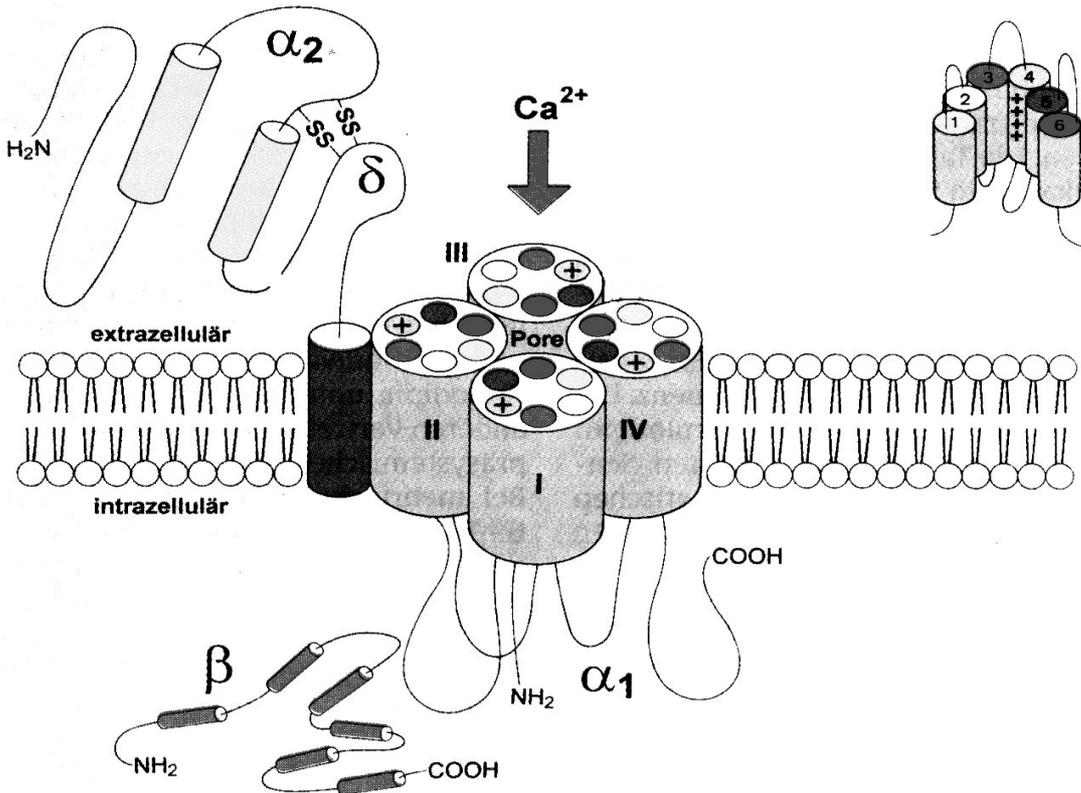


Abb.2: Modell eines spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanals, Erläuterungen siehe Text (aus: Handrock & Herzig, 1998)

4. Ca²⁺-Kanäle an nicht-erregbaren Strukturen

Für nicht-erregbare Zellen sind bisher keine spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle beschrieben worden. Statt dessen konnten an verschiedenen nicht-erregbaren Zellen sogenannte „store-operated Ca²⁺-channels“ (d.h. Speicher-gesteuerte Ca²⁺-Kanäle) nachgewiesen werden (Parekh & Penner, 1997). Dies bedeutet, daß bei diesen Geweben durch den Füllungszustand der intrazellulären Calciumspeicher der Ca²⁺-Einstrom von außen in die Zelle reguliert wird. Daher spricht man auch vom „kapazitiven Calciumeinstrom“. Eine Entleerung der Speicher aktiviert auf bisher noch unbekanntem Weg den Ca²⁺-Einstrom in diese Gewebe. Abbildung 3 zeigt ein Modell, wie der kapazitative Ca²⁺-Einstrom in die Zellen aktiviert werden kann. Die bisher beschriebenen Leitfähigkeiten, durch die Ca²⁺ in die Zellen gelangt, unterscheiden sich bezüglich ihrer Kationenselektivität z.T. erheblich (Parekh & Penner, 1997). Während einige dieser Leitfähigkeiten hochselektiv für Ca²⁺ sind, lassen andere beschriebene Leitfähigkeiten auch andere Kationen passieren. Aus diesem Grund ist in Abb. 3 die aktivierte Leitfähigkeit mit „Kationen“ beschriftet und nicht, wie man vielleicht erwarten würde, mit „Ca²⁺“.

Am nativen Kolonepithel konnte der kapazitative Ca²⁺-Einstrom bisher noch nicht gezeigt werden.

In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, die zur Aktivierung des Ca²⁺-Einstroms führen (Parekh & Penner, 1997). So kann z.B. über eine Stimulation muskarinergere Rezeptoren bei Zellen aus der Zellkulturlinie HT29 die Freisetzung von Ca²⁺ aus den intrazellulären Speichern induziert werden, was eine Aktivierung des kapazitiven Ca²⁺-Einstroms zur Folge hat (Fischer et al., 1992). Die Stimulation muskarinergere Rezeptoren kann z.B. über Acetylcholin oder Carbachol - ein stabiles Acetylcholinderivat - erfolgen. Durch die Rezeptorstimulation wird - gekoppelt über ein G-Protein - eine Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die PLC katalysiert dann eine Reaktion, bei der aus Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) entstehen. Die intrazellulären Ca²⁺-Speicher haben IP₃-Rezeptoren, die als Ca²⁺-Kanäle fungieren und nach IP₃-Bindung Ca²⁺ aus den Speichern freisetzen (Supattapone et al., 1988, s. Abb. 3 Punkt 1).

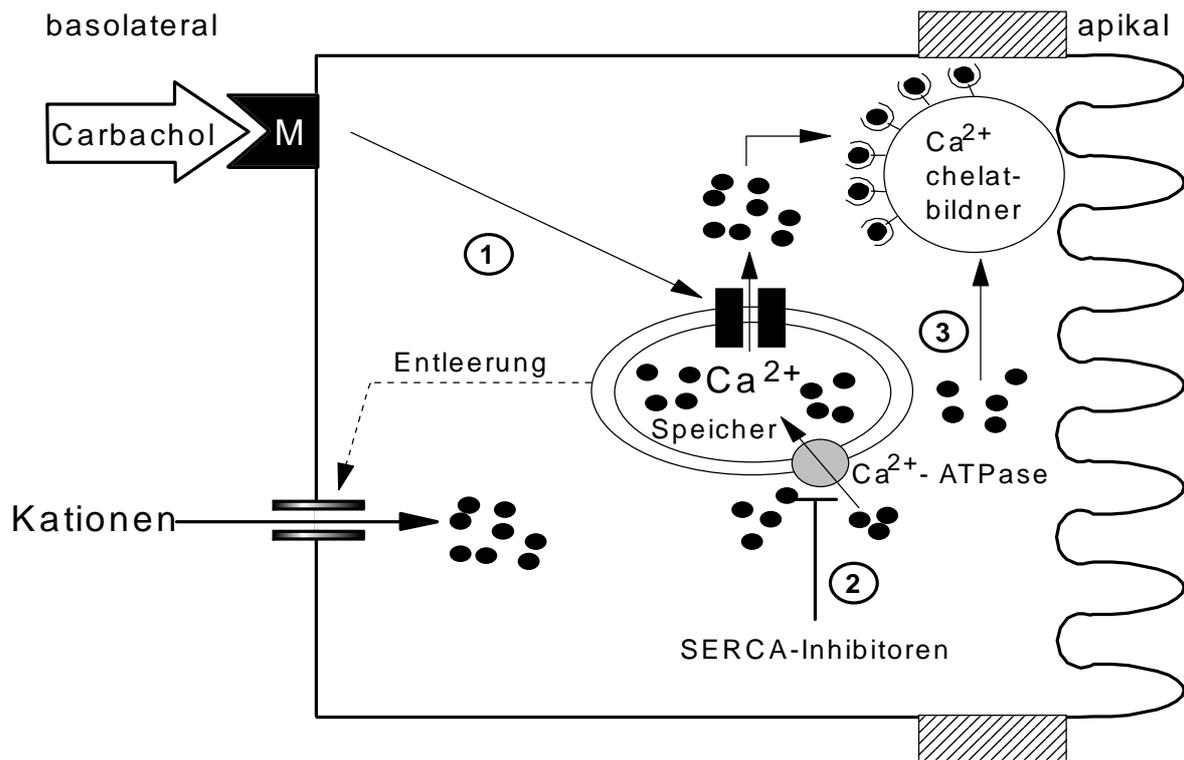
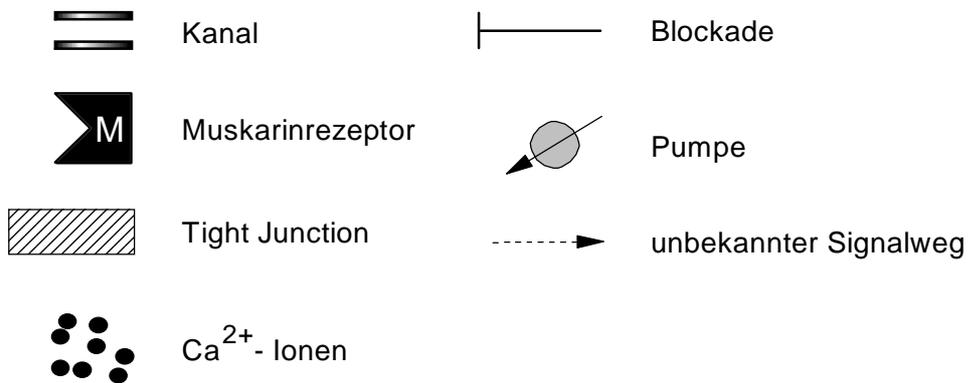


Abb.3: Modell zur Aktivierung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms.



Eine andere Möglichkeit, die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher zu entleeren, besteht darin, die Wiederaufnahme des freien intrazellulären Ca^{2+} in die Speicher mit Hilfe von Ca^{2+} -ATPase-Blockern zu hemmen. Zu diesen Stoffen, auch als SERCA (Sarkoplasmat. / Endoplasmat. Retikulum Ca^{2+} -ATPase) -Inhibitoren bezeichnet, zählen z.B. Thapsigargin und Cyclopiazonsäure (Taylor & Broad, 1998). Dadurch, daß diese Stoffe die Wiederauffüllung der Ca^{2+} -Speicher verhindern, aktivieren sie indirekt den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Zellen (s. Abb. 3 Punkt 2).

Ein weiterer Ansatz, diesen Einstrom zu aktivieren, besteht in der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkapazität. Dies kann erreicht werden durch eine hohe intrazelluläre Konzentration an Ca^{2+} -Chelatbildnern wie EGTA (Ethylenglykol bis-(β -aminoethylether) N,N,N',N'-Tetraessigsäure) oder BAPTA (1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N', Tetraessigsäure). Die Chelatbildner binden freies intrazelluläres Ca^{2+} und führen somit zu einer allmählichen Entleerung der Speicher. Dadurch, daß gebundenes Ca^{2+} durch Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern ersetzt wird, bleibt die freie Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle unbeeinflusst. Die allmähliche Entleerung der Speicher führt dann nach einigen Minuten zu einer Aktivierung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstromes (s. Abb. 3 Punkt 3).

Für Zellen aus der Kolonepithelzelllinie HT29 z.B. ist eine derartige Aktivierung eines Kationeneinstromes durch EGTA beschrieben (Kerst et al., 1995).

5. Iontentransporter und -leitfähigkeiten am Kolonepithel

Die Zellen des Kolonepithels besitzen eine Vielzahl von Transportern und Kanälen, die in die Plasmamembran eingelagert und an der Resorption und Sekretion von Elektrolyten beteiligt sind. Bei den Kanälen handelt es sich um Membranproteine, die eine wassergefüllte Pore bilden, durch die in geöffnetem Zustand kleine Moleküle passiv entlang ihrem elektrochemischen Gradienten hindurchdiffundieren können. Diese Kanäle sind meist relativ selektiv für ein bestimmtes Ion.

Dem passiven Iontentransport durch mehr oder weniger spezifische Kanäle stehen aktive Transportprozesse gegenüber. Der wichtigste aktive Transportprozeß geschieht durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Diese transportiert unter Energieverbrauch jeweils 3 Na^+ aus der Zelle und 2 K^+ in die Zelle hinein. Damit stellt sie die intrazellulär niedrige Natriumkonzentration und hohe Kaliumkonzentration sicher, die wiederum den Antrieb für andere Transporter darstellen. Die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ist elektrogen und trägt mit etwa 10 mV zum Ruhemembranpotential bei. Transporter, welche die durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aufrechterhaltenen elektrochemischen Gradienten nutzen, um Ionen über die Plasmamembran hinweg zu transportieren, nennt man sekundär aktive Transporter. Hierzu zählt z.B. der $\text{Na}^+\text{-H}^+\text{-Austauscher}$, der in der apikalen Membran der Kolonepithelzellen lokalisiert ist (s. Abb. 4).

Weitere Transportsysteme der Enterozyten sind der $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-\text{-Austauscher}$, die $\text{K}^+\text{-H}^+\text{-ATPase}$ und der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-\text{-Kotransporter}$. Eine Übersicht über die verschiedenen Transportsysteme und Kanäle in der Plasmamembran der Kolonepithelzelle gibt Abb. 4.

Iontentransporte unterliegen einer Regulation durch second messenger. Ein wichtiger second messenger ist das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP), ein Produkt des membranständigen Enzyms Adenylatzyklase. Zyklisches AMP aktiviert eine Proteinkinase A, die über eine Phosphorylierungsreaktion bestimmte Kaliumkanäle in der basolateralen Membran der Enterozyten hemmt, wobei ebenfalls in dieser Membran eingelagerte Kaliumkanäle eines anderen Typs gleichzeitig aktiviert werden (Mc Roberts et al., 1985, Warth et al., 1996). Gleichzeitig stimuliert diese Proteinkinase apikal gelegen Chloridkanäle, so daß es zu einer Chloridsekretion kommt.

Daher kommt es unter cAMP-Einfluß zu einer Depolarisation der Zellen, verbunden mit einer Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Fischer et al., 1996, Greger et al., 1997).

Ca^{2+} ist ebenfalls ein wichtiger second messenger am Kolonepithel, auf dessen Bedeutung im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

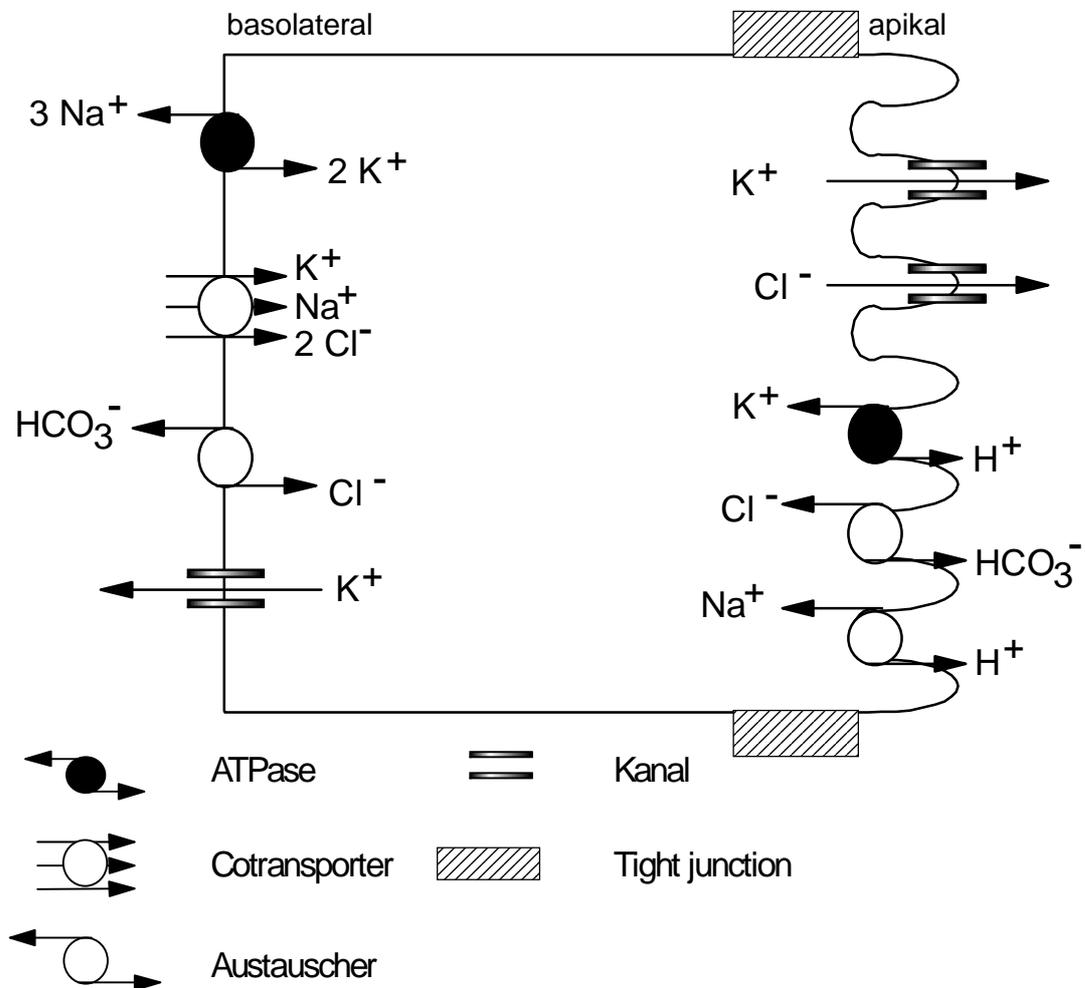


Abb. 4: Modell der Ionentransportsysteme am Kolonepithel der Ratte

6. Wirkung von intrazellulärem Ca^{2+} auf Ionenkanäle der Kolonepithelzellen

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann physiologischerweise auf verschiedenen Wegen erfolgen; entweder durch eine Entleerung der intrazellulären Speicher, durch Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Zellen oder durch eine Kombination von beidem. In allen Fällen kommt es, wie in Abb. 5 dargestellt, zu einer Aktivierung sowohl basolateral (= serosal = Blutseite) als auch apikal (=luminal = mukosal) gelegener Kaliumleitfähigkeiten (Bleich et al., 1996, Schultheiß & Diener, 1997). Kalium tritt, seinem Konzentrationsgradienten folgend, aus den Zellen aus und die Zellmembranen hyperpolarisieren. Durch das Absinken des Membranpotentials erhöht sich die elektrische Triebkraft für Cl^- , durch apikal gelegene Chloridkanäle die Zelle zu verlassen (Böhme et al., 1991). Es kommt also zu einer Chloridsekretion, die hier im Gegensatz zu cAMP indirekt vermittelt ist.

In der basolateralen Membran der Kolonkryptenzellen sind Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle und ein Ca^{2+} -abhängiger nichtselektiver Kationenkanal nachgewiesen worden (Bleich et al., 1996). Ein Modell, wie das Ca^{2+} in die Kolonepithelzellen gelangen könnte und welche Wirkung das intrazelluläre Ca^{2+} auf verschiedene Ionenleitfähigkeiten dieser Zellen hat, zeigt Abb. 5.

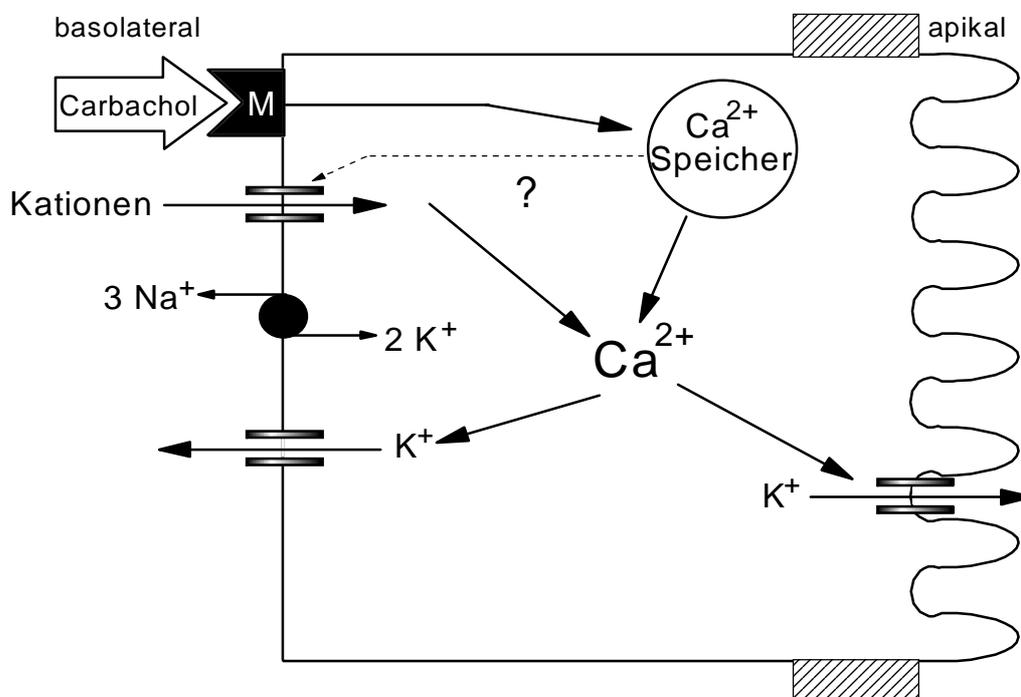


Abb.5: Wirkung von Ca^{2+} auf verschiedene Ionenleitfähigkeiten der Kolonepithelzellen. Legende siehe Abb. 4; M = Muskarinrezeptor.

7. Eigene Fragestellung

Wie bereits erläutert spielt Ca^{2+} am Kolonepithel eine wichtige Rolle als second messenger. Wie das Ca^{2+} in die Epithelzellen gelangt ist unbekannt. Für viele nicht-erregbare Gewebe ist ein kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom bereits beschrieben worden (Parekh & Penner, 1997). Vom nativen Kolonepithel gibt es bisher allerdings keinerlei Daten darüber, ob auch hier ein solcher Einstrom vorhanden ist.

Die vorliegende Arbeit soll daher folgende Fragen beantworten:

- Gibt es auch am nativen Kolon einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom ?
- Durch welche Ansätze kann dieser Einstrom in die Zellen aktiviert und inhibiert werden ?
- Gibt es Unterschiede in der Ausprägung dieser Leitfähigkeit entlang der Kryptenachse?
- Wie wird der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom reguliert ?
- Wird dieser Einstromweg von der Zelle auch unter physiologischen Bedingungen verwendet ?

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Patch-Clamp-Untersuchungen an isolierten Krypten aus dem Kolonepithel der Ratte durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden ergänzt durch Messungen des intrazellulären Ca^{2+} mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2.

Um die physiologische Rolle des Ca^{2+} -Einstroms zu analysieren wurde die Ussingkammer-Technik eingesetzt.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Universität Gießen. Es handelte sich um Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts. Für Messungen mit isolierten Krypten wurden nur Tiere im Alter von fünf bis neun Wochen verwendet, da bei älteren Tieren eine Isolierung intakter Krypten nicht mehr möglich war. Für die Ussingkammer-Versuche spielte das Alter der Tiere keine Rolle. Futter und Wasser stand den Ratten bis unmittelbar vor Versuchsbeginn ad libitum zur Verfügung.

2. Lösungen und Chemikalien

2.1 Lösungen für die Präparation

Die Präparation der Darmschleimhaut wurde in einer Bicarbonat-gepufferten Parsons-Lösung (Parson & Paterson, 1965) vorgenommen. Diese enthielt (alle Angaben in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 107; KCl 4,5; NaHCO_3 25; Na_2HPO_4 1,8; NaH_2PO_4 0,2; CaCl_2 1,25; MgSO_4 1 und Glucose 12. Die Lösung wurde mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast, das pH wurde mit $\text{NaHCO}_3/\text{HCl}$ auf 7,4 eingestellt.

Die Isolationslösung für die Krypten enthielt NaCl 107; KCl 4,5; NaHCO_3 25; Na_2HPO_4 1,8; NaH_2PO_4 0,2; Glucose 12,2; bovines Serumalbumin (BSA) 0,1% und als Calciumchelator Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-essigsäure (EDTA) $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)/HCl unter Carbogenbegasung auf 7,4 eingestellt.

Die Auffangtyrode für die isolierten Krypten war eine kaliumreiche, chloridarme Lösung (Böhme et al., 1991, Diener et al., 1991) und enthielt im Einzelnen ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): KGluc 100; KCl 30; N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure) (HEPES) 10; NaCl 20; MgCl_2 1; CaCl_2 1,25; Glucose 12; Natriumpyruvat 5; außerdem enthielt sie 0,1% BSA. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit KOH/HCl auf 7,4 titriert.

2.2 Bad- bzw. Perfusionslösungen

Die Standardbadlösung war bei den Ussingkammer-Versuchen die bereits beschriebene Parsons-Lösung. Bei den Patch-Clamp- und FURA-2-Messungen war es eine HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung. Sie enthielt in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$: NaCl 140; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 10; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt. Bei den Patch-Clamp-Untersuchungen wurde, um eine bessere Abdichtung (*Seal*) zwischen Glaspipette und Zelloberfläche zu erhalten, die Calciumkonzentration dieser Lösung kurzzeitig auf $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ erhöht. Bei den Versuchen, die unter chloridfreien Bedingungen gefahren wurden, wurde NaCl durch Natriumgluconat ersetzt. Für die Kationensubstitutionsversuche bezüglich der Natrium- und Calciumselektivität der Leitfähigkeit wurde einmal NaCl komplett durch N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt. In einer anderen Lösung wurde die Calciumkonzentration auf $70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ erhöht, das NaCl weggenommen und, um eine Osmolarität von $280\text{-}290 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu gewährleisten, $80 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol zugefügt. Die übrigen Komponenten der Lösung wurden nicht verändert. Um das Verhalten der Leitfähigkeit bei variierenden Natrium- und Calciumkonzentrationen zu untersuchen, wurde die Standardbadlösung jeweils entsprechend modifiziert. Einmal wechselte die Calciumkonzentration ($0,5; 1; 5; 10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), die NaCl-Konzentration betrug dabei konstant $120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. In einer anderen Versuchsreihe wurde die Natriumkonzentration verändert ($10; 50; 80; 120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), die Calciumkonzentration wurde dabei konstant bei $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ gehalten. Bei beiden Versuchsansätzen wurden, um die Osmolarität der Lösungen zu gewährleisten, jeweils noch entsprechende Mengen $\text{NMDG}\cdot\text{Cl}^-$ zugegeben.

2.3 Pipettenlösungen

Bei Patch-Clamp-Ableitungen im Whole-cell-Modus (siehe unten) wurde durch die Wahl der Pipettenlösung die Zusammensetzung der intrazellulären Flüssigkeit vorgegeben, denn es erfolgt ein rascher Austausch zwischen Zellinnerem und Pipettenlösung.

Die Standardpipettenlösung für die Patch-Clamp-Experimente enthielt in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$: KGluc 100; KCl 30; NaCl 10; Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA) 11; TRIS 10; ATP 5; MgCl_2 2; CaCl_2 1. Sie wurde mit TRIS/HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

Die hohe EGTA-Konzentration diente hierbei zur Pufferung der intrazellulären Calciumkonzentration und somit indirekt zur Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher,

was eine Aktivierung der nichtselektiven Kationenleitfähigkeit zur Folge hatte. In Fällen, wo dies nicht erwünscht war, wurde die EGTA-Konzentration auf $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ abgesenkt und das Calciumchlorid in der Lösung weggelassen. Dadurch war in beiden Fällen gewährleistet, daß die freie intrazelluläre Calciumkonzentration etwa $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ betrug.

Wollte man eine Beteiligung intrazellulärer Kalium- und Natriumionen an den gemessenen Strömen ausschließen, so ersetzte man diese einwertigen Ionen durch Cäsium. Die Pipettenlösung enthielt dann in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$: CsCl 140; EGTA 11; TRIS 10; ATP 5; MgCl_2 2; CaCl_2 1.

Für den sogenannten *Perforated Patch*, eine Form der Messung mit permeabilisiertem Membranfleck, wurde das Ionophor Nystatin in Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgelöst. Die Stammlösung enthielt $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Nystatin. Sie wurde zu jedem Versuchstag frisch angesetzt und unter Lichtschutz aufbewahrt. Von der Stammlösung wurden $6 \mu\text{l}$ in 1 ml Pipettenlösung gegeben. Auch diese Lösung wurde unter Lichtschutz aufbewahrt und jedesmal vor dem Füllen der Pipetten in einem Ultraschallbad geschallt.

Um eine stabile Abdichtung während des Versuchs zu erreichen, mußte die Spitze der Pipette mit der entsprechenden Pipettenlösung ohne Porenbildner vorgefüllt werden. Nach dem Seal dauerte es dann einige Minuten, bis das Nystatin in die Membran hineindiffundiert und der elektrische Zugang zum Zellinneren hergestellt war.

2.4 Lösungen für die FURA-2-Messungen

FURA-2-Acetoxy-methylester (Molecular Probes, Eugene, USA) wurde als $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Stammlösung in DMSO angesetzt und bei -20°C aufbewahrt. Pluronic® F-127 (BASF, Weyandotte, USA), ein Detergenz zur Unterstützung der Löslichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2, wurde als 20 %-ige Lösung in DMSO im Gefrierschrank aufbewahrt.

Die isolierten Krypten wurden mit $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FURA-2 und 0,05% Pluronic für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Farbstoff mit Auffangtyrode abgespült und die Krypten bis zur Messung unter Lichtschutz aufbewahrt.

Bei einigen FURA-2-Messungen wurde eine intrazelluläre Eichung vorgenommen. Die hierzu verwendeten Eichlösungen enthielten einmal in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$: Calcium 0; EGTA 2; und einmal Calcium 10. Die Konzentrationen an NaCl, KCl, HEPES, MgCl_2 und Glucose entsprachen denen der Standardbadlösungen. Zusätzlich enthielten beide Eichlösungen noch das Calciumionophor Ionomycin in einer Konzentration von $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

2.5 Chemikalien

Lanthan, Gadolinium und Flufenamat wurden als Blocker der nichtselektiven Kationenleitfähigkeit in den Perfusionslösungen eingesetzt. In den Ussingkammer-Experimenten wurden sie aus einer wässrigen Stammlösung direkt in die Kammern pipettiert. Gleiches gilt für Carbachol, ein stabiles Acetylcholinderivat.

Ionomycin wurde als Stammlösung in 96 %-igem Ethanol angesetzt und kurz vor Versuchsbeginn in die Perfusionslösungen pipettiert. Die Konzentration an Ethanol in der Perfusionslösung betrug 0,25%.

Poly-L-Lysin (Biochrom KG, Berlin, BRD) wurde als 0,01%-ige Lösung zur Beschichtung von Deckgläsern benutzt. Dadurch haften die isolierten Krypten fester auf dem Glas.

Alle Chemikalien stammten, falls nicht anders angegeben, von der Firma Sigma, Deisenhofen, BRD.

3. Gewebepräparation

3.1 Präparation der Darmschleimhaut

Die Ratten wurden durch einen Schlag auf den Kopf betäubt und anschließend mittels Entblutung getötet. Die Bauchhöhle wurde entlang der Linea alba eröffnet. Das Kolon wurde an seinem distalen Ende, ca. 5 mm anal des Lymphknotens, der die Grenze zum Rektum markiert (Lindström et al., 1979), durchtrennt und stumpf vom Mesenterium gelöst. Die Präparation des Kolons nach cranial erfolgte ebenfalls stumpf. Am Übergang vom Caecum zum Kolon wurde das freipräparierte Darmsegment durchtrennt. Der Dickdarm wurde nun sofort in eisgekühlte, Carbogen-begaste Parsons-Lösung gelegt. Das Darmlumen wurde mit etwa 20 ml Parsons-Lösung gespült und so von Kot gereinigt. Anschließend wurde das Kolon auf einen 5 mm dicken Plastikstab gezogen.

Proximal des bereits erwähnten Lymphknotens wurden stumpf die Tunica serosa und die Tunica muscularis mit der Hand abgestreift. Dadurch erhielt man ein Mucosa-Submucosa-Präparat, welches nur noch aus drei Schichten bestand: der Lamina muscularis mucosae, der Lamina propria mucosae und der Lamina epithelialis mit Resten des Plexus submucosus. Um das so erhaltene Schleimhautpräparat in die Ussingkammer einzuspannen, wurde es im Bereich des Mesenterialansatzes in Längsrichtung aufgeschnitten.

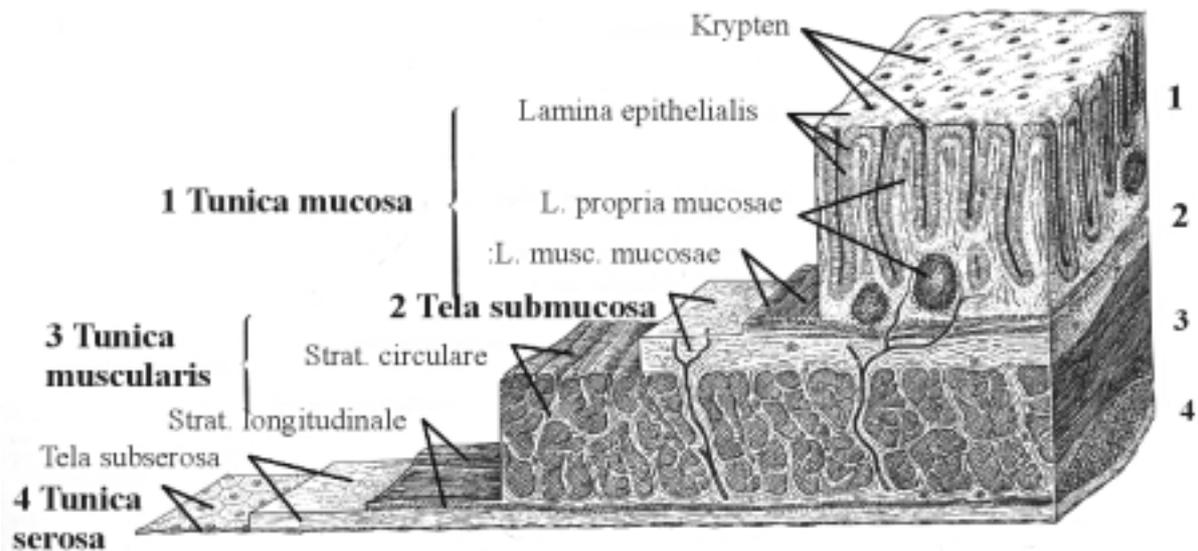


Abb. 6: Schematische Darstellung der Kolonwand, Lupenvergrößerung (nach Sobotta & Becher, 1972)

3.2 Präparation der isolierten Krypten

Für die Isolation der Krypten eignet sich nur der distale Teil des Kolons. Dieser wurde so präpariert, wie für die Ussingkammer-Versuche bereits beschrieben. Das Mukosa-Submukosa-Präparat wurde dann ebenfalls in Längsrichtung aufgeschnitten und mit Cyanacrylatkleber auf Plexiglashalter geklebt.

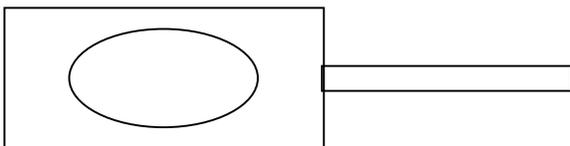


Abb. 7: Plexiglashalter

Diese Halter wurden nun für 5 - 8 Minuten, je nach Alter, Geschlecht und Gewicht der Tiere, in einer Calcium-freien, EDTA-haltigen Isolationslösung inkubiert. Die Inkubation fand in einem Wasserbad bei 37°C unter Carbogenbegasung statt. Anschließend wurden die Halter in einen Vibromischer (Chemap, Volketswil, Schweiz) eingespannt und in Auffangtyrode geschüttelt, so daß sich die intakten Krypten von der Darmschleimhaut lösten. Die kryptenhaltige Suspension konnte nun bis zu 6 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden. Unmittelbar vor jeder Messung wurden einige Krypten mit Hilfe einer Pasteur-Pipette unter

optischer Kontrolle auf runde, mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen gebracht und in die Meßkammer gegeben.

4. Elektrische Messungen mittels Patch-Clamp-Technik

Neher und Sakmann entwickelten 1976 eine Methode weiter, mit der sich ein Strom durch die einzelnen Ionenkanäle in der Membran lebender Zellen messen läßt. Diese Ionenströme spielen nicht nur bei elektrisch erregbaren Zellen eine wichtige Rolle, sondern sind in allen Geweben, also auch im Darmepithel, vorhanden. Um die winzigen Einzelkanalströme, die im pA-Bereich liegen, messen zu können, muß man sie aus dem viel größeren Hintergrundrauschen herauslösen. Dies geschieht dadurch, daß man eine mit Elektrolytlösung gefüllte Glaspipette auf die Zelloberfläche der zu messenden Zelle aufsetzt und somit einen kleinen Teil - einen Flecken (*Patch*) - der Zellmembran elektrisch von seiner Umgebung isoliert. Um das Hintergrundrauschen zu reduzieren, muß man eine sehr dichte Verbindung (*Seal*) zwischen der Zellmembran und dem Rand der Pipette schaffen. Dies geschieht einmal durch die Verwendung sauberster Oberflächen auf beiden Seiten (Pipette und Zelle) und zusätzlich durch die Erzeugung eines moderaten Unterdrucks in der Pipette (Hamill et al., 1981). Durch diese Maßnahmen kommt es zu einer sehr innigen Verbindung zwischen Zellmembran und Glasoberfläche, was einen starken Anstieg des Widerstandes der Pipettenöffnung vom Megaohm- in den Gigaohmbereich zur Folge hat. Dieser hohe Widerstand ermöglicht es nun auch, die Spannung über der Membran auf definierte Werte zu klemmen. Das gelingt mit einem geeigneten elektronischen Verstärker, mit dem gleichzeitig der Strom gemessen werden kann, welcher nötig ist, um die vorgegebene Spannung aufrecht zu erhalten.

4.1. Patch-Clamp-Konfigurationen

Durch den „Gigaseal“, dessen physikalische Grundlage bis heute noch ungeklärt ist, haftet die Zellmembran so fest an der Glaswand der Pipette, daß verschiedene Manipulationen mit dem Membranfleck möglich sind, ohne daß die Verbindung zwischen Glaswand und Membran abreißt. Dadurch sind diverse Meßkonfigurationen möglich, die im Folgenden kurz beschrieben werden sollen (s. Abb. 8).

Das bereits beschriebene Aufsetzen der Pipette auf eine intakte Zelle mit Bildung eines Gigaseals bezeichnet man als *Cell-attached-Konfiguration*. Durch einen kurzen Saugpuls läßt sich das Membranstück unter der Pipette durchbrechen bzw. herausreißen und man gelangt zur

sogenannten Ganzzell- oder *Whole-Cell-Konfiguration*. Hierbei hat man elektrischen Zugang zum Zellinneren und kann Ströme durch die gesamte Zellmembran messen. Durch Anlegen einer bestimmten Spannung (*Voltage-clamp*) oder Einspeisung eines definierten Stromes (*Current-clamp*) in die Zelle kann nun jeweils der entsprechende Strom bzw. das Potential über der Membran gemessen werden. Bei der Ganzzelleableitung kommt es sehr schnell zu einem Austausch zwischen Pipettenlösung und Zellinnerem. Daher ist es möglich, durch die Wahl der Elektrolytlösung in der Pipette das zytoplasmatische Milieu zu kontrollieren. Ein Nachteil der *Whole-Cell-Ableitung* ist, daß Enzyme und second messenger aus dem Zellinneren in die Pipettenlösung diffundieren und das Zytoplasma seine natürliche Zusammensetzung verliert. Will man dies verhindern, kann man den sogenannten *Perforated Patch* anwenden. Hierbei gibt man den Porenbildner Nystatin, ein Polyen-Antibiotikum, in die Pipettenlösung und wartet im *Cell-attached-Modus* ein paar Minuten, bis durch die ausreichende Porenbildung der elektrische Zugang zum Zellinneren hergestellt wurde.

Weitere wichtige Meßkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik sind die *Inside-out* und die *Outside-out-Konfiguration*, die allerdings hier nicht zur Anwendung kamen.

4.1.1 Vorzeichenkonventionen

Generell betrachtet man die Richtung des Stromes aus der Sicht der Zelle. Somit ist ein Strom positiv geladener Ionen in die Zelle hinein ein Einwärtsstrom und wird definitionsgemäß als negativer Strom dargestellt. Ein Strom positiv geladener Ionen aus der Zelle heraus ist ein Auswärtsstrom und wird als positiver Strom dargestellt. Für negativ geladene Ionen gilt das Umgekehrte.

4.2. Der Patch-Clamp-Meßstand

4.2.1. Mikroskop

Der Meßstand war mit einem inversen Mikroskop (IX 70 Olympus, Tokyo, Japan) ausgestattet. Bei diesen Mikroskopen befindet sich der optische Teil unter dem Objektisch. Die Beleuchtungseinrichtung und der Kondensor sind so hoch über den Objektiven positioniert, daß der Raum oberhalb des Präparates ausreichend Platz für Meßkopf, Elektrodenhalter, Elektroden, Perfusions- und Absaugvorrichtung bietet.

Das Mikroskop verfügte über 10 x Weitwinkel-Okulare und Objektive mit 4-, 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung. Bei einem Patch-Clamp-Experiment ist das kontrollierte Aufsetzen der Pipette auf die Zelloberfläche ein zentraler Vorgang, der eine gute dreidimensionale Darstellung der Zellen verlangt. Aus diesem Grund ist das Mikroskop mit der sogenannten Normarski-Optik ausgestattet. Bei diesem kontrastverstärkenden Verfahren, einem differentiellen Interferenzkontrast, wird optisch ein dünner Schnitt durch das Untersuchungsobjekt gelegt, so daß Strukturen ober- und unterhalb der Betrachtungsebene weniger stören. Durch abwechselndes Fokussieren von Pipettenspitze und Zelle kann man sich daher sehr genau orientieren und die Pipettenspitze langsam an bzw. auf die Zelloberfläche bringen.

4.2.2 Meßkammer und Perfusionssystem

Der Objektisch des Mikroskops war so modifiziert, daß spezielle Meßkammern eingesetzt und in X- und Y-Richtung bewegt werden konnten. Die Meßkammern bestanden aus einer 10 mm starken Plexiglasscheibe (\varnothing 50 mm) mit einer runden Vertiefung in der Mitte (\varnothing 15 mm). In diese Vertiefung wurden Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen (\varnothing 13 mm, Stärke 0,16 - 0,19 mm, W. Plannet GmbH, Wetzlar, BRD) eingebracht, auf denen sich die isolierten Krypten befanden. Diese Kammern wurden dann perfundiert. Die Gefäße mit den Perfusionslösungen waren etwa 50 cm oberhalb der Meßkammer angebracht und mit dieser über Infusionsbestecke (LDKS Oversan Industria Biomedica S.p.A. Mailand, Italien), die in einer Kanüle endeten, verbunden. Der Zulauf in die Meßkammer erfolgte kontinuierlich. Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 1 ml pro Minute. An der dem Zulauf gegenüberliegenden Seite der Meßkammer wurde in definierter Höhe eine Absaugung positioniert, so daß der Flüssigkeitsspiegel in der Kammer konstant war. Das Flüssigkeitsvolumen in der Meßkammer betrug 0,5 ml. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.2.3. Meßtisch und mechanische Komponenten

Da selbst minimalste Bewegungen zwischen Präparat und Pipette die empfindlichen Patch-Clamp-Messungen stören, mußte der Meßplatz von mechanischen Schwingungen und Erschütterungen abgeschirmt werden. Dies erreichte man durch einen schwingungsgedämpften Tisch. Auf diesem Tisch befanden sich das Mikroskop, die Meßkammer und der Mikromanipulator mit Pipettenhalter und Vorverstärker.

Um die Patchpipette präzise an die Zellen heranführen zu können wurde der Vorverstärker mit dem Pipettenhalter auf einen hydraulischen Mikromanipulator (MHW-103, Narishige International, London, England) montiert. Der Mikromanipulator erlaubte Bewegungen in alle Raumrichtungen.

Die Pipetten wurden in einen Pipettenhalter eingesetzt (s. Abb. 10), welcher direkt am Vorverstärker befestigt war. Der Pipettenhalter hatte eine Schlauchverbindung, über die ein Unter- oder Überdruck ausgeübt werden konnte. Beim Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde eine Überdruck appliziert, um einer Verschmutzung der Pipettenöffnung vorzubeugen. Bei der Herstellung des Gigaseals wurde über den gleichen Anschluß ein Unterdruck erzeugt.

Die elektrische Verbindung zwischen Pipette und Vorverstärker erfolgte über einen Silber/Silberchlorid-Draht (siehe unten).

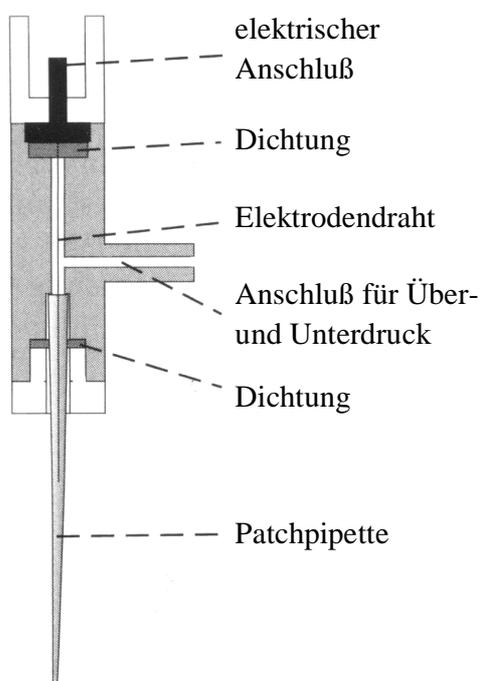


Abb. 10: Pipettenhalter im Längsschnitt (aus Numberger & Draguhn : Patch-Clamp-Technik)

Um den Meßstand von elektrischen Störungen aus der Umgebung abzuschirmen, war der gesamte Aufbau mit einem Faraday-Käfig umgeben.

4.2.4 Elektronische Komponenten

Zur Messung der Membranströme und -potentiale wurde ein Patch-Clamp-Verstärker (RK 400, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) verwendet. Sein auf dem Mikromanipulator montierter Vorverstärker (HK 409), auch *Headstage* genannt, mißt den Strom, der durch die Membran unter der Pipette fließt, wandelt ihn in eine Spannung um, verstärkt das Signal und schickt es in das Hauptgerät (schematische Darstellung des Vorverstärkers s. Abb. 11).

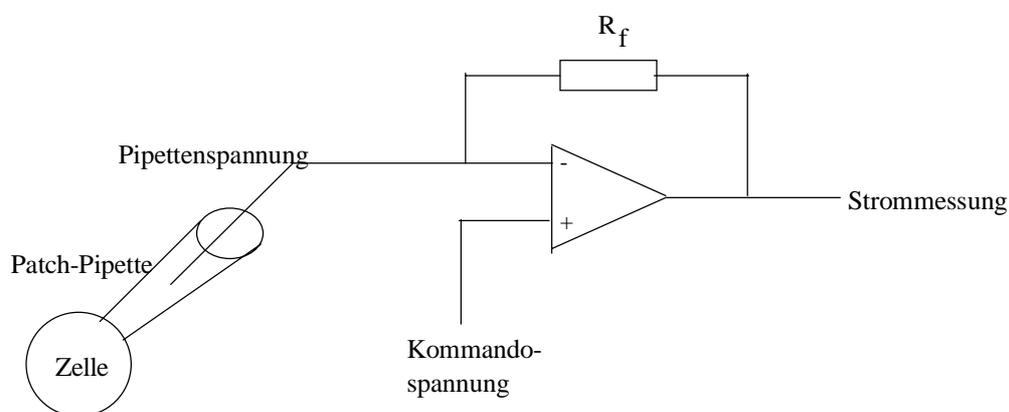


Abb. 11: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers. Dieser stellt einen Strom-Spannungs-Wandler dar. Sind Kommando- und Pipettenspannung unterschiedlich groß, so fließt ein Strom durch den Rückkopplungswiderstand R_f und es entsteht dort eine Spannung, die proportional dem Strom ist, der in die Pipette injiziert wird.

Der Hauptverstärker kann das Signal weiter verstärken, es filtern und er enthält die Bedienungsfläche für den Benutzer. Der RK 400 arbeitet nach dem Prinzip des Rückkopplungswiderstandes ($1 \text{ G}\Omega$ für die Ganzzelleableitungen).

Der Verstärker ist mit einem Computer verbunden. Von hier aus kann mit Hilfe eines Programms (CED Patch and Voltage Clamp Software, Cambridge Electronic Design LTD., Cambridge, England) eine Kommandospannung in Form eines Haltepotentials oder einer Potentialpulsfolge festgelegt und, nach Umwandlung des digitalen in ein analoges Signal, in den Eingang des Verstärkers eingespeist werden. Dadurch ist es möglich, die Spannung an der Pipette auf Werte zwischen $+200 \text{ mV}$ und -200 mV zu klemmen. Der Verstärker bietet auch

die Möglichkeit zur stromkonstanten Spannungsmessung (*Current-Clamp*) und erlaubt so die Messung des Membranpotentials. Zur „Verständigung“ von digital arbeitendem Computer und analog arbeitendem Verstärker ist ein DA-AD-Wandler (CED 1401, Cambridge Electronic Design LTD., Cambridge, England) zwischengeschaltet. Dieser wandelt analoge Signale in digitale Signale um und umgekehrt. Gesteuert wird er von der Computersoftware.

Um das hochfrequente Rauschen der gemessenen Signale zu reduzieren besitzt der RK 400 einen sogenannten low pass filter (AF-180, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) von 3 kHz.

Zur optischen Kontrolle der elektrischen Vorgänge bei der Sealbildung, dem Aufbrechen der Zellmembran sowie im Verlauf einer Strom-Spannungskurve (näheres dazu siehe später) war ein Oszilloskop (HM-205-3 HAMEG Instruments, Frankfurt, BRD) an den Verstärker angeschlossen. Dieses diente auch zum Abschätzen der Pipettenwiderstände.

4.2.5 Elektroden und Patchpipette

Sowohl die Referenzelektrode, die in die Badlösung eintauchte, als auch die Elektrode, die den Vorverstärker mit der Pipettenlösung verband, waren Silber/Silberchloridelektroden. Die Badelektrode wurde über eine Agarbrücke ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl} + 3 \% \text{ Agar}$) mit der Badlösung verbunden. Die Meßelektrode befand sich in der Pipette, die zuvor mit der entsprechenden Pipettenlösung gefüllt worden war. Um die Silberchloridschicht der Meßelektrode und das Dichtungsgummi im Pipettenhalter zu schonen, wurde das hintere Ende der Pipetten mit einem Bunsenbrenner rundgeschmolzen. Dies verhinderte, daß beim Einsetzen der Pipette in den Pipettenhalter die Silberchloridschicht abgekratzt oder das Dichtungsgummi beschädigt wurde. Für die Patchpipetten wurde Borosilikatglas (Jencons Scientific, Bedfordshire, England) mit einem Innendurchmesser von 1,15 mm und einem Außendurchmesser von 1,8 mm verwendet. Nach dem Zuschneiden wurden die Enden aus bereits erwähntem Grund feuerpoliert. Anschließend wurden sie mit einem Vertikalpuller (Typ PC 95, Hans Ochotzki, Feinmechanik, Homburg/Saar, BRD) in zwei Stufen fein ausgezogen. Der Widerstand der Pipetten betrug 5 - 9 M Ω , die Pipettenspitzen hatten eine Öffnung von etwa 1 μm Durchmesser.

4.3 Datenerfassung

Zur Erfassung und Speicherung der gemessenen, low-pass-gefilterten Daten waren verschiedene Geräte an den Hauptverstärker angeschlossen.

Ein Papierschreiber (L 250 E, Phywe Systeme GmbH, Düsseldorf, BRD) zeichnete während der gesamten Messung kontinuierlich entweder Membranpotential oder -strom auf. Gleichzeitig wurden die gemessenen Strom- und Spannungswerte auf einen digitalen Kassettenrekorder (DTR 1204, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) aufgenommen. Über ein angeschlossenes Mikrofon war es möglich, Kommentare zu den einzelnen Messungen auf das Band zu sprechen. Schließlich wurden die Daten auch noch auf der Festplatte des Computers gespeichert. Zur Datenerfassung diente die bereits erwähnte CED Patch and Voltage Clamp Software. Die Frequenz, mit der die Daten gesammelt wurden, betrug 4 kHz.

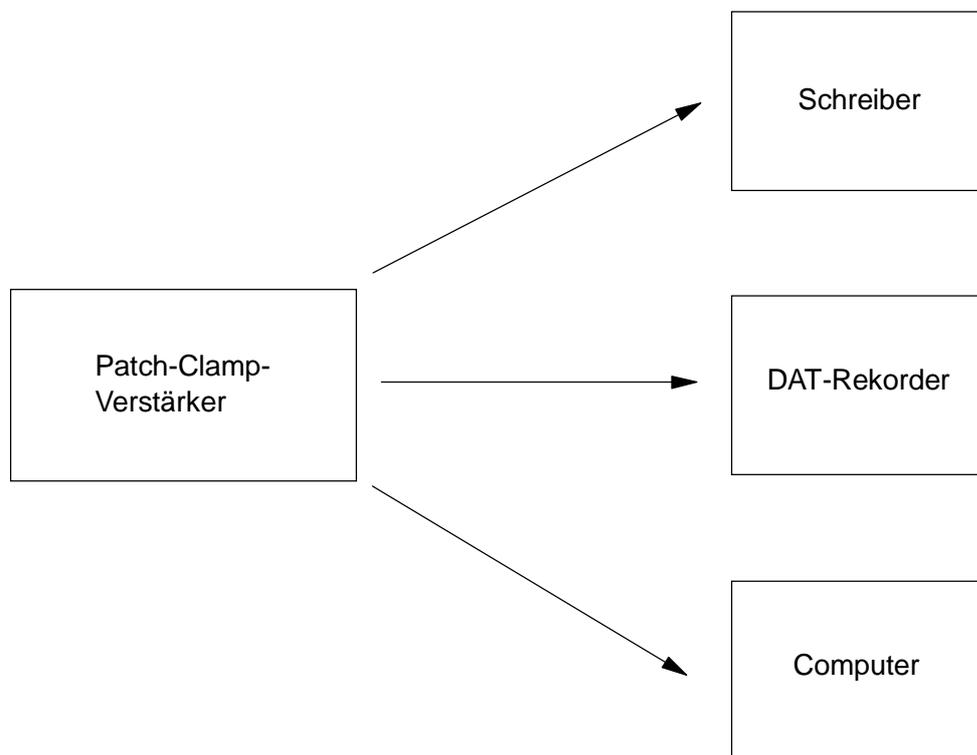


Abb. 12: Geräte für die Erfassung der Meßergebnisse

4.4 Ablauf eines Patch-Clamp-Experimentes und Erläuterung der Meßverfahren

4.4.1 Sealbildung

Bevor man mit der eigentlichen Messung beginnen konnte, war es wichtig, mit Hilfe des Mikroskops eine Krypte in der Meßkammer zu suchen, die intakt war und fest auf dem Untergrund haftete.

Dann füllte man die am Versuchstag frisch gezogene Pipette luftblasenfrei mit Elektrolytlösung und spannte sie in den Pipettenhalter ein. Nun legte man einen Überdruck im Pipetteninneren an. Dieser sollte das Verstopfen der Pipette beim Eintauchen in die Badlösung verhindern. Hatte man die Luft-Wasser-Grenze überschritten, war der nächste Schritt zur Vermeidung von Meßartefakten die Korrektur des sogenannten *Liquid Junction Potentials*, auch als *Offsetpotential* bezeichnet. Hierunter versteht man Spannungen, die an Übergängen innerhalb der Meßkette Silberdraht - Pipettenlösung - Badlösung - Erdung entstehen und nicht auf das Präparat oder die Kommandospannung zurückzuführen sind. Als nächstes erzeugte man einen rechteckförmigen Kommandospannungspuls (s. Abb. 13). Aus der Höhe des Spannungspulses und des daraus sich ergebenden Stromes konnte man am Oszilloskop den Eingangswiderstand der Pipette mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes abschätzen. Nun führte man die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators nahe an die Zelloberfläche der zu messenden Zelle heran, ließ den Überdruck ab und setzte die Pipettenöffnung vorsichtig auf die Zelle auf. In einigen Fällen kam es durch das Aufsetzen spontan zur Sealbildung, in den meisten Fällen mußte man allerdings durch behutsames Saugen einen Unterdruck erzeugen. War ein Seal zustande gekommen, konnte man dies am Oszilloskop daran erkennen, daß die Stromantwort auf den Kommandospannungspuls zu einer geraden Linie (= Gigaohmbereich) mit zwei kapazitiven Artefakten geworden war (s. Abb. 13).

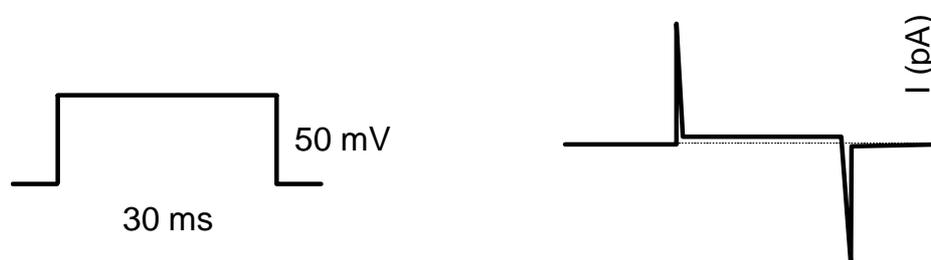


Abb. 13: Kommandospannungspuls

Stromantwort nach Sealbildung

Die kapazitiven Artefakte konnten durch eine Einrichtung am Hauptverstärker kompensiert werden. Nach Einstellen eines negativen Haltepotentials wurde durch vorsichtiges, später je nach Zelle stärkeres, ruckartiges Saugen am Pipettenschlauch versucht, die Membran unter der Pipettenöffnung wegzureißen und so den elektrischen Zugang zur Zelle zu erhalten. Nach Durchbrechen der Membran änderte sich die Stromantwort am Oszilloskop in charakteristischer Weise. Da nun statt des kleinen Membranflecks unter der Pipette bei jedem Spannungspuls die gesamte Fläche der Zellmembran umgeladen werden mußte, nahmen die kapazitiven Ströme sehr stark zu. Gleichzeitig verringerte sich der Widerstand unterhalb der Pipette, so daß ein Stromfluß auf dem Oszilloskop sichtbar wurde. Sobald der Zugang zur Zelle hergestellt war, wurde der Kommandospaltungspuls von 50 mV weggenommen und es wurde in den *Current-clamp Modus* umgeschaltet.

4.4.2 Membranpotential

In der sogenannten Stromklemmanordnung (*Current-clamp*) kann man einen definierten Strompuls in die Zelle einspeisen und das daraus resultierende Membranpotential ablesen. Injiziert man keinen Strom, so kann man in diesem Modus das Ruhemembranpotential der Zellen erfassen. Auch die Änderung des Membranpotentials nach Lösungswechseln wurde so untersucht. Bei Versuchen, die so angelegt waren, wurde das Membranpotential kontinuierlich von einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet.

4.4.3 Membranstrom

Klemmt man die Zellen auf ein bestimmtes Membranpotential (*Voltage clamp*), kann man den entsprechenden Membranstrom, der durch die Zellen fließt, kontinuierlich messen und aufzeichnen. Hierbei kann man durch die Wahl eines geeigneten Haltepotentials den Beitrag bestimmter Ionen zum Membranstrom ausschalten. Man muß dazu ein Haltepotential wählen, welches nahe dem Umkehrpotential (s. Punkt 4.5.2) des betreffenden Ions liegt.

4.4.4 Strom-Spannungskurven

Mißt man im sogenannten *Voltage-Clamp-Modus* die Ströme durch die Zelle bei verschiedenen Haltepotentialen und trägt anschließend diese Stromwerte in Abhängigkeit vom Potential auf, erhält man eine sogenannte *Strom-Spannungskurve*, auch IV-Kurve genannt. Das Pulsprotokoll für eine solche Kurve sah folgendermaßen aus: das Haltepotential wurde auf -80 mV eingestellt; von dort ausgehend erfolgten rechteckige Spannungssprünge in +10 mV-

Schritten bis auf einen letzten Wert von +60 mV. Diese Spannungspulse von -70mV, -60 mV, ... bis +60 mV dauerten jeweils 30 ms. Dazwischen wurde jedesmal für eine Sekunde wieder auf das Haltepotential geklemmt.

Aus der Steigung der Kurve ($\Delta I / \Delta U$) im Bereich ihres Schnittpunktes mit der X-Achse läßt sich die Leitfähigkeit der Zelle (G_C) bestimmen. Der Schnittpunkt der Kurve mit der Spannungsachse ergibt das sogenannte *Umkehrpotential*, auch Nullstrompotential genannt. Das ist die Spannung, bei der kein Strom fließt. Das Umkehrpotential hängt ab von den ionalen Bedingungen auf beiden Seiten der Membran und läßt sich mit Hilfe der Nernst-Gleichung (siehe Punkt 4.5.2) für jedes beteiligte Ion berechnen.

Anhand der IV-Kurven konnten auch der Ein- und Auswärtsstrom der Zellen bei -80mV bzw. bei +60 mV bestimmt werden. Zwischen den einzelnen IV-Kurven wurde immer wieder in den Current-Clamp-Modus umgeschaltet, um das Membranpotential zu kontrollieren.

4.5 Berechnungen

4.5.1 Delta-Strom-Kurven

Für die Berechnung der Delta-I-Kurven wurde jeweils der Stromwert bei einem bestimmten Haltepotential unter Versuchsbedingungen von dem entsprechenden Wert unter Kontrollbedingungen subtrahiert. Die so erhaltenen Werte wurden dann als Strom-Spannungskurve in ein Diagramm aufgetragen.

4.5.2 Umkehrpotentiale

Besteht über einer semipermeablen Membran ein elektrochemischer Gradient für ein bestimmtes Ion, so wird sich durch Diffusion ein Steady-state einstellen, bei dem kein Nettostrom durch die Membran fließt. Das Potential, bei dem sich dieses Gleichgewichtspotential (= Umkehrpotential = Nullstrompotential) einstellt, läßt sich mit Hilfe der Nernst-Gleichung berechnen, wenn die Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran bekannt sind. Die Formel dafür lautet:

$$E = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[Ion]_a}{[Ion]_i}$$

E = Gleichgewichtspotential (V)

R = Gaskonstante ($8,3143 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T = Versuchstemperatur (Kelvin)

z = Ladung des betreffenden Ions

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

[]_a / []_i = Konzentration des Ions auf der Außen- bzw. Innenseite der Membran in mol·l⁻¹

4.5.3 Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit ist der Kehrwert des Widerstandes:

$$G = 1/R$$

Legt man das Ohmsche Gesetz zugrunde, welches lautet:

$$U = R \cdot I ,$$

so ergibt sich für die Berechnung der Leitfähigkeit die Formel

$$G = I / U,$$

angegeben wird die Leitfähigkeit in Siemens [S].

5. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit FURA-2

FURA-2 ist ein Fluoreszenz-Indikator-Farbstoff, mit dessen Hilfe man intrazelluläre Calciumkonzentrationen messen kann. FURA-2 bildet mit Calcium zusammen einen Chelatorkomplex, wobei die Bindungskurve sigmoidal verläuft. Den Verlauf einer solchen Bindungskurve in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration zeigt Abbildung 14.

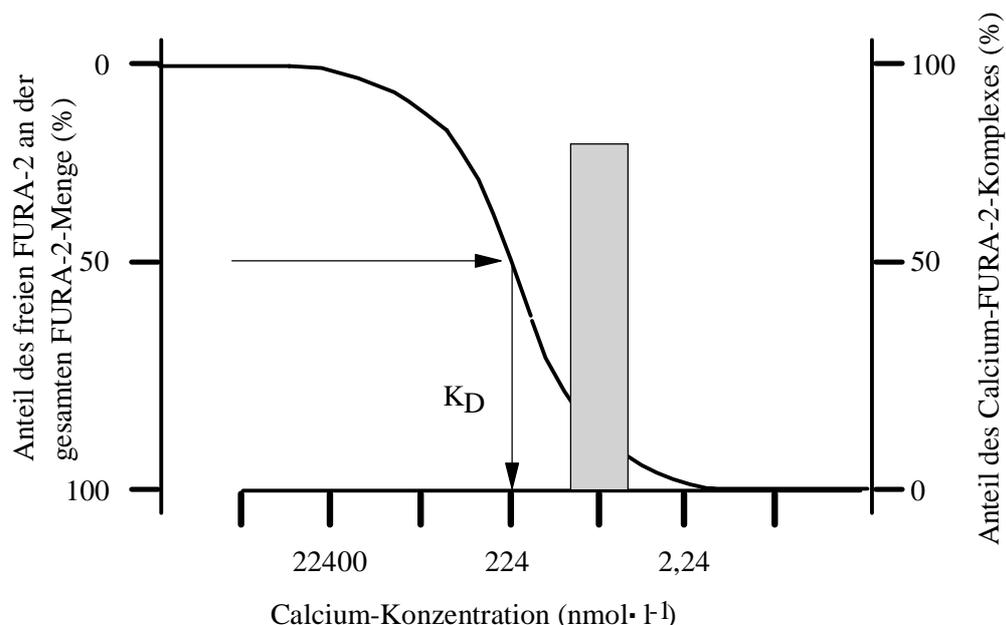


Abb. 14: Bindung von FURA-2 an Calcium in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration K_D = Dissoziationskonstante; die graue Säule zeigt den Bereich, in dem die intrazelluläre Calciumkonzentration unter Ruhebedingungen liegt.

Die Dissoziationskonstante (K_D) ist der Wert, bei dem 50% des Indikatorfarbstoffes an das Zielion, in diesem Fall Calcium, gebunden sind. Je kleiner der K_D -Wert, desto stärker ist die Affinität des Farbstoffes für das Zielion. Für FURA-2 liegt der K_D -Wert bei einer Calciumkonzentration von $224 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. In den meisten Zellen liegt die Konzentration an freiem Calcium unter Ruhebedingungen darunter (bei etwa $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Der Bereich, in dem sich die intrazelluläre Calciumkonzentration der meisten Zellen bewegt, ist durch die graue Säule gekennzeichnet. Betrachtet man die Abbildung, so liegt man zu Beginn einer Messung mit der Calciumkonzentration etwa am Fuß der sigmoiden Bindungskurve. Das bedeutet, daß man ausreichend Kapazität hat, um eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration auf einen Stimulus hin zu erfassen.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei FURA-2 um einen Chelatbildner. Dies sind in der Regel mehrfach geladene, größere Moleküle, die die apolare Zellmembran nicht passieren können. Um also die zu messenden Zellen mit dem Farbstoff zu „beladen“, bedient man sich der ungeladenen Acetoxymethyl (AM)-Ester-Form. Diese kann in die Zelle hineindiffundieren, kann aber das Zielion nicht binden. Befindet sich allerdings der AM-Ester einmal in der Zelle, so spalten die unspezifischen Esterasen, die in jeder Zelle vorhanden sind, die Ester-Bindung in die freie Säure-Form, welche nun zur Ionenbindung fähig ist. Diese „intrazelluläre Konvertierung“ von der inaktiven in die aktive Form hat zudem noch den Vorteil, daß der aktive Farbstoff nun, aufgrund seiner Ladung, nur sehr schwer wieder aus der Zelle hinausdiffundieren kann. Dies erlaubt es, das nicht aufgenommene extrazelluläre FURA-2 nach Ablauf der Inkubationszeit wegzuspülen.

FURA-2 zählt zu den sogenannten *Excitation Shifting Dyes*, das heißt zu den Fluoreszenzfarbstoffen, die mit Bindung an das Zielion (sprich Calcium) ihre Anregungswellenlänge ändern (s. Abb. 15).

Man sieht deutlich, daß für das ungebundene FURA-2 das Anregungsmaximum bei 380 nm Wellenlänge liegt, für das an Calcium gebundene FURA-2 liegt es bei 340 nm. Die stärkste Emission erfolgt konstant bei 510 nm.

Die Tatsache, daß freies und gebundenes FURA-2 bei unterschiedlichen Wellenlängen maximal angeregt werden, macht es möglich, sogenannte Verhältnismessungen (*Ratio measurements*) durchzuführen. Hierbei wird immer abwechselnd die Anregung bei 360 und 390 nm gemessen, und daraus das Verhältnis (*Ratio*) gebildet. (Aus technischen Gründen ist es nicht möglich, bei 340 und 380 nm zu messen).

Diese Art der Messung bringt einige Vorteile mit sich:

- die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration ist unabhängig von der absoluten Konzentration an Farbstoff in der Zelle
- Faktoren wie Zelldicke und Zellgröße spielen keine Rolle
- Fehlermöglichkeiten aufgrund eines möglichen Austrittes von Farbstoff aus der Zelle oder Ausbleichen werden reduziert

Da all die genannten Punkte bei beiden Wellenlängen die gleiche Auswirkung haben, fallen sie durch die Bildung der Ratio entweder ganz weg, oder sie werden minimiert.

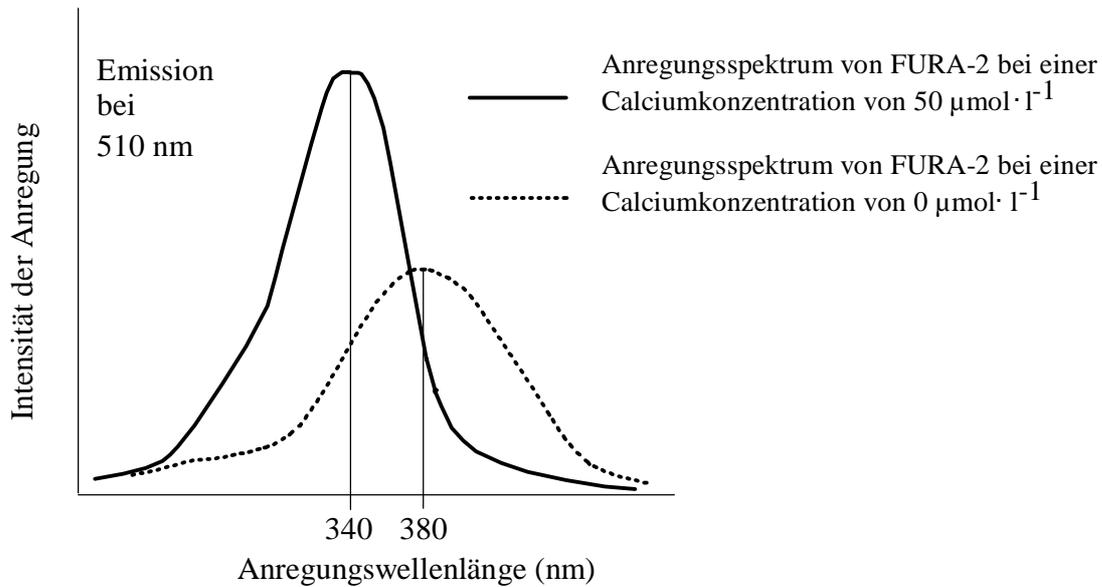


Abb. 15: Exzitiationsspektren von FURA-2 bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Die Emission wurde bei 510 nm gemessen.

5.1 Der FURA-2-Meßstand

5.1.1 Mikroskop und elektronische Komponenten

Auch bei den FURA-2 Messungen wurde, wie für die Patch-Clamp-Experimente bereits beschrieben, mit einem inversen Lichtmikroskop (Axiovert 35M, Zeiss, Oberkochen, BRD) gearbeitet. Dieses enthielt, um die Anforderungen für eine Fluoreszenzmessung zu erfüllen, einige zusätzliche Filter, Lampen, Filterrad u.a. Die Einzelheiten des optischen Systems sind in Abb. 16 dargestellt.

Das Mikroskop war mit einem *Photomultiplier* und einem *Controller* verbunden, die beide zum FURA-2 Data Acquisition System (Luigs und Neumann, Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen, BRD) gehörten. Einen Überblick über die Geräte gibt Abb. 17.

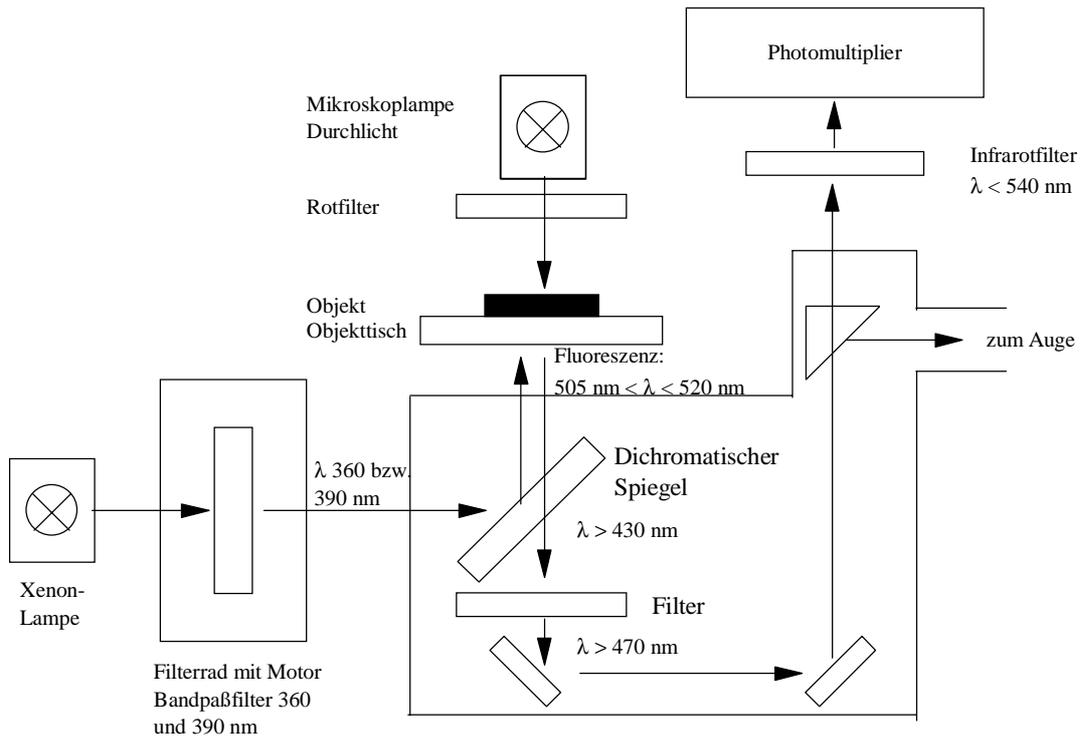


Abb. 16: Darstellung des optischen Systems für die FURA-2-Messungen

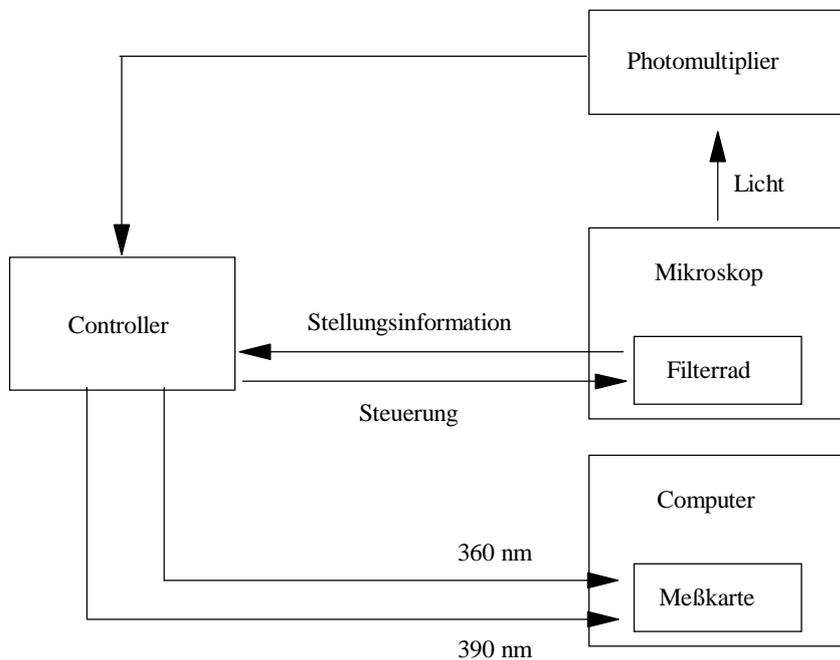


Abb. 17: Geräte für die FURA-2-Messungen

5.1.2 Meßkammer und Perfusionssystem

Als Meßkammern dienten Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, BRD). In diese Schalen wurde in der Mitte des Bodens ein Loch mit einem Durchmesser von 10 mm gebohrt.

Die isolierten Krypten wurden, wie schon vorher beschrieben, auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen gebracht und in Vorinkubationsschalen (Nunc Brand Products, Roskilde, Dänemark) mit FURA-2 inkubiert. Anschließend wurde der Farbstoff mit Auffangtyrode abgespült und die kryptenhaltigen Deckgläschen wurden mit Hilfe von Silikonpaste (Baysilone, Bayer AG, Leverkusen, BRD) unter die gebohrte Öffnung der Zellkulturschalen geklebt. Diese Schalen wurden auf das Mikroskop gebracht und konnten dort auch, ähnlich wie für den Patch-Clamp-Meßstand beschrieben, kontinuierlich perfundiert werden.

5.2 Meßprinzip und Datenerfassung

Gemessen wurde die Fluoreszenz von FURA-2 bei zwei Anregungswellenlängen (360 nm und 390 nm) durch einen Photomultiplier, dessen Filter Wellenlängen unter 540 nm passieren ließen. Die Wellenlänge des Anregungslichtes wurde durch ein sich ständig drehendes Filterrad, welches sich im Anregungsstrahlengang befand, gewechselt. Die Fluoreszenzsignale wurden vom Photomultiplier in ein Spannungssignal umgewandelt und an den Controller weitergeleitet. Dieser hatte zwei Ausgänge; einen für das Signal bei 360 nm und einen für das Signal bei 390 nm Wellenlänge. Die Ausgänge waren mit einer Meßkarte im Computer verbunden. Diese fragte mit einer vorher festgelegten Sammelrate von 2 Hz die Werte beider Kanäle ab und berechnete daraus die Ratio ($\text{Fluoreszenz}_{360} / \text{Fluoreszenz}_{390}$). Die Werte von Ratio, F_{360} und F_{390} wurden während der Messung kontinuierlich auf dem Bildschirm des Computers angezeigt. Gleichzeitig wurden die Zahlenwerte mit der festgelegten Frequenz auf der Festplatte gesammelt.

5.3 Messung und Eichung

Gemessen wurde bei 630-facher Vergrößerung mit einem 63-er Ölimmersions-Fluoreszenz-Objektiv. Durch den Einsatz verschiedener Blenden konnte man die Größe des Meßfeldes variieren. Für die Messungen an den isolierten Krypten wurde eine Blende von 1 mm Durchmesser gewählt, so daß das Meßfeld immer eine Größe von etwa 16 μm Durchmesser hatte.

Man suchte sich intakte, zur Messung geeignete Zellen im Fundusbereich der Krypte. Nach Kontrolle des Fluoreszenzsignals dieser Zellen wählte man einen zellfreien Bereich, um die Autofluoreszenz des Deckgläschens mit Hilfe der Software abzugleichen. Während der dann folgenden Messung wurden diese Autofluoreszenzwerte automatisch von den gemessenen Werten unter Versuchsbedingungen subtrahiert. Nun begann der eigentliche Versuch, bei dem man die Fluoreszenz und damit die intrazelluläre Calciumkonzentration unter dem Einfluß verschiedener Substanzen untersuchte.

Bei einigen Krypten wurde im Anschluß an den Versuch eine sogenannte intrazelluläre Eichung vorgenommen. Da man als Meßergebnis immer nur eine Änderung in der Intensität der Fluoreszenz und damit auch in der Ratio erhielt, war es nun interessant, den Größenordnungsbereich, in dem diese Änderungen lagen, auf die intrazelluläre Calciumkonzentration direkt zu beziehen. Dazu wurden die Zellmembranen mit dem Calciumionophor Ionomycin permeabilisiert. Dann wurden die Zellen mit einer Lösung perfundiert, die $0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Calcium und zur Pufferung von vorhandenen Calciumionen $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA enthielt. Man kann davon ausgehen, daß die wenigen freien Calciumionen in der Zelle nun in die extrazelluläre Flüssigkeit diffundieren und somit die Calciumkonzentration im Inneren der Zellen nahezu Null beträgt. Entsprechend läßt sich der nun gemessene Wert für die Ratio als R_{\min} verwenden. Jetzt wurde die Perfusion gewechselt auf eine $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Calciumlösung ohne EGTA. Das Calcium diffundiert nun in großem Maße in die Zellen hinein und die Ratio steigt dementsprechend stark an. Nachdem sie einen stabilen Wert erreicht hat, läßt sich dieser als R_{\max} verwenden.

Mit Hilfe der Grynkiewicz-Gleichung (Grynkiewicz et al., 1985) ist es nun möglich, auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zurückzurechnen, der ein bestimmter Wert für die Ratio zu Grunde liegt.

Die Grynkiewicz-Gleichung lautet:

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

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

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

β = Fluoreszenzsignal bei 360 nm bei 0 Calcium / Fluoreszenzsignal bei 390 nm bei 10

mmol·l⁻¹ Calcium

R = Ratio

R_{min} = Ratio bei 0 mmol·l⁻¹ Calcium

R_{max} = Ratio bei 10 mmol·l⁻¹ Calcium

5.4 Berechnungen

Die Ratio-Werte, die mit einer Frequenz von 2 Hz gesammelt worden waren, wurden mit Hilfe eines Gauss'schen Filters (Colquhoun & Sigworth, 1983) digital gefiltert. Die Cutoff-Frequenz betrug 0,125.

Dann wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes (Lotus 1-2-3, Version 5.01) die Regressionsgeraden für einen bestimmten Zeitabschnitt sowohl unter Kontroll-, als auch unter Versuchsbedingungen berechnet und anschließend statistisch miteinander verglichen.

6. Elektrische Messungen mit der Ussingkammer-Technik

6.1 Versuchsaufbau

Bereits 1949 entwickelte Ussing eine Technik, die es ermöglichte, elektrische Messungen an isolierten Epithelien durchzuführen. Als Versuchsanordnung im vorliegenden Fall diente eine modifizierte Ussingkammer (Ussing & Zerahn, 1951). Das Modell einer solchen Kammer zeigt Abb. 18.

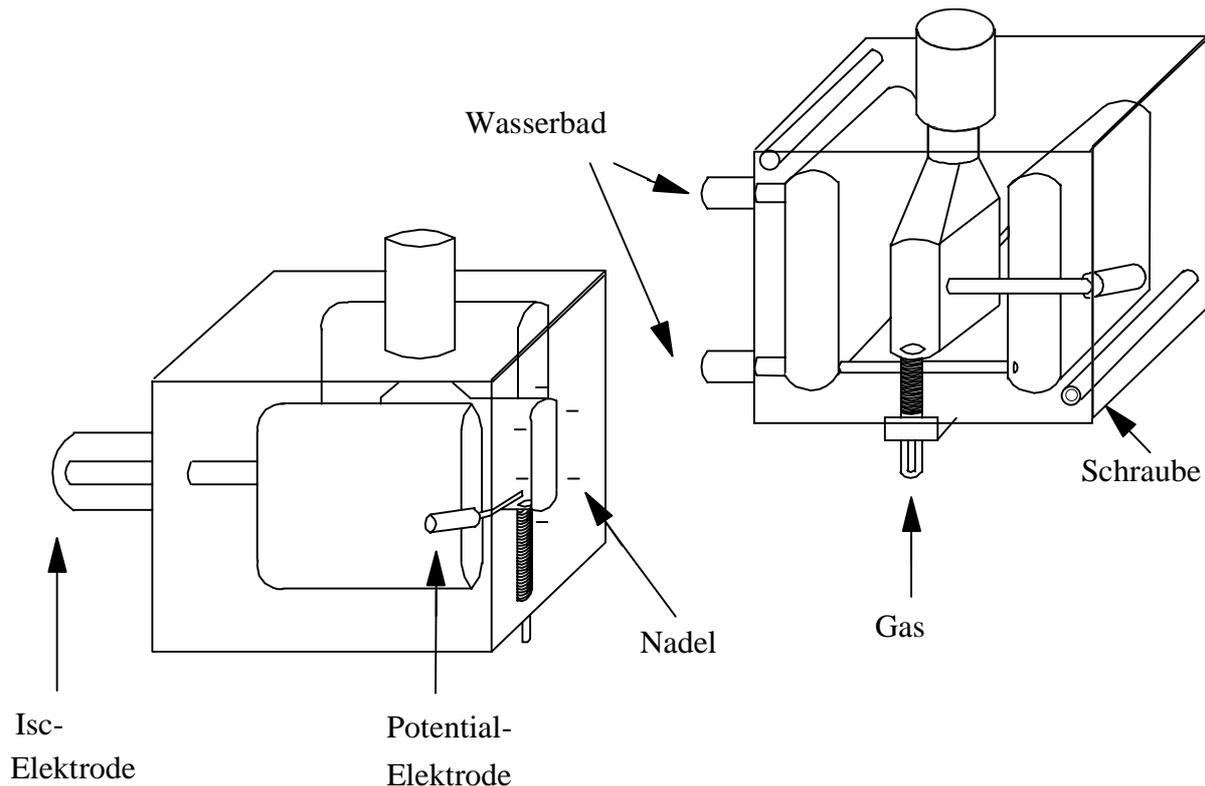


Abb. 18: Schematische Darstellung der Ussingkammer

Die Ussingkammer bestand aus zwei miteinander verschraubbaren Plexiglaskammerhälften. Zwischen diesen wurde das Darmepithel eingespannt. Sowohl mukosal (= apikal = Lumenseite), als auch serosal (= basolateral = Blutseite) konnte das Gewebe nun von unterschiedlichen Pufferlösungen umspült werden. Die Kammerhälften und die Lösungen wurden durch einen temperierten, zirkulierenden Wasserkreislauf konstant auf 37°C gehalten. Die Pufferlösung, die sich in der jeweiligen Kammerhälfte befand, konnte über eine Öffnung in der Kammer gewechselt werden, ebenso ließen sich über diese Öffnung verschiedene Substanzen applizieren. Über zwei am Kammerboden befindliche Gasfritten konnten Gewebe und Pufferlösung kontrolliert begast werden. Dies führte dazu, daß zum einen das Gewebe

ausreichend mit Sauerstoff versorgt wurde, zum anderen blieb durch die Begasung der pH-Wert der Pufferlösung konstant bei 7,4.

Um die elektrischen Parameter bestimmen zu können, wurde ein gewebe nah und ein gewebe fern plaziertes Elektrodenpaar jeweils über Agarbrücken (5% Agar in Parsons-Lösung) mit der Kammer verbunden. Bei den gewebe nahen Elektroden handelte es sich um Kalomelelektroden, die in $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl eintauchten. Über diese Elektroden wurde die Potentialdifferenz (PD) zwischen der mukosalen und serosalen Seite des Gewebes bestimmt. Bei dem anderen Elektrodenpaar handelte es sich um Silber/Silberchlorid-Elektroden. Über sie konnte ein definierter Strom in das Kolonepithel gespeist werden.

Die Potentialmessung, Stromeinspeisung, Datenerfassung und -verarbeitung geschah mit Hilfe einer computergestützten, automatischen Voltage-Clamp-Anlage (Aachen Microclamp, AC Copy Datentechnik, Aachen, BRD).

Zu Beginn einer Messung wurde die Potentialdifferenz zwischen den PD-Elektroden bestimmt, so daß diese bei den folgenden Messungen berücksichtigt wurde. Werden beide Seiten des Kolonepithels mit dem gleichen Volumen derselben Lösung umspült, so liegt weder ein Ionengradient, noch ein hydrostatischer Druckgradient vor. Trotzdem kann man eine Potentialdifferenz messen. Diese kommt dadurch zustande, daß das Kolon spontan Anionen sezerniert. Dadurch wird die serosale Seite gegenüber der mukosalen Seite um einige mV positiver. Diese Potentialdifferenz wird mit Hilfe der Stromelektroden des Voltage-Clamp-Gerätes auf Null gestellt. Der dazu notwendige kompensatorische Strom wird als *Kurzschlußstrom* (I_{SC}) bezeichnet (s. Abb.19). Hat man die Potentialdifferenz auf Null gestellt, so entfällt auch der elektrische Gradient für eine passive Ionenbewegung. Mißt man nun, unter sogenannten *short-circuit-Bedingungen* noch einen I_{SC} , so muß dieser auf aktiven Transportvorgängen beruhen. Der Kurzschlußstrom ist per definitionem dann positiv, wenn es zu einer Anionenbewegung von serosal nach mukosal kommt oder ein Kationentransport von mukosal nach serosal erfolgt.

Die Gewebeleitfähigkeit (G_t) wurde dadurch gemessen, daß jede Minute ein bipolarer Strompuls von $\pm 50 \mu\text{A}$ für eine Dauer von 200 ms an das Gewebe angelegt wurde. Aus der resultierenden Potentialdifferenz-Änderung kann mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes die Gewebeleitfähigkeit errechnet werden.

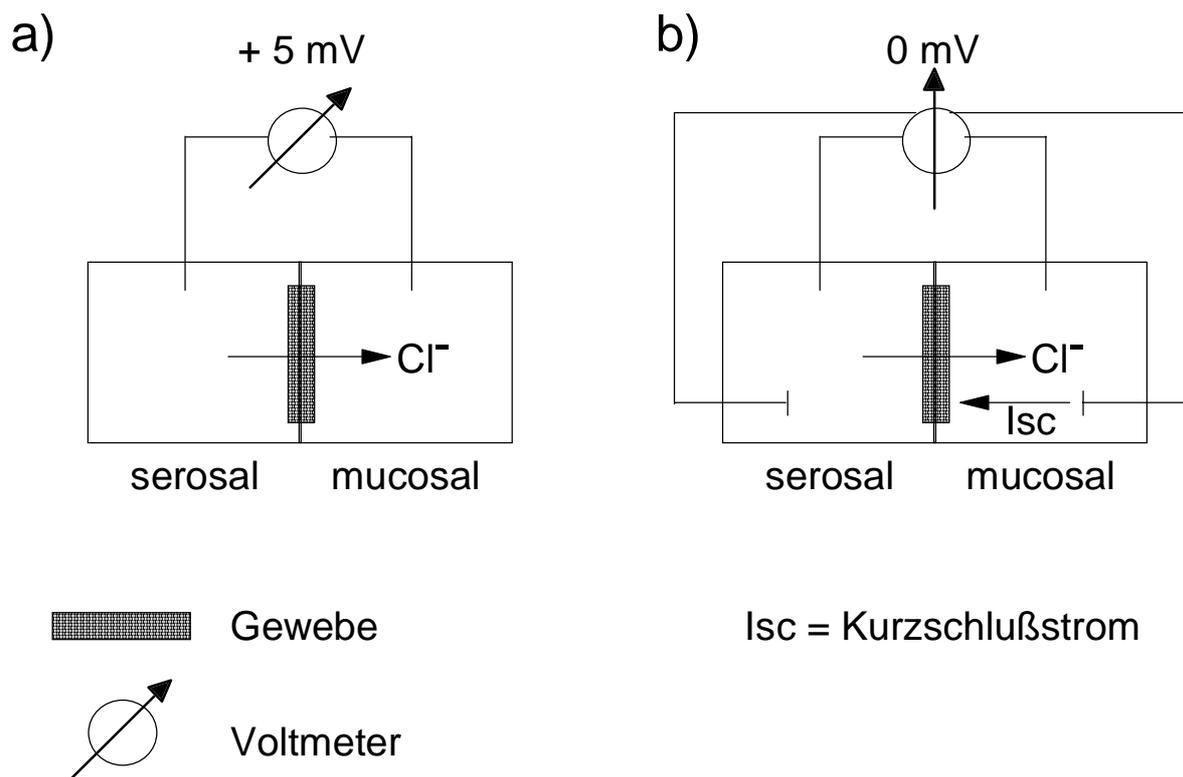


Abb. 19: a) unter *open-circuit* Bedingungen ist die serosale Seite aufgrund spontaner Chloridsekretion positiv gegenüber der mukosalen Seite des Gewebes. b) unter *voltage-clamp* Bedingungen wird diese spontane Potentialdifferenz durch Applikation eines sogenannten Kurzschlußstromes über die Stromelektroden kompensiert.

6.2 Datenerfassung und Berechnung

Die Versuche wurden nach einer Äquilibrierungszeit von 60 Minuten, in denen sich der I_{SC} auf ein stabiles Plateau einstellen konnte, begonnen.

Die Werte von Potentialdifferenz, Kurzschlußstrom und Gewebeleitfähigkeit wurden alle 6 Sekunden erfaßt und vom Computer gespeichert. Am Ende des Versuches wurden die 1-Minuten-Werte ausgedruckt.

Als *Baseline* (Kurzschlußstrom unter basalen Bedingungen) wurde der Mittelwert der letzten drei I_{SC} -Minutenwerte vor Substanzzugabe genommen. Der *Peak* ist der höchste Wert nach Substanzzugabe. Die *Plateau-Werte* wurden jeweils 10 Minuten nach Substanzzugabe genommen.

7. Statistik

Die Ergebnisse wurden als Originalwerte oder als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean) dargestellt. Für die graphische Darstellung der Strom-Spannungskurven wurden die Mittelwerte als Kästchen, die Standardfehler als vertikale Fehlerbalken gezeigt. In manchen Abbildungen sind die Fehlerbalken aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung gezeichnet. Werden die Ergebnisse in Form von Säulendiagrammen dargestellt, so zeigt die Höhe der Säule den Mittelwert an, der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Vor jedem statistischen Vergleich wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Danach wurden entsprechend mit einem U-Test oder mit einem gepaarten oder ungepaarten t-Test die Signifikanzen ermittelt. Das gewählte Signifikanzniveau betrug jeweils 5% ($p < 0,05$).

III. ERGEBNISSE

1. Patch-Clamp Untersuchungen an isolierten Krypten

1.1 Effekte einer hohen intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkapazität

In einer ersten Versuchsserie wurden die Kryptenzellen mit der Whole-Cell Patch-Clamp Methode untersucht. Dabei wurde eine Pipettenlösung verwendet, die eine hohe Ca^{2+} -Pufferkapazität aufwies ($11 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA / $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca^{2+}). Die dadurch hervorgerufene allmähliche Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher ist eine Möglichkeit, den sogenannten *kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom* zu aktivieren (Kerst et al., 1995, eine Übersicht gibt Parekh & Penner, 1997).

Die Ruhemembranpotentiale der Kryptenzellen, die einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkapazität ausgesetzt waren, zeigten sich deutlich weniger negativ als die Potentiale der Zellen, die mit einer 'normalen' Pipettenlösung (d.h. $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA / nominal $0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca^{2+}) untersucht wurden (s. Abb. 20). Dieser Effekt war am deutlichsten ausgeprägt bei Zellen aus der Fundusregion der Krypte. Aus der Literatur ist bekannt, daß bezüglich der Membranpotentiale entlang der Kryptenachse ein Gradient besteht, wobei Zellen aus der Fundusregion deutlich negativere Membranpotentiale haben, als Zellen aus dem Mittel- und Oberflächenbereich der Krypten (Böhme et al., 1991). Ein solcher Gradient war auch hier vorhanden (s. Abb. 20).

Faßt man die Werte, die an den verschiedenen Lokalisationen entlang der Kryptenachse gemessen wurden, zusammen, so ergeben sich für die Zellen, die mit einer niedrigen EGTA-Konzentration in der Pipette untersucht wurden, Potentiale von $-45,0 \pm 3,3 \text{ mV}$ ($n = 17$). Die Zellen, die einer hohen intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkapazität ausgesetzt waren, wiesen Potentiale von $-23,4 \pm 2,3 \text{ mV}$ auf ($n = 17$, $p < 0,05$). Eine mögliche Erklärung für die weniger negativen Membranpotentiale bei hoher intrazellulärer Ca^{2+} -Pufferkapazität wäre das Einströmen von Kationen von extrazellulär. Deshalb wurden in den nächsten Versuchsserien Blocker nichtselektiver Kationenkanäle eingesetzt um diese Hypothese zu überprüfen.

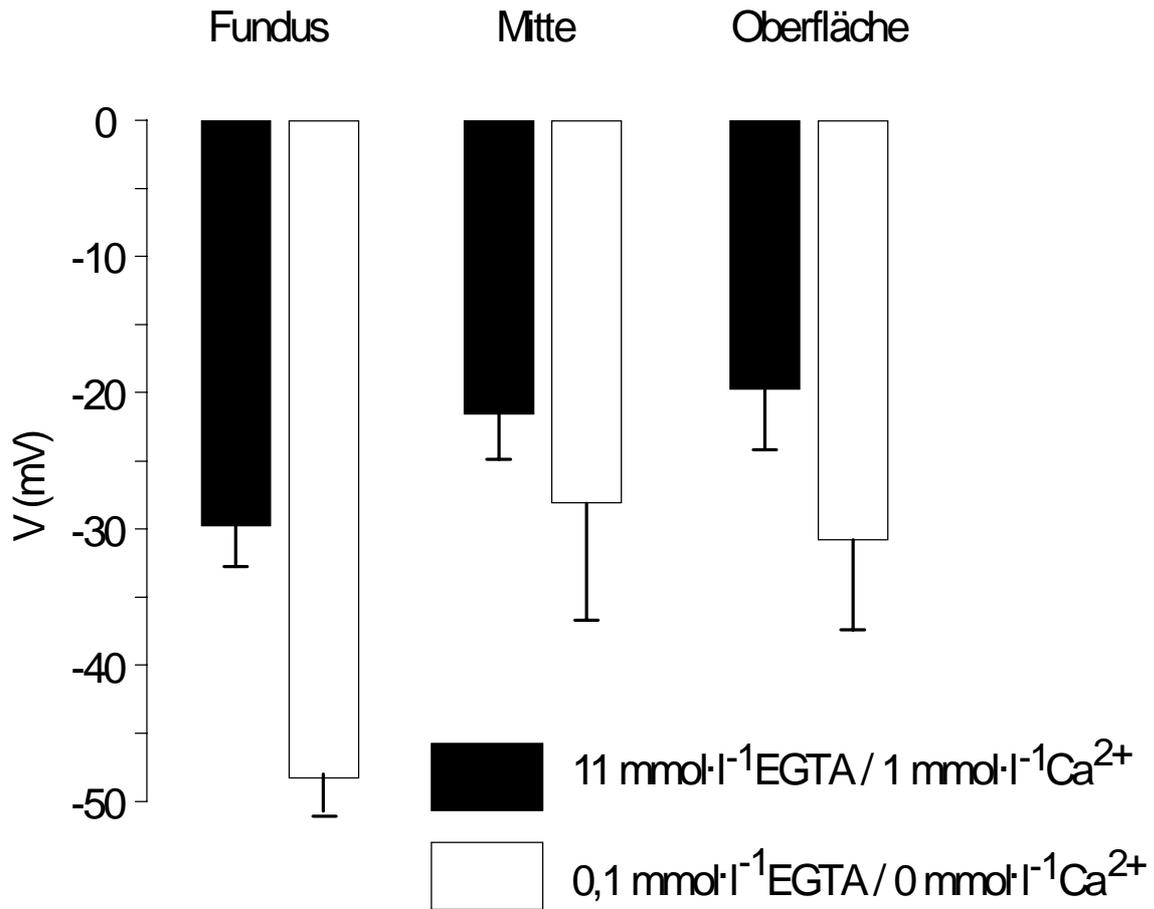


Abb. 20: Ruhemembranpotentiale der Kryptenzellen mit hohen und niedrigen intrazellulären Ca²⁺-Pufferkapazitäten an verschiedenen Lokalisationen entlang der Kryptenachse.

1.2 Wirkung von La^{3+} auf die Kryptenzellen

In der Literatur sind verschiedene Speicher-gesteuerte Ca^{2+} - und Kationenströme beschrieben, die durch La^{3+} hemmbar sind (Hoth & Penner, 1993, Davis & Sharma, 1997).

Die Zugabe von La^{3+} ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) führte bei den Zellen, die mit einer hohen EGTA-Konzentration in der Pipette untersucht wurden, zu einer deutlichen, teilweise reversiblen Hyperpolarisation um $22,1 \pm 5,1 \text{ mV}$ ($n = 17$, $p < 0,05$; s. Abb. 21).

Um eine mögliche basale Wirkung von Lanthan auf die Zellen auszuschließen, wurde die Substanz auch unter Standardbedingungen, also mit niedriger EGTA-Konzentration in der Pipette, zugegeben. Unter diesen Bedingungen induzierte La^{3+} ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nur eine geringe, nicht signifikante Hyperpolarisation um $8,9 \pm 5,5 \text{ mV}$ ($n = 6$).

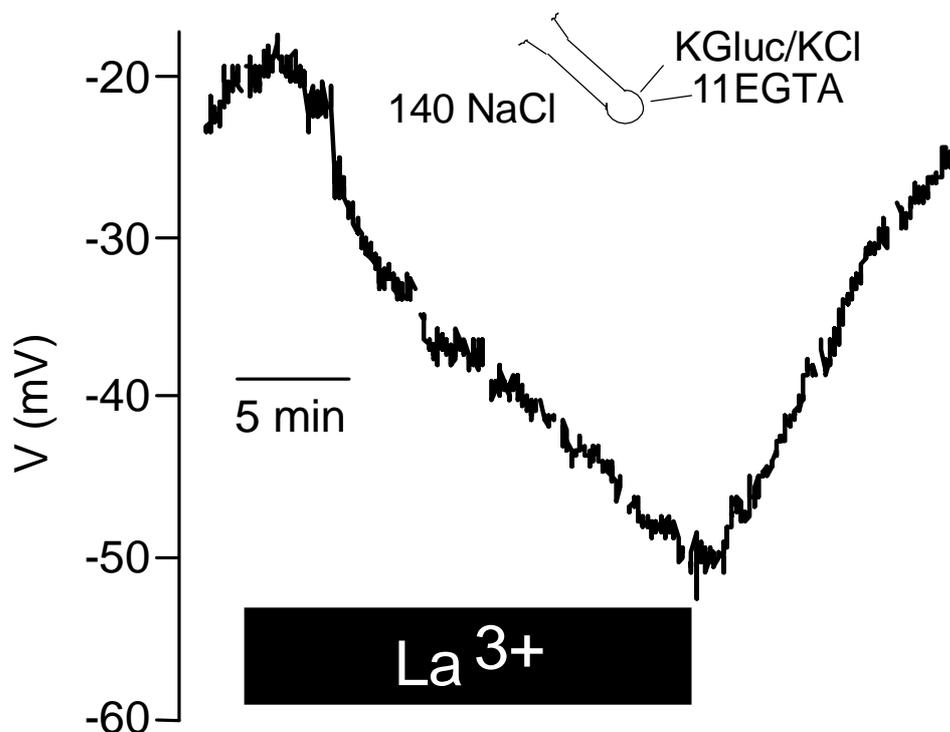


Abb. 21: Effekt von La^{3+} ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) auf das Membranpotential einer Funduszelle. Dargestellt ist eine Originalaufzeichnung. Die Unterbrechungen im Verlauf der Kurve stammen von durchgeführten Strom-Spannungsprotokollen unter Voltage-Clamp-Bedingungen.

Mit der starken Hyperpolarisation ging eine Abnahme im Membranein- und -auswärtsstrom einher (s. Abb. 22).

Der Membraneinwärtsstrom, gemessen bei einem Haltepotential von -80 mV , nahm in Gegenwart von La^{3+} um $51 \pm 13 \text{ pA}$ ab ($n = 17$, $p < 0,05$ gegen Null). Der Membran-

auswärtsstrom, gemessen bei einem Haltepotential von +60 mV, nahm um 158 ± 74 pA ab ($n = 17$, $p < 0,05$ gegen Null). Bedingt durch diese Stromänderungen sank auch die zelluläre Leitfähigkeit. Diese wurde aus der Steigung der Strom-Spannungskurve im Klemmbereich zwischen -20 und +20 mV berechnet und fiel nach der Lanthanzugabe um $1,6 \pm 0,6$ nS.

Aus den in Abbildung 22b dargestellten Strom-Spannungskurven unter Kontrollbedingungen und nach Lanthanzugabe läßt sich durch Subtraktion der Werte eine Delta-IV-Kurve berechnen. Diese Kurve stellt die Strom-Spannungsbeziehung der La^{3+} -sensitiven Leitfähigkeit dar (s. Abb. 23). Das Umkehrpotential (siehe Material und Methoden), d.h. der Punkt, wo die Kurve die Abszisse schneidet und kein Strom fließt, läßt erste Rückschlüsse auf die beteiligte Leitfähigkeit zu, die durch Lanthan gehemmt wurde. In diesem Fall lag das Umkehrpotential der Delta-IV-Kurve bei $-8,7 \pm 4,8$ mV ($n = 17$).

Nach der Nernst-Gleichung (Hille, 1992) liegt das Umkehrpotential von nichtselektiven Kationenleitfähigkeiten bei 0 mV wenn die Kationenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran gleich sind.

Das in diesem Fall gemessene Umkehrpotential von $-8,7 \pm 4,8$ mV war nicht signifikant verschieden von 0 mV und gab somit einen ersten Hinweis darauf, daß Lanthan eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit hemmt.

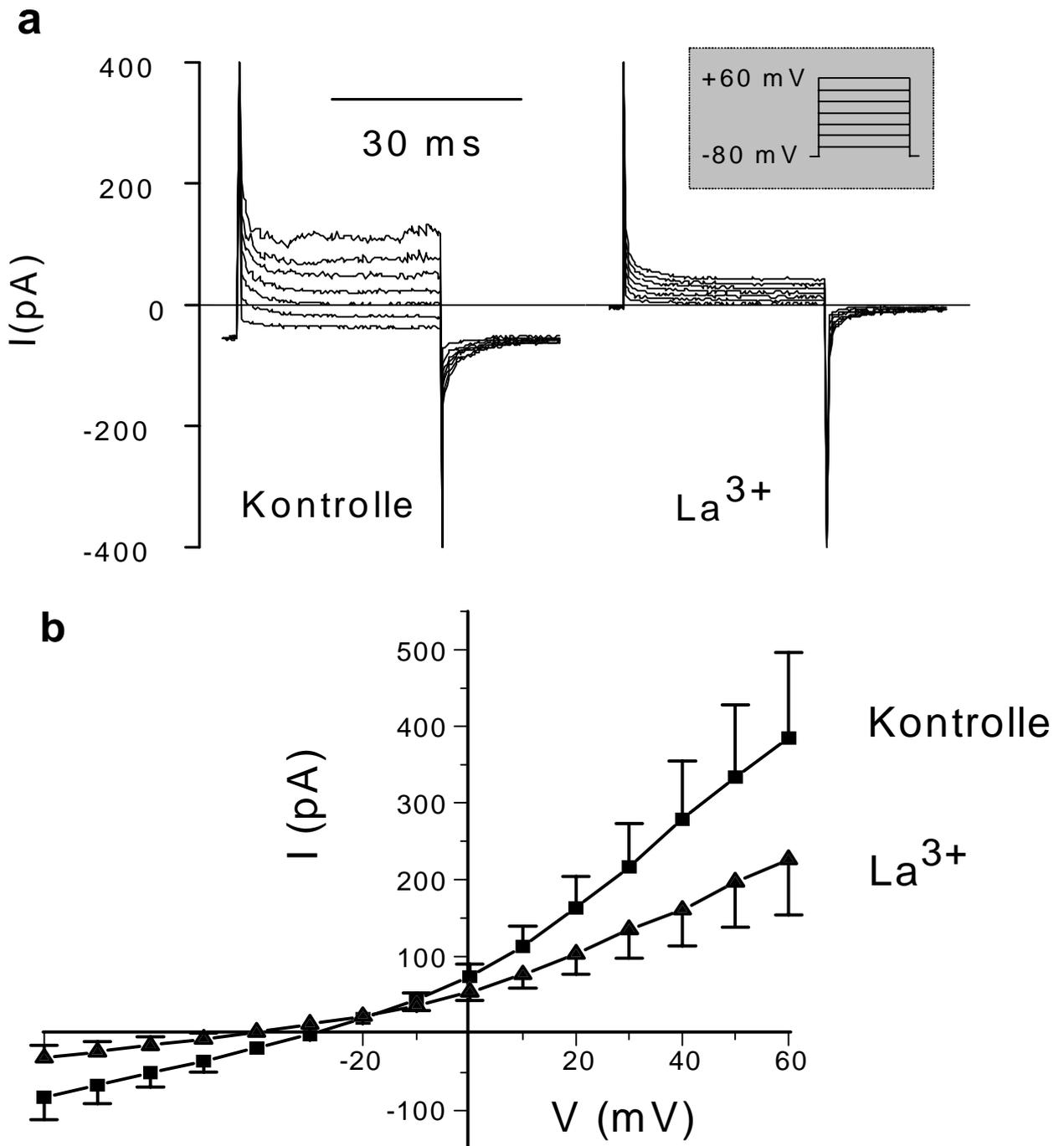


Abb. 22: a) Originalaufzeichnung der Membranströme einer Kryptenzelle während 30 ms andauernder depolarisierender Pulse unter Kontrollbedingungen und nach La^{3+} -Zugabe ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wird die Zelle jeweils für 30 ms auf immer positivere Potentiale geklemmt und der entsprechende Strom, der durch die Zelle fließt, wird gemessen. Die Depolarisation erfolgt in 10 mV -Schritten bis auf ein Potential von $+60 \text{ mV}$. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist hier nur jeder zweite Puls dargestellt.

b) Membranströme, zusammengefasst von 17 Kryptenzellen unter Kontrollbedingungen (schwarze Quadrate) und nach La^{3+} -Zugabe (schwarze Dreiecke). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm \text{SEM}$.

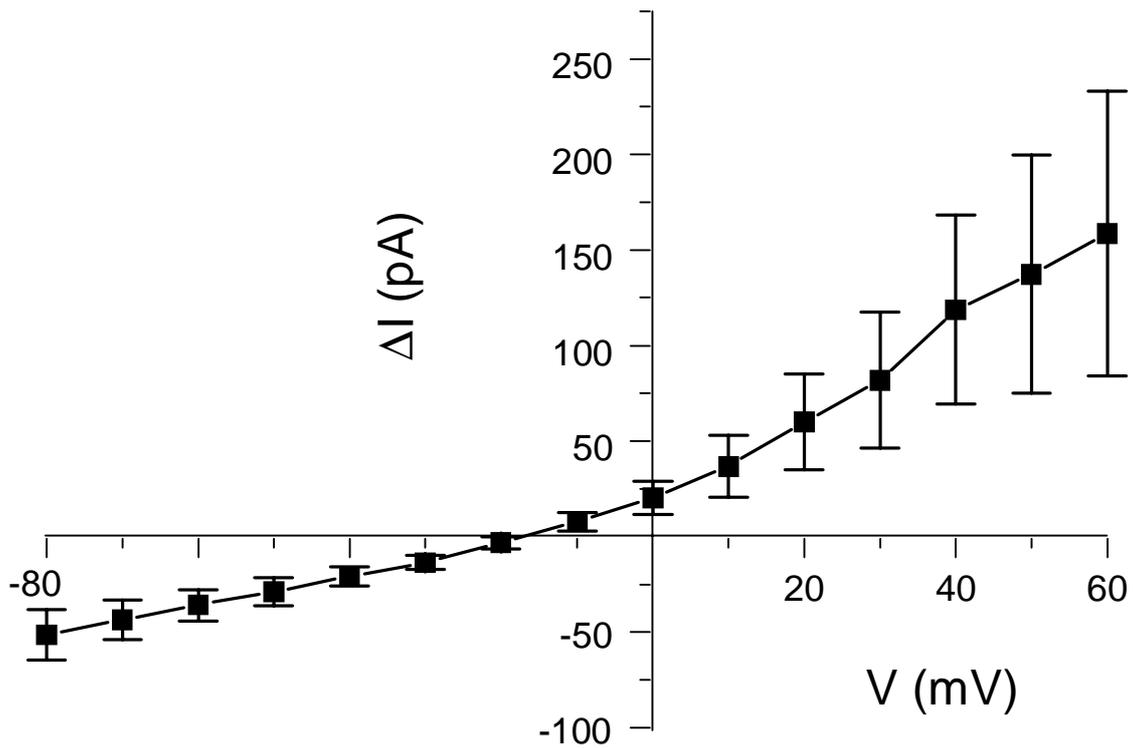


Abb. 23: Strom-Spannungsbeziehung des durch La^{3+} gehemmten Stromes ($n = 17$). Die Differenz (ΔI) wurde durch Subtraktion der Ströme unter Kontrollbedingungen und nach Lanthanzugabe berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

1.3 Wirkung von Gd^{3+} auf die Kryptenzellen

Die Wirkung von Gd^{3+} ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), einem weiteren Blocker nichtselektiver Kationenkanäle (Schumann et al., 1994), auf die Kryptenzellen war qualitativ vergleichbar dem Effekt von La^{3+} , wengleich die Ausprägung der Effekte weniger stark war. Auch die Zugabe von Gd^{3+} bei einer hohen intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkapazität führte zu einer Hyperpolarisation der Zellmembranen um $7,6 \pm 1,9 \text{ mV}$ ($n = 18$, $p < 0,05$; s. Abb. 24).

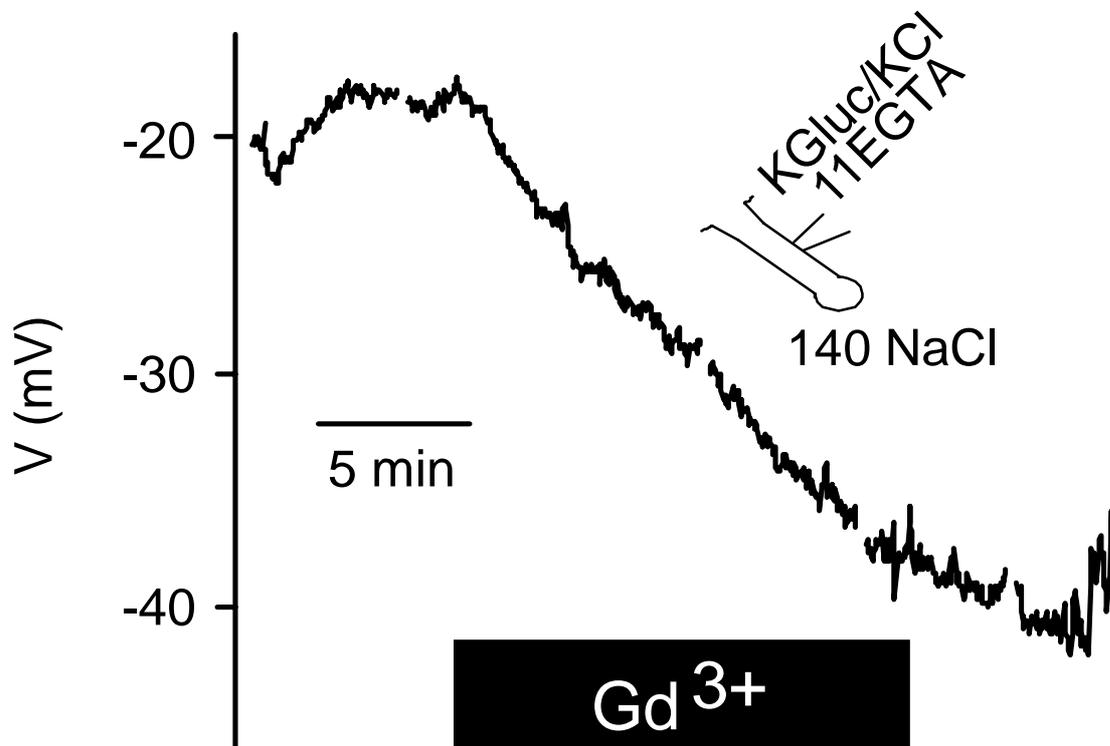


Abb. 24: Effekt von Gd^{3+} ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) auf das Membranpotential einer Zelle aus dem mittleren Bereich einer Krypte. Dargestellt ist eine Originalaufzeichnung. Die Unterbrechungen im Verlauf der Kurve stammen von durchgeführten Strom-Spannungsprotokollen unter Voltage-Clamp-Bedingungen.

Auch in dieser Versuchsserie ging die Hyperpolarisation der Zellen mit einer Abnahme der Membranströme und der Zelleitfähigkeit einher. Der Membraneinwärtsstrom nahm im Mittel um $43 \pm 13 \text{ pA}$ ab ($n = 18$, $p < 0,05$), der Membranauswärtsstrom nahm um $80 \pm 42 \text{ pA}$ ab ($n = 18$). Die Leitfähigkeit der Zellen verringerte sich um $0,9 \pm 0,4 \text{ nS}$ ($n = 18$, $p < 0,05$). Die Änderungen der Ströme sind graphisch dargestellt in Abbildung 25 und 26. Die errechnete Delta-IV-Kurve zeigt Abbildung 27. Das Umkehrpotential für den durch Gd^{3+} gehemmten

Strom lag bei $+2,7 \pm 5,5$ mV, nicht signifikant verschieden von 0 mV. Dies bedeutet, daß Gd^{3+} , vergleichbar La^{3+} , eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit hemmt.

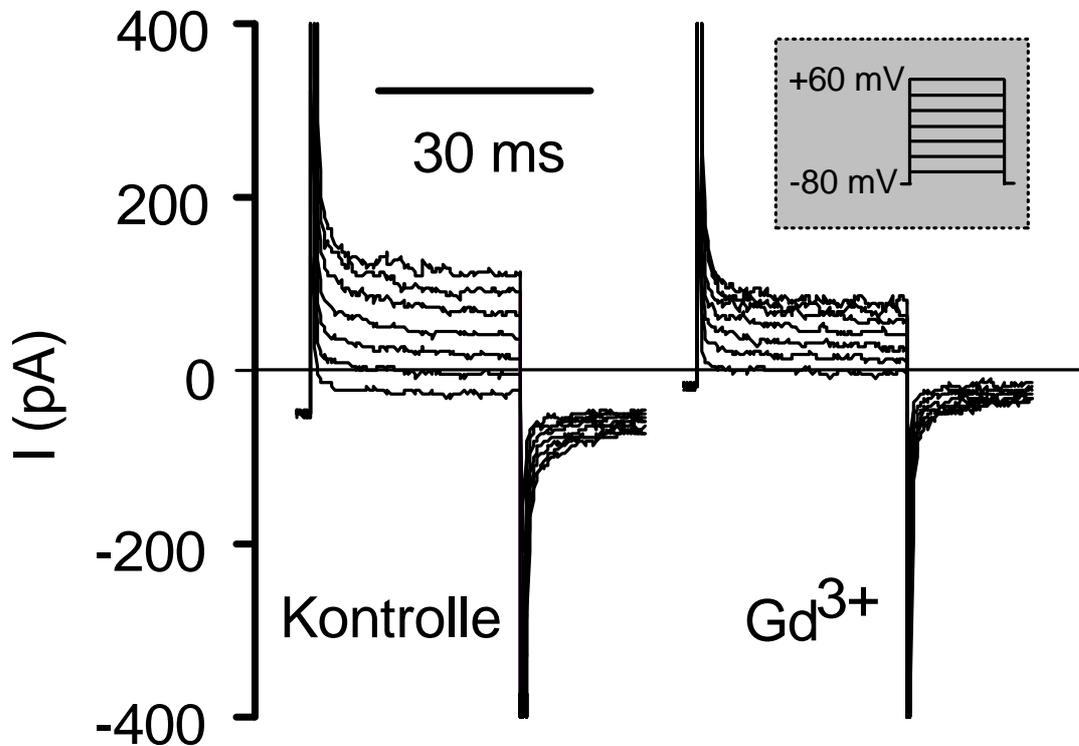


Abb. 25: Originalaufzeichnung der Membranströme einer Kryptenzelle während 30 ms andauernder depolarisierender Pulse unter Kontrollbedingungen und nach Gd^{3+} -Zugabe ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wird die Zelle jeweils für 30 ms auf immer positivere Potentiale geklemmt und der entsprechende Strom, der durch die Zelle fließt, wird gemessen. Die Depolarisation erfolgt in 10 mV-Schritten bis auf ein Potential von +60 mV. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist hier nur jeder zweite Puls dargestellt.

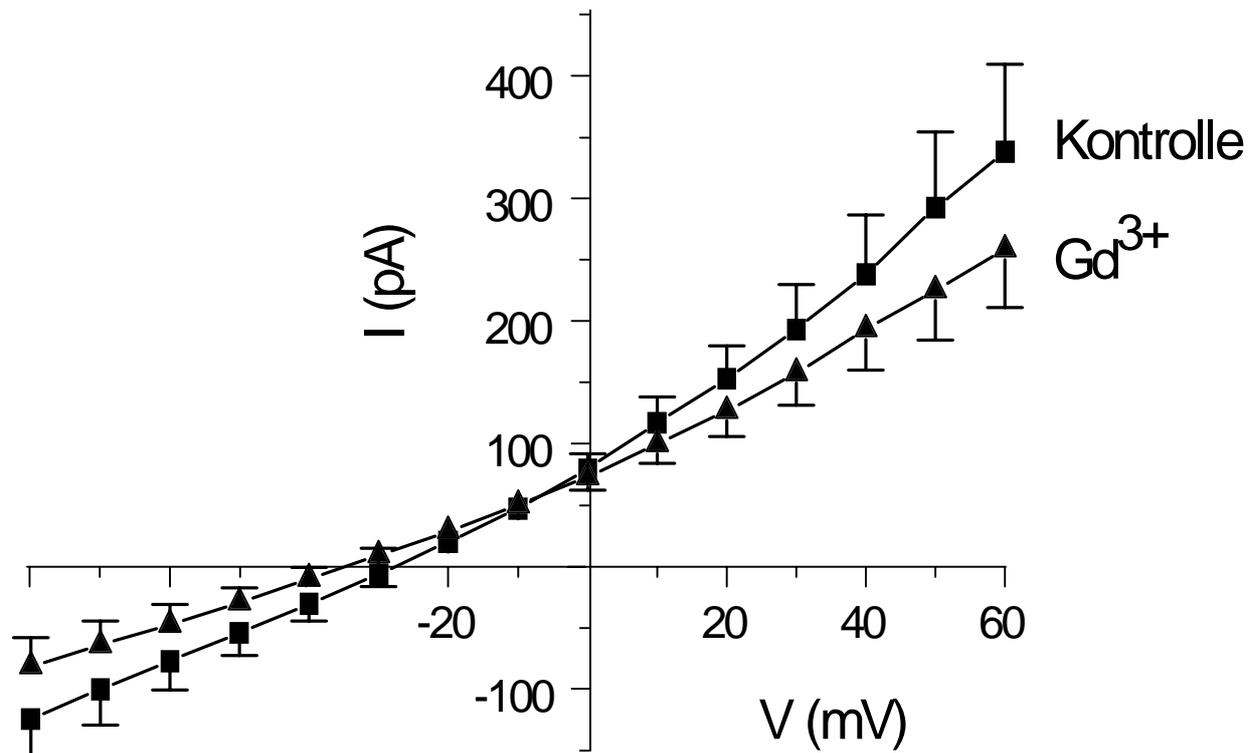


Abb. 26: Membranströme, zusammengefasst von 18 Zellen, unter Kontrollbedingungen (schwarze Quadrate) und nach Gd³⁺-Zugabe (schwarze Dreiecke). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

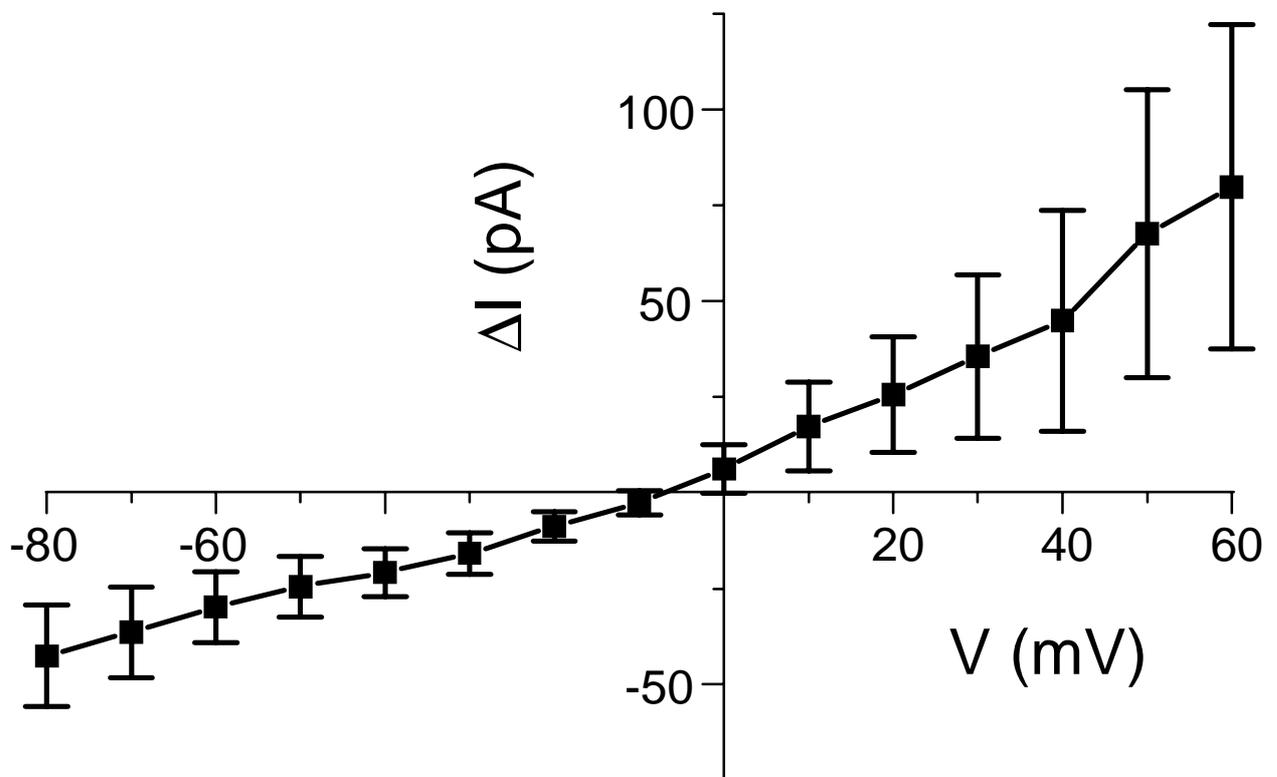


Abb. 27: Strom-Spannungsbeziehung des durch Gd³⁺ gehemmten Stromes, berechnet aus der Differenz der Ströme unter Kontrollbedingungen und nach Gadoliniumzugabe (n = 18).

1.4 Wirkung von Flufenamat auf die Kryptenzellen

Als dritter Blocker von nichtselektiven Kationenkanälen wurde Flufenamat ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, eingesetzt (Kerst et al., 1995). Vergleichbar den Lanthaniden war auch hier nach Zugabe der Substanz eine Hyperpolarisation der Zellen, im Mittel um $9,2 \pm 2,4 \text{ mV}$ ($n = 15$, $p < 0,05$ gegen Null, s. Abb. 28), zu beobachten.

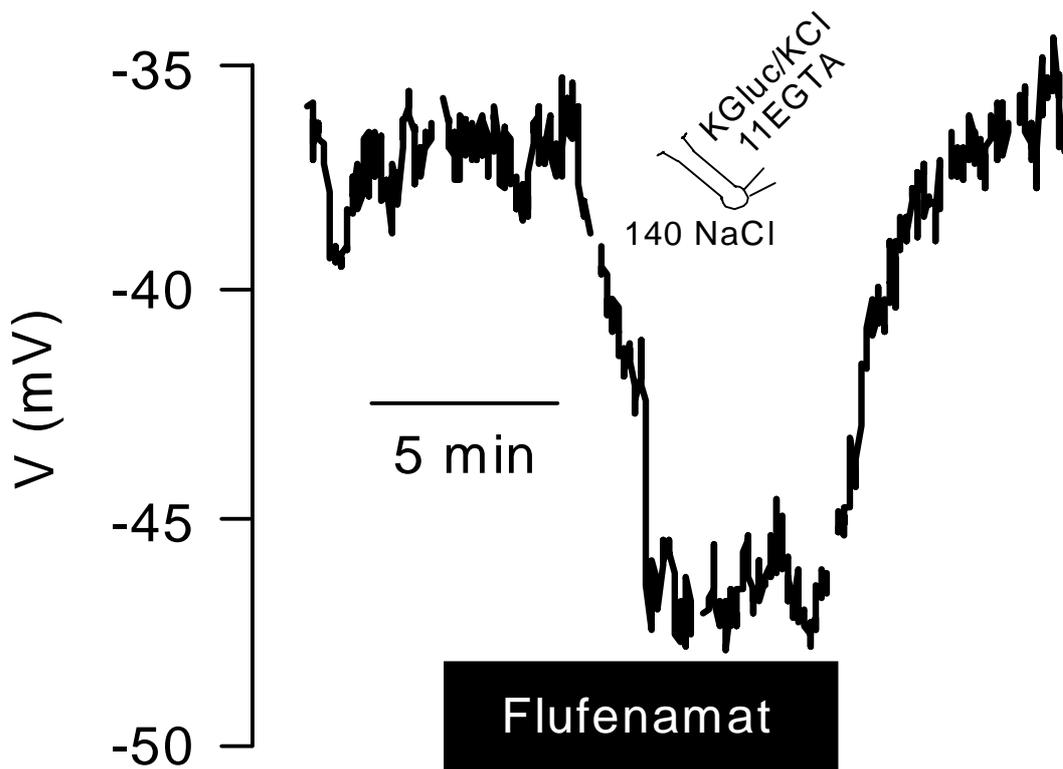


Abb. 28: Effekt von Flufenamat ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) auf das Membranpotential einer Funduszelle. Dargestellt ist eine Originalaufzeichnung. Die Unterbrechungen im Verlauf der Kurve stammen von durchgeführten Strom-Spannungsprotokollen.

Die Membranströme wurden durch Flufenamat ebenfalls gehemmt. Der Membraneinwärtsstrom sank um $44 \pm 13 \text{ pA}$ ($n = 15$, $p < 0,05$ gegen Null). Der Auswärtsstrom nahm im Durchschnitt um $88 \pm 18 \text{ pA}$ ab ($n = 15$, $p < 0,05$ gegen Null). Die Leitfähigkeit der Zellen sank um $0,9 \pm 0,2 \text{ nS}$. Die Abbildungen 29 und 30 zeigen wieder die entsprechenden Stromveränderungen.

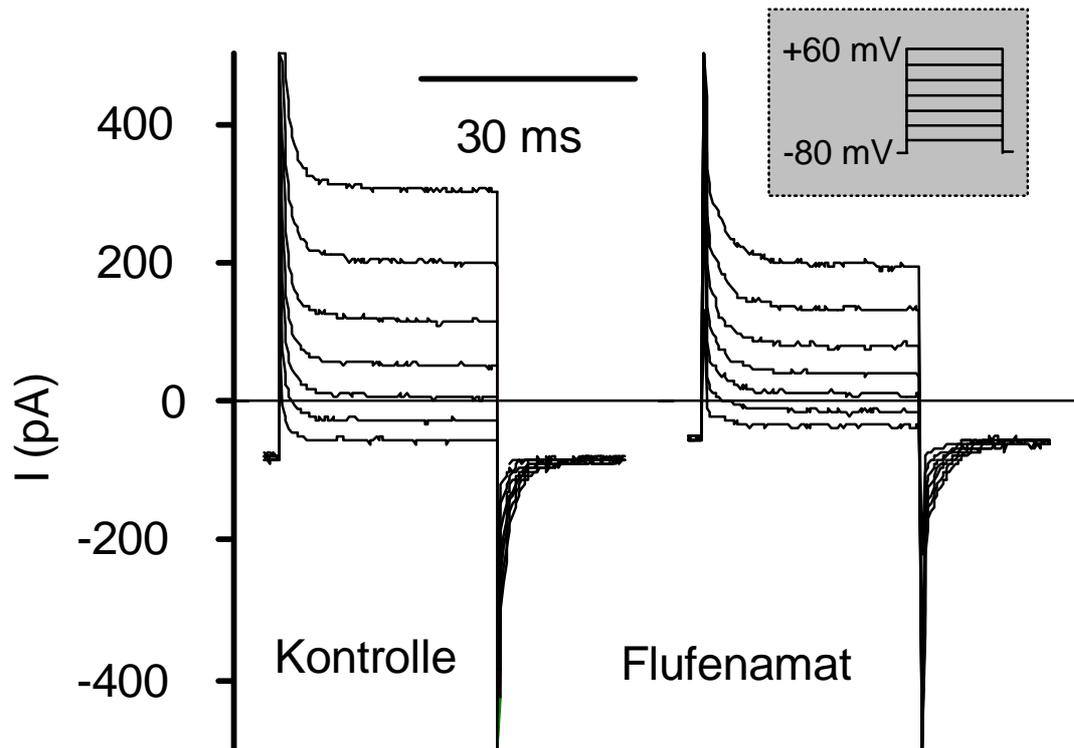


Abb. 29: Originalaufzeichnung der Membranströme einer Kryptenzelle während 30 ms andauernder depolarisierender Pulse unter Kontrollbedingungen und nach Flufenamat-Zugabe ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wird die Zelle jeweils für 30 ms auf immer positivere Potentiale geklemmt und der entsprechende Strom, der durch die Zelle fließt, wird gemessen. Die Depolarisation erfolgt in 10 mV -Schritten bis auf ein Potential von $+60 \text{ mV}$. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist hier nur jeder zweite Puls dargestellt.

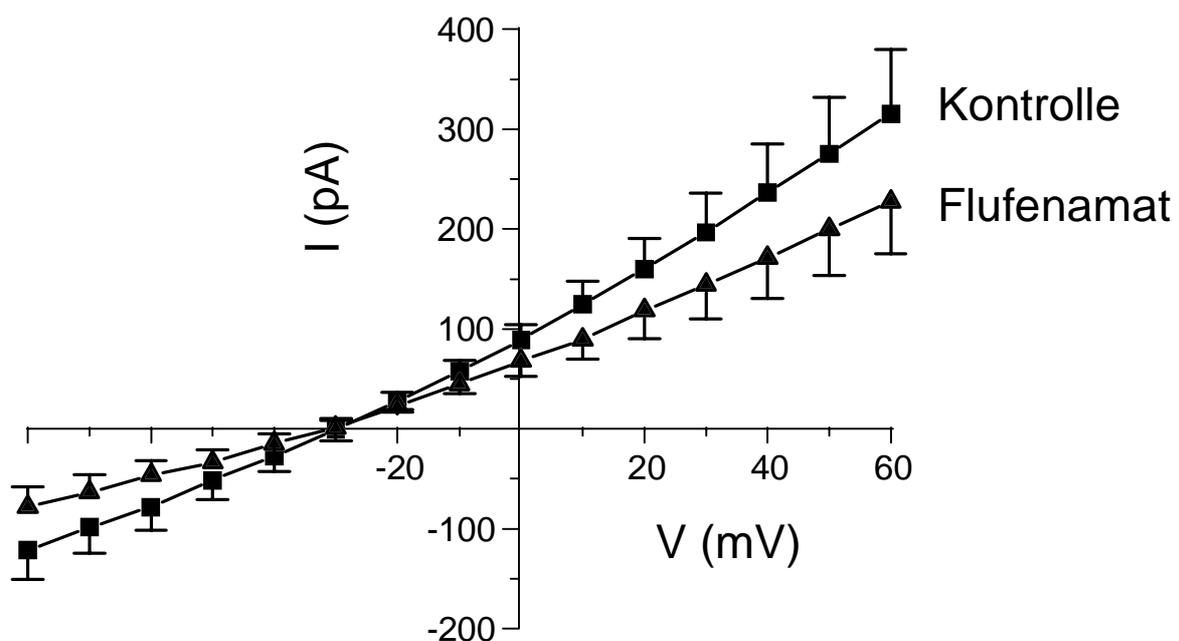


Abb. 30: Membranströme, zusammengefaßt von 15 Kryptenzellen unter Kontrollbedingungen (schwarze Quadrate) und nach Flufenamat-Zugabe (schwarze Dreiecke).

Bei Flufenamat ergab die Berechnung der Delta-IV-Ströme ein Umkehrpotential von $-31,9 \pm 5,5$ mV ($n = 15$). Dieses Umkehrpotential war signifikant verschieden von 0 mV ($p < 0,05$). Daraus läßt sich schließen, daß Flufenamat nicht bzw. nicht nur eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit beeinflusst, da dann das Umkehrpotential des gehemmten Stromes bei 0 mV liegen müßte, wie im Falle von La^{3+} und Gd^{3+} . Die Hemmung weiterer Leitfähigkeiten durch Flufenamat ist in der Literatur beschrieben (Mc Carty et al., 1993, Weiser & Wienrich, 1996).

Abbildung 31 zeigt wieder die Strom-Spannungsbeziehung der durch Flufenamat beeinflussten Leitfähigkeit, gemittelt für 15 Zellen.

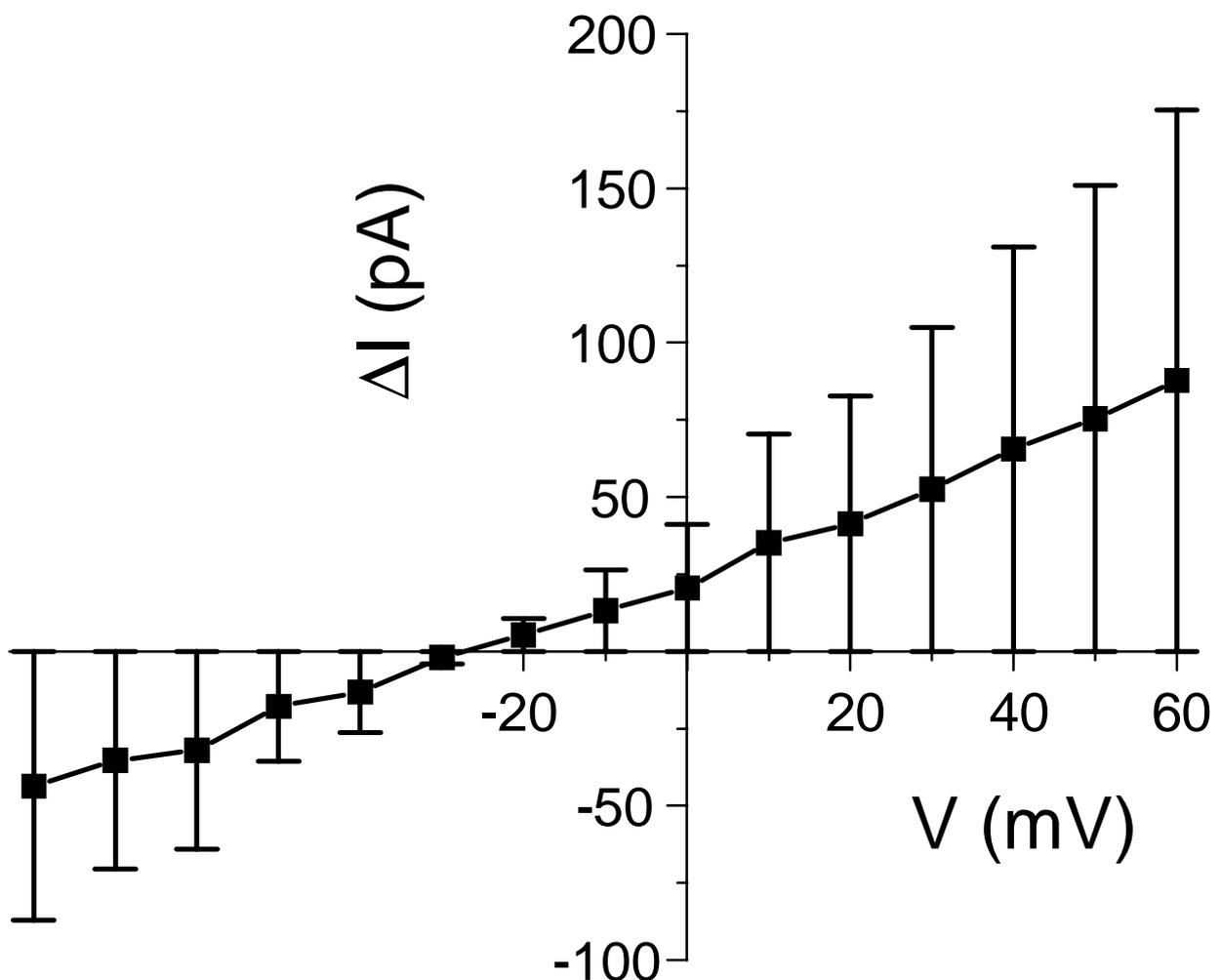


Abb. 31: Strom-Spannungsbeziehung des durch Flufenamat gehemmten Stromes ($n = 15$). Die Differenz (ΔI) wurde aus der Differenz der Ströme unter Kontrollbedingungen und nach Flufenamat-Zugabe berechnet.

1.5 Flufenamat-Wirkung unter chloridfreien Bedingungen

Wie bereits erwähnt, lag das Umkehrpotential des durch Flufenamat gehemmten Stromes bei $-31,9 \pm 5,5$ mV. Damit unterschied es sich deutlich von den Umkehrpotentialen der durch La^{3+} und Gd^{3+} gehemmten Ströme. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen betrug die Chloridionenkonzentration auf der Membranaußenseite $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und auf der Membraninnenseite $44 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Setzt man diese Werte in die Nernst-Gleichung ein (s. Material und Methoden), so ergibt sich für Cl^- ein theoretisches Umkehrpotential von $-32,5$ mV. Das Umkehrpotential des durch Flufenamat gehemmten Stromes von $-31,9 \pm 5,5$ mV legte daher die Vermutung nahe, daß Flufenamat eine Chloridleitfähigkeit beeinflusst. Um diese Vermutung zu überprüfen wurde Flufenamat unter chloridfreien Bedingungen getestet. Die Pipettenlösung enthielt in diesem Falle Kaliumgluconat anstelle von KCl und NaCl, so daß Cl^- durch ein impermeables Anion ersetzt wurde. In der Perfusionslösung wurde NaCl durch Natriumgluconat ersetzt. Nun wurden erneut die Membranströme vor und nach Flufenamat-Zugabe gemessen. Unter diesen Versuchsbedingungen hatte Flufenamat keinerlei Effekt auf die Membranströme.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so kann man sagen, daß Flufenamat in der Hauptsache eine Chloridleitfähigkeit beeinflusst. Damit war Flufenamat als Blocker für die noch ausstehenden Versuche nicht geeignet.

1.6 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Tabelle 1 faßt die Wirkung der drei Blocker auf die elektrischen Parameter der Kryptenzellen noch einmal zusammen.

	La³⁺	Gd³⁺	Flufenamat
	n = 17	n = 18	n = 15
ΔV (mV)	$-22,1 \pm 5,1^*$	$-7,6 \pm 1,9^*$	$-9,2 \pm 2,4^*$
ΔI_{in} (pA)	$51 \pm 13^*$	$43 \pm 13^*$	$44 \pm 13^*$
ΔI_{out} (pA)	$-158 \pm 74^*$	-80 ± 42	$-88 \pm 18^*$
ΔG_C (nS)	$-1,6 \pm 0,6$	$-0,9 \pm 0,4^*$	$-0,9 \pm 0,2$

Tab.1: Wirkung von La³⁺ (10^{-5} mol·l⁻¹), Gd³⁺ (10^{-5} mol·l⁻¹) und Flufenamat (10^{-4} mol·l⁻¹) auf die elektrischen Parameter der Kryptenzellen. ΔV = Änderung des Membranpotentials, ΔI_{in} = Änderung des Membraneinwärtsstromes, gemessen bei einem Haltepotential von -80 mV, ΔI_{out} = Änderung des Membranauswärtsstromes, gemessen bei einem Haltepotential von +60 mV, ΔG_C = Änderung der Zelleitfähigkeit (berechnet aus der Steigung der ΔIV -Kurve im Klemmbereich zwischen -20 und +20 mV). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM, * : $p < 0,05$ gegen 0.

Die Daten aus diesen ersten Versuchsserien wurden zu jeweils annähernd gleichen Teilen von verschiedenen Lokalisationen entlang der Kryptenachse erhoben (etwa 1/3 aus der Fundus-, 1/3 aus der Mittel- und 1/3 aus der Oberflächenregion). Aus der Literatur ist bekannt, daß die Zellen entlang der Kryptenachse einen Entwicklungsgradienten zeigen, wobei die undifferenzierten Zellen in der Fundusregion liegen und die Differenzierung der Zellen vom mittleren Bereich der Krypte bis hin zur Oberflächenregion zunimmt (Lipkin, 1985). In den beschriebenen ersten Untersuchungen wurde getestet, ob die untersuchte Leitfähigkeit in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen entlang der Kryptenachse unterschiedlich ausgeprägt ist. Einen ersten Hinweis darauf, daß ein solcher Gradient existiert, gibt Abbildung 20 auf Seite 42. Die Unterschiede im Membranpotential bei Zellen, die mit hoher und niedriger intrazellulärer Ca²⁺-Pufferkapazität untersucht wurden, waren am deutlichsten ausgeprägt im Fundusbereich der Krypten. Aus den in der Tabelle 1 dargestellten Werten wird ersichtlich, daß La³⁺ der effektivste Blocker mit der größten Wirkung an den Kryptenzellen war. Aus diesem Grunde, und auch aufgrund der Tatsache, daß Flufenamat eine Chloridleitfähigkeit blockt, wurde in den nachfolgenden Versuchsserien nur noch La³⁺ als Blocker eingesetzt.

1.7 Kationenselektivität

Um eine Aussage über die Kationenselektivität der Leitfähigkeit zu machen, welche durch die hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferkapazität induziert wird, wurden Kationensubstitutionsexperimente durchgeführt. Um die Kaliumleitfähigkeiten, die unter normalen Umständen die Leitfähigkeit der Kryptenzellen dominieren (Böhme et al., 1991; Diener & Scharrer, 1995), auszuschalten, wurde eine kaliumfreie Pipettenlösung verwendet, die als Hauptelektrolyt $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ des schlecht permeablen CsCl enthält. Die Zellen wurden zusätzlich auf ein Potential von -80 mV geklemmt, einen Wert der nahe dem K^+ -Gleichgewichtspotential liegt. Während der Superfusion mit verschiedenen Lösungen wurde kontinuierlich der Membraneinwärtsstrom aufgezeichnet. In Anwesenheit von $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl erreichte der Einwärtsstrom im Mittel Werte von $-123 \pm 45 \text{ pA}$ ($n = 6$). Wurde Na^+ komplett durch das impermeable Kation N-Methyl-D-Glucamin (NMDG^+) ersetzt, sank der Einwärtsstrom auf $-60 \pm 30 \text{ pA}$ ($n = 6$, $p < 0,05$; s. Abb. 32). Wurde Na^+ durch Ca^{2+} ersetzt ($70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Ca}^{2+} / 80 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol zum Ausgleich der Osmolarität), reduzierte sich der Einwärtsstrom auf $-78 \pm 33 \text{ pA}$ ($n = 6$). Dieser Wert war signifikant geringer als der Stromwert in Anwesenheit von $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl ($p < 0,05$), gleichzeitig war er aber auch signifikant höher als in Anwesenheit von $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG^+ ($p < 0,05$). Diese Werte zeigen, daß die Leitfähigkeit, die durch die hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferkapazität stimuliert wird, sowohl für Na^+ als auch für Ca^{2+} durchlässig ist, wobei sie jedoch für Natrium besser permeabel ist. Die Differenz der Ströme unter Na^+ - bzw. Ca^{2+} -haltigen Bedingungen wurde gebildet im Vergleich zu dem Reststrom, der floß, wenn nur das impermeable Kation NMDG^+ in der Perfusionslösung vorhanden war. Anhand dieser Differenzströme konnte mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes die Leitfähigkeit der Kryptenzellen bei -80 mV für Na^+ und Ca^{2+} berechnet werden. Für Na^+ ergab sich dabei eine Leitfähigkeit von $428 \pm 110 \text{ pS}$, für Ca^{2+} lag die errechnete Leitfähigkeit bei $73 \pm 19 \text{ pS}$ ($n = 6$, $p < 0,05$ für G_{Ca} versus G_{Na} , s. Abb. 33).

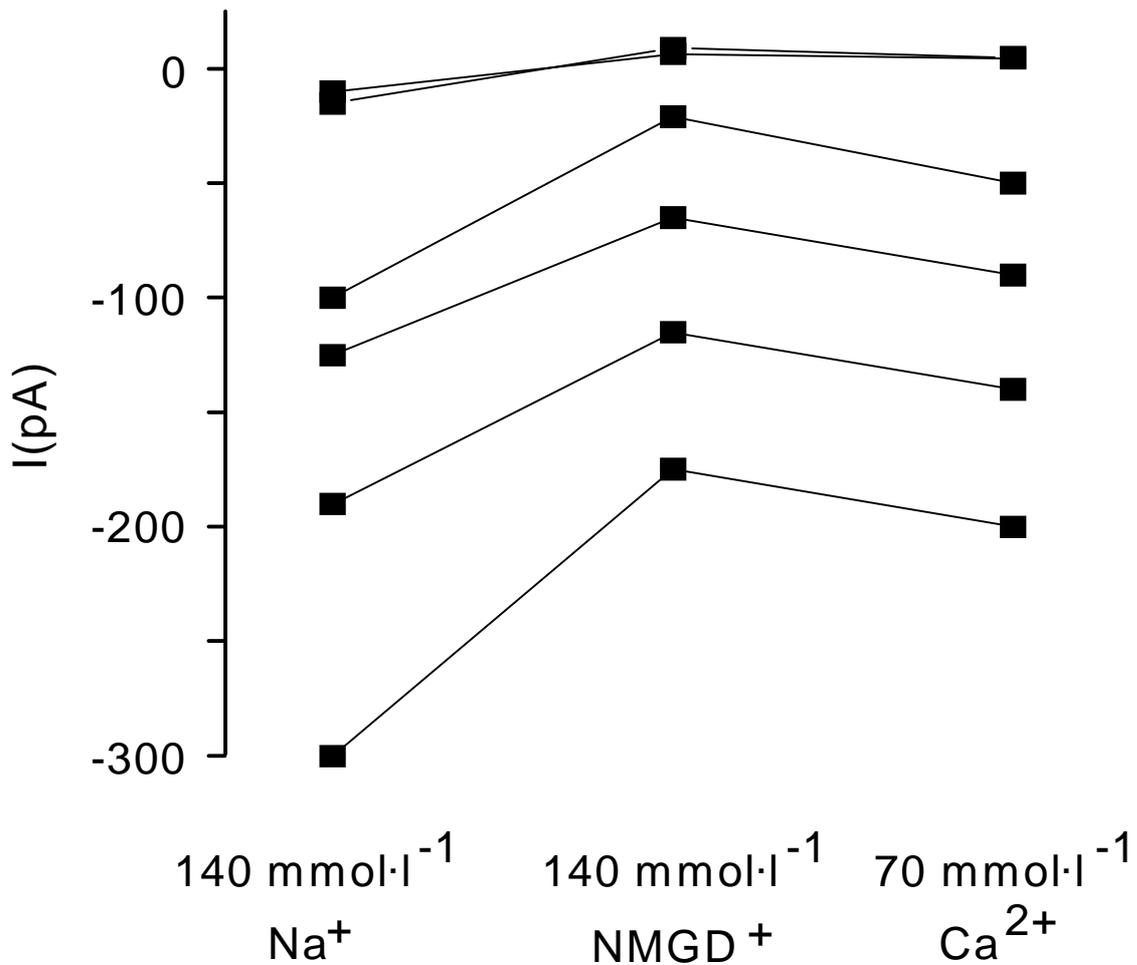


Abb. 32: Membraneinwärtsströme von Funduskryptenzellen die mit verschiedenen Lösungen perfundiert wurden. Dargestellt sind 6 Einzelmessungen, die gemessenen Ströme sind durch Linien miteinander verbunden.

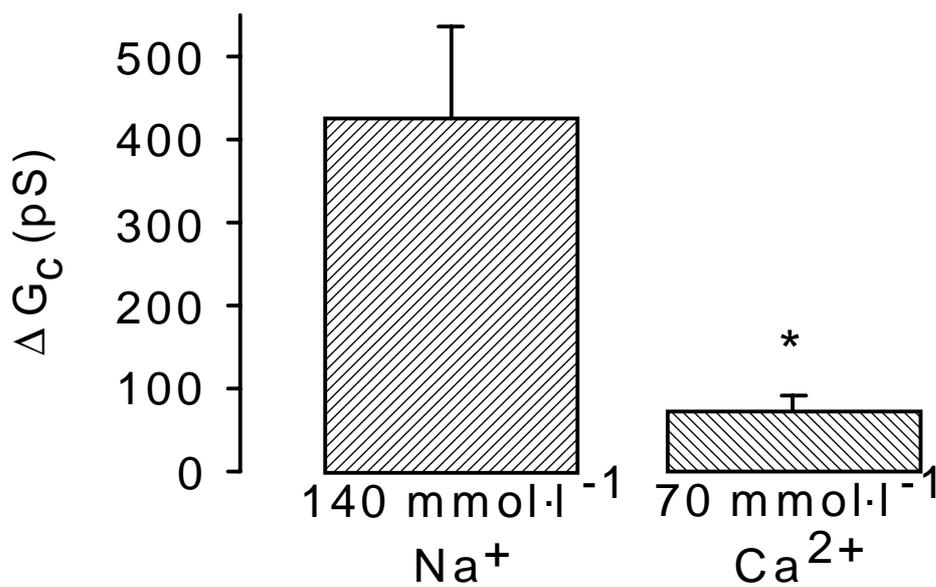


Abb. 33: Darstellung der Gesamtzelleitfähigkeit, berechnet anhand der in Abb.32 gemessenen Ströme, n = 6, *: p < 0,05

1.8 Abhängigkeit des Kationenstromes von extrazellulärem Na⁺

Nachdem durch die in Punkt 1.7 beschriebenen Versuche klar war, daß die durch eine hohe intrazelluläre Ca²⁺-Pufferkapazität stimulierte Leitfähigkeit sowohl für Na⁺ als auch für Ca²⁺ permeabel war, stellte sich nun die Frage, welchen Einfluß die Konzentrationen extrazellulärer Kationen auf die Leitfähigkeit ausüben. Aus der Literatur ist bekannt, daß Na⁺ bei manchen Kanälen den eigenen Einstrom hemmen kann (Fuchs et al., 1977, Turnheim et al., 1983).

Um dies zu untersuchen, wurden die Zellen auf -80 mV geklemmt und es wurde, um die sonst dominierenden Kaliumströme zu unterbinden, eine K⁺-freie Pipettenlösung verwendet. Wurde nun die extrazelluläre Na⁺-Konzentration von 120 auf 10 mmol·l⁻¹ gesenkt (wobei das NaCl in der Lösung durch NMDGCl ersetzt wurde), so hatte dies, wie erwartet, eine starke Abnahme des Einwärtsstromes zur Folge (s. Abb. 34). Eine schrittweise Erhöhung der extrazellulären Na⁺-Konzentration bis zurück auf 120 mmol·l⁻¹ NaCl brachte den Einwärtsstrom wieder zurück auf die bereits zuvor gemessenen Werte.

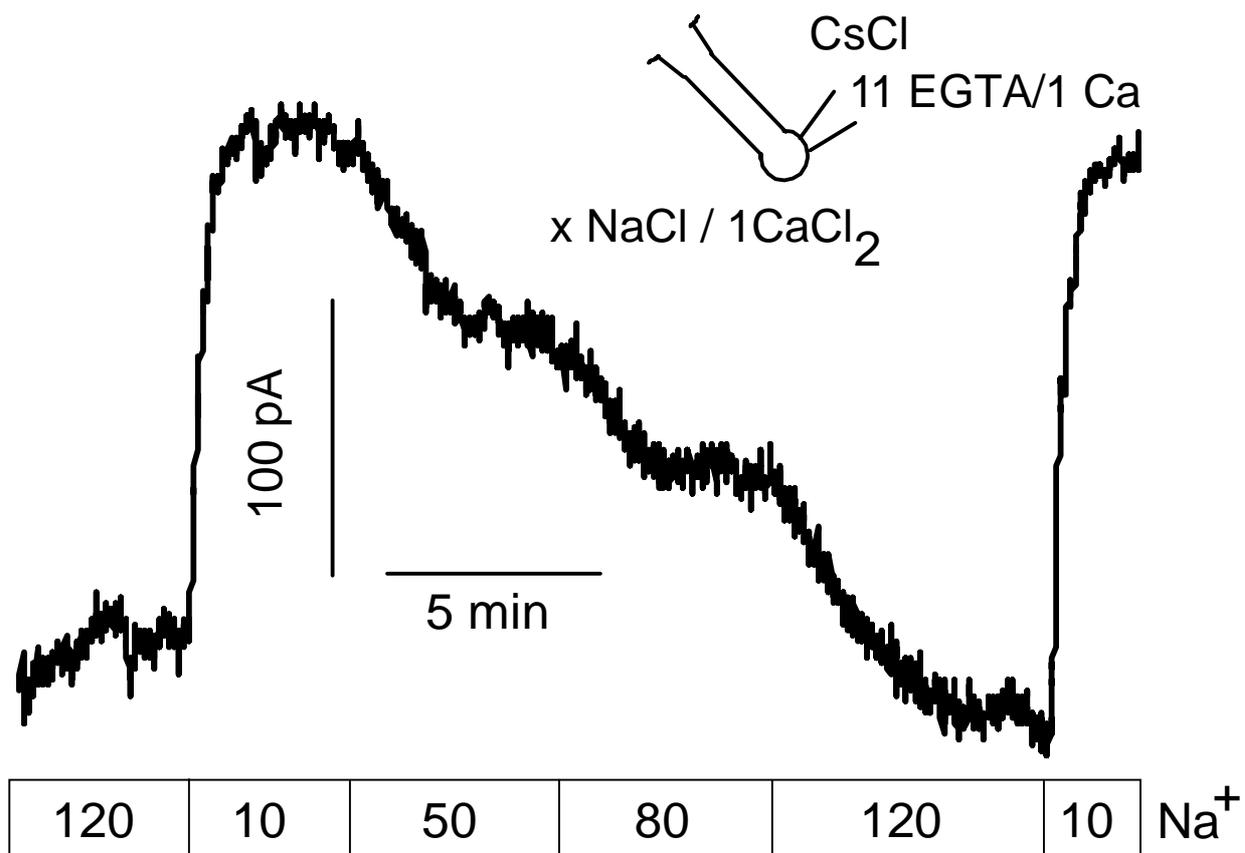


Abb. 34: Originalaufzeichnung des Membranstromes einer Funduszelle während Superfusion mit Lösungen verschiedener Na⁺-Konzentrationen (mmol·l⁻¹). Cave: eine Abnahme des Stromes ist hier als Bewegung der Kurve nach oben dargestellt.

1.9 Abhängigkeit des Kationenstromes von extrazellulärem Ca^{2+}

Unter Punkt 1.7 wurde gezeigt, daß die untersuchte Leitfähigkeit sowohl für Na^+ als auch für Ca^{2+} permeabel ist. Aus der Literatur ist bekannt, daß hohe Ca^{2+} -Konzentrationen einen hemmenden Einfluß auf den Ca^{2+} -Einstrom haben können (Zweifach & Lewis, 1995a und 1995b). Um dies zu untersuchen wurde zunächst ein ähnliches Protokoll wie unter Punkt 1.8 beschrieben gewählt. Hierbei wurde das Na^+ der Perfusionslösungen durch NMDG^+ ersetzt. Die Ca^{2+} -Konzentration in den Perfusionslösungen variierte zwischen 0,5 und 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Unter diesen Bedingungen führte eine schrittweise Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration dazu, daß der Einwärtsstrom der Zellen, gemessen bei einem Haltepotential von -80 mV, oftmals erst einen transienten Anstieg zeigte, dem dann ein Abfall des Stromes folgte. Dadurch, daß die untersuchte Leitfähigkeit aber für Ca^{2+} im Vergleich zu Na^+ geringer permeabel war (vgl. Punkt 1.7), waren die beobachteten Stromänderungen relativ gering und zugleich nur von kurzer Dauer.

Daraufhin wurde das Versuchsprotokoll variiert, um das Phänomen der Stromabnahme nach Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration detaillierter untersuchen zu können. Der Einwärtsstrom wurde dadurch erhöht, daß die Na^+ -Konzentration in der Lösung auf 120 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ angehoben wurde.

In dieser Versuchsserie wurde jetzt also kein Ca^{2+} -getragener Strom gemessen, sondern es wurde ein Na^+ -getragener Membranstrom gemessen, der durch die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration moduliert wurde.

Wurde unter diesen Versuchsbedingungen (bei einem Haltepotential von -80 mV und mit 140 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CsCl in der Pipettenlösung) nun die Ca^{2+} -Konzentration von 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ gesenkt, nahm der Einwärtsstrom in die Zelle paradoxerweise zu und nicht ab, wie man es eigentlich erwarten sollte, wenn die Konzentration eines permeablen Ions vermindert wird. Eine schrittweise Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf 1, 5 bzw. 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hemmte den Einwärtsstrom wieder und eine erneute Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration auf 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ließ ihn wieder ansteigen (s. Abb. 35).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß Ca^{2+} nicht nur ein permeables Ion für die nichtselektive Kationenleitfähigkeit ist (s. Punkt 1.7), sondern in höheren Konzentrationen auch einen hemmenden bzw. regulierenden Einfluß auf diese Leitfähigkeit ausübt.

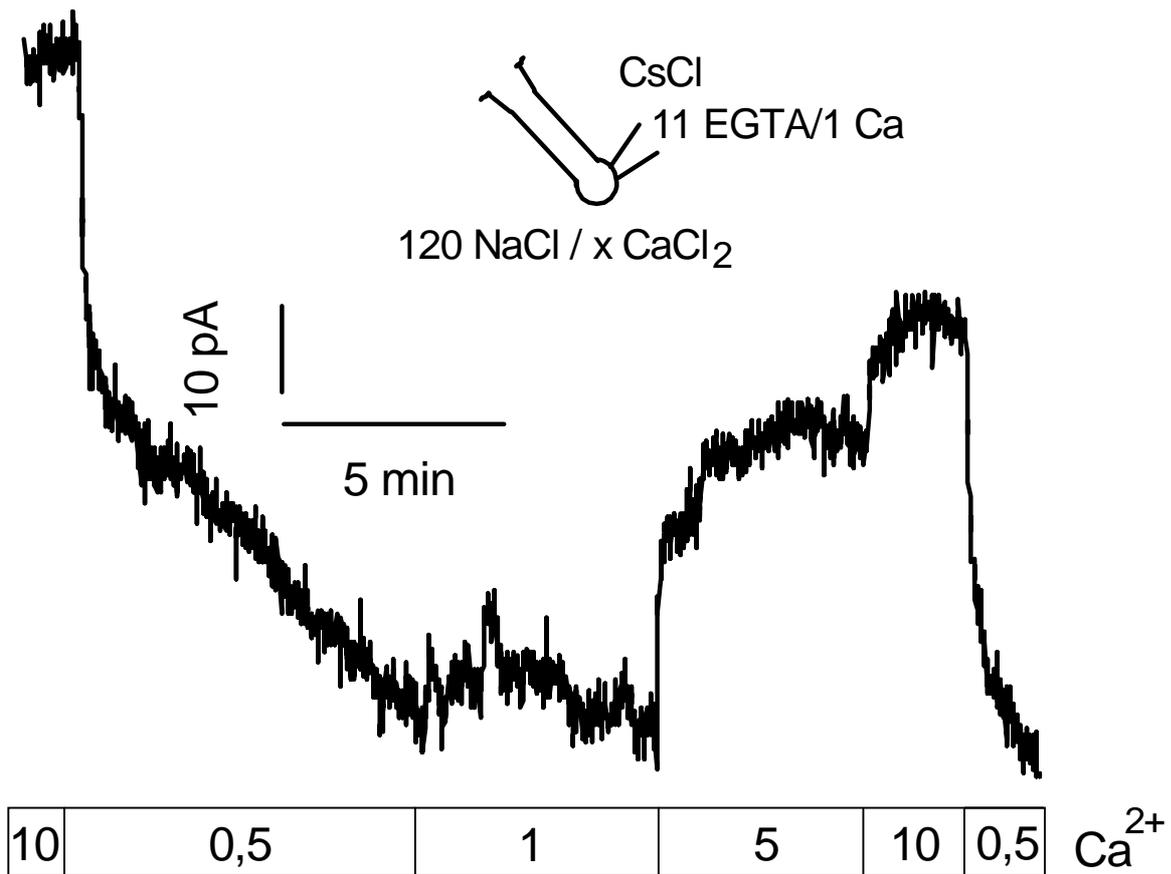


Abb. 35: Originalaufzeichnung einer Messung des Membranstromes einer Funduszelle bei verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Die Zelle wurde auf -80 mV geklemmt, die Pipettenlösung enthielt 140 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CsCl als Hauptelektrolyt und hatte eine hohe Ca^{2+} -Pufferkapazität. Cave: Eine Bewegung der Kurve nach unten bedeutet eine Zunahme des Stromes.

1.10 Effekt von Carbachol auf die Kryptenzellen

In den vorangegangenen Versuchen wurde immer eine hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferkapazität gewählt, um den *kapazitiven* Ca^{2+} -Einstrom zu aktivieren. Aus der Literatur ist bekannt, daß man diesen Strom auch auf physiologische Weise aktivieren kann (Parekh & Penner, 1997). Daher wurde nun in einer neuen Versuchsreihe Carbachol, ein stabiles Acetylcholinderivat, als muskarinerges Agonist eingesetzt. Von dieser Substanz weiß man, daß sie zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und nachfolgenden Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle von außen führt (Fischer et al., 1996). Um zu untersuchen, ob Carbachol einen Ca^{2+} -Einstrom durch die La^{3+} -sensitive Leitfähigkeit stimuliert, wurde der Effekt von Carbachol alleine und in Anwesenheit von La^{3+} getestet.

In einer ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die wiederholte Gabe von Carbachol zu einer Desensitivierung der Kryptenzellen führt, wie sie z.B. in Ussingkammer-Versuchen beobachtet wird (Diener et al., 1991). Die erste Superfusion der Zellen mit Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) führte zu einer transienten Hyperpolarisation um $15,2 \pm 3,2 \text{ mV}$ ($n = 7$, $p < 0,05$). Diese Hyperpolarisation war nach $2,3 \pm 0,3 \text{ min}$ ($= t_{1/2}$) bereits wieder um die Hälfte abgefallen. Nach Auswaschen und erneuter Carbachol-Zugabe wenige Minuten später hyperpolarisierten die gleichen Zellen um $13,1 \pm 3,4 \text{ mV}$, die Halbwertszeit dieses Effektes betrug $2,1 \pm 0,5 \text{ min}$. Diese Ergebnisse zeigten, daß die isolierten Krypten - im Gegensatz zur intakten Mukosa (Diener et al., 1991) - auf wiederholte Gabe des muskarinergen Agonisten nicht desensitivieren (s. Abb. 36).

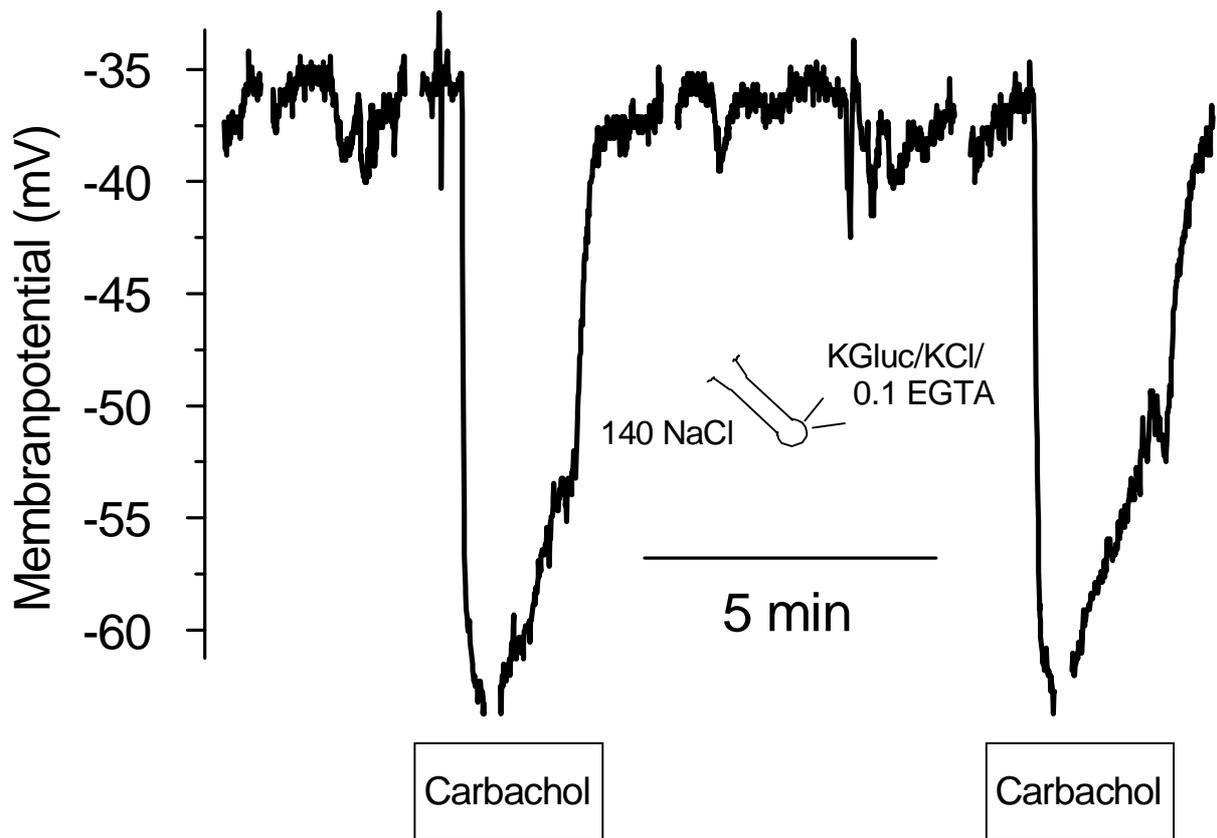


Abb. 36: Originalaufzeichnung des Membranpotentials einer Funduszelle während wiederholter Carbachol-Zugabe ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Zelle reagiert auch bei einer zweiten Zugabe mit nahezu gleicher Hyperpolarisation und ähnlichem zeitlichen Verlauf.

1.11 Hemmung des Carbacholeffektes durch La^{3+}

Dadurch, daß die wiederholte Gabe von Carbachol nicht zu einer Densitivierung der Kryptenzellen führte (vgl. Punkt 1.10), konnte der Effekt von La^{3+} auf die Carbacholwirkung an ein und derselben Kryptenzelle gemessen werden. Zugabe von Carbachol alleine löste eine Hyperpolarisation der Funduszellen um $15,6 \pm 2,2 \text{ mV}$ ($n = 6$) aus. Die Halbwertszeit dieses Effektes lag bei $2,0 \pm 0,2 \text{ min}$. Wurde Carbachol ein zweites Mal, nun in Anwesenheit von La^{3+} ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zugegeben, so hyperpolarisierten die Zellen um $11,1 \pm 1,5 \text{ mV}$ ($n = 6$). Dieser Effekt war nicht signifikant verschieden von der Hyperpolarisation der Zellen unter Kontrollbedingungen, d.h. unter Carbachol alleine. Was signifikant verändert wurde durch die Anwesenheit von Lanthan war der zeitliche Verlauf des Carbachol-induzierten Effektes. Die Halbwertszeit, mit der die Hyperpolarisation abfiel, wurde durch La^{3+} -Zugabe um etwa 50% auf $1,1 \pm 0,1 \text{ min}$ reduziert ($n = 6$, $p < 0,05$, s. Abb. 37).

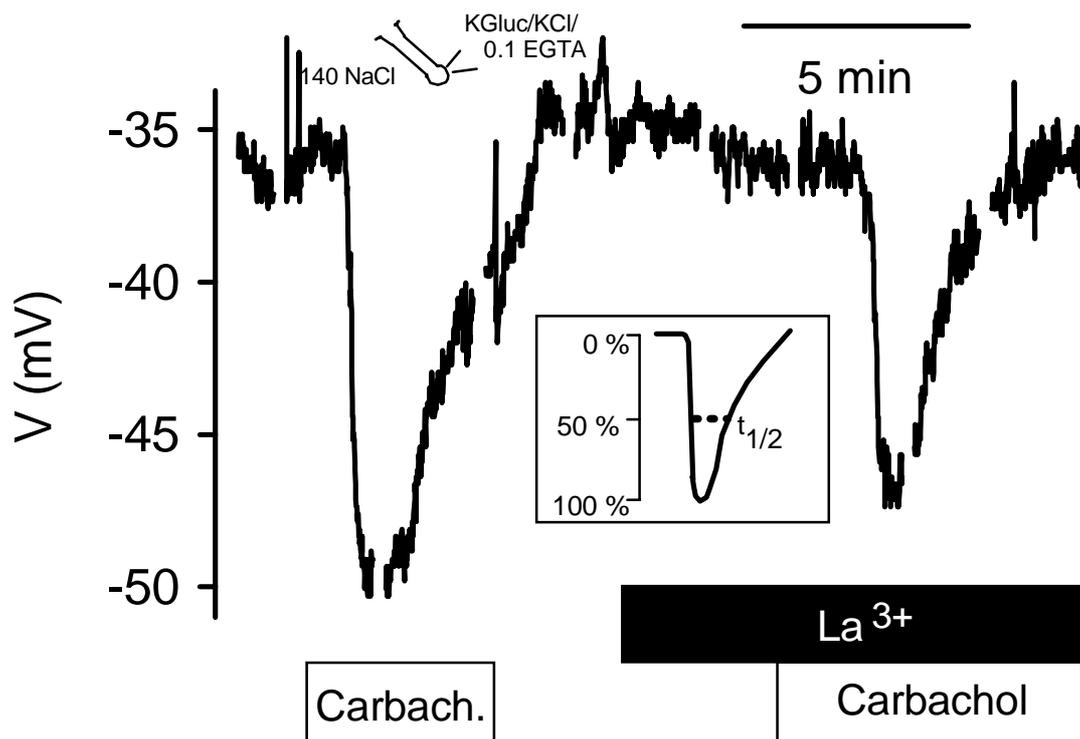


Abb. 37: Originalaufzeichnung des Membranpotentials einer Funduszelle. In Anwesenheit von La^{3+} ist der zeitliche Verlauf des Carbachol-induzierten Effektes deutlich verkürzt. Das Insert zeigt, wie die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) ermittelt wurde.

Eine weitere Versuchsserie wurde durchgeführt um den Effekt zu untersuchen, den Carbachol alleine und in Anwesenheit von La^{3+} auf den Ganzzellstrom ausübt. Diese Experimente wurden unter Voltage-Clamp-Bedingungen bei einem Haltepotential von -35 mV durchgeführt, d.h. am Chlorid-Gleichgewichtspotential, um eine Beteiligung von Chloridströmen auszuschließen. Zugabe von Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) führte unter diesen Bedingungen zu einem transienten Anstieg des Auswärtsstromes um $26 \pm 8 \text{ pA}$ ($n = 6, p < 0,05$), die Halbwertszeit dieses Effektes betrug $3,2 \pm 0,8 \text{ min}$. Eine zweite Gabe von Carbachol in Anwesenheit von La^{3+} ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) führte ebenfalls zu einem transienten Anstieg des Stromes um $32 \pm 8 \text{ pA}$ ($n = 6$), der statistisch nicht signifikant verschieden von der vorher gemessenen Kontrolle war. Im Gegensatz zur alleinigen Gabe von Carbachol war jedoch nun die Halbwertszeit auf $1,2 \pm 0,2 \text{ min}$ verkürzt ($n = 6, p < 0,05$ verglichen mit der $t_{1/2}$ in Abwesenheit von La^{3+} , s. Abb. 38).

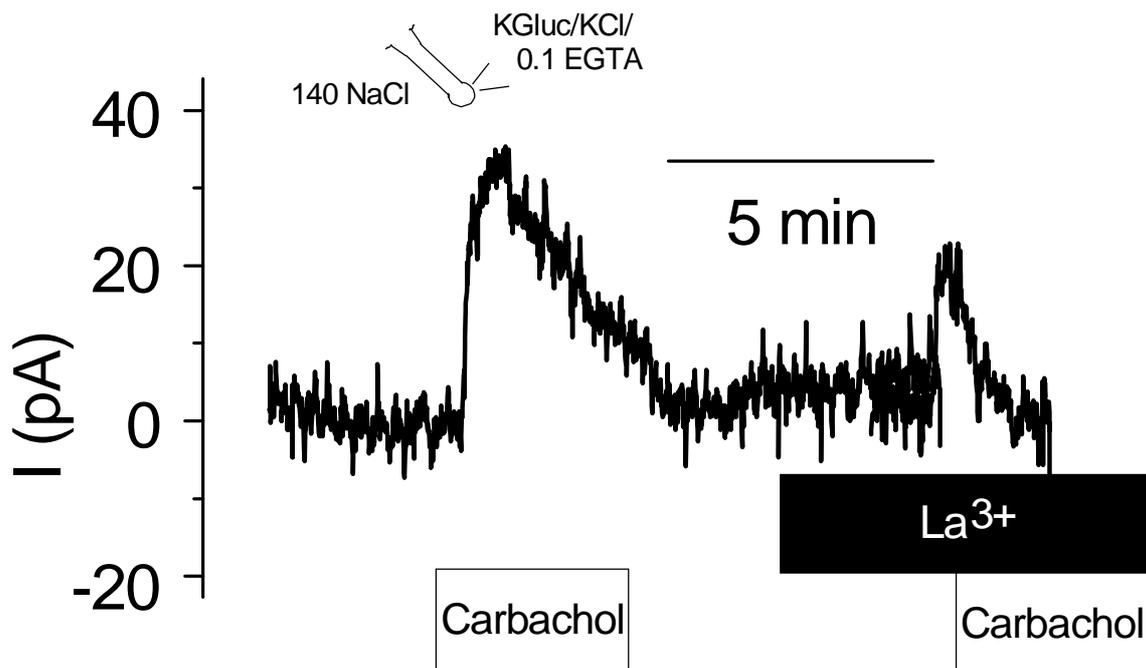


Abb. 38: Effekt von Carbachol auf den Membranstrom einer Funduszelle alleine und in Anwesenheit von La^{3+} . Dargestellt ist eine Originalaufzeichnung.

2. FURA-2-Messungen an isolierten Krypten

Aus der Literatur ist bekannt, daß durch Carbachol die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt (s. Einleitung / Literaturübersicht Punkt 4). Ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} wiederum führt zu einer Aktivierung basolateral gelegener Kaliumleitfähigkeiten (Bleich et al., 1996, Schultheiß & Diener, 1997). Um nun entscheiden zu können, ob La^{3+} wirklich den Ca^{2+} -Einstrom in die Kryptenzellen und nicht etwa die Kaliumleitfähigkeiten direkt blockiert, wurde der Effekt von La^{3+} auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 untersucht. Hierbei wurden nur die relativen Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration anhand der Änderung im Fluoreszenzverhältnis gemessen (s. Material und Methoden).

Die Zugabe von Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) induzierte im Fundusbereich der isolierten Krypten einen biphasischen Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses, gleichbedeutend mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Ein initialer Peak wurde gefolgt von einem lange anhaltenden Plateau. Während dieser Plateauphase nahm das Fluoreszenzverhältnis linear um $0,09 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ ab ($n = 8$). Die Zugabe von La^{3+} ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) während dieser Plateauphase führte zu einem beschleunigten Abfall dieses Plateaus um $0,29 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ ($n = 8$, $p < 0,05$ gegenüber dem Abfall vor Zugabe von La^{3+} , s. Abb. 39). Bereits 90 s nach Lanthanzugabe war das Fluoreszenzverhältnis nicht mehr signifikant höher als vor der Carbacholzugabe, was dafür spricht, daß La^{3+} den Carbachol-induzierten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vollständig hemmt.

Bei einigen Zellen wurde im Anschluß an die Messung eine intrazelluläre Kalibrierung vorgenommen (s. Material und Methoden Punkt 5.3). Diese Form der Eichung birgt einige Probleme, die in der Diskussion näher erläutert werden (Punkt 1.3). Die mit der Kalibrierung ermittelten Werte der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sollen daher nur der Orientierung dienen und zeigen, ob die Konzentrationen im physiologischen Bereich liegen.

Für die basale Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle wurde ein Wert von $166 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ errechnet. Nach Zugabe von Carbachol erhöhte sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf $293 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Applikation von Lanthan führte zu einem Absinken der Ca^{2+} -Konzentration auf 207

$\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Diese Werte stimmen mit den für Epithelzellen bekannten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen gut überein (Putney, 1997).

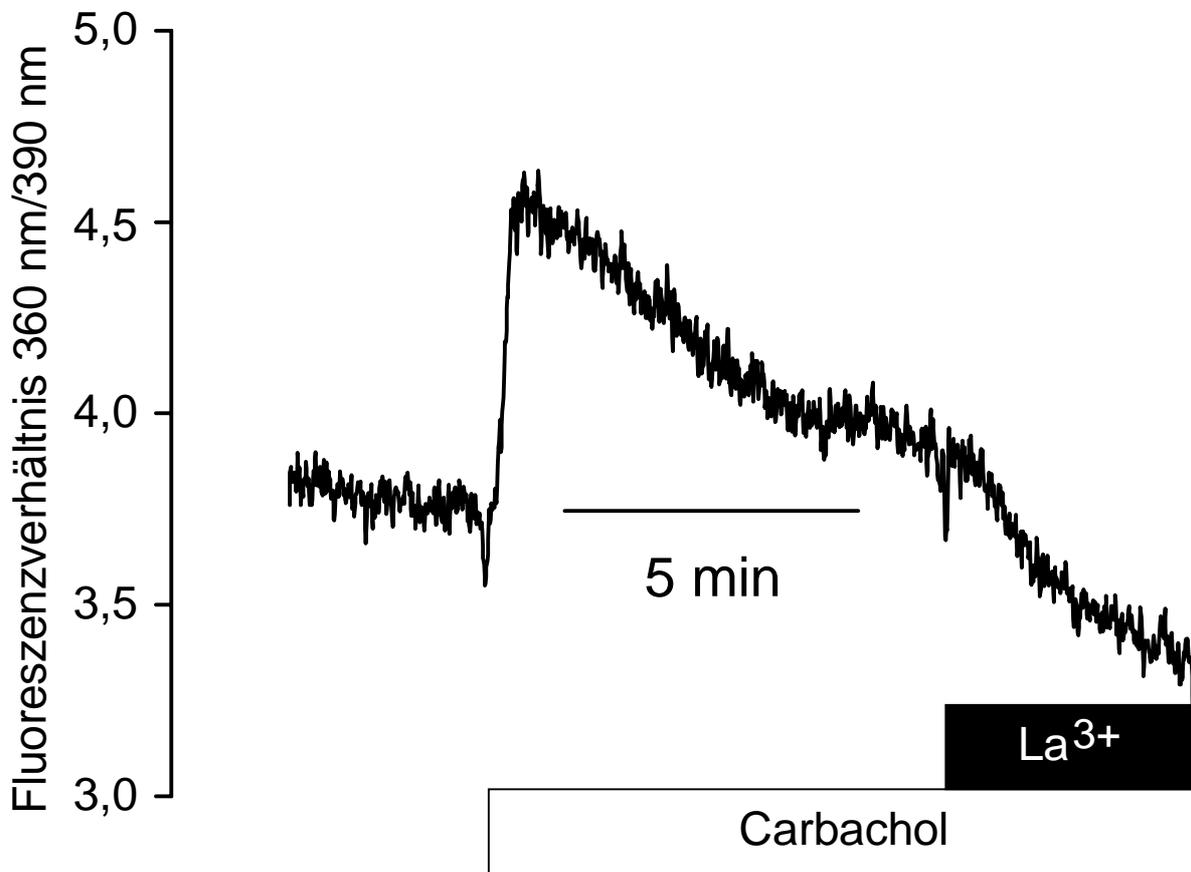


Abb. 39: La^{3+} blockt den durch Carbachol induzierten Anstieg im Verhältnis der Fluoreszenzsignale von FURA-2, angeregt bei 360 und 390 nm. Dargestellt ist die Originalaufzeichnung einer Messung aus der Fundusregion einer isolierten Krypte.

3. Ussingkammer-Experimente am intakten Epithel

Am intakten Epithelgewebe verursacht Carbachol indirekt eine Chloridsekretion, indem es durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine basolaterale Kaliumleitfähigkeit aktiviert und somit die Triebkraft für einen apikalen Chloridaustritt aus der Zelle erhöht (Böhme et al., 1991; Strabel & Diener, 1995).

In einer letzten Versuchsreihe wurde mit Hilfe der Ussingkammer-Technik am intakten Epithel untersucht, ob der La^{3+} -sensitive Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle am nativen Gewebe vorhanden ist, und ob er dort eine physiologische Rolle spielt. Zugabe von Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) induzierte einen biphasischen Anstieg des Kurzschlußstromes (I_{SC}); ein initialer Peak wurde gefolgt von einem langanhaltenden Plateau.

In einem ersten Ansatz wurde La^{3+} in Konzentrationen von 10^{-5} , 10^{-4} und $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ während der Plateauphase des Carbacholeffektes zugegeben. In der niedrigsten Konzentration war kein hemmender Lanthaneffekt zu beobachten. In den beiden Konzentrationen 10^{-4} und $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ war der Effekt, den La^{3+} auf den Kurzschlußstrom ausübte, sehr schwach und instabil.

Dieser erste Ansatz in der Ussingkammer wurde in einer Bikarbonat-gepufferten Lösung (siehe Material und Methoden) durchgeführt. In der Literatur wird beschrieben, daß Gadolinium, das genau wie Lanthan in die chemische Gruppe der Lanthanide gehört, durch Karbonat- und Phosphatanionen gebunden wird (Caldwell et al., 1998). Eine solche Bindung würde erklären, warum Lanthan erst in höheren Konzentrationen wirkt und auch die Instabilität des La^{3+} -Effektes läßt sich durch eine solche Bindung erklären. Deswegen wurden die Experimente in einer HEPES-gepufferten Tyrode, wie sie auch für die Patch-Clamp und FURA-2 Experimente verwendet wurde, wiederholt.

In der Tyrode-Lösung zeigte sich, daß La^{3+} ein effektiver Blocker der Carbachol-induzierten Chloridsekretion war. Dennoch waren auch in dieser Lösung höhere Konzentrationen des Blockers erforderlich als bei den Versuchen mit isolierten Krypten. Die serosale Zugabe von $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ La^{3+} war auch in der Tyrode-Lösung ineffektiv. Wurde La^{3+} in einer Konzentration von $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ während der Plateauphase des Carbacholeffektes serosal zugegeben, so wurde der I_{SC} um $74 \pm 13 \%$ gehemmt ($n = 6$, $p < 0,05$). Eine weitere Erhöhung der Lanthankonzentration auf $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ führte zu einer kompletten Hemmung des

Carbacholeffektes (s. Abb. 40). Innerhalb weniger Minuten nach La^{3+} -Zugabe fiel der I_{SC} von $4,5 \pm 0,5 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $0,8 \pm 0,3 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$, $p < 0,05$), einen Wert der signifikant niedriger als der Baseline-Kurzschlußstrom vor Carbacholzugabe war.

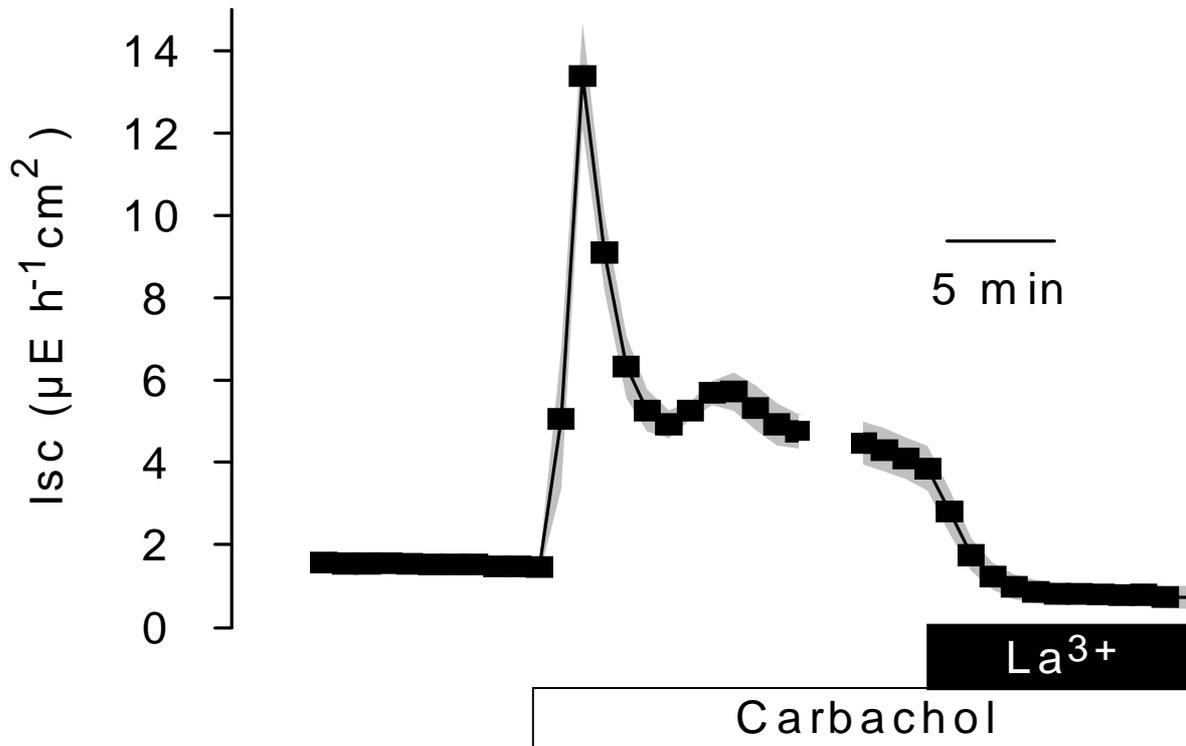


Abb. 40: Effekt von La^{3+} ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) auf den Carbachol-induzierten Kurzschlußstrom. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$.

Wurde das Mukosa-Submukosa-Präparat des Kolons mit La^{3+} vorbehandelt ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) und anschließend Carbachol ($5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) zugegeben, so konnte ebenfalls eine hemmende Wirkung des La^{3+} auf den Kurzschlußstrom festgestellt werden. Die Vorbehandlung mit La^{3+} verursachte einen kleinen, nicht signifikanten Abfall des I_{SC} von $1,7 \pm 0,2 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $1,5 \pm 0,2 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$, s. Abb. 41). Die Zugabe von Carbachol in Anwesenheit von La^{3+} führte zu einem Anstieg des Kurzschlußstromes um $4,0 \pm 1,6 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$, s. Abb. 41). Dieser Anstieg des I_{SC} war signifikant kleiner als in Geweben, welche nicht mit La^{3+} vorbehandelt worden waren. In

Abwesenheit von La^{3+} hatte Carbachol hier einen Anstieg des Isc um $12,6 \pm 0,8 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ hervorgerufen ($n = 6, p < 0,05$, s. Abb. 40).

Das unter Kontrollbedingungen vorhandene Plateau von $4,5 \pm 0,5 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ war nach La^{3+} -Vorbehandlung und anschließender Carbachol-Applikation nicht mehr vorhanden (s. Abb. 41).

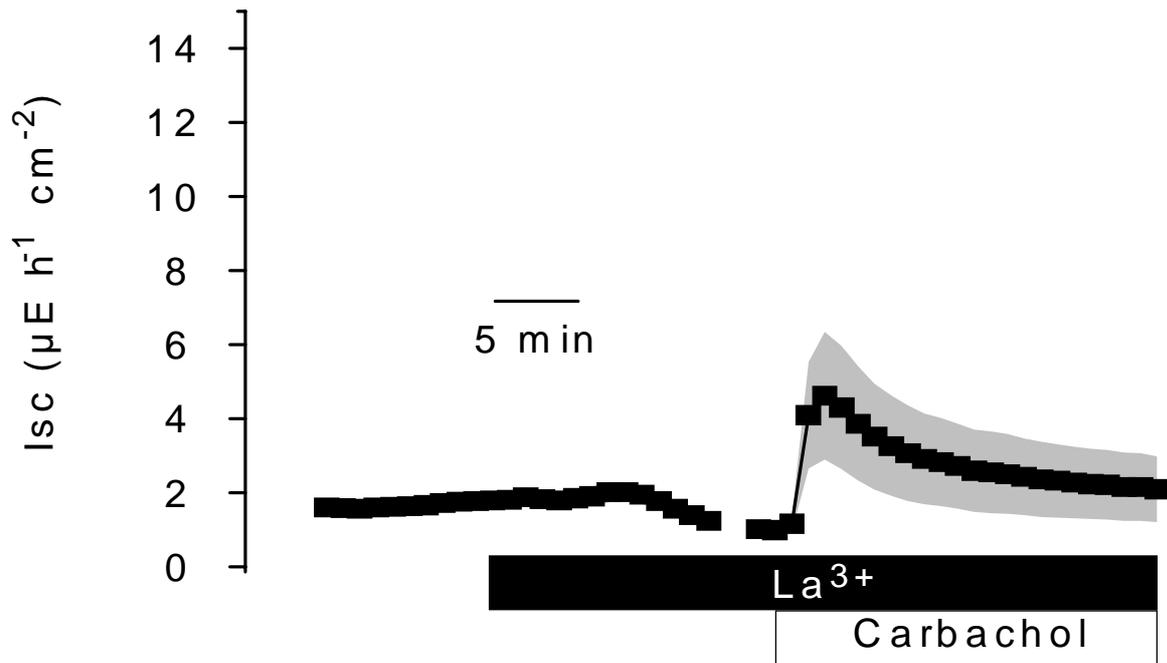


Abb. 41: Die Vorbehandlung des Gewebes mit La^{3+} ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) führt zu einem deutlich verringerten Anstieg des Kurzschlußstromes nach Carbacholzugabe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$.

IV. DISKUSSION

1. Methodenkritik

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um festzustellen, ob am Kolon der Ratte eine Kationenleitfähigkeit vorhanden ist, durch die extrazelluläres Ca^{2+} , welches ein wichtiger second messenger ist, in die Zellen gelangen kann und welche durch Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher aktiviert wird. Um diese Frage zuverlässig beantworten zu können, war es nötig, elektrophysiologische Meßmethoden miteinander zu kombinieren und ergänzend dazu die Fluoreszenzmikroskopie einzusetzen, da jede einzelne Methode für sich immer nur Teilaspekte der Fragestellung abdecken konnte.

1.1 Patch-Clamp-Messungen

Ein großer Vorteil der Patch-Clamp-Methode ist das hohe Auflösungsvermögen. Man erhält mit dieser Technik Informationen über das Membranpotential einzelner Zellen und über die Ströme, die durch diese Zellen fließen. Hierbei können noch Ströme gemessen werden, die im pA-Bereich liegen. Im Ganzzellmodus kann man darüberhinaus die zytoplasmatische Ionenzusammensetzung durch die Wahl der Pipettenlösung vorgeben und somit den Typ der beeinflussten Leitfähigkeiten ermitteln. Außerdem ist diese Methode bei kleinen Zellen wesentlich schonender als die Messung der Membranpotentiale mittels Mikroelektrode, bei der am Ort des Eindringens in die Zelle hohe Leckströme auftreten können.

Der Nachteil bei den Messungen an isolierten Krypten liegt hingegen darin, daß sämtliche subepithelialen Strukturen bei der Präparation entfernt werden. Das enterale Nervensystem z.B., welches bekanntermaßen einen großen Einfluß auf die sekretorischen und resorptiven Vorgänge des Kolonepithels hat, ist bei diesen Messungen nicht mehr vorhanden. Desweiteren ist es bei den durchgeführten Ableitungen im Ganzzellmodus nicht möglich, die zu testende Substanz ganz gezielt nur auf der apikalen oder serosalen Seite zu applizieren. Daher kann man auch nicht unterscheiden, ob die beeinflussten Leitfähigkeiten auf der apikalen oder serosalen Seite der Zellmembran lokalisiert sind.

Aus diesen Gründen wurde ergänzend zur Patch-Clamp-Technik die Ussingkammer-Methode eingesetzt.

1.2 Ussingkammer-Technik

Mit der Ussingkammer-Technik kann man die bei der Patch-Clamp-Methode erwähnten Nachteile z.T. ausgleichen. Hier wird das Darmepithel samt subepithelialer Strukturen in die Kammern eingespannt, so daß ein eventueller Einfluß des enteralen Nervensystems auf die untersuchten Leitfähigkeiten jetzt miterfaßt wird. Desweiteren ist eine gezielte Applikation von Substanzen auf die mukosale oder serosale Seite möglich. Im Gegensatz zur Patch-Clamp-Methode ist dabei das Auflösungsvermögen der elektrischen Vorgänge am Epithel sehr viel geringer. Auch kann man mit der Ussingkammer-Technik nicht das Zytoplasma der Zellen verändern, so wie dies durch die Wahl der Pipettenlösung bei Patch-Clamp-Messungen im Ganzzellmodus möglich ist.

Insgesamt gesehen ist also die Kombination von Patch-Clamp und Ussingkammer-Technik sehr sinnvoll, da jeweils die eine Methode die Nachteile der anderen Methode kompensiert.

1.3 FURA-2-Technik

Die FURA-2-Technik ist eine Methode zur Messung von Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Diese Veränderungen zeigen sich in einer Änderung des Fluoreszenzverhältnisses des Farbstoffes, gemessen bei zwei verschiedenen Wellenlängen. Mit dieser Methode auf die absolute Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle zu schließen birgt allerdings einige Fehler und Schwierigkeiten. Um die absolute intrazelluläre Konzentration an Ca^{2+} bestimmen zu können, muß eine Kalibrierung durchgeführt werden. Eine Möglichkeit ist die intrazelluläre Kalibrierung, bei der nach der Durchführung des eigentlichen Experimentes die Zellen mit Hilfe eines Ionophors perforiert werden und durch Vorgabe der entsprechenden Badlösungen die Extinktionen des Farbstoffes, einmal unter Ca^{2+} -freien Bedingungen (kein Ca^{2+} an den Farbstoff gebunden) und einmal bei Ca^{2+} -Überschuß (maximale Ca^{2+} -Bindung an den Farbstoff) gemessen werden. Diese Extinktionswerte können dann in die von Grynkiewicz aufgestellte Gleichung (siehe Material und Methoden) eingesetzt werden, mit deren Hilfe man von den vorher im Versuch gemessenen Fluoreszenzwerten auf die absolute intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zurückrechnen kann (Grynkiewicz et al., 1985). Voraussetzung für diese Art der Kalibrierung ist eine vollständige Perforation der Membran für Ca^{2+} -Ionen und gleichzeitig ein vollkommener Konzentrationsausgleich zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Diese Voraussetzung läßt sich aber nicht überprüfen und beruht nur auf einer Annahme.

Eine zweite Art der Kalibrierung ist die extrazelluläre Methode. Hierbei titriert man verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen in die Farbstofflösung und mißt das entsprechende Fluoreszenzverhältnis. Anhand der ermittelten Werte erstellt man durch lineare Regression eine Eichkurve. Setzt man die im Versuch gemessenen Fluoreszenzverhältnisse in diese Eichkurve ein, kann man die entsprechende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ablesen.

Ein großer Nachteil bei beiden Arten der Kalibrierung ist, daß die Bindungskurve von Ca^{2+} an den Chelatbildner FURA-2 einen sigmoidalen Verlauf hat und nur im Bereich der Dissoziationskonstanten (K_D) linear verläuft. Daher kann man auch nur für intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen, die ebenfalls im Bereich der K_D liegen, exakte Werte aus der Eichkurve ermitteln. Hinzu kommt, daß die Dissoziationskonstante von FURA-2 intrazellulär durch die Bindung des Farbstoffes an zytoplasmatische Proteine verändert wird und nicht mit der theoretischen K_D übereinstimmt, die in die Formel zur Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration eingesetzt wird.

Aufgrund der hier erwähnten Schwierigkeiten bei der Ermittlung absoluter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen ist es durchaus üblich in der Literatur nur die Veränderungen im Fluoreszenzverhältnis anzugeben, die für die relative Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration stehen, und auf die Angabe von Absolutwerten zu verzichten (Fischer et al., 1996). Aus diesem Grund sind auch in der vorliegenden Arbeit nur die Änderungen in der Ratio angegeben und nicht die absoluten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen.

Hintergrundrauschen und Eigenfluoreszenz des Präparates, zwei weitere Probleme, die bei Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen auftreten können, wurden in den durchgeführten Versuchen dadurch vermieden, daß vor der Messung die Fluoreszenz von Präparat und Hintergrund bestimmt und automatisch bei den Messungen abgezogen wurde.

2. Nichtselektive Kationenleitfähigkeit an isolierten Krypten

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß am Kolonepithel der Ratte eine Kationenleitfähigkeit vorhanden ist, die sowohl durch Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher als auch durch Carbachol aktiviert werden kann. Wurden die Kryptenzellen mit einer Lösung dialysiert, die eine hohe Ca^{2+} -Pufferkapazität enthielt, so zeigten diese Zellen nach anfänglich normalen Membranpotentialen eine deutliche Depolarisation in den ersten 10-15 Minuten nach Durchbrechen der Membran. Diese Depolarisation gibt einen ersten Hinweis darauf, daß durch die hohe EGTA-Konzentration in der Pipettenlösung ein Kationeneinstrom von außen in die Zellen aktiviert wird. Dies läßt sich folgendermaßen erklären: Durch die hohe Konzentration an EGTA in der Pipettenlösung steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferkapazität an, und es wird intrazelluläres freies Ca^{2+} gebunden. Als Folge davon wird Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern freigesetzt, was wiederum an der Plasmamembran ein - bisher unbekanntes - Signal auslöst, daß nun die Kationenleitfähigkeit stimuliert wird und Na^+ und Ca^{2+} entlang ihrem elektrochemischen Gradienten in die Zellen strömen und zu einer Depolarisation der Membran führen. Die Applikation von Blockern nichtselektiver Kationenkanäle wie etwa Lanthan oder Gadolinium führte dazu, daß die Zellen hyperpolarisierten (s. Abb. 21 und 24), bis hin auf ihr ursprüngliches Ruhemembranpotential. Dieser Befund spricht dafür, daß tatsächlich ein Kationeneinstrom durch eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit stattgefunden hat.

Die Depolarisation der Zellen unter einer hohen intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkapazität wäre theoretisch auch dadurch zu erklären, daß EGTA Ca^{2+} bindet und bedingt durch das Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration basolateral gelegene K^+ -Leitfähigkeiten schließen. Auch in diesem Fall würde man eine Depolarisation der Zellen erwarten, da K^+ dann in der Zelle akkumulieren würde. Betrachtet man aber die Ganzzellströme, so wäre bei einem Schließen der K^+ -Kanäle eine Abnahme des Stromes festzustellen. Bei einer Pipettenlösung mit einer hohen EGTA-Konzentration waren die Auswärtsströme aus der Zelle jedoch sehr viel höher als unter Bedingungen mit einer niedrigen EGTA-Konzentration in der Pipette, so daß ein Schließen der K^+ -Kanäle hier nicht vorhanden sein kann. Gegen ein Schließen von K^+ -Kanälen spricht auch, daß sich die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch eine Erhöhung der Pufferkapazität nicht ändert.

Der Differenzierungsgrad der Kryptenzellen nimmt vom Kryptengrund zur Oberfläche hin zu (Lipkin, 1985). Die beschriebenen Reaktionen, d.h. die Depolarisation der Zellen unter einer

hohen intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkapazität und die Hyperpolarisation nach Applikation der verschiedenen Blocker, waren am stärksten ausgeprägt in Zellen aus der Fundusregion der Krypte, konnten aber auch bei Zellen aus dem Mittel- und Oberflächenbereich beobachtet werden. Die Unterschiede der Membranpotentialänderungen an den verschiedenen Lokalisationen erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

Ein vergleichbarer Gradient entlang der Kryptenachse an isolierten Krypten des Rattenkolons ist erst kürzlich beschrieben worden. Hierbei wurden mit Hilfe der FURA-2-Methode die durch Acetylcholin induzierten Ca^{2+} -Signale an verschiedenen Kryptenabschnitten gemessen. Auch hier reagierten Zellen aus dem Fundusbereich stärker als Zellen aus dem Mittel- und Oberflächenbereich (Lindqvist et al., 1998).

Die Umkehrpotentiale der Strom-Spannungsbeziehungen liefern Hinweise über die Art der beteiligten Leitfähigkeit (siehe Material und Methoden). Die Umkehrpotentiale der durch Lanthan und Gadolinium gehemmten Ströme lagen bei $-8,7 \pm 4,8$ mV bzw. $2,7 \pm 5,5$ mV und waren damit statistisch nicht signifikant verschieden von 0 mV.

Diese Umkehrpotentiale geben einen Hinweis darauf, daß es sich bei der untersuchten Leitfähigkeit um einen nichtselektiven Kationenkanal handelt, da sich bei nichtselektiven Kationenkanälen bei gleicher Kationenkonzentration auf beiden Seiten nach der Nernst-Gleichung ein theoretisches Umkehrpotential von 0 mV ergibt (Hille, 1992).

Im Gegensatz zu La^{3+} und Gd^{3+} war das Umkehrpotential des Flufenamat-gehemmten Stromes mit $-31,9 \pm 5,5$ mV signifikant von 0 mV verschieden. Das gemessene Umkehrpotential des Flufenamat-sensitiven Stromes lag nahe dem bei den gegebenen Ionenverhältnissen erwarteten Umkehrpotential für eine Chloridleitfähigkeit. Somit lag die Vermutung nahe, daß Flufenamat eine Chloridleitfähigkeit beeinflusst. Dies konnte durch eine Versuchsserie unter chloridfreien Bedingungen bestätigt werden.

Ein Umkehrpotential von etwa 0 mV spricht, wie bereits erwähnt, dafür, daß es sich bei der untersuchten Leitfähigkeit um einen nichtselektiven Kationenkanal handelt. Diese Vermutung wurde durch Kationensubstitutionsversuche bestätigt. Diese Versuche ergaben, daß die Leitfähigkeit sowohl für Na^+ als auch für Ca^{2+} durchlässig ist, wobei Na^+ die Leitfähigkeit deutlich besser passieren kann (s. Abb. 32 und 33). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß extrazelluläres Ca^{2+} , im Gegensatz zu Na^+ , in Konzentrationen über $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ einen hemmenden Einfluß auf diese Leitfähigkeit ausübt (s. Abb. 34 und 35).

Wenn die hier untersuchte Leitfähigkeit für die Zellen ein Weg ist, den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel zu erhöhen, so stellt sich die Frage, wieso die Leitfähigkeit für Na^+ besser permeabel ist als für Ca^{2+} . Eine mögliche Antwort auf diese Frage könnte sein, daß es sich um eine Art Schutzmechanismus handelt, welcher die Zelle vor zu hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen schützt. Zu hohe Ca^{2+} -Konzentrationen können zellschädigende Reaktionen bis hin zur Apoptose auslösen (Hoth et al., 1997).

Für die Hemmung der nichtselektiven Kationenleitfähigkeit durch hohe extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Es wäre denkbar, daß die einströmenden Ca^{2+} -Ionen von der zytoplasmatischen Seite oder von außen her einen negativen Feedback-Mechanismus auf die Leitfähigkeit ausüben. So könnte Ca^{2+} direkt mit dem Kanal interagieren und an einer inhibitorischen Stelle im Kanal oder nahe an der Kanalöffnung binden und so den Einstrom weiterer Kationen verhindern (Putney, 1997). Auch die aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern freigesetzten Ca^{2+} -Ionen könnten über einen negativen Feedback-Mechanismus entweder direkt oder über ein - bisher unbekanntes - Signalmolekül die Leitfähigkeit nach einer Weile blockieren. Das einströmende Ca^{2+} dient in erster Linie der Wiederauffüllung der intrazellulären Speicher (Holda et al., 1998), so daß auch von diesen, wenn sie voll sind, eine Hemmwirkung auf den Ca^{2+} -Einstrom ausgeübt werden könnte. Durch welchen Mechanismus die Hemmung der Leitfähigkeit bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen nun wirklich ausgelöst wird ist bisher unbekannt.

3. Vergleich der Leitfähigkeit am Rattenkolon mit anderen Spezies

In der Literatur sind viele verschiedene „store-operated ion channels“ beschrieben worden (Parekh & Penner, 1997). Einer der am besten untersuchten elektrogenen Eintrittswege für Ca^{2+} in nicht-erregbare Zellen ist der sogenannte I_{Crac} (für calcium release-activated calcium current), ein Calciumstrom also, der durch Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern aktiviert wird. Dieser Strom ist an Mastzellen und T-Lymphozyten beschrieben und charakterisiert worden (Hoth & Penner, 1992, Hoth & Penner, 1993). I_{Crac} kann an den genannten Zellen durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden, wie etwa hohe EGTA-Konzentrationen in der Zelle, Verwendung von Thapsigargin als Blocker der Ca^{2+} -ATPase oder auch durch IP_3 in der Zelle, welches ebenfalls Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern

freisetzt. Der durch diese Methoden aktivierte Strom in die Mastzellen ist hochselektiv für Ca^{2+} , er ist nicht spannungsabhängig, hat ein positives Umkehrpotential von +50 mV oder mehr und zeigt bei negativen Potentialen eine Einwärtsrektifizierung, d.h. eine Gleichrichtung in der Art, daß er Ca^{2+} besser in die Zelle hinein- als hinausströmen läßt (Hoth & Penner, 1992, Hoth & Penner, 1993, Parekh & Penner, 1997).

Unterschiede zwischen I_{crac} und der Kationenleitfähigkeit am Rattenkolon bestehen in der Kationenselektivität und dadurch bedingt auch im Umkehrpotential. Gemeinsamkeiten liegen z.B. darin, daß beide Leitfähigkeiten durch hohe extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen gehemmt werden, wohingegen Na^+ keinen solchen negativen Feedback ausübt. Für die Hemmung des I_{crac} durch Ca^{2+} sind mindestens drei unabhängige Mechanismen bekannt. So gibt es zwei Mechanismen der sogenannten langsamen Inaktivierung, wovon einer abhängig von der Füllung der Speicher ist (Zweifach & Lewis, 1995b). Daneben ist ein Mechanismus der schnellen Inaktivierung beschrieben (Zweifach & Lewis, 1995a). Auf welchen Mechanismus die am Rattenkolon beobachtete Hemmwirkung des Ca^{2+} auf die Kationenleitfähigkeit zurückzuführen ist, kann hier aufgrund der geringen zeitlichen Auflösung nicht beantwortet werden.

Neben dem bereits erwähnten I_{crac} sind noch andere Speicher-gesteuerte Ca^{2+} -permeable Kanäle beschrieben worden. So gibt es in Endothelzellen aus der Aorta des Rindes einen Kationenkanal mit einer Leitfähigkeit von 2,5 pS, der durch Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat aktiviert wird (Lückhoff & Clapham, 1992).

In Endothelzellen der Koronararterie des Schweines ist ein durch Speicherentleerung aktivierbarer Kationeneinstrom beschrieben worden, der sowohl durch Na^+ als auch Ca^{2+} -Ionen getragen wird, durch Lanthan hemmbar ist und durch hohe extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen inaktiviert wird (Davis & Sharma, 1997).

Eine weitere Familie Speicher-gesteuerter Ca^{2+} -Kanäle sind die Säugetier-Homologe des Drosophila-TRP-Proteins (für transient receptor potential). Die Photorezeptoren des Drosophila-Wildtyps besitzen in ihrer Plasmamembran Ca^{2+} -Einstromkanäle, durch die bei Erregung der Rezeptoren Ca^{2+} einströmt und die Erregung aufrechterhält. Mutanten, bei denen dieser Kanal fehlt, können das Rezeptorpotential nicht aufrechterhalten, daher wird das Gen, welches für den Ca^{2+} -Kanal codiert als TRP-Gen bezeichnet. Man vermutete schon

lange, daß bei Säugetieren Homologe zu diesem Drosophila-TRP-Gen für speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle codieren. Mittlerweile sind diese Homologe nachgewiesen und scheinen tatsächlich für kapazitative Ca^{2+} -Kanäle zu codieren (Philipp et al., 1996, Philipp et al., 1998, Zhu & Birnbaumer, 1998).

Welcher der hier beschriebenen Gruppen und Familien von kapazitativen Ca^{2+} -Kanälen die in dieser Arbeit untersuchte Leitfähigkeit zugeordnet werden kann, muß an dieser Stelle offen bleiben. Es gibt jeweils einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zu den beschriebenen Gruppen. Eine eindeutige Zuteilung erfordert noch eine genauere Charakterisierung des Ca^{2+} -Einstromweges.

4. Physiologische Bedeutung der Kationenleitfähigkeit

Die ersten Versuche haben gezeigt, daß am Rattenkolon eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit vorhanden ist, die durch Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher aktiviert werden kann. Nun stellte sich die Frage, ob diese Leitfähigkeit auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielt. Deswegen wurde untersucht, ob die Leitfähigkeit auch durch Carbachol, ein stabiles Acetylcholinderivat, aktiviert werden kann.

Es ist bekannt, daß cholinerge Agonisten am Kolonepithel zu einem biphasischen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen (Diener et al., 1991, Fischer et al., 1992, Lindqvist et al., 1998). In der ersten Phase erfolgt ein rascher Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, bedingt durch ein Entleeren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. Nach Erreichen eines Gipfels fällt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in der zweiten Phase ab und es stellt sich ein stabiles Plateau ein. Die in dieser Phase erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle beruht auf einem Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär (Fischer et al., 1992). Durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration öffnen basolateral gelegene Kaliumkanäle (Bleich et al., 1996), was sich in einem Anstieg der Membranauswärtsströme und einer Hyperpolarisation der Zellen zeigt. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Applikation von Carbachol führte bei den isolierten Krypten zu einer transienten Hyperpolarisation (s. Abb. 36) mit Zunahme des Auswärtsstromes. Wurde Carbachol den Krypten in Anwesenheit von Lanthan zugesetzt, kam es ebenfalls zu einer Hyperpolarisation mit Zunahme des Auswärtsstromes, allerdings war dieser transiente Effekt jetzt deutlich verkürzt (s. Abb. 37 und 38). Als Maß für die Verkürzung des Carbachol-Effektes durch Lanthan wurde die

Halbwertszeit der Strom- bzw. Membranpotentialveränderung herangezogen. Die Amplitude der Strom- und Membranpotentialänderungen wurde durch Lanthan nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Lanthan einen Einstrom von Kationen von außen in die Zellen hemmt, wie es auch während der Plateauphase des Carbachol-Effektes der Fall ist.

Um zu überprüfen, ob Lanthan wirklich einen Kationeneinstrom hemmt und nicht vielleicht direkt an der Kaliumleitfähigkeit angreift, wie es zum Beispiel für Zellen der Zellkulturlinie A6 beschrieben ist (De Smet et al., 1998), wurden FURA-2-Messungen durchgeführt. Diese zeigten, daß Lanthan, während der Plateauphase des Carbachol-Effektes appliziert, sehr schnell ein Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt (s. Abb. 39). Somit muß es den Einstrom von Ca^{2+} von außen in die Zellen hemmen.

In einer letzten Versuchsserie konnte gezeigt werden, daß die Lanthan-sensitive nichtselektive Kationenleitfähigkeit auch am intakten Kolonepithel an der Regulation des Elektrolyttransportes beteiligt ist. In der Ussingkammer verursacht die Applikation von Carbachol einen biphasischen Anstieg des Kurzschlußstromes, der auf eine indirekte Aktivierung einer Chloridsekretion zurückgeführt werden kann (Strabel & Diener, 1995). Auch hier wird ein erster transients Gipfel gefolgt von einem lang anhaltenden Plateau. Zugrunde liegt wieder der schon mehrfach erwähnte Mechanismus: durch Carbachol kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, dadurch werden Ca^{2+} -abhängige Kaliumleitfähigkeiten geöffnet, K^+ strömt aus den Zellen und damit erhöht sich die Triebkraft für Chloridionen, ebenfalls die Zellen durch spontan geöffnete, apikal gelegene Chloridkanäle zu verlassen. Dies konnte sowohl am Rattenkolon (Böhme et al., 1991) als auch am humanen Kolon (Mall et al., 1998) gezeigt werden.

Applikation von Lanthan auf die Carbachol-induzierte Plateauphase des Kurzschlußstromes führte in hohen Konzentrationen zu einer kompletten Reduktion des Kurzschlußstromes auf Werte, wie sie vor Carbachol-Zugabe gemessen wurden (s. Abb. 40). Wurde das Epithel mit Lanthan vorbehandelt, stellte man ein Absinken des basalen Kurzschlußstromes fest. Wurde dann Carbachol appliziert, so war der Carbachol-induzierte Anstieg des Kurzschlußstromes deutlich geringer als ohne Vorbehandlung mit Lanthan (s. Abb. 41). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Lanthan-sensitive Kationenleitfähigkeit auch unter physiologischen Bedingungen in den Epithelzellen aktiv ist.

In den Ussingkammer-Versuchen mußten höhere Konzentrationen an Lanthan eingesetzt werden als in den Versuchen mit isolierten Krypten. Ein Grund dafür ist mit Sicherheit die

große Diffusionsbarriere beim intakten Epithel. Während bei den isolierten Krypten die Substanzen mittels der Perfusion direkt an die Zellen herangebracht werden können, und dort nur eine dünne, undurchmischte Grenzsicht vorhanden ist, müssen bei serosaler Applikation in der Ussingkammer die Substanzen zusätzlich die subepithelialen Strukturen und die Basalmembran durchdringen, bevor sie die basolaterale Membran der Epithelzellen erreichen. Wie bereits mehrfach erwähnt, ist bei dem biphasischen Carbachol-Effekt die erste Phase auf eine Entleerung der intrazellulären Speicher zurückzuführen und die zweite Phase auf einen Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Zellen. Demzufolge dürfte eine Vorbehandlung des Gewebes mit Lanthan eigentlich den Carbachol-induzierten ersten Anstieg des Kurzschlußstromes in seiner Amplitude nicht beeinflussen. Dies war in den Patch-Clamp Versuchen auch nicht der Fall. In der Ussingkammer jedoch betrug der durch Carbachol induzierte Anstieg des I_{SC} nach Lanthanvorbehandlung nur noch etwa 1/3 des Anstieges unter Kontrollbedingungen. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß Lanthan in einer so hohen Konzentration, wie sie in der Ussingkammer eingesetzt wurde, mit den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern interagiert und eventuell deren vollständige Wiederauffüllung verhindert. Eine solche Wirkung der Lanthanide ist für Gadolinium an der Zellkulturlinie CFPAC-1 beschrieben worden (Schumann et al., 1994). Eine weitere Erklärung wäre, daß die basal vorhandene Leitfähigkeit durch Lanthan gehemmt wird, und es dadurch zu einer teilweisen Entleerung der Speicher kommt. Für diese Theorie spricht die Hemmung des basalen Kurzschlußstromes bei Lanthanvorbehandlung. Faßt man die gezeigten Ergebnisse noch einmal kurz zusammen, so kann man sagen, daß es am Rattenkolon einen nichtselektiven Kationenkanal gibt, der der Gruppe der Speicher-gesteuerten Kanäle zugeordnet werden kann, und der auch unter physiologischen Bedingungen an der Regulation des Elektrolyttransportes durch das Kolonepithel beteiligt ist.

5. Kommunikation zwischen intrazellulären Ca^{2+} Speichern und Plasmamembran

Der Speicher-gesteuerte Ca^{2+} -Einstrom ist für viele nicht-erregbare Gewebe beschrieben worden. Dabei ist bisher noch völlig unbekannt, wie die Signalübertragung zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und der Plasmamembran vonstatten geht. Prinzipiell braucht man für die 'Verständigung' zwischen den beiden Strukturen einen Calciumsensor, der den Füllungszustand der Speicher registriert, und ein aktivierendes Signal, welches bei Entleerung

der Speicher den Ca^{2+} -Einstrom aktiviert. Es gibt viele Modellvorstellungen, von denen aber bisher noch keine bewiesen werden konnte. Grundsätzlich sind zwei verschiedene Kopplungen zwischen intrazellulären Speichern und Plasmamembran möglich: eine direkte und eine indirekte. Bei der direkten Kopplung könnte man sich vorstellen, daß - ähnlich wie bei der Skelettmuskulatur durch den Ryanodinrezeptor - eine Verbindung zwischen Speicher und Plasmamembran besteht, z.B. über einen IP_3 -Rezeptor. Bei Entleerung der intrazellulären Speicher bindet dieser Rezeptor Ca^{2+} , dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, welche direkt Einfluß auf den Ca^{2+} -Kanal in der Plasmamembran ausübt und diesen öffnet. Eine solche Hypothese wurde erstmals von Irvine aufgestellt (Irvine 1990), konnte aber bisher nicht bewiesen werden. Eine Voraussetzung für die direkte Kopplung wäre, daß die Speicher, die den Ca^{2+} -Einstrom aktivieren, sehr dicht an der Plasmamembran lokalisiert sind. Dies konnte von einigen Arbeitsgruppen bereits gezeigt werden (Parekh & Penner, 1997).

Für den Mechanismus der indirekten Kopplung gibt es eine Reihe von Vorstellungen, von denen an dieser Stelle nur einige vorgestellt werden sollen (eine Übersicht darüber findet sich bei Parekh & Penner, 1997). Eine viel diskutierte Möglichkeit ist das Vorhandensein eines sogenannten Calcium influx factors (CIF). Aus T-Lymphozyten konnte eine niedermolekulare Substanz isoliert werden, die aus entleerten Speichern freigesetzt wurde und in verschiedenen nicht-erregbaren Zellen einen Ca^{2+} -Einstrom auslöste (Randriamampita & Tsien, 1993). Eine andere Hypothese besagt, daß durch die Speicherentleerung die Stickstoffmonoxid-Synthase aktiviert wird. Diese wiederum stimuliert das Enzym Guanylatzyklase und der cGMP-Spiegel in der Zelle steigt. Durch cGMP wird eine Proteinkinase aktiviert, die den Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen aktiviert (Bischof et al., 1995).

Andere Modellvorstellungen gehen davon aus, daß G-Proteine, Tyrosin-Kinasen, Protein-Kinasen oder eine Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase in die Signalübertragung zwischen Speicher und Plasmamembran involviert sind (Vostal et al., 1991, Somasundaram et al., 1995). Keine dieser Theorien ist jedoch bisher bewiesen.

Für das Modell der indirekten Kopplung spricht eine relativ langsame Aktivierung des Speicher-gesteuerten Ca^{2+} -Einstroms, die einen dazwischenliegenden biochemischen Schritt sehr wahrscheinlich macht, sowie die Tatsache, daß in Versuchen mit *Xenopus* Oocyten in excised patches, d.h. in Patch-Clamp-Ableitungen mit isolierten Membranabschnitten, der

gemessene Ca^{2+} -Strom sofort verlorengelht und erst durch Insertion des Membranflecks in die Zelle wieder meßbar wird (Parekh et al., 1993).

Auch für den hier vorgestellten Kationeneinstrom in die Kolonepithelzellen ist die Frage der Signalübertragung zwischen Ca^{2+} -Speicher und Plasmamembran völlig ungeklärt.

6. Modell zur Ca^{2+} -Homöostase am Kolonepithel

Eine Modellvorstellung zur Ca^{2+} -Homöostase am Kolonepithel zeigt Abb. 42. Eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher führt zur Aktivierung eines Ca^{2+} - bzw. Kationeneinstromes von außen in die Zellen. Dieser Einstrom kann im Experiment gehemmt werden durch verschiedene Blocker nichtselektiver Kationenkanäle.

Das einströmende Ca^{2+} dient in erster Linie der Wiederauffüllung der intrazellulären Speicher. Wichtige Organellen der Zellen, welche den kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom regulieren, sind die Mitochondrien (Hoth et al., 1997). Die Mitochondrien fungieren als Puffer für Ca^{2+} . Sie können große Mengen an Ca^{2+} aufnehmen und so exzessive Ca^{2+} -Anstiege in der Zelle verhindern, da diese durchaus schädlich für die Zelle sein können und u.U. sogar Apoptose, also den programmierten Zelltod, auslösen. Es konnte gezeigt werden, daß Mitochondrien oft nahe an den Orten lokalisiert sind, wo Ca^{2+} abgegeben wird; also nahe dem endoplasmatischen Retikulum oder nahe an den Speicher-gesteuerten Ca^{2+} -Kanälen (Rizzuto et al., 1993). Dadurch, daß die Mitochondrien nahe an den Speicher-gesteuerten Ca^{2+} -Kanälen liegen, können sie einströmendes Ca^{2+} abpuffern und so auch die Inaktivierung der Kanäle durch zu hohe Ca^{2+} -Konzentrationen verhindern (Hoth et al., 1997). Das von den Mitochondrien aufgenommene Ca^{2+} können diese später bei Bedarf wieder abgeben. Damit sind die Mitochondrien ganz wesentlich an der Ca^{2+} -Homöostase der Zellen beteiligt.

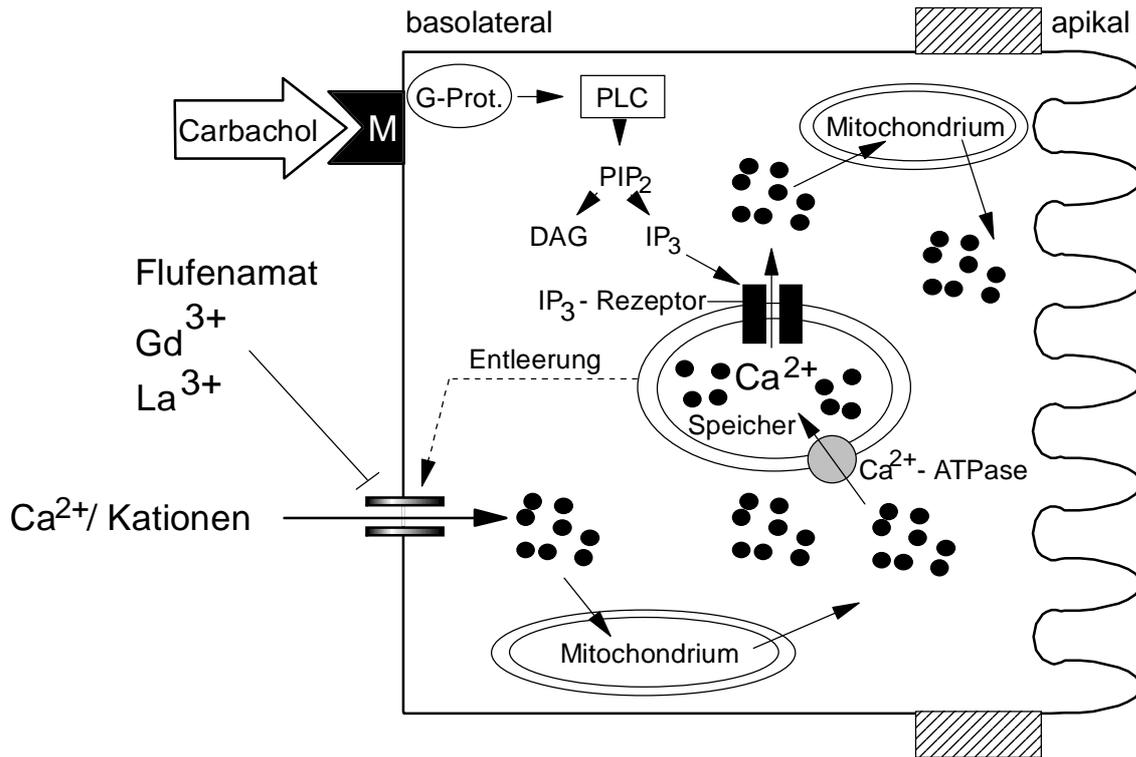


Abb. 42: Modell zur Ca²⁺-Homöostase der Kolonepithelzellen. Legende siehe Abb. 3.

7. Pathophysiologie

Der kapazitative Ca²⁺-Einstrom ist an vielen nicht-erregbaren Geweben nachgewiesen worden. Dabei ist für einige Gewebe bekannt, daß dieser Einstrom nicht nur physiologischerweise aktiviert wird, sondern auch bei pathophysiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle spielt. An humanen T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, daß der kapazitative Ca²⁺-Einstrom wichtig ist für die Ca²⁺-abhängige biochemische Kaskade, die letztendlich zur Proliferation der T-Zellen und zur Entwicklung der Immunkompetenz dieser Zellen führt (Partiseti et al., 1994). Bei Patienten, die an einer primären Immundefizienz leiden, ist der kapazitative Ca²⁺-Einstrom in die Lymphozyten nicht vorhanden und dieser Defekt geht mit einem Fehlen der T-Zell-Proliferation einher (Partiseti et al., 1994).

Bei Patienten, die an Diabetes mellitus leiden, führt die Hyperglykämie unter anderem dazu, daß die Autoregulation der Gefäße durch die glatten Muskelzellen nicht mehr funktioniert. An kultivierten glatten Muskelzellen aus der Aorta der Ratte konnte gezeigt werden, daß hohe

Glucosespiegel im Nährmedium die Kinetik der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern verändern und den kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom drastisch reduzieren (Rivera et al., 1995).

Am Darmepithel sind verschiedene pathologische Zustände beschrieben, bei denen es über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer verstärkten Chloridsekretion und damit zum klinischen Erscheinungsbild einer Diarrhoe kommt.

So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, daß bei Personen, die in psychologische Streßsituationen gebracht werden, Durchfälle auftreten und daß dieser Effekt cholinerg vermittelt ist. Die Gabe von Atropin, einem Muskarin-Rezeptor-Antagonisten, führte dazu, daß das klinische Bild des Durchfalls verschwand (Barclay & Turnberg, 1987).

Die Infektion mit dem Bakterium *Vibrio parahaemolyticus*, einem der wichtigsten Verursacher von Lebensmittelvergiftungen, erzeugt ebenfalls eine Diarrhoe. Diese wird verursacht durch ein bakterielles Enterotoxin, das thermostabile Hämolysin. Das Toxin bindet an spezifische Rezeptoren der Enterozyten und führt darüber zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was dann über den schon bekannten Mechanismus der Chloridsekretion das Auftreten von Durchfällen zur Folge hat (Raimondi et al., 1995).

Auch für Rotaviren, die Erreger von viralen Gastroenteritiden bei Jungtieren und Kindern, ist beschrieben, daß diese ein Enterotoxin produzieren, welches über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Steigerung der intestinalen Sekretion führt (Ball et al., 1996).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, daß am Kolonepithel der Ratte ein nichtselektiver, Speicher-gesteuerter Kationenkanal an der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beteiligt ist. Wenn es gelingt, mehr über die molekularen und pharmakologischen Eigenschaften dieses Kanals herauszufinden, bieten diese Erkenntnisse möglicherweise die Basis für neue Ansätze in der Therapie von sekretorischen Durchfällen, die Ca^{2+} -vermittelt sind.

V. Zusammenfassung

An isolierten Krypten aus dem distalen Kolon der Ratte konnte eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit nachgewiesen werden. In Whole-Cell Patch-Clamp-Experimenten wurde diese Leitfähigkeit durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferkapazität ($11\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA / $1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca^{2+} in der Pipettenlösung) aktiviert und war durch Blocker von nichtselektiven Kationenkanälen, wie etwa Lanthan und Gadolinium, hemmbar.

Kationensubstitutionsexperimente ergaben, daß die Leitfähigkeit für Na^+ 6-fach besser permeabel ist als für Ca^{2+} . Im Gegensatz zu Na^+ wirkten extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen von $> 1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ über einen negativen Feedback inhibierend.

Auch die Stimulation muskarinergere Rezeptoren durch Carbachol führte zu einer Aktivierung der nichtselektiven Kationenleitfähigkeit. Perfusion der Zellen mit dem cholinergen Agonisten führte bei den isolierten Krypten zu einer transienten Hyperpolarisation mit Zunahme des Auswärtsstromes. Enthielt die Perfusionslösung gleichzeitig La^{3+} , so verkürzte sich die Dauer dieser Effekte um etwa 50%.

FURA-2-Experimente bestätigten, daß La^{3+} den Carbachol-induzierten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hemmt.

In Ussingkammer-Versuchen konnte gezeigt werden, daß die nichtselektive Kationenleitfähigkeit auch am intakten Epithel eine Rolle spielt. Hier unterdrückte Lanthan die zweite Phase der durch Carbachol induzierten Chloridsekretion, welche auf einem Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Zellen beruht, vollständig.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß am Kolonepithel der Ratte eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit vorhanden ist, welche durch Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher aktiviert wird. Sie ist daher der Gruppe der Speicher-gesteuerten Kanäle zuzuordnen. Offensichtlich ist diese Leitfähigkeit an der Regulation des Elektrolyttransportes durch Agonisten des Ca^{2+} -Signalweges beteiligt.

VI. Summary

Capacitative Ca^{2+} entry in isolated rat colonic crypts was induced by dialysing the cells with a pipette solution containing a high Ca^{2+} -buffering capacity in the whole-cell patch-clamp mode. Under these conditions the crypt cells showed lower resting potentials compared to normal conditions. Flufenamate, La^{3+} and Gd^{3+} , known blockers of non-selective cation channels, induced a hyperpolarization and a decrease in membrane current of the crypt cells. This current exhibited a cation selectivity of $\text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+}$. In contrast to Na^+ Ca^{2+} exhibited an inhibitory effect at concentrations $> 1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Indirect evidence suggests that the non-selective cation conductance is activated after stimulation of muscarinic receptors. Carbachol, a cholinergic agonist, evoked a transient hyperpolarization and an increase in membrane outward current. The half-time of the decay of the carbachol response was strongly shortened in the presence of La^{3+} .

FURA-2 experiments with isolated crypts confirmed, that La^{3+} inhibited the carbachol-induced increase in intracellular Ca^{2+} . In parallel Ussing chamber experiments La^{3+} suppressed the induction of Cl^- secretion by carbachol.

These results demonstrate that a non-selective cation conductance activated by store depletion may be involved in the regulation of electrolyte transport by agonists of the Ca^{2+} signaling pathway.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- BALL, J.M., TIAN, P., ZENG, C.Q., MORRIS, A.P., ESTES, M.K. (1996)
Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein.
Science 272, 101-104
- BARCLAY, G.R., TURNBERG, L.A. (1987)
Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum.
Gastroenterology 93, 91-97
- BINDER, H.J., SANDLE, G. (1994)
Electrolyte transport in the mammalian colon
in: *Physiology of the gastrointestinal tract*. JOHNSON, L.R. (Hrsg.),
2133-2171; Raven Press, New York
- BISCHOF, G., BRENNAN, J., BREDT, D.S., MACHEN, T.E. (1995)
Possible regulation of capacitative Ca^{2+} entry into colonic epithelial cells by NO and cGMP.
Cell Calcium 17, 250-262
- BLEICH, M., RIEDEMANN, N., WARTH, R., KERSTAN, D., LEIPZIGER, J., HÖR, M.,
Van DRIESSCHE, W., GREGER, R. (1996)
 Ca^{2+} regulated K^{+} and nonselective cation channels in the basolateral membrane of rat
colonic crypt base cells.
Pflügers Arch. 432, 1011-1022
- BÖHME, M., DIENER, M., RUMMEL, W. (1991)
Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts
Pflügers Arch. 419, 144-151
- CALDWELL, R.A., CLEMO, H.F., BAUMGARTEN, C.M. (1998)
Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations
Am. J. Physiol. 275, C619-621
- COLQUHOUN, D., SIGWORTH, F. J. (1983)
Fitting and statistical analysis of single-channel records.
in: *Single-Channel Recording*. SAKMANN, B. und NEHER, E. (Hrsg.),
191-263; Plenum Press, New York.
- DAVIS, M.J., SHARMA, N.R. (1997)
Calcium-release-activated calcium influx in endothelium.
J. Vascular Research 34, 186-195
- DE SMET, P., LI, J.Q., VAN DRIESSCHE, W. (1998)
Hypotonicity activates a lanthanide-sensitive pathway for K^{+} release in A6 epithelia.
Am. J. Physiol. 275, C189-C199

- DIENER, M., RUMMEL, W., MESTRES, P., LINDEMANN, B. (1989)
Single chloride channels in colon mucosa and isolated colonic enterocytes of the rat.
J. Membr. Biol. 108, 21-30
- DIENER, M., EGLEME, C., RUMMEL, W. (1991)
Phospholipase C-induced anion secretion and its interaction with carbachol in the rat
colonic mucosa.
Eur. J. Pharmacol. 200, 267-276
- DIENER, M., SCHARRER, E. (1995)
Swelling-activated conductances for chloride, potassium and amino acids in the rat
colon: A whole-cell study.
Exp. Physiol. 80, 411-428
- DOUGLAS, W.W. (1974)
Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis-vesiculation sequence.
Biochem. Soc. Symp. 39, 1-28
- FISCHER, H., ILLEK, B., NEGULESCU, P.A., CLAUSS, W., MACHEN, T.E. (1992)
Carbachol-activated calcium entry into HT-29 cells is regulated by both membrane
potential and cell volume.
Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 1438-1442
- FISCHER, K.G., LEIPZIGER, J., RUBINI-ILLES, P., NITSCHKE, R., GREGER, R. (1996)
Attenuation of stimulated Ca^{2+} influx in colonic epithelial (HT₂₉) cells by cAMP.
Pflügers Arch. 432, 735-740
- FUCHS, W., LARSEN, E.H., LINDEMANN, B. (1977)
Current-voltage curve of sodium channels and concentration dependence of sodium
permeability in frog skin.
J. Physiol. (London) 267, 137-166
- GREGER, R., BLEICH, M., LEIPZIGER, J., ECKE, D., MALL, M., KUNZELMANN, K.
(1997)
Regulation of ion transport in colonic crypts.
NIPS 12, 62-66
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., TSIEN, R.Y. (1985)
A new generation of Ca^{2+} -indicators with improved fluorescence properties.
J. Biol. Chem. 260, 3440-3450
- HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., SIGWORTH, F.J. (1981)
Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and
cell-free membrane patches.
Pflügers Arch. 391, 85-100

HANDROCK, R., HERZIG, S. (1998)

Amlodipin
DMW 1/2, 19

HEILBRUNN, L.V. (1958)

Grundzüge der allgemeinen Physiologie (3.Aufl.)
Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin

HOLDA, J.R., KLISHIN, A., SEDOVA, M., HÜSER, J., BLATTER, L. (1998)

Capacitative Calcium Entry.
NIPS 13, 157-163

HOTH, M., PENNER, R. (1992)

Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells.
Nature 355, 353-355

HOTH, M., PENNER, R. (1993)

Calcium release-activated calcium current in rat mast cells.
J. Physiol. 465, 359-386

HOTH, M., FANGER, C.M., LEWIS, R.S. (1997)

Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T-lymphocytes.
J. Cell. Biol. 137, 633-648

HILLE, B. (1992)

Ionic channels of excitable membranes (2. Aufl.)
Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

IRVINE, R.F. (1990)

'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates - a possible mechanism.
FEBS 263, 5-9

KERST, G., FISCHER, K.-G., NORMANN, C., KRAMER, A., LEIPZIGER, J., GREGER, R. (1995)

Ca²⁺ influx induced by store release and cytosolic Ca²⁺ chelation in HT29 colonic carcinoma cells
Pflügers Arch. 430, 653-665

KÖCKERLING, A., FROMM, M. (1993)

Origin of cAMP-dependent Cl⁻ secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine.
Am. J. Physiol. C1295-C1301

LIEBICH, H.G. (1990)

Funktionelle Histologie
Schattauer Verlag Stuttgart - New York

- LINDSTRÖM, C.G., ROSENGREN, J.E., FORK, F.T. (1979)
Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation.
Acta Radiologica Diagnosis Stockholm 20, 523-536
- LINDQVIST, S.M., SHARP, P., JOHNSON, I.T., SATOH, Y., WILLIAMS, M.R. (1998)
Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis.
Gastroenterology 115, 1131-1143
- LIPKIN, M. (1985)
Growth and development of gastrointestinal cells.
Ann. Rev. Physiol. 47, 175-197
- LÜCKHOFF, A., CLAPHAM, E. (1992)
Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca^{2+} -permeable channel.
Nature 355, 356-358
- MALL, M., BLEICH, M., SCHÜRLEIN, M, KÜHR, J., SEYDEWITZ, H.H., BRANDIS, M.,
GREGER, R., KUNZELMANN, K (1998)
Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP.
Am. J. Physiol. 275, G1274-G1281
- McCARTY, N.A., McDONOUGH, S., COHEN, B.N., RIORDAN, J.R., DAVIDSON, N.,
LESTER, H.A. (1993)
Voltage-dependent block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
 Cl^- channel by two closely related arylaminobenzoates.
J. Gen. Physiol. 102, 1-23
- McROBERTS, J.A., BEUERLEIN, G., DHARMSATHAPHORN, K. (1985)
Cyclic AMP and Ca^{2+} -activated K^+ Transport in a human colonic epithelial cell line.
J. Biol. Chem. 260, 14163-14172
- MOLECULAR PROBES INC.
Produktinformation
- NUMBERGER, M., DRAGUHN, A. (1996)
Patch-Clamp-Technik
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford
- PAREKH, A.B., TERLAU, H., STÜHMER, W. (1993)
Depletion of InsP_3 stores activates a Ca^{2+} and K^+ current by means of a phosphatase
and a diffusible messenger.
Nature 364, 814-818
- PAREKH, A.B., PENNER, R. (1997)
Store Depletion and Calcium Influx
Physiological Reviews 77, 901-930

- PARSON, D.S., PATERSON, C.R. (1965)
Fluid and solute transport across rat colonic mucosa.
Quarterly Journal of Experimental Physiology 50, 220-231
- PARTISETI, M., LE DEIST, F., HIVROZ, C., FISCHER, A., KORN, A., CHOQUET, D. (1994)
The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency.
J. Biol. Chem. 269, 32327-32335
- PHILIPP, S., CAVALIE, A., FREICHEL, M., WISSENBACH, U., ZIMMER, S., TROST, C., MARQUART, A., MURAKAMI, M., FLOCKERZI, V. (1996)
A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL.
EMBO J. 15, 6166-6171
- PHILIPP, S., HAMBRECHT, J., BRASLAVSKI, L., SCHROTH, G., FREICHEL, M., MURAKAMI, M., CAVALIE, A., FLOCKERZI, V. (1998)
A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells.
EMBO J. 17, 4274-4282
- PUTNEY, J.W. (1997)
Capacitative Calcium Entry.
Springer-Verlag, Heidelberg
- RAIMONDI, F., KAO, J.P., KAPER, J.B., GUANDALINI, S., FASANO, A. (1995)
Calcium-dependent intestinal chloride secretion by vibrio parahaemolyticus thermostable direct hemolysin in a rabbit model.
Gastroenterology 109, 381-386
- RANDRIAMAMPITA, C., TSIEN, R.Y. (1993)
Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx.
Nature 364, 809-814
- RASMUSSEN, H. (1970)
Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate.
Science 170, 404-412
- RINGER, S. (1883)
A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart
J. Physiol. (Lond.) 4, 29-42
- RIVERA, A.A., WHITE, C.R., GUEST, L.L., ELTON, T.S., MARCHASE, R.B. (1995)
Hyperglycemia alters cytoplasmic Ca²⁺ responses to capacitative Ca²⁺ influx in rat aortic smooth muscle cells.
Am. J. Physiol. 269, C1482-C1488

- RIZZUTO, R., BRINI, M., MURGIA, M., POZZAN, T. (1993)
Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighbouring mitochondria.
Science 262, 744-747
- SCHULTHEIß, G., DIENER, M. (1997)
Regulation of apical and basolateral K^+ conductances in the rat colon.
Brit. J. Pharmacol. 122, 87-94
- SCHUMANN, S., GREGER, R., LEIPZIGER, J. (1994)
Flufenamate and Gd^{3+} inhibit stimulated Ca^{2+} influx in the epithelial cell line CFPAC-1
Pflügers Arch. 428, 583-589
- SINGH, S.K., BINDER, H.J., BORON, W.F., GEIBEL, J.P. (1995)
Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts.
J. Clin. Invest. 96, 2373-2379
- SOBOTTA, J., BECHER, H. (1972)
Verdauungsapparat
In: Atlas der Anatomie des Menschen
Hrsg.: Ferner H., Staubesand J.; 17. Auflage
Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien
Band 2, 61-143
- SOMASUNDARAM, B., NORMAN, J.C., MAHAUT-SMITH, M.P. (1995)
Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes.
Biochem. J. 309, 725-729
- STRABEL, D., DIENER, M. (1995)
Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon
Eur. J. Pharmacol. 274, 181-191
- SUPATTAPONE, S., WORLEY, P.F., BARABANT, J.M., SNYDER, S.H. (1988)
Solubilization, purification and characterization of an inositol trisphosphate receptor.
J. Biol. Chem. 263, 1530-1534
- TAYLOR, C.W., BROAD, L.M. (1998)
Pharmacological analysis of intracellular Ca^{2+} signaling: problems and pitfalls.
TIPS 19, 370-375
- TURNHEIM, K., THOMPSON, S.M., SCHULTZ, S.G. (1983)
Relation between intracellular sodium and active sodium transport in rabbit colon: Current-voltage relations of the apical sodium entry mechanism in the presence of varying luminal sodium concentrations.
J. Membr. Biol. 76, 299-309

- USSING, H.H., ZERAHN, K. (1951)
Active transport of sodium as the source of electric current in the short circuit isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 23, 110-127
- VOSTAL, J.G., JACKSON, W.L., SHULMAN, N.R. (1991)
Cytosolic and stored calcium antagonistically control tyrosine phosphorylation of specific platelet proteins.
J. Biol. Chem. 266, 16911-16916
- WARTH, R., RIEDEMANN, N., BLEICH, M., VAN DRIESSCHE, W., BUSCH, A.E., GREGER, R. (1996)
The cAMP-regulated and 293B-inhibited K⁺ conductance of rat colonic crypt base cells.
Pflügers Arch. 432, 81-88
- WEISER, T., WIENRICH, M. (1996)
Investigations on the mechanism of action of the antiproliferant and ion channel antagonist flufenamic acid.
Arch. Pharmacol. 353, 452-460
- WELSH, M.J., SMITH, P.L., FROMM, M., FRIZZELL, R.A. (1982)
Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion
Science 218, 1219-1221
- ZHU, X., BIRNBAUMER, L. (1998)
Calcium channels formed by mammalian TRP homologues.
NIPS 13, 211-217
- ZWEIFACH, A., LEWIS, R.S. (1995a)
Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I_{crac}) due to local calcium feedback.
J. Gen. Physiol. 105, 209-226
- ZWEIFACH, A., LEWIS, R.S. (1995b)
Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current.
J. Biol. Chem. 270, 14445-14451

Mein herzlicher Dank gilt:

an erster Stelle Herrn **Prof. Dr. M. Diener** für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und die prompte Bearbeitung von Fragen und Problemen, die im Verlauf dieser Arbeit aufgekommen sind,

Herrn **Dr. G. Schultheiß**, der mich in allen Phasen der Entstehung der Doktorarbeit hervorragend unterstützt hat und immer für alles eine Lösung hatte,

Prof. Dr. W. Clauss dafür, daß ich in seinem Labor die FURA-Experimente durchführen konnte und den **Mitarbeitern** seiner Arbeitsgruppe für die freundliche Einführung in die Meßtechnik,

Guido Haschke, der die Probleme mit Computer und Technik immer im Handumdrehen lösen konnte,

Brigitta Brück, Eva-Maria Haas, Doreen Marks, Alice Metternich, Jolanta Murgott und **Bärbel Schmidt** für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente,

Michael Haas und **Silke Handstein** für die gute Pflege und Versorgung der Versuchstiere,

den **Mitarbeitern** und **Mitarbeiterinnen** des Institutes für Veterinärphysiologie für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre, die dazu beigetragen hat, daß ich die Zeit am Institut immer in guter Erinnerung behalten werde,

meinen Eltern, die mich während Studium und Doktorarbeit immer bedingungslos unterstützt haben,

und last but not least **Martin**, der geduldig alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre mit mir durchlebt hat.