# IMMUNHISTOCHEMISCHE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER $IP_3$-REZEPTORSUBTYPEN IM KOLONEPITHEL DER RATTE

ANNE SIEFJEDIERS

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

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

1. Auflage 2006

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

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg
Printed in Germany

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**
édition scientifique

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

**www.doktorverlag.de**

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

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

# Immunhistochemische und funktionelle Charakterisierung der IP3-Rezeptorsubtypen im Kolonepithel der Ratte

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

eingereicht von

**Anne Siefjediers**

Tierärztin aus Oldenburg

Gießen 200

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. M. Diener

Prof. Dr. G. Scheiner-Bobis

Tag der Disputation: 26.01.2006

# Inhaltsverzeichnis

**Inhaltsverzeichnis** I
**Abkürzungen** 1
**I. Einleitung** 3
1 Das Kolon - Aufbau und Funktion 3
2 Transportprozesse am Kolon 5
3 $Ca^{2+}$ als intrazellulärer Botenstoff 9
4 $IP_3$-Rezeptoren 14
5 Eigene Fragestellung 17
**II. Material und Methoden** 19
1 Versuchstiere 19
2 Lösungen 19
2.1. Lösungen für die Fluoreszenzmarkierungen 19
2.1.1 Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung 19
2.1.2 Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung 19
2.1.3 Phosphatpuffer (= PB) 20
2.1.4 Blocking-Lösung 20
2.1.5 Primärantikörper-Lösung 20
2.1.6 Sekundärantikörper-Lösung 20
2.1.7 DAPI-Lösung 20
2.2. Lösungen für die Immunogoldmarkierungen 21
2.2.1 Cacodylatpuffer 21
2.2.2 Fixationslösung 21
2.2.3 Lowicryl HM20 21
2.2.4 $PB_{EM}$ 21
2.2.5 Ätzlösung 22
2.2.6 Glycin-Puffer 22
2.2.7 Blocking-Lösung 22
2.2.8 BSA-Lösung 22
2.2.9 Primärantikörper-Lösung 22
2.2.10 Kontrastierungslösung 22
2.3. Lösungen für die Kryptenisolation 22
2.3.1 Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung 22
2.3.2 Isolationslösung 23
2.3.3 Auffang-Tyrode 23
2.4. Lösungen für die Imaging-Messungen 23
2.4.1 Fura-2-Stammlösung 23
2.4.2 Fura-2 AM-Stammlösung 23
2.4.3 Pluronic® F-127-Stammlösung 23
2.4.4 Mag-Fura-2 AM-Stammlösung 23
2.4.5 NaCl-Tyrode 24
2.4.6 Intrazellular-ähnliche Lösung (ICL) 24
2.5. Lösungen für die Kernisolation 24
2.5.1 Low-saline-buffer 24
2.5.2 Intrazellular-ähnliche Lösung mit ATP 24
2.5.3 Propidiumjodid 24
3 Chemikalien 25

4 Präparation der Darmschleimhaut 26
5 Immunhistochemische Analyse des Darmpräparates 26
5.1. Grundlage der Immunhistochemie 26
5.2. Verwendete Antikörper 28
5.3. Fluoreszenz-Kernfarbstoff 30
5.4. Fluoreszenzmarkierungen 30
5.4.1 Kryofixierung 30
5.4.2 Herstellung der Gewebeschnitte 31
5.4.3 Versuchsdurchführung / Färbeprotokolle 31
5.4.3.1 Einfachmarkierung 31
5.4.3.2 Doppelmarkierung 32
5.4.4 Mikroskopie 33
5.5. Immuno-Gold-Reaktion 34
5.5.1 Messeranfertigung 34
5.5.2 Gridbefilmung 34
5.5.3 Gewebefixation 35
5.5.4 Gewebeeinbettung 35
5.5.5 Schneiden 36
5.5.6 Färbeprotokoll 36
5.5.7 Elektronenmikroskopie 37
6 Imaging-Messungen 37
6.1. Kryptenpräparation 37
6.2. Kernisolation 38
6.3. $Ca^{2+}$-Messung mittels $Ca^{2+}$-sensitiver Farbstoffe 39
6.3.1 Allgemeines 39
6.3.2 Fura-2 41
6.3.3 Mag-Fura-2 43
6.4. Messstand 44
6.5. Messkammer und Perfusionssystem 46
6.6. Versuchsdurchführung 46
6.6.1 Messungen an isolierten Krypten 46
6.6.2 Messungen an isolierten Zellkernen 47
6.6.3 Stimulanzien 48
6.6.3.1 ATP 48
6.6.3.2 $IP_3$ 48
6.6.3.3 Adenophostin A 49
6.6.4 Blocker 49
6.6.4.1 Heparin 49
6.6.4.2 2-APB 50
6.7. Datenerfassung 50
6.8. Statistik 51
**III. Ergebnisse 52**
1 Immunhistochemische Untersuchung der Lokalisation der $IP_3$-Rezeptorsubtypen im Kolonepithel 52
1.1. Lokalisation des $IP_3R1$ im Kolonepithel 52
1.2. Immunhistochemischer Nachweis des $IP_3R2$ im Kolonepithel 54
1.3. Lokalisation des $IP_3R3$ im Kolonepithel 61

2 Funktionelle Auswirkungen des $IP_3R3$-Gradienten entlang der Kryptenachse 63
2.1. Rezeptorvermittelte Stimulation des $IP_3$-Signalweges 63
2.2. Direkte Stimulation der $IP_3$-Rezeptoren 65
3 Funktioneller Nachweis des $IP_3$-Rezeptors im Epithelzellkern 72
**IV. Diskussion 76**
1 Die $IP_3$-Rezeptorsubtypen 77
1.1. Typ 1 $IP_3$-Rezeptor 77
1.2. Typ 2 $IP_3$-Rezeptor 78
1.3. Typ 3 $IP_3$-Rezeptor 79
2 Funktionelle Charakterisierung der $IP_3$-Rezeptoren im Kolonepithel 80
2.1. Isolierte Epithelzellkerne antworten auf $IP_3$-Stimuli 80
2.2. Der $IP_3R2$ muss in den zytosolischen $Ca^{2+}$-Signalwegen involviert sein 83
2.3. Bedeutung des $IP_3R3$-Gradienten entlang der Kryptenachse 86
**V. Zusammenfassung 90**
**VI. Summary 92**
**VII. Literaturverzeichnis 94**
**Danksagung 105**
**Erklärung 106**

**Abkürzungen**

| | |
|---|---|
| 2-APB | 2-Aminoethoxy-diphenylborat |
| AG | Antigen |
| AM | Acetoxymethylester |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz |
| BAPTA | 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N‘,N‘-tetraessigsäure |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| cADPR | zyklische (cyclic)-Adenosindiphosphat-Ribose |
| CaMK II | Calcium / Calmodulin-Kinase II |
| cAMP | zyklisches (cyclic)-3`5`-Adenosin-Monophosphat |
| CCD-Kamera | charge coupled device Kamera |
| CFTR | cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| DAG | Diacylglycerin |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (= desoxyribonucleic acid) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-bis-(ß-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| $F_{ab}$ | antigen-bindendes Fragment |
| $F_c$ | kristallisierbares Fragment |
| G-Protein | Guaninnucleotid-bindendes Protein |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| ICL | Intrazellular-ähnliche (= intracellular-like) Lösung |
| IgG | Immunglobulin G (= Antikörper) |
| $IP_3$ | Inositol-1,4,5-trisphosphat |
| $IP_3R$ | Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptor |
| $K_d$ | Dissoziationskonstante |
| NAADP | Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NGS | Normales Ziegenserum (= normal goat serum) |
| PB | Phosphatpuffer |

| | |
|---|---|
| $PIP_2$ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PLT | progressive lowering of temperature |
| PMCA | Plasmamembran $Ca^{2+}$-ATPase |
| ROI | Messfeld bei Imaging-Experimenten (= region of interest) |
| RyR | Ryanodinrezeptor |
| SERCA | Sarkoplasmatische-Endoplasmatische Retikulum $Ca^{2+}$-ATPase |
| SOCC | speichergesteuerte $Ca^{2+}$-Kanäle (= store operated $Ca^{2+}$ channels) |
| TEM | Transmisssions-Elektronenmikroskop |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| UV-Licht | Ultraviolett-Licht |
| VOCC | spannungsabhängige $Ca^{2+}$-Kanäle (= voltage-operated $Ca^{2+}$ channels) |
| v/v | Volumenanteil (= volume per volume) |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

# I. Einleitung

## 1 Das Kolon - Aufbau und Funktion

Bei Säugetieren bildet das Kolon das Ende des Verdauungstraktes und stellt somit die letzte Möglichkeit dar, die Zusammensetzung der Faeces zu verändern. Die Verdauung des Nahrungsbreies ist im Kolon weitestgehend abgeschlossen, es findet lediglich eine bakterielle Spaltung von Kohlenhydraten statt. Neben dem Weitertransport der Ingesta erfolgt eine Resorption und Sekretion von Elektrolyten und Wasser, wodurch das Kolon an der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes beteiligt ist. Die Kolonoberfläche bildet eine Barriere zwischen der Außenwelt und dem Körperinneren und schützt den Körper so vor dem Eindringen von Erregern.

Die Wand des Kolons entspricht einem häutig-muskulären Schlauch, der aus vier Schichten aufgebaut ist (siehe Abbildung I.1).

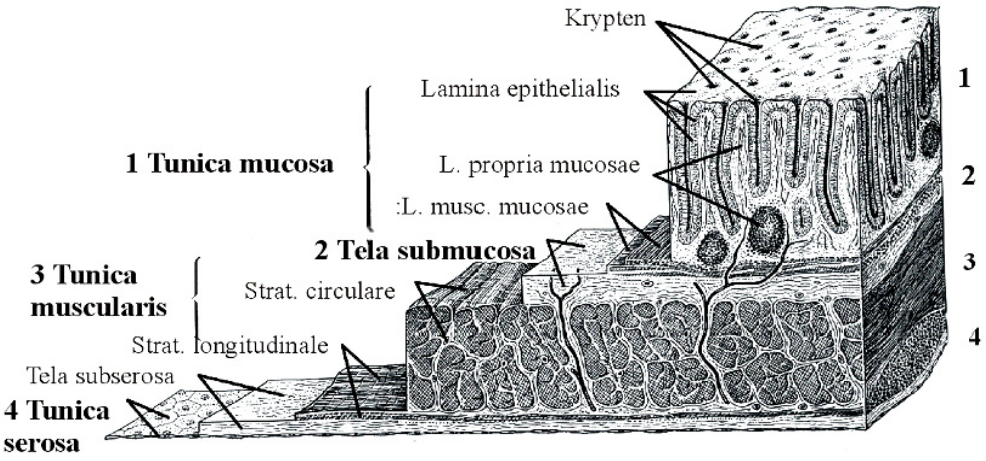



**Abbildung I.1:** Schematische Darstellung der Kolonwand (Sobotta and Becher 1972).

Die Tunica mucosa besteht aus der Lamina epithelialis, welche Vertiefungen, die so genannten Krypten, aufweist. Die Krypten sind von dem Bindegewebe der Lamina propria mucosae umgeben. Darunter folgt die Lamina muscularis mucosae mit ihren glatten Muskelzellen.

Das Kryptenepithel ist aus unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzt. Die Enterozyten bilden den größten Teil der Zellpopulation, sie resorbieren und sezernieren Elektrolyte und Wasser. An ihrer apikalen Membran tragen sie Mikrovilli (in Abbildung I.2 gelb dargestellt), die besonders im Oberflächenepithel ausgeprägt sind. Ihr Zellkern liegt im basalen Drittel der Zelle. Becherzellen (in Abbildung I.2 bläulich dargestellt) finden sich hauptsächlich im Kryptenepithel. Sie produzieren Schleim, der die Mucosa schützen und zu einem besseren Ingestatransport führen soll. Die Gruppe der enteroendokrinen Zellen ist sehr heterogen und produziert verschiedene Hormone wie z.B. Somatostatin, Vasoaktives Intestinales Peptid (= VIP) und Serotonin (Specht 1977). Dieser Zelltyp weist basal Granula auf.

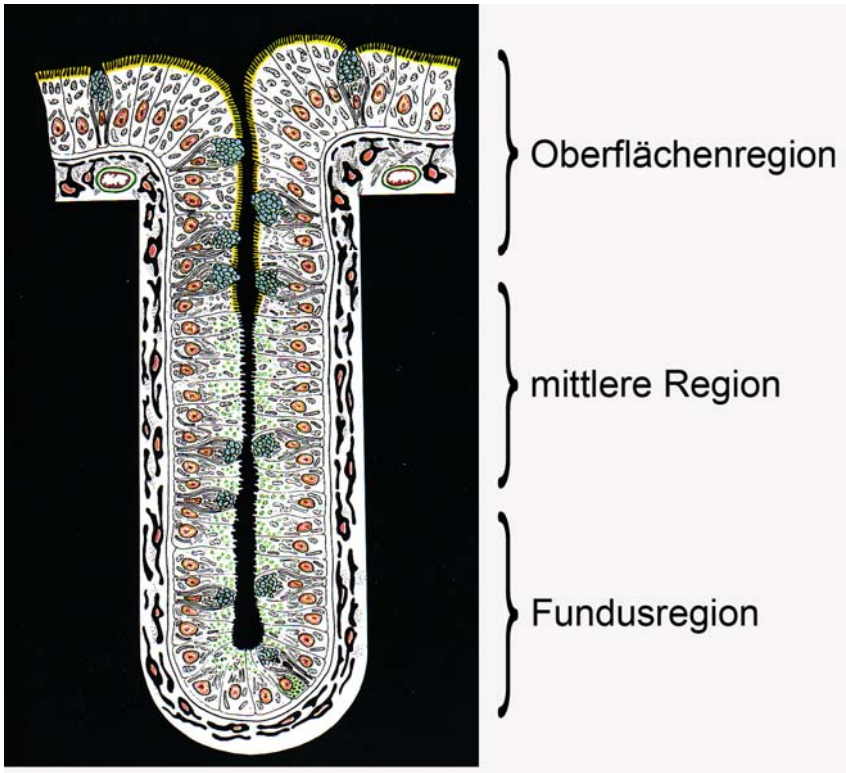



**Abbildung I.2:** Schematischer Längsschnitt durch eine Krypte (Specht 1977).

Im Kryptenfundus liegen Stammzellen, die dort proliferieren. Die entstehenden Tochterzellen wandern entlang der Kryptenachse zum Oberflächenepithel und differenzieren zu reifen Zellen. An der Oberfläche lockert sich die Verbindung

zwischen Zelle und Basallamina und die Zellen schilfern in das Darmlumen ab (Lipkin 1985; Potten et al. 1997).

Durch die Differenzierung der Enterozyten während ihrer Wanderung zum Oberflächenepithel verändern sich auch ihre Eigenschaften hinsichtlich des Elektrolyttransportes. Über einen langen Zeitraum wurde das Modell einer strengen funktionellen Heterogenität entlang der Kryptenachse vertreten. Man war der Meinung, dass im Oberflächenepithel die Elektrolytresorption stattfindet und das Kryptenepithel Elektrolyte sezerniert (Welsh et al. 1982). Das Modell wurde verworfen, als Evidenzen für eine Sekretion im Oberflächenepithel (Köckerling and Fromm 1993) und für Resorptionsprozesse im Kryptenepithel (Singh et al. 1995) entdeckt wurden. Heute weiß man, dass die Funktionen in den Enterozyten nicht strikt getrennt sind. Im Laufe ihrer Differenzierung ändern die Zellen ihre Haupttätigkeit, so sezernieren die Enterozyten im Kryptenfundus hauptsächlich NaCl und stellen bei ihrer Wanderung an die Kolonoberfläche den Elektrolyttransport auf eine NaCl-Resorption um (Ecke et al. 1996). Die Zellen können aber jederzeit, zum Beispiel bei Stimulation durch second messenger, zwischen Sekretion und Resorption umschalten (Greger et al. 1997).

Bei einem gesunden Menschen werden täglich fast 2000 ml Flüssigkeit im Kolon resorbiert. Steigt der ileozäkale Flüssigkeitsübertritt aufgrund von Dünndarmerkrankungen, kann das Kolon seine Flüssigkeitsresorption auf bis zu sechs Liter steigern. Wird diese Resorptionskapazität des Kolons überschritten, kommt es zu einer klinisch manifesten Diarrhoe (Binder et al. 1991; Binder and Sandle 1994). Neben der ungenügenden Flüssigkeitsresorption kann auch eine erhöhte Elektrolytsekretion im Kolon zu einer Diarrhoe führen (Field and Semrad 1993).

## 2 Transportprozesse am Kolon

Die verschiedenen Ionen werden durch spezifische Mechanismen in die Zelle aufgenommen und abgegeben, wobei der Transport über Kanäle, sekundär aktive Transporter oder Pumpen stattfinden kann (siehe Abbildung I.3).

In den Enterozyten wird NaCl elektroneutral über apikale $Na^+/H^+$-Austauscher und $Cl^-/HCO_3^-$-Austauscher resorbiert. Kalium wird apikal über eine $H^+/K^+$-ATPase

aufgenommen (Binder and Sandle 1994). Weiterhin erfolgt eine $Na^+$-Resorption über epitheliale $Na^+$-Kanäle (= ENaC; Greger 2000). Das Chlorid verlässt die Zelle über basolaterale $Cl^-$-Kanäle, die sich bei Zellschwellung vermehrt öffnen (Diener et al. 1992). Das Natrium wird über eine basolaterale $Na^+/K^+$-ATPase aus der Zelle transportiert. Basolateral verlässt das Kalium die Zelle über einen small-conductance $K^+$-Kanal, der eine $K^+$-Leitfähigkeit von 16 pS besitzt. Die Enterozyten können durch physiologische Vorgänge von dieser Resorptionstätigkeit in eine Sekretionstätigkeit umprogrammiert werden (Singh et al. 1995). So führt eine Dehnung der Kolonwand ebenso zu einer $Cl^-$-Sekretion (Diener and Rummel 1990) wie die Stimulation mit z. B. dem Vasoaktiven Intestinalen Peptid, Prostaglandinen, Acetylcholin oder ATP (Binder et al. 1991; Greger 2000). Aber auch pathophysiologische Reize wie verschiedene Enterotoxine (Vibrio cholerae Toxin, hitzestabiles Escherichia Coli Toxin, Clostridium difficile Toxine) führen zu einer $Cl^-$-Sekretion (Barrett and Keely 2000).

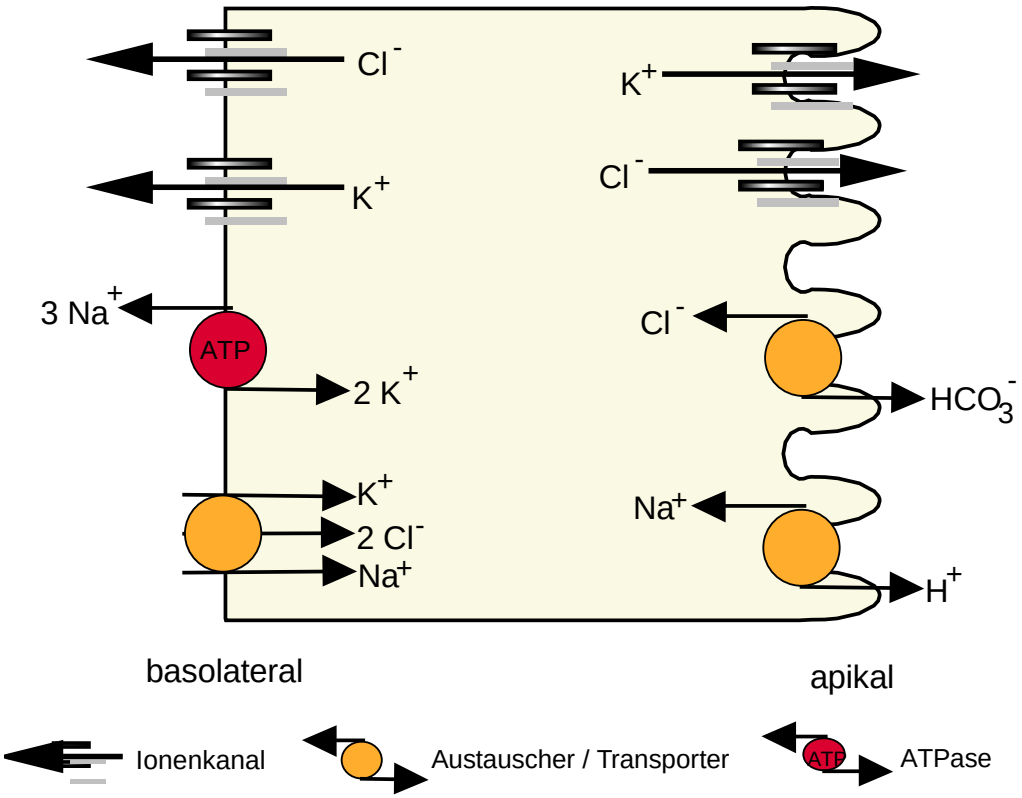



**Abbildung I.3:** Dargestellt sind wichtige Elektrolyttransportprozesse, die den Transport von Chlorid, Kalium und Natrium am Kolonepithel der Ratte vermitteln.

Die zu sezernierenden Ionen werden dem Enterozyten meist durch eine basolaterale Aufnahme bereitgestellt. So nimmt die Zelle über die basolaterale $Na^+/K^+$-ATPase Kalium auf, während Natrium aus der Zelle transportiert wird. Durch diesen Mechanismus wird gleichzeitig die Antriebskraft für einen basolateralen $Na^+/K^+/2Cl^-$-Kotransporter – eine niedrige intrazelluläre $Na^+$-Konzentration – geliefert. Dieser Transporter akkumuliert Chlorid oberhalb des elektrochemischen Gradienten in der Zelle. Außerdem stellt dieser Kotransporter dem Enterozyten Kalium zur Sekretion zur Verfügung (Schultheiss and Diener 1998).

Das aufgenommene Kalium kann über apikale $K^+$-Kanäle ins Darmlumen sezerniert werden. Dieser Vorgang wird durch einen Anstieg des intrazellulären $Ca^{2+}$-Spiegels aktiviert. Bei den apikalen $K^+$-Kanälen werden SK4-$K^+$-Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 16 pS, $K_VLQT_1$-Kanäle (< 3 pS; Bleich and Warth 2000; Greger 2000) und so genannte Maxi $K^+$-Kanäle (210-230 pS; Schultheiss and Diener 1998) unterschieden. Auch basolaterale $K^+$-Kanäle werden durch einen Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}$-Konzentration geöffnet. So führt zum Beispiel eine Stimulation von muscarinergen Rezeptoren durch Carbachol – einem stabilen Analog des Neurotransmitters Acetylcholin - zu einer Erhöhung des intrazellulären $Ca^{2+}$-Spiegels und damit zu einem $K^+$-Ausstrom (Dharmsathaphorn and Pandol 1986). Der Kanal wird durch cAMP über die Senkung des $Ca^{2+}$-Spiegels gehemmt (Warth et al. 1996). Dieser $K^+$-Ausstrom entlang seines Konzentrationsgradienten führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle (Dharmsathaphorn and Pandol 1986), welche wiederum die Antriebskraft für eine $Cl^-$-Sekretion darstellt (Böhme et al. 1991; Bleich et al. 1996; Warth et al. 1999).

Die $Cl^-$-Sekretion erfolgt über apikale $Cl^-$-Kanäle, wobei dem sezernierten $Cl^-$ aus Gründen der Elektroneutralität $Na^+$ parazellulär folgt. Auch Wasser folgt dem Chlorid durch den Zwischenzellraum entlang des osmotischen Gradienten (Barrett and Keely 2000). Seit einigen Jahren ist man sich über die Existenz eines $Cl^-$-Kanals vom CFTR-Typ (= cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) einig. Dieser Kanal ist cAMP abhängig. Findet eine Prästimulation mit cAMP statt, kann ein $Cl^-$-Ausstrom entlang des elektrochemischen Gradienten erfolgen (Strabel and Diener 1995; Barrett and Keely 2000). Die Zystische Fibrose ist eine

angeborene Erkrankung, bei der dieser CFTR-Kanal nicht korrekt exprimiert wird. Durch die starke Einschränkung der $Cl^-$-Sekretion kommt es zu Obstipationen oder zu einem Meconium Ileus. Auch in den Atemwegen führt die Erkrankung durch die niedrigere $Cl^-$-Sekretion zu massiven Störungen, da es zur Produktion eines dickflüssigen Schleimes in den Atemwegen kommt und diese verstopft werden. Die fehlende $Cl^-$-Sekretion über den CFTR-Kanal kann hier aber bis zu einem gewissen Grad durch eine Aktivierung von $Ca^{2+}$-abhängigen $Cl^-$-Kanälen über ATP und Purinoceptoren ausgeglichen werden (Greger 2000; Ribeiro et al. 2005). Ein apikal gelegener $Ca^{2+}$-abhängiger $Cl^-$-Kanal, wie er in vielen sekretorischen Epithelien vorkommt, war im Kolonepithel lange umstritten (Strabel and Diener 1995; Barrett and Keely 2000). Vor kurzem gelang es Schultheiss, Siefjediers und Diener (2005) diesen Kanal sowohl funktionell als auch immunhistochemisch im Rattenkolon nachzuweisen. Der Signalweg der Aktivierung ist allerdings noch nicht geklärt.

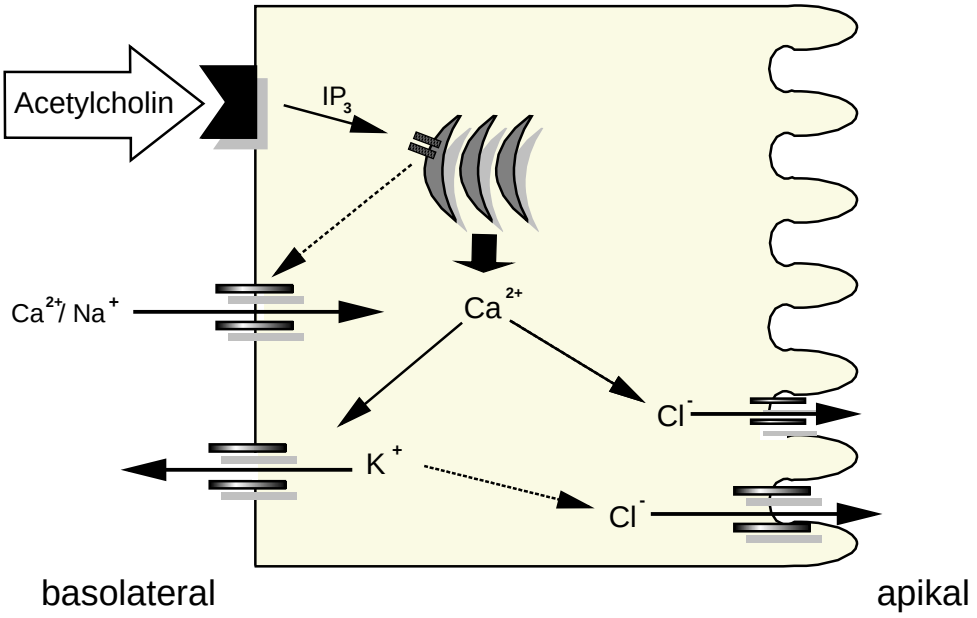



**Abbildung I.4:** Die Aktivierung eines muscarinergen Rezeptors mit Acetylcholin führt zur Öffnung eines intrazellulären $IP_3$-abhängigen $Ca^{2+}$-Kanals (= $IP_3$-Rezeptor) und damit zum Anstieg der zytosolischen $Ca^{2+}$-Konzentration. Die Speicherentleerung öffnet einen nicht-selektiven Kationenkanal in der Plasmamembran. Das Calcium aktiviert basolaterale $K^+$-Kanäle, so dass es durch den Kaliumausstrom zu einer Zellhyperpolarisation kommt. Diese führt wiederum zu einem apikalen $Cl^-$-Ausstrom. Außerdem aktiviert das $Ca^{2+}$ direkt einen apikalen $Ca^{2+}$-abhängigen $Cl^-$- Kanal.

Calcium ist demnach im Kolon über zwei Mechanismen an der Regulierung der $Cl^-$-Sekretion beteiligt (siehe Abbildung I.4). Zum einen über die Aktivierung von $K^+$-Kanälen und dem damit verbundenen $K^+$-Ausstrom, der die Membran hyperpolarisiert. Außerdem ist es an der Öffnung von $Ca^{2+}$-abhängigen $Cl^-$-Kanälen in der apikalen Membran beteiligt. Damit kommt Calcium auch im Kolonepithel eine zentrale Funktion in der Regulation von Transportprozessen zu.

## 3 $Ca^{2+}$ als intrazellulärer Botenstoff

Calcium ist ein intrazellulärer Botenstoff, der in allen Körperzellen der Tiere vorkommt und lebenswichtige Prozesse in den Zellen steuert. Sidney Ringer erkannte bereits vor mehr als einhundert Jahren, dass Calcium essentiell für den Herzschlag ist (Ringer 1883; Brini and Carafoli 2000). Die $Ca^{2+}$-Funktion wurde lange Zeit im Muskel und an erregbaren Geweben untersucht, bis seine Wichtigkeit auch für nicht-erregbare Gewebe erkannt wurde. Calcium ist in seiner Rolle als Botenstoff an der Steuerung vielfältiger physiologischer Vorgänge beteiligt und reguliert Zellfunktionen, die von der Befruchtung bis zum Zelltod reichen (Berridge et al. 2000; Bootman et al. 2002), wodurch seine Wichtigkeit im lebenden Organismus verdeutlicht wird. Die Frage, wie es Calcium gelingt so viele verschiedene Funktionen in einer Zelle gezielt zu beeinflussen, wird seit langem erforscht. Das Calcium bedient sich der drei Elemente Raum, Zeit und Amplitude, um die verschiedenen Signale zu verschlüsseln. Es gibt räumlich begrenzte $Ca^{2+}$-Signale und $Ca^{2+}$-Wellen, die über die gesamte Zelle laufen. Außerdem können $Ca^{2+}$-Wellen von Zelle zu Zelle weitergegeben werden und sich so über ein bestimmtes Gewebe ausbreiten. Auch über die unterschiedliche Länge der $Ca^{2+}$-Signale beziehungsweise über die Frequenz können Unterschiede in der Codierung von Signalen erreicht werden. Zudem kann die Amplitude des $Ca^{2+}$-Signals variiert werden (Petersen et al. 1994; Berridge et al. 1998).

In der ruhenden Zelle liegt die zytosolische $Ca^{2+}$-Konzentration bei $10^{-7}$ $mol \cdot l^{-1}$ und ist damit viel geringer als im Extrazellularraum. Dies bildet die Voraussetzung dafür, dass $Ca^{2+}$-Signale in der Zelle initialisiert werden können und es dadurch seine Rolle als Botenstoff ausüben kann. Zur Aufrechterhaltung der niedrigen

intrazellulären $Ca^{2+}$-Konzentration verfügt die Zelle über verschiedene Mechanismen. $Ca^{2+}$-ATPasen transportieren unter ATP-Verbrauch Calciumionen in den Extrazellularraum (Plasmamembran $Ca^{2+}$-ATPase = PMCA) und in intrazelluläre $Ca^{2+}$-Speicher wie z.B. in das Endoplasmatische Retikulum (= ER) und den Golgi Apparat (Pozzan et al. 1994; Wuytack et al. 2003). Die daran beteiligten $Ca^{2+}$-ATPasen werden als Sarkoplasmatische-Endoplasmatische Retikulum $Ca^{2+}$-ATPase (= SERCA) bezeichnet. Hierdurch wird ein niedriger zytosolischer $Ca^{2+}$-Spiegel in der Zelle aufrechterhalten. Die Plasmamembran verfügt zudem über $Na^{+}/Ca^{2+}$-Austauscher (= NCX), die den transmembranären $Na^{+}$-Gradienten nutzen, um $Na^{+}$ in die Zelle und gleichzeitig $Ca^{2+}$ aus der Zelle zu transportieren (Blaustein and Lederer 1999). Auch Mitochondrien können $Ca^{2+}$ aus dem Zytoplasma entfernen, indem sie $Ca^{2+}$ über einen $Ca^{2+}$-Uniporter mit hoher Geschwindigkeit aufnehmen. Die Antriebskraft hierfür stellt das mitochondriale Membranpotential dar. Das $Ca^{2+}$ wird später über einen $Na^{+}$-abhängigen Austauscher in der Mitochondrienmembran langsam wieder abgegeben (Kirichok et al. 2004). Dadurch sind die Mitochondrien an der Regulation der Amplitudenhöhe und der zeitlichen und räumlichen Verteilung des $Ca^{2+}$-Signals beteiligt (Bootman et al. 2001). Im Zytoplasma existieren $Ca^{2+}$-bindende Proteine wie z.B. Calmodulin und Calbindin. Diese binden das in das Zytoplasma strömende $Ca^{2+}$ und puffern es dadurch ab. Durch diesen Mechanismus beeinflussen sie Zeitspanne und Amplitudenhöhe des $Ca^{2+}$-Signals (Brini and Carafoli 2000).

Damit eine Zelle durch $Ca^{2+}$-Signale Prozesse regulieren kann, muss sie den $Ca^{2+}$-Spiegel im Zytoplasma extrem schnell massiv erhöhen können. Hierfür stehen ihr eine Vielzahl von Mechanismen zur Verfügung. In den Membranen der intrazellulären $Ca^{2+}$-Speicher werden intrazelluläre $Ca^{2+}$-Kanäle exprimiert, welche durch unterschiedliche Botenstoffe aktiviert werden. Durch die Öffnung der $Ca^{2+}$-Kanäle kommt es zu einem $Ca^{2+}$-Ausstrom aus dem Speicher ins Zytosol. Zu diesen intrazellulären Kanälen gehören die Ryanodinrezeptoren, die durch zyklische Adenosindiphosphat-Ribose (= cADPR) aktiviert werden (Zucchi and Ronca-Testoni 1997). Auch Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptoren (= $IP_3R$) existieren intrazellulär, wobei diese durch Stimulation mit Inositol-1,4,5-trisphosphat (= $IP_3$) geöffnet werden (Berridge 1993). Sowohl Ryanodinrezeptoren als auch $IP_3$-

Rezeptoren sind $Ca^{2+}$-abhängig und können an der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung (= CICR, calcium-induced calcium release) beteiligt sein (Berridge 1993; Bootman et al. 2002). Das Nukleotid Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (= NAADP) aktiviert einen bisher noch nicht identifizierten intrazellulären $Ca^{2+}$-Kanal, wodurch eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus einem Thapsigargin-insensitiven $Ca^{2+}$-Speicher induziert wird (Genazzani and Galione 1997, siehe Abbildung I.5).

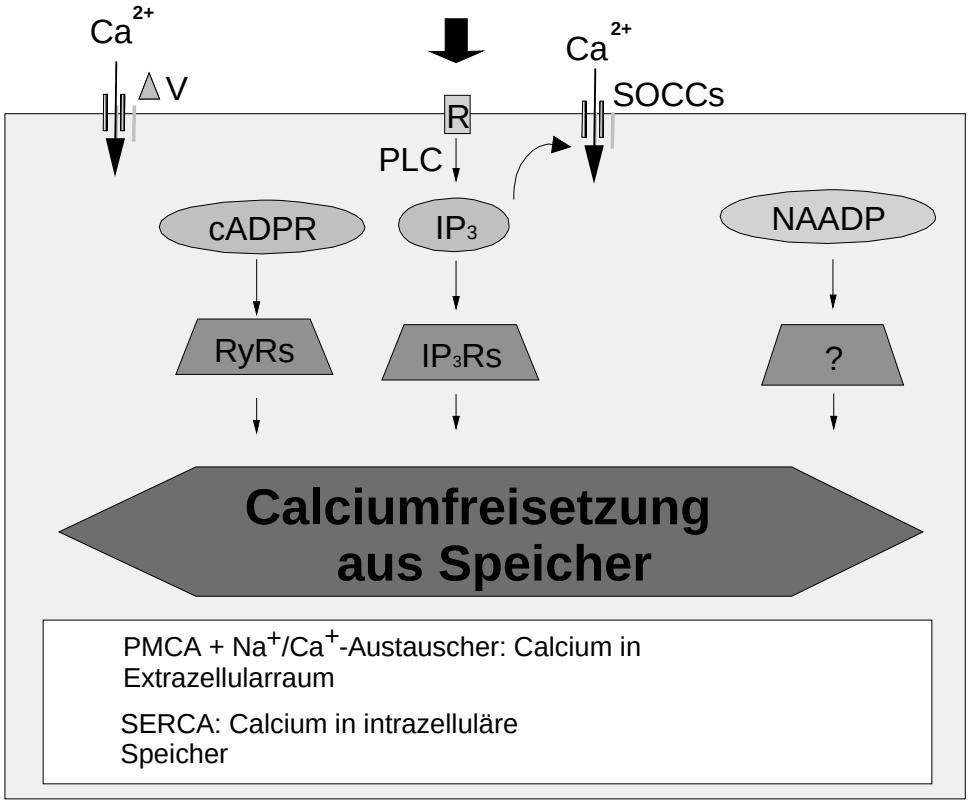



**Abbildung I.5:** Dargestellt sind Elemente der $Ca^{2+}$-Signalinduktion, derer sich die Körperzellen bedienen können. In der Plasmamembran sind spannungsabhängige (= $\Delta V$) $Ca^{2+}$-Kanäle und speichergesteuerte $Ca^{2+}$-Kanäle (= SOCCs) dargestellt, deren Aktivierung zu einem $Ca^{2+}$-Einstrom aus dem Extrazellularraum ins Zytoplasma führt. Der zelluläre Botenstoff cADPR aktiviert intrazelluläre Ryanodinrezeptoren, so dass es zu einer Speicherentleerung kommt. Durch die Bindung eines Agonisten an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor in der Plasmamembran wird $IP_3$ durch eine Phospholipase C synthetisiert, welches intrazelluläre $IP_3$-Rezeptoren öffnet. NAADP aktiviert bisher nicht identifizierte intrazelluläre $Ca^{2+}$-Kanäle und führt so zu einer Erhöhung der zytosolischen $Ca^{2+}$-Konzentration. Die zur Erniedrigung des zytosolischen $Ca^{2+}$-Spiegels benötigten $Ca^{2+}$-ATPasen und $Na^{+}/Ca^{2+}$-Austauscher sind grafisch nicht dargestellt.

In den verschiedenen Zelltypen können unterschiedliche Organellen, z.B. Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Kernhülle, Golgi Apparat, als $Ca^{2+}$-Speicher genutzt werden (Pozzan et al. 1994), an denen unterschiedliche Kanäle exprimiert werden. An erregbaren Geweben existieren spannungsabhängige $Ca^{2+}$-Kanäle (= VOCCs, voltage-operated $Ca^{2+}$ channels) in der Plasmamembran, die durch eine Änderung des Membranpotentials geöffnet werden, so dass es zu einem $Ca^{2+}$-Einstrom aus dem Extrazellularraum kommt (Übersicht siehe Tsien and Tsien 1990). In der Plasmamembran werden außerdem speichergesteuerte $Ca^{2+}$-Kanäle (= SOCCs, store-operated $Ca^{2+}$ channels) exprimiert, über deren Öffnung zwei Theorien bestehen. Zum einen kann die Aktivierung über einen Botenstoff stattfinden, der durch die Entleerung der intrazellulären $Ca^{2+}$-Speicher entsteht und durch das Zytoplasma zu den Kanälen diffundiert. Die andere Theorie beinhaltet eine direkte Kopplung zwischen intrazellulären $IP_3$-Rezeptoren mit den SOCCs, z.B. durch das Protein Homer (Yuan et al. 2003), wodurch es durch eine Speicherentleerung zu einer Konformationsänderung der Kanäle und damit zu einem $Ca^{2+}$-Einstrom von außen kommt. Die SOCCs gehören wahrscheinlich zur Familie der TRP (= transient receptor protein)-Kanäle, konnten aber noch nicht eindeutig auf molekularer Ebene identifiziert werden (Spassova et al. 2004).

Im Kolonepithel stellt Calcium einen wichtigen zellulären Botenstoff dar, da es in besonderer Weise an der Regulation der $Cl^-$-Sekretion beteiligt ist. Die Mechanismen, die dem Enterozyten zur Generation von $Ca^{2+}$-Signalen zur Verfügung stehen, wurden in den letzten Jahren vermehrt untersucht. So konnte ein funktioneller Ryanodinrezeptor nachgewiesen werden, der durch cADPR bzw. Ryanodin aktiviert werden konnte und durch Ruthenium Rot gehemmt wurde. Durch die Aktivierung wird Calcium aus einem bisher nicht definierten $Ca^{2+}$-Speicher freigesetzt. Im Kolonepithel ist der Ryanodinrezeptor auch an der $Ca^{2+}$-induzierten $Ca^{2+}$-Freisetzung beteiligt (Kocks et al. 2002). An den Membranen der intrazellulären $Ca^{2+}$-Speicher konnten außerdem SERCAs nachgewiesen werden, indem nach Blockade mit Cyclopiazonsäure (= CPA) bzw. Thapsigargin ein Anstieg der zytosolischen $Ca^{2+}$-Konzentration gemessen wurde (Kocks et al. 2002). Durch die Expression der SERCAs kann der Enterozyt die niedrige zytosolische $Ca^{2+}$-Konzentration aufrechterhalten. Auch der in der Plasmamembran exprimierte

$Na^+/Ca^{2+}$-Austauscher dient der Erniedrigung des zytosolischen $Ca^{2+}$-Spiegels. Dieser $Na^+/Ca^{2+}$-Austauscher wird durch einen Anstieg der $Na^+$-Konzentration im Zytosol der Zelle nach einer $Ca^{2+}$-Entleerung der intrazellulären Speicher inaktiviert und verlängert hierdurch das $Ca^{2+}$-Signal. Vom Füllungszustand der Speicher ist dieser Austauscher jedoch unabhängig (Seip et al. 2001). Die Speicherentleerung im Kolonepithel führt weiterhin zu einer Aktivierung eines nicht-selektiven Kationenkanals, wodurch es zu seinem $Na^+$- und $Ca^{2+}$-Einstrom kommt. Durch diesen Kationenkanal wird das $Ca^{2+}$-Signal verstärkt, des Weiteren wird durch ihn die intrazelluläre $Na^+$-Konzentration erhöht (Frings et al. 1999).

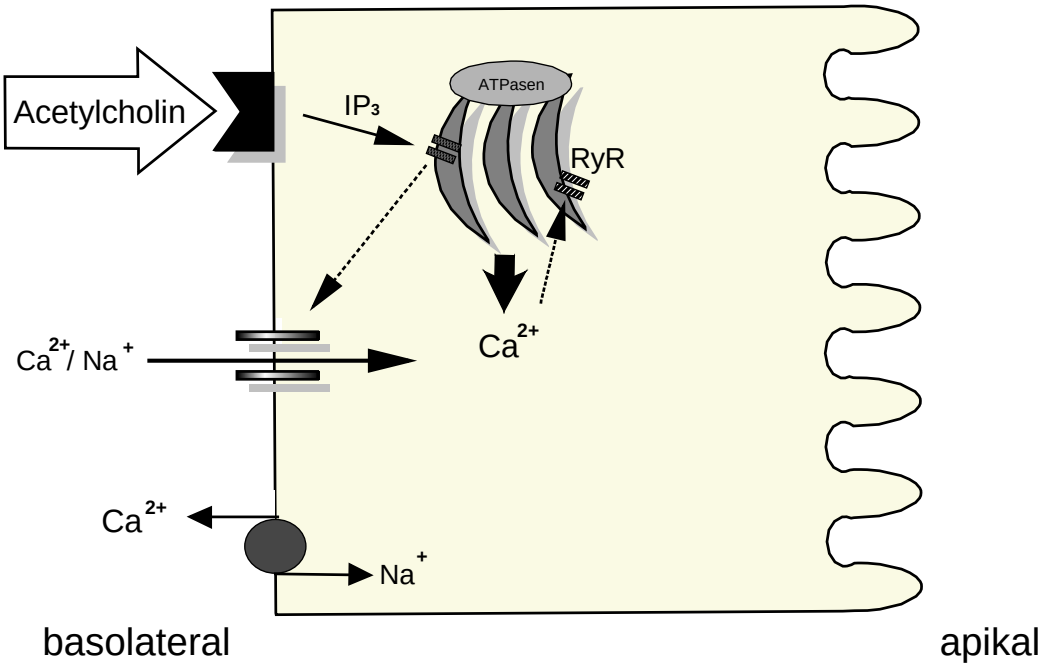



**Abbildung I.6:** Dargestellt sind die für das Kolonepithel nachgewiesenen $Ca^{2+}$-Kanäle und $Ca^{2+}$-Transportsysteme (siehe Text).

Über die Aktivierung von muscarinergen M3 Rezeptoren durch Acetylcholin bzw. Carbachol konnte eine Erhöhung des intrazellulären $Ca^{2+}$-Spiegels erreicht werden. Dieser $Ca^{2+}$-Anstieg wird durch die Öffnung von intrazellulären $IP_3$-gesteuerten Kanälen hervorgerufen, die somit funktionell im Kolonepithel nachgewiesen sind (Dharmsathaphorn and Pandol 1986; Lindqvist et al. 1998).

## 4 $IP_3$-Rezeptoren

Die Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptoren (= $IP_3R$) gehören neben den Ryanodinrezeptoren zu den wichtigsten $Ca^{2+}$-Kanälen, die durch die Erzeugung von $Ca^{2+}$-Signalen an der Steuerung zellulärer Prozesse beteiligt sind.

$IP_3$-Rezeptoren sind intrazelluläre $Ca^{2+}$-Kanäle, die durch die Bindung des zellulären Botenstoffes aktiviert werden und dadurch einen $Ca^{2+}$-Ausstrom aus den intrazellulären Speichern bewirken. Es handelt sich also um ligandengesteuerte Ionenkanäle. $IP_3$ kann über zwei Signalwege in der Zelle gebildet werden. Durch die Bindung von Agonisten (z.B. Acetylcholin, ATP oder Vasopressin) an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Plasmamembran wird ein G-Protein (= Guaninnucleotid-bindendes Protein) aktiviert. Dieses stimuliert die Phospholipase $C\beta_1$, welche das membrangebundene Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (= $PIP_2$) zu Diacylglycerin (= DAG) und $IP_3$ hydrolysiert (siehe Abbildung I.7). Das $IP_3$ diffundiert durch das Zytosol von der Plasmamembran zu den $IP_3$-abhängigen $Ca^{2+}$-Kanälen.

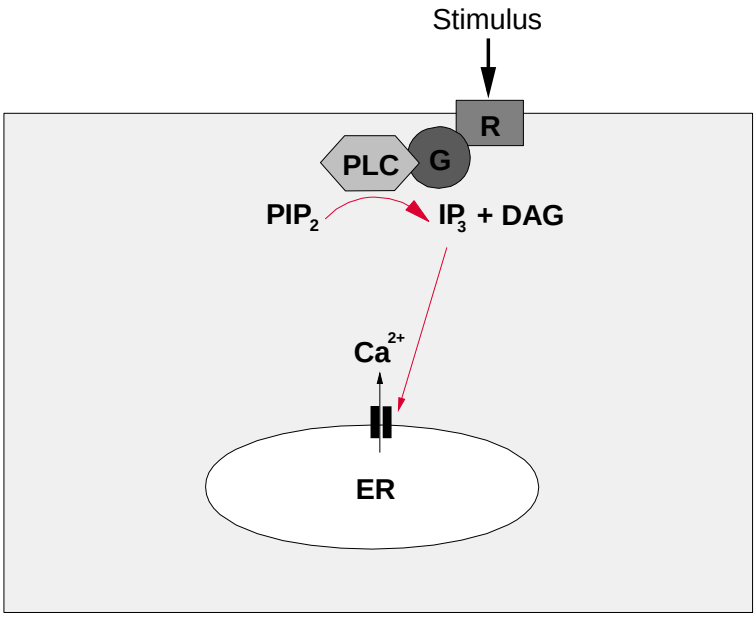



**Abbildung I.7:** Dargestellt ist die Aktivierung des $IP_3$-Rezeptors über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor in der Plasmamembran (siehe Text).

Auch durch die Bindung von Agonisten wie z.B. Platelet-derived growth factor (= PDGF) und Epidermal growth factor (= EGF) an Tyrosinkinase-gekoppelte

Rezeptoren in der Plasmamembran kann $IP_3$ gebildet werden. Die Rezeptoren können nach Autophosphorylierung die Phospholipase $C\gamma_1$ aktivieren, welche wiederum das $PIP_2$ zu DAG und $IP_3$ hydrolysiert (Abdel-Latif 1986; Berridge 1993).

Bisher wurden drei Subtypen von $IP_3$-Rezeptoren identifiziert, Typ 1 (= $IP_3R1$), Typ 2 (= $IP_3R2$) und Typ 3 $IP_3$-Rezeptor (= $IP_3R3$). Ein $IP_3$-Rezeptor kann aus vier homogenen oder heterogenen Untereinheiten bestehen, die ein Tetramer bilden. Bei der Tetramerbildung interagieren jeweils ein C-Terminus einer Untereinheit mit einem N-Terminus einer benachbarten Untereinheit (Joseph et al. 1995). Die so entstehende Rezeptorform wurde als Windmühlenstruktur beschrieben (siehe Abbildung I.8 A), in deren Mitte sich die Kanalpore befindet (Hamada et al. 2002; Serysheva et al. 2003).

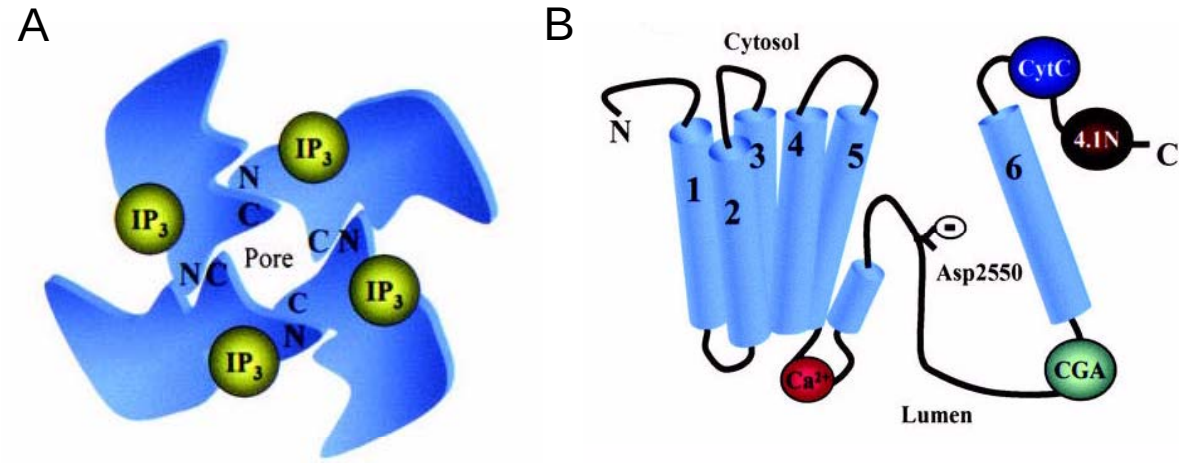



**Abbildung I.8: A** zeigt die Windmühlenstruktur der $IP_3$-Rezeptoren; **B** stellt schematisch eine Untereinheit des Rezeptors dar (Patterson et al. 2004).

Die drei Subtypen unterscheiden sich in der Länge ihrer Aminosäuresequenz. In der Primärstruktur existieren so genannte konstante Bereiche, die sich bei den drei Subtypen gleich darstellen. So liegt die $IP_3$-Bindungsstelle aller drei Subtypen im N-Terminus des Proteins, welcher in das Zytoplasma ragt. Für die Bindung des $IP_3$ ist die Tertiärstruktur des Rezeptors essentiell, da das $IP_3$ mit seinen negativ geladenen Phosphatgruppen an positiv geladene Aminosäuren bindet, die in der Primärstruktur weit auseinander liegen und sich erst durch die Proteinfaltung

annähern (Patel et al. 1999; Patterson et al. 2004). Die Kanalregion liegt bei allen drei Isoformen im C-Terminus. Sie besteht aus sechs transmembranären Regionen, wobei die fünfte und die sechste zusammen mit dem luminalen Loop die Kanalpore bilden (Joseph et al. 1997). Zwischen den beschriebenen Regionen befindet sich die Regulationsdomäne, von der die des $IP_3R1$ am besten, die des $IP_3R2$ und $IP_3R3$ sehr wenig untersucht worden sind. In der Regulationsdomäne liegen die meisten variablen Regionen, das heißt hier weisen die drei Subtypen Unterschiede auf. Diese Domäne beinhaltet $Ca^{2+}$-Bindungsstellen, ATP-Bindungsstellen, Bindungsstellen für Proteinkinasen (z.B. PKA, PKC, CamKII) und Bindungsstellen für unterschiedliche Proteine wie Ankyrin, Homer, Calmodulin, Caspase 3 (Übersicht siehe Patterson et al. 2004; Bezprozvanny 2005).

Da alle drei Isoformen die gleiche $IP_3$-Bindungsstelle besitzen, das gleiche $Ca^{2+}$-Gating zeigen und die gleiche Ionenleitfähigkeit aufweisen (Miyakawa et al. 1999; Tu et al. 2005), stellt sich die Frage, wie die Zellen unterschiedliche $Ca^{2+}$-Signale mit den drei Subtypen generieren können. Die Antwort liegt in einer unterschiedlichen Modulation der Rezeptoren durch regulatorische Moleküle. Die Subtypen unterscheiden sich in ihrer Affinität zu $IP_3$, $Ca^{2+}$ und ATP. Während $IP_3$ lediglich ein Aktivator für die Kanäle darstellt, wirken $Ca^{2+}$ und ATP in Abhängigkeit der angebotenen Konzentration ganz verschieden. $Ca^{2+}$ wirkt biphasisch auf die Kanäle: es stimuliert sie in geringer Konzentration und hemmt sie in hoher Konzentration (Übersicht siehe Patterson et al. 2004). Das gleiche gilt für ATP, das in niedriger Konzentration die Rezeptoraktivität erhöht (Ehrlich and Watras 1988; Maeda et al. 1991), bei Konzentrationen im millimolaren Bereich hingegen hemmt (Bezprozvanny 2005). Der $IP_3R1$ zeigt eine mittlere $IP_3$-Affinität, eine niedrige $Ca^{2+}$-Affinität und eine hohe ATP-Affinität. Der $IP_3R2$ besitzt eine hohe $IP_3$-Affinität, eine mittlere $Ca^{2+}$-Affinität und ist ATP unabhängig. Der $IP_3R3$ weist dagegen eine niedrige $IP_3$-Affinität, eine hohe $Ca^{2+}$-Affinität und eine niedrige ATP-Affinität auf (Miyakawa et al. 1999; Tu et al. 2005).

Die Expression der drei Subtypen erfolgt gewebs- und entwicklungsspezifisch und ist in unterschiedlichen Geweben bzw. Zelltypen sehr verschieden, wodurch den Zellen erlaubt wird, sehr vielfältige $Ca^{2+}$-Signale zu initialisieren. Selbst eine Downregulation eines Subtyps nach besonderen Stimuli z.B. mit Peptidhormonen

ist den Zellen möglich, so dass auch differenzierte Zellen ihr Expressionsmuster der Subtypen verändern können (Wojcikiewicz 1995). Der $IP_3R1$ ist der dominante Subtyp im ZNS (Taylor et al. 1999), wobei er auch in nicht-neuronalen Geweben wie z.B. der Niere exprimiert wird (Monkawa et al. 1998). Außerdem wurde er auch in vaskulären, glatten Muskelzellen gefunden (Monkawa et al. 1998; Vermassen et al. 2003). Der $IP_3R2$ wurde in zahlreichen Organen wie z.B. Gehirn, Lunge und Pankreas nachgewiesen (Wojcikiewicz 1995). Der $IP_3R3$ wird hauptsächlich in nicht-neuronalen Geweben exprimiert, er wurde in Jejunum, Niere und Fettgewebe gefunden (Blondel et al. 1993). $IP_3$-Rezeptoren sind an vielen intrazellulären Organellen nachgewiesen worden. Sie werden häufig am Endoplasmatischen Retikulum gefunden (Sharp et al. 1992; Blondel et al. 1993; Bush et al. 1994; Pozzan et al. 1994), wurden aber auch am Golgi Apparat nachgewiesen (Pinton et al. 1998; Surroca and Wolff 2000). Auch die Kernhülle besitzt $IP_3$-Rezeptoren (Gerasimenko et al. 1995; Humbert et al. 1996). Es gibt außerdem Evidenzen für $IP_3$-Rezeptoren in der Plasmamembran, wobei dies umstritten ist und die physiologische Bedeutung nicht geklärt ist (Vermassen et al. 2004). In Epithelzellen wurden $IP_3$-Rezeptoren häufig am sekretorischen bzw. apikalen Zellpol nachgewiesen (Nathanson et al. 1992; Thorn et al. 1993). Im Kolonepithel der Ratte fehlt bisher der immunhistochemische Nachweis von $IP_3$-Rezeptoren. Funktionell konnten sie über eine Stimulation mit Acetylcholin und anschließender $Ca^{2+}$-Freisetzung aus intrazellulären Speichern nachgewiesen werden (Dharmsathaphorn and Pandol 1986).

## 5 Eigene Fragestellung

Dass Calcium über seine Beteiligung an der Regulation der $Cl^-$-Sekretion im Kolonepithel eine zentrale Rolle als intrazellulärer Botenstoff zukommt, ist unumstritten. Daher wurden in den letzten Jahren vermehrt Untersuchungen an den Mechanismen der $Ca^{2+}$-Aktivierung im Kolonepithel vorgenommen. Obwohl der $IP_3$-Rezeptor bereits vor vielen Jahren funktionell nachgewiesen wurde, ist das Expressionsmuster der $IP_3$-Rezeptoren im Kolonepithel vollkommen unbekannt.

Durch meine Untersuchungen sollten daher folgende Fragen geklärt werden:

- Können $IP_3$-Rezeptoren immunhistochemisch im Kolonepithel der Ratte nachgewiesen werden?
- Welche $IP_3$-Rezeptorsubtypen werden exprimiert und welche Lokalisation weisen sie in der Epithelzelle auf?
- Gibt es Unterschiede in der Subtypverteilung entlang der Kryptenachse?
- Führen Unterschiede in der $IP_3$-Rezeptorsubtypexpression zu einer unterschiedlichen $Ca^{2+}$-Freisetzung entlang der Kryptenachse?

# II. Material und Methoden

## 1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Für die Immunfluoreszenzmarkierungen und die Imaging-Messungen wurden Wistar-Ratten, für die Immunogoldmarkierungen wurden Sapra-Ratten verwendet. Zur Isolierung von Kolonkrypten wurden weibliche Tiere mit einer Körpermasse zwischen 110 und 160 g bzw. in einem Alter von maximal 7 Wochen verwendet. Intakte Krypten können bis zu einem Alter von 9 Wochen bzw. einem Gewicht bis 180 g isoliert werden (Schultheiss et al. 2002). Für die immunhistochemischen Untersuchungen spielten Geschlecht, Alter und Gewicht der Tiere keine Rolle. Die Ratten wurden nach Geschlecht sortiert in Kleingruppen gehalten, ihnen stand Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Im Stall wurde ein 12-Stunden-hell-dunkel-Rhythmus eingehalten.

## 2 Lösungen

### 2.1. Lösungen für die Fluoreszenzmarkierungen

#### *2.1.1 Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung*

Es wurden 5 $g \cdot l^{-1}$ Gelatine (300 bloom; die Einheit bloom ist ein Indikator für die Festigkeit der erkalteten Form der Gelatine) in Aqua dest. gelöst und erhitzt. Bei 54 °C wurden 0,5 $g \cdot l^{-1}$ Chromkaliumsulfat hinzugegeben. Die Lösung wurde dann weiter auf 60 °C erhitzt.

#### *2.1.2 Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung*

100 $g \cdot l^{-1}$ Haushaltsgelatine wurden in Aqua dest. gelöst und auf 37 °C erhitzt. Die Lösung wurde dann durch Papierfilter filtriert.

### *2.1.3 Phosphatpuffer (= PB)*

Es wurde eine 0,2 mol·l$^{-1}$ $NaH_2PO_4$-Stammlösung und eine 0,2 mol·l$^{-1}$ $Na_2HPO_4$-Stammlösung hergestellt. 1 Volumenteil $NaH_2PO_4$-Stammlösung wurde mit 4 Volumenteilen $Na_2HPO_4$-Stammlösung gemischt; die entstandene Lösung wurde mit 5 Volumenteilen Aqua dest. aufgefüllt, so dass sich ein 0,1 mol·l$^{-1}$ Phosphatpuffer ergab. Der pH-Wert wurde unter pH-Meter-Kontrolle mit NaOH / HCl auf 7,4 eingestellt.

### *2.1.4 Blocking-Lösung*

Die Grundlage der Lösung stellte der 0,1 mol·l$^{-1}$ Phosphatpuffer dar. In diesem wurden 5 ml·l$^{-1}$ Triton-X-100, 20 g·l$^{-1}$ bovines Serumalbumin (= BSA) und 100 ml·l$^{-1}$ normales Ziegenserum (= NGS, normal goat serum) gelöst.

### *2.1.5 Primärantikörper-Lösung*

In 0,1 mol·l$^{-1}$ Phosphatpuffer wurden 5 ml·l$^{-1}$ Triton-X-100, 5 g·l$^{-1}$ Magermilchpulver, 10 g·l$^{-1}$ BSA und 10 ml·l$^{-1}$ NGS gelöst.

### *2.1.6 Sekundärantikörper-Lösung*

Es wurden 5 ml·l$^{-1}$ Triton-X-100, 5 g·l$^{-1}$ Magermilchpulver und 10 g·l$^{-1}$ BSA in 0,1 mol·l$^{-1}$ Phosphatpuffer gelöst.

### *2.1.7 DAPI-Lösung*

10 mg DAPI (= 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat) wurden in 2 ml Aqua dest. gelöst, so dass eine 10,9 mmol·l$^{-1}$ Stammlösung entstand. Um eine 300 nmol·l$^{-1}$ Gebrauchslösung zu erhalten, wurden 6,8 µl DAPI-Stammlösung mit 250 ml Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (= PBS, phosphate-buffered saline, mit folgender Zusammensetzung in mmol·l$^{-1}$: NaCl 120; KCl 2,7; Phosphatpuffer 10; pH 7,4) gemischt.

## 2.2. Lösungen für die Immunogoldmarkierungen

### *2.2.1 Cacodylatpuffer*

Es wurde eine 0,2 $mol \cdot l^{-1}$ Natriumcacodylat-Lösung ($Na(CH_3)_2AsO_2 \cdot 3\ H_2O$) hergestellt. Unter pH-Meter-Kontrolle wurde HCl (0,2 $mol \cdot l^{-1}$) zugesetzt, bis sich ein pH-Wert von 7,2 einstellte.

### *2.2.2 Fixationslösung*

Die Lösung sollte 40 $g \cdot l^{-1}$ Paraformaldehyd und 0,5 $ml \cdot l^{-1}$ Glutaraldehyd enthalten. Das benötigte Paraformaldehyd wurde zuerst in 20 ml Aqua dest. gelöst und in einem Wasserbad auf 55 °C erhitzt. Durch Zugabe von 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ NaOH wurde das Paraformaldehyd gänzlich gelöst, so dass eine klare Lösung entstand. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt. Als die Lösung abgekühlt war, wurde das Glutaraldehyd hinzugegeben und die Lösung wurde mit 0,2 $mol \cdot l^{-1}$ Cacodylatpuffer ad 100 ml aufgefüllt.

### *2.2.3 Lowicryl HM20*

Zur Herstellung des Harzes wurden der Crosslinker und das Monomer vermischt. Dann wurde der Initiator zugefügt und verrührt. Zu der Lösung wurde Molekularsieb (0,3 nm Perlform; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Das Gefäß wurde verschlossen bei –20 °C in einer Gefrierbox aufbewahrt.

### *2.2.4 $PB_{EM}$*

Für die elektronenmikroskopischen Versuche wurde ein leicht modifizierter Phosphatpuffer (= $PB_{EM}$) verwendet. Ein Volumenteil 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$-Lösung und zehn Volumenteile 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$-Lösung wurden gemischt. Der pH-Wert des entstandenen Puffers betrug 7,4.

### *2.2.5 Ätzlösung*

30 $g \cdot l^{-1}$ Natriummetaperjodat ($JNaO_4$) wurden in Aqua bidest. gelöst und durch Papierfilter filtriert.

### *2.2.6 Glycin-Puffer*

0,05 $mol \cdot l^{-1}$ Glycin wurden in $PB_{EM}$ gelöst. Die Lösung wurde durch Papierfilter filtriert.

### *2.2.7 Blocking-Lösung*

50 $ml \cdot l^{-1}$ NGS wurden in BSA-Lösung (siehe II.2.2.8) gelöst.

### *2.2.8 BSA-Lösung*

10 $g \cdot l^{-1}$ BSA wurden in $PB_{EM}$ gelöst und durch Papierfilter filtriert.

### *2.2.9 Primärantikörper-Lösung*

10 $ml \cdot l^{-1}$ NGS wurden in BSA-Lösung gelöst.

### *2.2.10 Kontrastierungslösung*

Es wurden 20 $g \cdot l^{-1}$ Methyl-Cellulose in Aqua bidest. gelöst. Davon wurde ein Volumenteil mit neun Volumenteilen 20 $g \cdot l^{-1}$ Uranylacetat-Lösung gemischt.

## 2.3. Lösungen für die Kryptenisolation

### *2.3.1 Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung*

Die Lösung enthielt (Parsons and Paterson 1965; in $mmol \cdot l^{-1}$): NaCl 107; $NaHCO_3$ 25; $NaH_2PO_4$ 0,2; $Na_2HPO_4$ 1,8; KCl 4,5; $CaCl_2$ 1,25; $MgSO_4$ 1; Glucose 12. Die Lösung wurde mit Carbogen (95 % $O_2$, 5 % $CO_2$; v / v) begast. Der pH-Wert wurde mit $NaHCO_3$ / HCl auf 7,4 eingestellt.

### *2.3.2 Isolationslösung*

Die Lösung enthielt (in $mmol \cdot l^{-1}$): NaCl 107; $NaHCO_3$ 25; $NaH_2PO_4$ 0,2; $Na_2HPO_4$ 1,8; KCl 4,5; Glucose 12; EDTA (= Ethylendiamintetraessigsäure) 10 und 1 $g \cdot l^{-1}$ BSA. Die Lösung wurde unter Carbogenbegasung mit TRIS (= Tris(hydroxymethyl)aminomethan) bzw. HCl auf ein pH von 7,4 eingestellt und anschließend auf 42 °C erwärmt.

### *2.3.3 Auffang-Tyrode*

Die Lösung enthielt (in $mmol \cdot l^{-1}$): Kaliumgluconat 100; KCl 30; HEPES (= N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure) 10; NaCl 20; $MgCl_2$ 1; $CaCl_2$ 1,25; Glucose 12; Natriumpyruvat 5 und 1$g \cdot l^{-1}$ BSA. Der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH / HCl auf 7,4 eingestellt.

## 2.4. Lösungen für die Imaging-Messungen

### *2.4.1 Fura-2-Stammlösung*

Es wurde eine 1 $mmol \cdot l^{-1}$ Lösung in Aqua dest. hergestellt.

### *2.4.2 Fura-2 AM-Stammlösung*

Es wurde eine 1 $mmol \cdot l^{-1}$ Lösung in DMSO angesetzt.

### *2.4.3 Pluronic® F-127-Stammlösung*

Es wurden 200 $g \cdot l^{-1}$ in DMSO gelöst.

### *2.4.4 Mag-Fura-2 AM-Stammlösung*

Es wurde eine 1 $mmol \cdot l^{-1}$ Lösung in DMSO hergestellt.

### *2.4.5 NaCl-Tyrode*

Die Tyrode für die Superfusion der isolierten Krypten bestand aus (in $mmol \cdot l^{-1}$): NaCl 140; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 5; $CaCl_2$ 1,25; $MgCl_2$ 1. Der pH-Wert wurde mit NaOH / HCl auf 7,4 eingestellt.

### *2.4.6 Intrazellular-ähnliche Lösung (ICL)*

Die Lösung enthielt (in $mmol \cdot l^{-1}$): Kaliumgluconat 100; KCl 30; NaCl 10; $MgCl_2$ 2; EGTA (= Ethylenglycol-bis-(ß-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) 0,1; TRIS 10. Der pH-Wert wurde mit TRIS / HCl auf 7,2 eingestellt.

## 2.5. Lösungen für die Kernisolation

### *2.5.1 Low-saline-buffer*

Der Puffer enthielt (in $mmol \cdot l^{-1}$): TRIS 10; Saccharose 320; $MgCl_2$ 2; $CaCl_2$ 3; Dithiothreitol (= DTT, wirkt als Reduktionsmittel) 0,5 und 4 $ml \cdot l^{-1}$ Igepal CA 630 (= (Octylphenoxy)polyethoxyethanol; wirkt als nicht-ionisches, nicht-denaturierendes Detergens). Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

### *2.5.2 Intrazellular-ähnliche Lösung mit ATP*

Die Lösung enthielt (in $mmol \cdot l^{-1}$): Kaliumgluconat 100; KCl 30; NaCl 10; $MgCl_2$ 2; EGTA 0,1; TRIS 10; ATP (= Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz) 3. Der pH-Wert wurde mit TRIS / HCl auf 7,2 eingestellt.

### *2.5.3 Propidiumjodid*

Es wurden 10 $\mu g \cdot ml^{-1}$ Propidiumjodid in ICL mit ATP gelöst.

## 3 Chemikalien

Alle Chemikalien stammten, falls nicht anders angegeben, von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Im Folgenden sind die Chemikalien angegeben, die bei anderen Herstellern bezogen wurden:

4`,6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat (DAPI; Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Adenophostin A, synthetic (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland)

BSA Fraction V, lyophil (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Citifluor (Plano, Wetzlar, Deutschland)

Epon (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Formvar (= Polyvinyl Formal, Kunststoff zur Herstellung von Trägerfilmen; Plano, Wetzlar, Deutschland)

Fura-2 Acetoxymethylester (= Fura-2 AM; Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Fura-2-Pentakaliumsalz (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Glutaraldehydlösung 25% (250 $g \cdot l^{-1}$; Merck, Darmstadt, Deutschland)

Glycin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Haushaltsgelatine (RUF, Quakenbrück, Deutschland)

Heparin (Heparinnatriumsalz, Molekulargewicht ca. 5000 D; Calbiochem, Bad Soden, Deutschland)

Lowicryl HM20 (Polyscience Europe GmbH, Eppenheim, Deutschland)

Magermilchpulver (Sucofin; TSI GmbH&Co.KG, Zeven, Deutschland)

Mag-Fura-2 Acetoxymethylester (= Mag-Fura-2 AM; Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Natriummetaperjodat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Normal Goat Serum (Jackson Immunoresearch, West Grove, USA)

Poly-L-Lysin (Gebrauchslösung: 0,1$mg \cdot ml^{-1}$; Biochrom KG, Berlin, Deutschland)

Saponin (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland)

Tissue Tec, O.C.T. Compound (Miles, Elkhart, USA)

## 4 Präparation der Darmschleimhaut

Die Ratten wurden durch einen Genickschlag betäubt und anschließend durch Entbluten getötet (genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen). Die Bauchhöhle wurde durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet und der Zugang wurde durch zwei Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens erleichtert. Das Kolon wurde freigelegt und an seinem Übergang zum Rektum, der durch einen Lymphknoten gekennzeichnet ist (Lindstroem et al. 1977), mit einem Scherenschlag abgesetzt. Dann wurde das Kolon mittels stumpfer Präparation vom Mesenterium gelöst, an seinem Übergang zum Caecum abgetrennt und aus der Bauchhöhle entnommen. Das Gewebe wurde sofort in eisgekühlte, carbogenbegaste Parsons-Lösung gegeben. Um den Darm von Kot zu reinigen, wurde er mit der eiskalten Parsons-Lösung gespült. Anschließend wurde der Darm auf einen Kunststoffstab mit einem Durchmesser von 5 mm gezogen. Am distalen Ende des Darmstücks wurde mit einem stumpfen Skalpell eine zirkuläre Inzision vorgenommen und die Serosa zusammen mit der Muscularis propria abgestreift. Das so erhaltene Mucosa-Submucosa-Präparat wurde in ungefähr drei Zentimeter lange Abschnitte unterteilt. Für die immunhistochemischen Analysen wurden sowohl intakte Darmwand-präparate wie auch Mucosa-Submucosa-Präparate verwendet.

## 5 Immunhistochemische Analyse des Darmpräparates

### 5.1. Grundlage der Immunhistochemie

Zur Analyse der Darmpräparate wurden immunhistochemische Methoden angewandt. Die Grundlage der Immunhistochemie bildet die Interaktion zwischen hochspezifischen mono- bzw. polyklonalen Antikörpern (meist IgG) mit dem nachzuweisenden Antigen. Antigene besitzen spezielle Determinanten (= Epitope), die von der $F_{ab}$-Region (= antigen-bindendes Fragment) des Antikörpers erkannt und gebunden werden. Dadurch entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe (Harlow 1988). Auf diese Weise können bei Vorhandensein von spezifischen Antikörpern Antigene jeglicher Art, wie zum Beispiel Proteine, in Geweben detektiert werden. Der Nachweis dieser Antigen-Antikörper-Komplexe kann durch verschiedene Methoden geführt werden. In diesen Studien erfolgte der Nachweis auf

lichtmikroskopischer Ebene durch indirekte Immunfluoreszenz (Coons 1958) und auf elektronenmikroskopischer Ebene mit der indirekten Immuno-Gold-Reaktion (Denk 1988).

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird an den antigenspezifischen Primärantikörper ein sekundärer, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper angelagert, der mit seiner $F_{ab}$–Region gegen die $F_c$-Region (= kristallisierbares Fragment) des Primärantikörpers gerichtet ist. Die Detektierung dieser Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt durch Anregung des Fluorophors mit Licht geeigneter Wellenlänge, was zu einer längerwelligen Emissionsstrahlung führt. Durch Verwendung von unterschiedlichen Primärantikörpern aus unterschiedlichen Tierspezies und geeigneten Sekundärantikörpern mit unterschiedlichen Fluorophoren kann mit der indirekten Immunfluoreszenz eine gleichzeitige Detektion mehrerer Antigene erfolgen.

Die indirekte Immuno-Gold-Reaktion wird für immunhistochemische Untersuchungen von Ultradünnschnitten im Elektronenmikroskop genutzt, da die Goldpartikel durch ihre hohe Elektronendichte gut detektiert werden können (Griffiths 1993). Das Versuchsprinzip ähnelt stark der indirekten Immunfluoreszenz. Anstatt des Fluorophors ist ein Goldpartikel an den Sekundärantikörper gekoppelt (siehe Abbildung II.1), welcher dann im elektronen-mikroskopischen Bild sichtbar ist und auch quantifiziert werden kann.

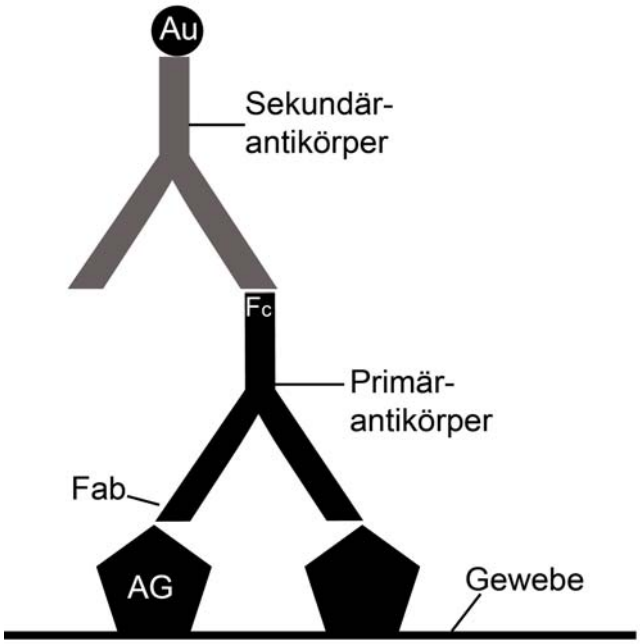



**Abbildung II.1:** Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion und die Bindung eines Goldpartikel-gekoppelten Sekundärantikörpers. AG = Antigen, $F_{ab}$ = antigen-bindendes Fragment, $F_c$ = kristallisierbares Fragment, Au = Goldpartikel.

## 5.2. Verwendete Antikörper

| Primärantikörper | Wirt | Verdünnung | Hersteller |
|---|---|---|---|
| KM1112<br>$IP_3R1$-AK | Maus | 10 µg/ml | Prof. Katsuhiko Mikoshiba<br>Universität Tokyo<br>Japan |
| KM1083<br>$IP_3R2$-AK | Maus | 2,5 µg/ml | Prof. Katsuhiko Mikoshiba<br>Universität Tokyo<br>Japan |
| $IP_3R3$-AK | Maus | 1:100 | Beckton Dickinson<br>D-Heidelberg |
| Lamin B1-AK | Huhn | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology,<br>D-Heidelberg |

**Tabelle II.1:** Darstellung der verwendeten Primärantikörper.

Die Primärantikörper KM1112 und KM1083 (Geschenk von Prof. K. Mikoshiba, Tokyo, Japan) wurden verwendet, um den $IP_3R1$ und den $IP_3R2$ in den Darmschnitten nachzuweisen. KM1112 ist ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen ein synthetisches Peptid gerichtet ist, welches zum humanen

COOH-terminalen Ende (ragt in das Zytoplasma) des $IP_3R1$ korrespondiert (Aminosäuresequenz 2,681-2,695). Auch KM1083 ist ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen ein synthetisches Peptid gerichtet ist, welches zum humanen COOH-terminalen Ende (ragt in das Zytoplasma) des $IP_3R2$ korrespondiert (Aminosäuresequenz 2,687-2,701). Westernblot-Untersuchungen zeigen, dass beide Antikörper auch spezifisch in der Ratte binden (Sugiyama et al. 1994). $IP_3R3$-AK ist ein polyklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen eine Aminosäuresequenz des N-terminalen Endes (ragt in das Zytoplasma) des humanen $IP_3R3$ gerichtet ist und diesen auch spezifisch in der Ratte detektiert (Angabe des Herstellers). Lamin B1-AK ist ein polyklonaler Antikörper aus dem Huhn, welcher gegen ein Peptid aus dem C-terminalen Ende des Proteins aus der Maus hergestellt wurde. Der Antikörper bindet das Lamin B1 auch spezifisch bei immunhistochemischen Analysen in der Ratte (Angabe des Herstellers).

| Sekundärantikörper | Wirt | Verdünnung | Hersteller |
|---|---|---|---|
| Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG | Ziege | 1:500 | Jackson Immunoresearch Laboratories, USA-West Grove |
| Alexa Fluor® 488 goat anti-chicken IgG | Ziege | 1:500 | Molecular Probes, USA-Oregon |
| EM Goat anti-Mouse IgG: 10nm Gold | Ziege | 1:50 | BBInternational UK-Cardiff |

**Tabelle II.2:** Darstellung der verwendeten Sekundärantikörper.

Der Cy3-conjugated Goat anti-Mouse IgG wurde zur Detektion der $IP_3R1$ bis 3 verwendet. Der Antikörper bindet spezifisch an die schweren und leichten Ketten von Maus IgG. Da er gegen Ratte adsorbiert wurde, ist eine unspezifische Gewebebindung unwahrscheinlich. Der Alexa Fluor® 488-gekoppelte Antikörper wurde an den Lamin B1-Antikörper gebunden. Er reagiert mit den schweren und leichten Ketten von Huhn IgG. Der Gold-konjugierte Antikörper wurde in der Elektronenmikroskopie eingesetzt und zur Detektierung der $IP_3R2$ genutzt. Der Antikörper reagiert mit Maus IgG und wurde gegen Ratte adsorbiert. Die Goldpartikel haben eine Größe von 10 nm.

Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurden so genannte Negativkontrollen durchgeführt. Bei diesen wurde die erste Inkubation (siehe Tabelle II.3, Tabelle II.4, Tabelle II.6) mit der Primärantikörper-Lösung ohne Zusatz des Primärantikörpers durchgeführt. Fluoreszenzsignale in den Negativkontrollen würden dann durch unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers hervorgerufen werden.

## 5.3. Fluoreszenz-Kernfarbstoff

Um eine bessere Orientierung in den Gewebeschnitten zu erreichen, wurden die Zellkerne mit DAPI (= 4`,6-Diamidino-2-phenylindol Dilaktat), einem Fluoreszenz-farbstoff, dargestellt. DAPI färbt die DNA der Zellkerne spezifisch und ist unabhängig von der Zellart (Kubista et al. 1987).

## 5.4. Fluoreszenzmarkierungen

### *5.4.1 Kryofixierung*

Die Darmpräparate wurden entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten und mit Cyanacrylkleber auf Plexiglashalter geklebt (Schultheiss et al. 2002). Die Plexiglashalter wurden dann zur Einbettung des Gewebes horizontal in die Gelatinelösung (siehe II.2.1.2) gelegt und vorsichtig randständig mit einer Kanüle perforiert. Nach Aushärten der Gelatine wurden kleine Blöcke (1 x 1cm) des Gelatine-Gewebe-Sandwiches mit einem spitzen Skalpell herauspräpariert.

Die Blöcke wurden dann mit einem Gefriereinbettmedium (= Tissue Tec) auf Kork aufgeblockt und für 2 min in stickstoffgekühltem Isopentan eingetaucht (Temperatur ca. -160 °C). Die gefrorenen Blöcke wurden bis zur Weiter-verarbeitung bei –70 °C aufbewahrt.

Die Methode der reinen Kryofixierung wurde gewählt, da eine chemische Fixierung mit 40 $g \cdot l^{-1}$ Paraformaldehyd (= PFA) zu einer starken Eigenfluoreszenz des Darmgewebes führte. Dadurch waren die Antikörpersignale nicht deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abzugrenzen.

### *5.4.2 Herstellung der Gewebeschnitte*

Die Herstellung der Gewebeschnitte erfolgte am Kryostaten (HM 500 O, MICROM, D-Walldorf). Es handelt sich hierbei um ein Gefriermikrotom, welches auf eine Betriebstemperatur von –24 °C in der Kühlkammer und –20 °C für den Objekthalter eingestellt wurde. Das gefrorene Gewebe wurde mit Tissue Tec auf einen beweglichen Objekthalter aufgeblockt. Es wurden 16 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf gelatinebeschichtete (siehe II.2.1.1), bei Raumtemperatur aufbewahrte Objektträger aufgenommen wurden. Die Schnitte wurden 1 h auf Eis getrocknet bevor sie gefärbt wurden.

### *5.4.3 Versuchsdurchführung / Färbeprotokolle*

#### *5.4.3.1 Einfachmarkierung*

Die Einfachmarkierung wurde angewandt, um die Lokalisation der $IP_3$-Rezeptorsubtypen im Kolonepithel zu untersuchen. Für die Waschschritte wurden die Objektträger in Objektträgerhalter aufgestellt. Als Reaktionsgefäße dienten schwarze verschließbare Färbeküvetten, die ein Fassungsvermögen von 200 ml hatten. Die Waschschritte wurden auf einem Schüttler (Polymax 1040, Heidolph, D-Schwabach) durchgeführt. Für die Inkubationsschritte wurden die Objektträger mit den Schnitten nach unten weisend auf die dafür speziell angefertigten Inkubationsplatten (institutseigene Herstellung aus transparentem Polycarbonat) angeordnet und in geschlossene, befeuchtete Blechkammern gelegt. Die Inkubationsplatten dienten dazu, Substanzen zu sparen, da die Lösungen hier in den Kapillarspalt zwischen den Objektträgern und der Inkubationsplatte gezogen werden, der ca. 200 µl fasst. Die Inkubationsplatten und die Färbeküvetten wurden vor jedem neuen Schritt unter fließendem Aqua dest. gereinigt und getrocknet, um jeweils eine Verschleppung der Substanzen in darauffolgende Lösungen zu vermeiden.

| | Schritt | Reagenz | Temperatur | Zeit |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Rehydrierung | Phosphatpuffer | Raumtemp. | 3 x 5 min |
| 2 | Blockung unspezifischer Bindungsstellen | Blocking-Lösung | Raumtemp. | 2 h |
| 3 | 1. Inkubation | Primärantikörper-Lösung + $IP_3R1$-3-AK | 4 °C | 36 h |
| 4 | Waschen | Phosphatpuffer | Raumtemp. | 3 x 5 min |
| 5 | 2. Inkubation | Sekundärantikörper-Lösung + Cy3 Goat anti-Mouse | Raumtemp. | 1 h |
| 6 | Waschen | Phosphatpuffer | Raumtemp. | 5 x 5 min |
| 7 | Kernfärbung | DAPI-Lösung | Raumtemp. | 5 min |
| 8 | Waschen | Phosphatpuffer | Raumtemp. | 5 x 5 min |
| 9 | Deckeln | 2 Tropfen Citifluor | Raumtemp. | |
| 10 | Lagerung | Im Dunkeln | 4 °C | Tage |

**Tabelle II.3:** Versuchsprotokoll für die einfache Fluoreszenzmarkierung.

*5.4.3.2 Doppelmarkierung*

Die Doppelmarkierungen wurden durchgeführt, um die Lokalisation der $IP_3$-Rezeptorsubtypen in den Kolonepithelzellen zu untersuchen. Neben den $IP_3$-Rezeptoren wurde das Protein Lamin B1 markiert (siehe Abbildung II.2). Lamin B1 gehört zur Familie der intermediären Filamente (= IF) und bildet mit anderen Laminen die nukleäre Lamina, die der inneren Kernmembran von innen anliegt (Moir et al. 2000).

Für die Wasch- und Inkubationsschritte wurden dieselben Techniken verwendet wie bei der Einfachmarkierung.

| | Schritt | Reagenz | Temperatur | Zeit |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Rehydrierung | Phosphatpuffer | Raumtemp. | 3 x 5 min |
| 2 | Blockung unspezifischer Bindungsstellen | Blocking-Lösung | Raumtemp. | 2 h |
| 3 | 1. Inkubation | Primärantikörper-Lösung + $IP_3R2$+3-AK und Lamin B1-AK | 4 °C | 36 h |
| 4 | Waschen | Phosphatpuffer | Raumtemp. | 3 x 5 min |
| 5 | 2. Inkubation | Sekundärantikörper-Lösung + Cy3 Goat anti-Mouse und Alexa Fluor® 488 goat anti-chicken | Raumtemp. | 1 h |
| 6 | Waschen | Phosphatpuffer | Raumtemp. | 5 x 5 min |
| 7 | Kernfärbung | DAPI-Lösung | Raumtemp. | 5 min |
| 8 | Waschen | Phosphatpuffer | Raumtemp. | 5 x 5 min |
| 9 | Deckeln | 2 Tropfen Citifluor | Raumtemp. | |
| 10 | Lagerung | Im Dunkeln | 4 °C | Tage |

**Tabelle II.4:** Versuchsprotokoll für die Doppel-Fluoreszenzmarkierung.

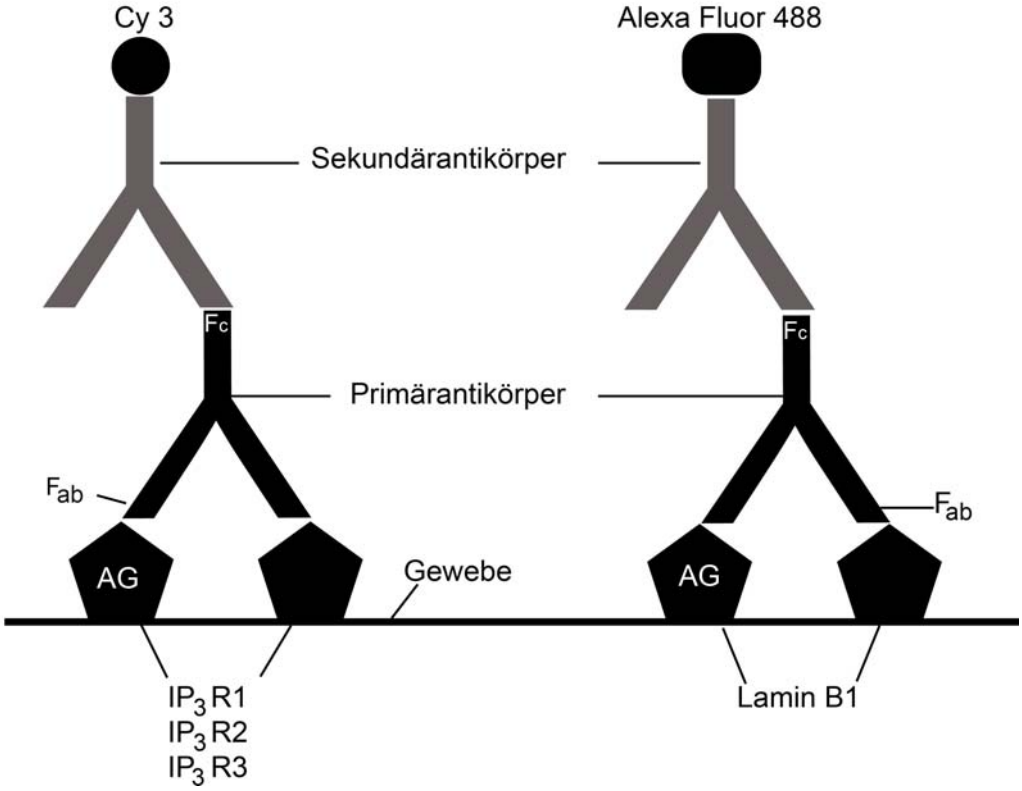



**Abbildung II.2:** Darstellung der in der Doppelmarkierung verwendeten Antikörper-Kombinationen.

### *5.4.4 Mikroskopie*

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Olympus BX50 Mikroskop analysiert. Zur Erzeugung der notwendigen Wellenlängen für die Anregung der entsprechenden Fluorophoren wurden spezielle Filter benötigt. Die Cy3-gekoppelten Antikörper wurden durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 510 - 530 nm angeregt und emittierten rotes Licht einer Wellenlänge von 630 - 660 nm. Die Alexa Fluor® 488-konjugierten (= Fluoreszein-Isothiocyanat-Konjugat) Antikörper konnten durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 450 - 490 nm angeregt werden. Sie emittierten grünes Licht einer Wellenlänge von 510 - 530 nm. Die Anregung des Kernfarbstoffes DAPI erfolgte durch gefiltertes Licht einer Wellenlänge von 358 nm. Er emittiert blaues Licht einer Wellenlänge von 461 nm.

Zur Bilddokumentation wurde eine digitale Schwarzweißkamera (Spot Insight, Visitron Systems, D-Puchheim) mit entsprechender Software (Spot Insight

Software, Diagnostic Instruments, Michigan, USA) verwendet. Entsprechend der emittierten Lichtfarbe wurden die Schwarzweißbilder mit Hilfe eines Softwareprogramms (Metamorph, Visitron Systems GmbH, D-Puchheim) eingefärbt. Zur Dokumentation erhielten demnach die $IP_3R1$-3-Signale eine rote, Lamin B1 eine grüne und DAPI eine blaue Farbe. Durch Übereinanderlegen der Einzelbilder einer Region konnte eine eventuelle Kolokalisation der Einzelsignale dargestellt werden. Dazu wurden gleiche Ausschnitte mit den drei Filtern fotografiert, eingefärbt und übereinander gelegt. Zur endgültigen Bildbearbeitung wurde die Adobe Photoshop Imaging-Software benutzt. Eine Befunddokumentation, wie die Erstellung von Bildtafeln, erforderte gegebenenfalls einen Farbabgleich oder eine Kontrastverstärkung mit dieser Software.

## 5.5. Immuno-Gold-Reaktion

### *5.5.1 Messeranfertigung*

Die Glasmesser wurden mit Hilfe eines Knife Maker LKB 7800B aus Ultramikrotomie-Glasstreifen (406 mm lang, 25 mm breit, 6 mm dick; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) hergestellt. Dazu wurden aus dem Glasstreifen erst Quadrate gebrochen, die dann weiter zu Dreiecken mit 45°-Neigung zur Bruchkante gebrochen wurden. An diese Messer wurde ein Messertrog zum Auffangen der Schnitte angebracht. Der Trog wurde aus Metallklebefolie hergestellt und mit Dentalwachs versiegelt.

### *5.5.2 Gridbefilmung*

Um eine bessere Haftung der Gewebeschnitte auf den Nickelgrids (100 mesh, Durchmesser 3,05 mm; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) zu gewährleisten, wurden diese mit 3 $g \cdot l^{-1}$ Formvar (in Chloroform gelöst) befilmt. Zur Herstellung des Films wurde ein gereinigter Objektträger in die Formvar-Lösung getaucht und gleichmäßig herausgezogen. Als der Objektträger getrocknet war, wurde der Formvar-Film angeritzt und der Objektträger in ein mit Aqua bidest. gefülltes Becherglas getaucht, so dass sich der Formvar-Film ablöste und auf dem Aqua

bidest. schwamm. Die Grids wurden auf den Film gelegt und dieser dann vorsichtig mit Parafilm aufgenommen und trocknen gelassen. Die Grids wurden bis zur Benutzung auf dem Parafilm belassen.

### *5.5.3 Gewebefixation*

Die Präparate wurden entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten und mit Cyanacrylkleber auf Plexiglashalter geklebt (Schultheiss et al. 2002). Die Plexiglashalter mit dem Gewebe wurden über Nacht bei 4 °C in der Fixationslösung (siehe II.2.2.2) inkubiert. Das Gewebe wurde dann gewaschen und aus dem Halter geschnitten. Dann wurde das Gewebe in kleine Streifen getrimmt (ca. 2 x 8 mm).

### *5.5.4 Gewebeeinbettung*

Die Darmpräparate wurden mit der PLT (= progressive lowering of temperature)-Methode in ein Acrylharz (Lowicryl HM20) eingebettet. Das Lowicryl HM20 erhält die Ultrastruktur und die Antigenität des Gewebes, wodurch es sehr gut für immunhistochemische Untersuchungen geeignet ist. Die Einbettung wurde bei Temperaturen unter 0 °C durchgeführt, wodurch die Denaturierung von Proteinen durch die Dehydrierung des Gewebes reduziert bzw. verhindert wird (Griffiths 1993).

| | Schritt | Medium | Temperatur (°C) | Dauer (h) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Dehydrierung | Ethanol 30 % (v/v) | 0 | 1 |
| 2 | Dehydrierung | Ethanol 50 % (v/v) | -20 | 1 |
| 3 | Dehydrierung | Ethanol 70 % (v/v) | -35 | 1 |
| 4 | Dehydrierung | Ethanol 90 % (v/v) | -35 | 1 |
| 5 | Dehydrierung | Ethanol 100 % (v/v) | -35 | 1 |
| 6 | Dehydrierung | Ethanol 100 % (v/v) | -35 | 1 |
| 7 | Infiltration | Ethanol/HM20 1:1 | -35 | 1 |
| 8 | Infiltration | Ethanol/HM20 1:2 | -35 | 1 |
| 9 | Infiltration | HM20 | -35 | 12 |
| 10 | Infiltration | HM20 | -35 | 2 |
| 11 | Überführung | HM20 | -35 | |
| 12 | Polymerisation | UV-Licht, in Gefriersubstitutionsmaschine | -35 | 24 |
| 13 | Nachpolymerisation | UV-Licht | 0 | 24 |

**Tabelle II.5:** Versuchsablauf der PLT mit HM20.

### *5.5.5 Schneiden*

Die Herstellung der Gewebeschnitte wurde am UltraCut (OmU2, Reichert; Wien, Österreich) durchgeführt. Die in Harz eingebettete Probe wurde in den Probenhalter gespannt. Unter dem Okular wurden die Proben mit Rasierklingen und Glasmessern so getrimmt, dass eine waagerechte, trapezförmige Probenfläche entstand. Um die allgemeine Struktur der Präparate zu untersuchen und um für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen geeignete Stellen zu finden, wurden Semidünnschnitte (1 - 2 µm) mit Toluidinblau (0,5 $g \cdot l^{-1}$ Toluidinblau + 0,5 $g \cdot l^{-1}$ Borax ($Na_2B_4O_5(OH)_4 \cdot 8H_2O$), Inkubation für 2 min auf einer Heizplatte) angefärbt. Von geeignet erscheinenden Arealen wurden Ultradünnschnitte (60 - 90 nm) hergestellt und auf die Nickelgrids aufgenommen.

### *5.5.6 Färbeprotokoll*

Die Färbung der Ultradünnschnitte wurde in einem verschließbaren Gefäß auf Parafilm durchgeführt, indem die Grids mit den Schnitten nach unten weisend auf Tropfen der entsprechenden Lösungen gelegt wurden.

| | **Schritt** | **Reagenz** | **Temperatur** | **Zeit** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Wässern | Aqua bidest. | Raumtemp. | 10 min |
| 2 | Ätzen | Ätzlösung | Raumtemp. | 5 min |
| 3 | Waschen | Aqua bidest. | Raumtemp. | 5 x 5 min |
| 4 | Blocken | Glycin-Puffer | Raumtemp. | 3 x 10 min |
| 5 | Blocken | Blocking-Lösung | Raumtemp. | 30 min |
| 6 | Waschen | BSA-Lösung | Raumtemp. | 10 min |
| 7 | 1. Inkubation | Primärantikörper-Lösung + $IP_3R2$-AK | 4 °C | 24 h |
| 8 | Waschen | BSA-Lösung | Raumtemp. | 5 x 5 min |
| 9 | 2. Inkubation | BSA-Lösung + EM Goat anti-Mouse IgG | Raumtemp. | 60 min |
| 10 | Waschen | BSA-Lösung | Raumtemp. | 5 x 5 min |
| 11 | Waschen | $PB_{EM}$ | Raumtemp. | 5 x 5 min |
| 12 | Waschen | Aqua bidest. | Raumtemp. | 4 x 5 min |
| 13 | Kontrastierung | Kontrastierungs-Lösung | 4 °C | 8 min |
| 14 | Waschen | Aqua bidest. | Raumtemp. | 6 x 3 min |

**Tabelle II.6:** Färbeprotokoll für die elektronenmikroskopische Untersuchung.

### *5.5.7 Elektronenmikroskopie*

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Gewebes erfolgte mit einem LEO 912 AB. Bei einem Elektronenmikroskop werden Ultrastrukturen des Gewebes mit Hilfe eines Elektronenstrahles sichtbar gemacht. Grundsätzlich ist es nicht möglich mit Strahlung einer bestimmten Wellenlänge Strukturen darzustellen, die kleiner sind als diese Wellenlänge. Abhängig von der Beschleunigung der Elektronen im Elektronenmikroskop, wird deren Wellenlänge derart stark reduziert, dass die Auflösung im Vergleich zum Lichtmikroskop ca. 100-fach verbessert wird. Das Grundprinzip eines Transmisssions-Elektronenmikroskops (= TEM) ähnelt dem eines Lichtmikroskops, mit Ausnahme der Größe und der umgekehrten Anordnung. Als Strahlenquelle dient im TEM eine Kathode, die am Ende einer zylindrischen Säule Elektronen emittiert. In dieser Säule wird zunächst ein Hochvakuum erzeugt, um die Streuung der Elektronen durch Luftmoleküle zu verhindern. Mittels einer Anode werden die Elektronen nach ihrer Emission beschleunigt und anschließend durch eine filterähnliche kleine Öffnung zu einem Elektronenstrahl gebündelt. Durch die in regelmäßigen Abständen in der Säule angebrachten Magnetspulen wird der Elektronenstrahl fokussiert, bevor er auf die durch eine Schleuse ins Vakuum eingebrachte Gewebeprobe trifft. Je nach Gewebedichte werden einige Elektronen abgelenkt, die anderen durchdringen das Gewebe und führen so zur Bildentstehung auf einer Fotoplatte bzw. einem phosphoreszierenden Schirm.

# 6 Imaging-Messungen

## 6.1. Kryptenpräparation

Für die Isolation der Krypten wurde der distale Teil des Kolons genutzt. Da das proximale Kolon eine Schrägstreifung der Schleimhaut aufweist (Lindstroem et al. 1977), kann das distale Kolon gut makroskopisch abgegrenzt werden. Das Mucosa-Submucosa-Präparat wurde entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten und anschließend mit Cyanacrylatkleber auf Plexiglashalter geklebt. Das Gewebe wurde nun für 6 – 8 Minuten, je nach Alter und Gewicht der Tiere, in der Isolationslösung (siehe II.2.3.2) bei 42 °C unter Carbogenbegasung inkubiert. Dann wurde der Halter in einen Vibromischer (Chemap, Volketswil, Schweiz) eingespannt und in

Auffangtyrode (siehe II.2.3.3) geschüttelt, so dass sich die Krypten von der Darmschleimhaut lösten. Mit Hilfe einer Mikropipette (10 – 100 µl) wurden 30 µl der Kryptensuspension unter optischer Kontrolle aufgenommen und auf runde, mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen aufgebracht (Schultheiss et al. 2002). Die 30 µl Kryptensuspension wurden mit Auffangtyrode auf 100 µl aufgefüllt. Die mit Krypten behafteten Deckgläschen wurden in Vorinkubationsschalen (Nunc Brand Products, Roskilde, Dänemark) bis zu 5 h im Kühlschrank aufbewahrt.

### 6.2. Kernisolation

Die Krypten wurden wie oben beschrieben isoliert und aufgefangen. In der Auffang-Tyrode wurden die Krypten 5 min bei 32·g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das so gewonnene Pellet (Größe ca. 200 µl) wurde in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und mit 1 ml gekühltem (4 °C) Low-saline-buffer (siehe II.2.5.1) überschichtet. Das Pellet wurde zuerst mit einer 1,2 mm Kanüle und dann mit einer 0,4 mm Kanüle homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 s bei 800·g zentrifugiert, um intakte Zellen von aufgebrochenen zu trennen. Der entstandene Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit gekühltem Low-saline-buffer aufgefüllt. Das Gemisch wurde bei 0 °C 12 min inkubiert und dabei alle 2 min geschwenkt. Das Gemisch wurde dann für 2 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die so präzipitierten Kerne wurden in 1 ml ICL mit ATP (siehe II.2.5.2) resuspendiert. Es wurden 90 µl der Kernlösung auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen aufgebracht. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

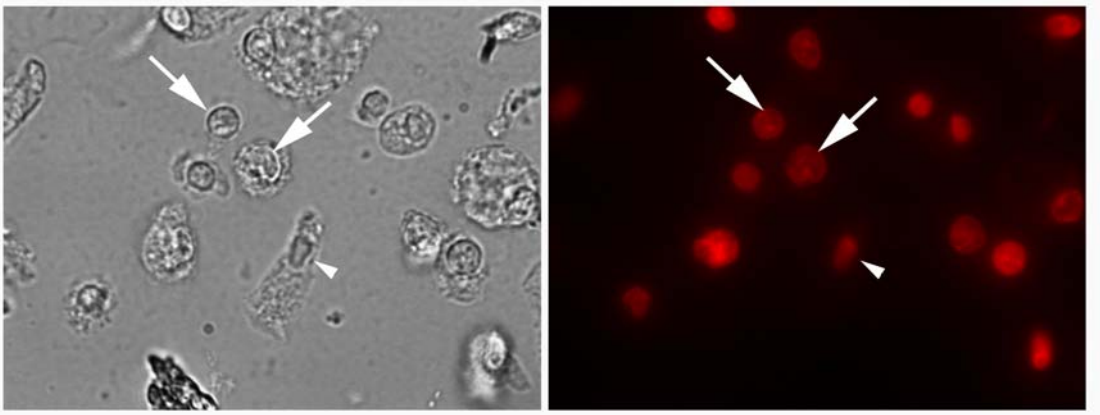


**Abbildung II.3:** Darstellung eines Kernpräparates. **A** stellt ein Transmissionsbild dar, **B** die entsprechende Propidiumjodid-Färbung. Die weißen Pfeile zeigen auf isolierte Kerne. Die weiße Pfeilspitze zeigt einen isolierten Enterozyten. Weiterhin sind in dem Präparat Zellkerne erkennbar, die von einem Zytoplasmarest umgeben sind.

Um die Beurteilung der Kernpräparate zu überprüfen, wurde an ihnen eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid durchgeführt, wodurch die DNA der Zellkerne rot angefärbt wurde. Die Zellkerne wurden 5 min mit der Propidiumjodid-Lösung (siehe II.2.5.3) inkubiert. Die Propidiumjodid-Färbung bewies, dass sich isolierte Zellkerne im Transmissionsbild gut von Zellresten unterscheiden ließen (siehe Abbildung II.3).

## 6.3. $Ca^{2+}$-Messung mittels $Ca^{2+}$-sensitiver Farbstoffe

### *6.3.1 Allgemeines*

Die Imaging Technik bietet die Möglichkeit, die intrazelluläre Konzentration freier Calciumionen kontinuierlich zu messen (Baylor and Hollingworth 2000). Damit stellt die Methode eine effiziente Möglichkeit zur Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion in lebenden Zellen dar.

Die Messung erfolgt mittels $Ca^{2+}$-sensitiver Farbstoffe, die erstmals von Roger Tsien (Tsien 1980) entwickelt wurden. Durch Modifikation des $Ca^{2+}$-Chelators EGTA erhielt er 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N‘,N‘-tetraessigsäure (= BAPTA), welches eine hohe Affinität zu $Ca^{2+}$ aufweist (Baylor and Hollingworth 2000). BAPTA bildet das Grundgerüst unterschiedlicher $Ca^{2+}$-chelierender

Fluoreszenzfarbstoffe. Die Fluoreszenzfarbstoffe können anhand ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften charakterisiert werden. Man unterscheidet die wellenlängenstabilen (= wavelength stable dyes) von den wellenlängenändernden (= wavelength shifting dyes) Fluoreszenzfarbstoffen. Bei wellenlängenstabilen Farbstoffen ändert sich bei $Ca^{2+}$-Bindung die Emissionsintensität, das Exzitations- und das Emissionsspektrum bleiben aber konstant. Mitglieder der Gruppe der wellenlängenändernden Fluoreszenzfarbstoffe ändern durch $Ca^{2+}$-Bindung entweder ihr Exzitations- oder ihr Emissionsspektrum (siehe Abbildung II.4).

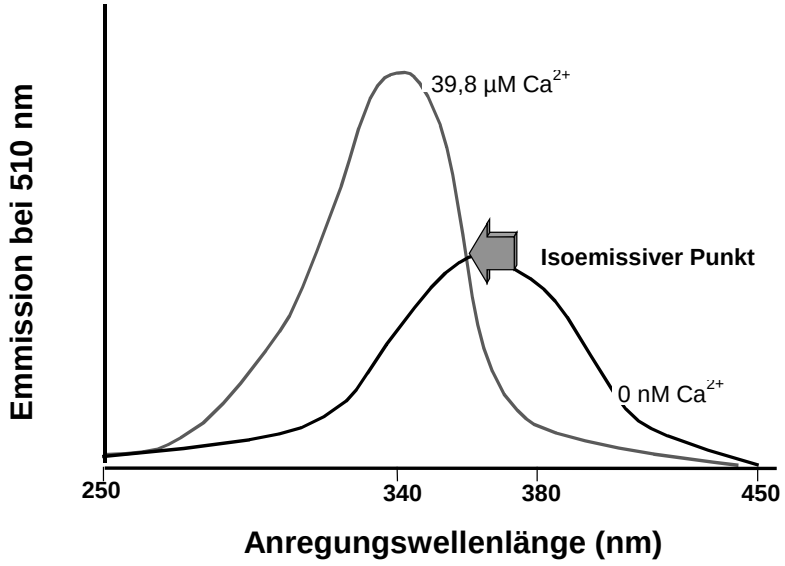



**Abbildung II.4:** Exzitationsspektren von Fura-2 bei verschiedenen $Ca^{2+}$-Konzentrationen.

Diese Verschiebung bietet die Möglichkeit, den $Ca^{2+}$-freien Farbstoffanteil von dem $Ca^{2+}$-gesättigten Farbstoffanteil zu unterscheiden und ist somit der entscheidende Vorteil, den die wellenlängenändernden Farbstoffe gegenüber den wellenlängen-stabilen Farbstoffen besitzen. Diese Eigenschaft wird für die Ratio (= Verhältnis)-messung genutzt. Bei der Ratio-Imaging-Technik wird der Quotient (= Ratio) aus

den gemessenen Emissionsintensitäten bei den beiden Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm gemessen. Dieser Quotient spiegelt das Verhältnis von gebundenem zu freiem Indikator wider.

Die Ratiomessung hat den Vorteil, dass viele Faktoren, welche die einfache Fluoreszenzmessung beeinflussen, minimiert werden. So wird die Bestimmung der $Ca^{2+}$-Konzentration von der absoluten Farbstoffkonzentration der Zelle und von morphologischen Faktoren wie Zelldicke unabhängig. Ebenso werden die Artefakte durch Ausbleichen oder durch Verlust des Farbstoffes vermindert (Tsien and Poenie 1986). Ein weiteres wichtiges Charakteristikum für die Wahl des Indikatorfarbstoffes ist die Dissoziationskonstante (= $K_d$). Sie beschreibt die Ionen-Konzentration, bei der 50 % des Farbstoffes das Zielion gebunden haben und ist somit ein Maß für die Affinität des Chelators zum Ion. Je kleiner die Dissoziationskonstante ist, desto stärker und selektiver ist das Chelat-Agenz.

Bei Fura-2 und bei Mag-Fura-2 handelt es sich um mehrfach negativ geladene Moleküle, welche nicht in der Lage sind, Zellmembranen zu permeieren. Um eine Farbstoffbeladung der zu untersuchenden Zellen ohne Schädigung der Zellmembran zu ermöglichen, wurden Acetoxymethylesterderivate der Fluoreszenzindikatoren entwickelt. Diese sind lipophil und somit membranpermeabel, können allerdings keine Calciumionen binden. In der Zelle wird der Fura-2 bzw. Mag-Fura-2 Acetoxymethylester durch zytoplasmatische Esterasen hydrolysiert. Da das Fura-2 bzw. Mag-Fura-2 Molekül nun membranimpermeabel ist, ist der Farbstoff in der Zelle „gefangen“ (Tsien and Poenie 1986).

### *6.3.2 Fura-2*

Fura-2 wurde zur $Ca^{2+}$-Messung im Zytosol der Darmepithelzellen und an isolierten Zellkernen verwendet. Das Exzitationsverhalten von Fura-2 zeigt die Abbildung II.4. Der freie Farbstoff hat sein Exzitationsmaximum bei 360 nm. Durch die Bindung von $Ca^{2+}$-Ionen verändert sich das Exzitationsmaximum zu einer Wellenlänge von 340 nm (Grynkiewicz et al. 1985). Da die Emissionsstärke der beiden Farbstoffvarianten bei 360 nm gleich sind (isoemissiver Punkt), kann man sie bei dieser Anregungswellenlänge nicht unterscheiden. Aufgrund dessen wählt

man für den freien Farbstoff eine Anregungswellenlänge von 380 nm. So erreicht man eine maximale dynamische Spannweite zwischen den beiden Farbstoffanteilen.

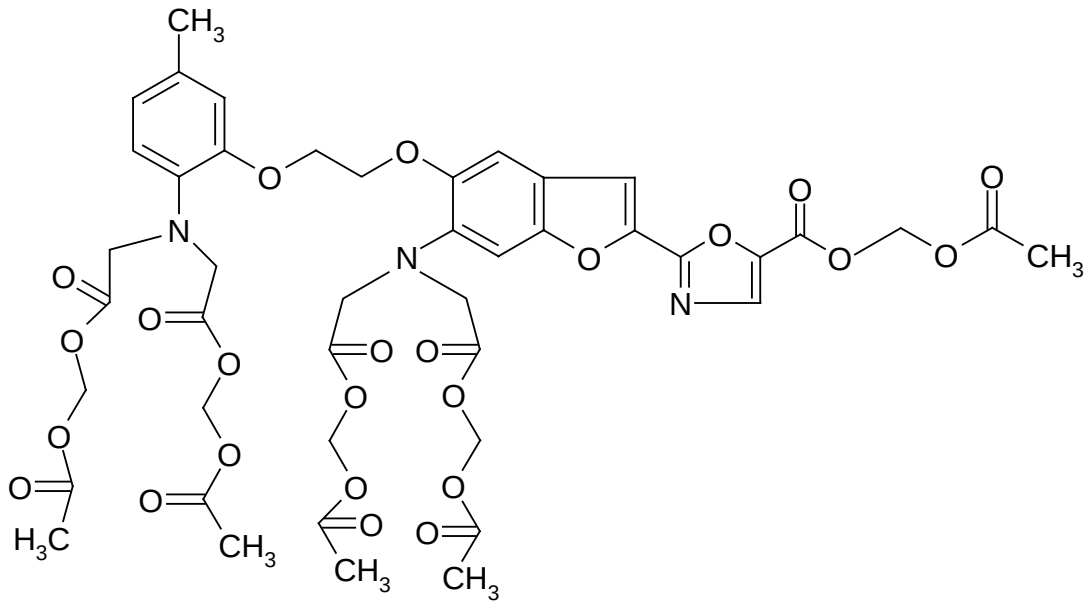



**Abbildung II.5:** Fura-2 Acetoxymethyl(= AM)ester

Das $Ca^{2+}$-affine BAPTA bildet das Grundgerüst des Chelators in Fura-2, wodurch es ein hoch selektiver $Ca^{2+}$-Indikator wird. Die $K_d$ für $Ca^{2+}$ von Fura-2 beträgt 224 $nmol \cdot l^{-1}$, so dass sein optimaler Messbereich zwischen ca. 22,4 $nmol \cdot l^{-1}$ und 2240 $nmol \cdot l^{-1}$ (siehe Abbildung II.6) liegt. Da die zytosolische $Ca^{2+}$-Konzentration im Ruhezustand bei ca. 100 $nmol \cdot l^{-1}$ liegt, kann Fura-2 optimal einen Anstieg der zytosolischen $Ca^{2+}$-Konzentration bei Entleerung der intrazellulären Speicher erfassen.

Aufgrund dieser $K_d$ spielt ein Übertreten von Farbstoff in die intrazellulären $Ca^{2+}$-Speicher keine Rolle, da hier eine $Ca^{2+}$-Konzentration von ca. 1,5 $mmol \cdot l^{-1}$ vorliegt und diese außerhalb des Messbereichs von Fura-2 (2,24 $nmol \cdot l^{-1}$ – 22400 $nmol \cdot l^{-1}$) liegt, das heißt, dass der Farbstoff in diesem Bereich gesättigt ist. Da sowohl intra- als auch extrazelluläre Kalibrierung von Fura-2-Signalen zur Berechnung der zytoplasmatischen $Ca^{2+}$-Konzentration mit vielen Ungenauigkeiten behaftet sind (so ist das Fluoreszenzsignal von intrazellulären Proteinen, pH und Osmolarität

abhängig; siehe Baylor and Hollingworth 2000), geht man mehr und mehr dazu über, nur die Fura-2-Ratio-Daten darzustellen und auf die problematische Umrechnung in echte $Ca^{2+}$-Konzentrationen zu verzichten; dieses Vorgehen wurde auch in der vorliegenden Arbeit gewählt.

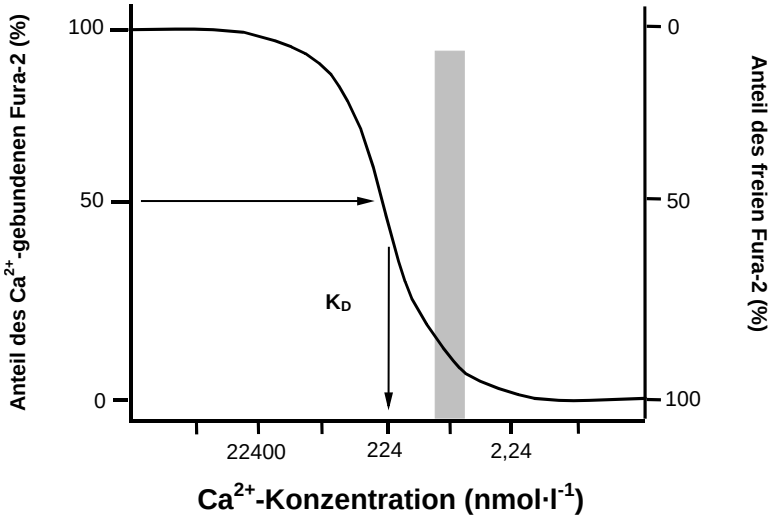



**Abbildung II.6:** Fura-2-Bindungskurve in Abhängigkeit von der $Ca^{2+}$-Konzentration. Die graue Säule markiert die intrazelluläre $Ca^{2+}$-Konzentration unter Ruhebedingungen.

### *6.3.3 Mag-Fura-2*

Mag-Fura-2 gehört zu den "lower-affinity-indicators". Das Grundgerüst bildet ein Tricarboxylat, welches das $Ca^{2+}$ mit drei Carboxylgruppen bindet und dem Mag-Fura-2 eine niedrige $Ca^{2+}$-Affinität verleiht (Baylor and Hollingworth 2000).

Die $K_d$ für $Ca^{2+}$ liegt bei ca. 20 $\mu mol \cdot l^{-1}$, so dass $Ca^{2+}$-Konzentrationen ab 3 $\mu mol \cdot l^{-1}$ gemessen werden können. Mag-Fura-2 ist mit einer $K_d$ von 1,9 $mmol \cdot l^{-1}$ auch affin zu $Mg^{2+}$ und ist somit sensitiv gegenüber $Mg^{2+}$ in einem millimolaren Konzentrationsbereich. Da die $Mg^{2+}$-Konzentration in ruhenden Zellen bei 0,5 - 2 $mmol \cdot l^{-1}$ liegt, kann diese mit Mag-Fura-2 gemessen werden (Hyrc et al. 2000).

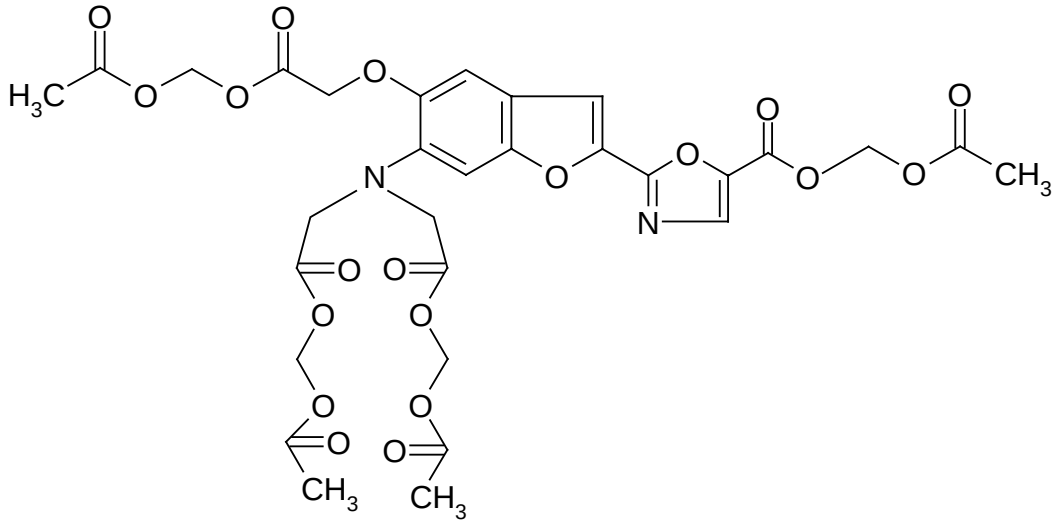


**Abbildung II.7**: Mag-Fura-2 Acetoxymethyl(= AM)ester

Der Farbstoff wird sowohl in Zellkompartimenten als auch im Zytosol angereichert. Durch Permeabilisierung der Zellen kann der zytosolische Farbstoff ausgewaschen werden, was durch eine Senkung des Fluoreszenzsignals überprüft werden kann (Hofer and Machen 1993). Um zu untersuchen, ob dennoch ein Teil des Signals aus dem Zytosol kommt, kann man den Zellen $Mn^{2+}$ zufügen, welches das Mag-Fura-2-Signal quencht (Hofer and Schulz 1996). Das gemessene Mag-Fura-2-Signal, welches dann aus den Speichern kommen muss, kann durch $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$ gleichermaßen hervorgerufen werden. Es wurde aber in Arbeiten gezeigt, dass $Mg^{2+}$ keine (Hofer and Machen 1994) bzw. nur sehr geringe (Hofer and Schulz 1996) Effekte bei $Ca^{2+}$-freien Mag-Fura-2 Messungen hatte. Mag-Fura-2 trägt das gleiche Fluorophor wie Fura-2 und zeigt den selben Wellenlängen-Shift durch $Ca^{2+}$-Bindung (siehe Abbildung II.4), wobei hier höhere $Ca^{2+}$-Konzentrationen zur Farbstoffsättigung vorliegen müssen.

### 6.4. Messstand

Die Calcium-Imaging-Messungen wurden an einem inversen Lichtmikroskop (Olympus IX-50, Olympus Optical, Japan) durchgeführt, das mit einem Epifluoreszenz-Setup und einer Imageanalyse-Software (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) ausgestattet ist (siehe Abbildung II.8). Zur Anregung der

$Ca^{2+}$-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe mit der entsprechenden Wellenlänge wurde eine Monochromatoreinheit (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) verwendet. Eine integrierte Xenon-Lichtquelle dient zur Generation von Lichtwellen, die über Spiegel in einen Lichtleiter gelenkt werden. Der Lichtleiter ist über einen Epifluoreszenz-Kondensor mit dem Mikroskop verbunden. Das Anregungslicht wird über einen dichroischen Spiegel (Grenzwellenlänge 410 nm) auf das Objekt gelenkt. Das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht (505-520 nm) kann durch den Spiegel treten und mit Hilfe einer CCD-Kamera (= charge coupled device; Till Photonics, Martinsried, Deutschland), die an das Mikroskop angeschlossen ist, detektiert werden. Die Kamera stellt die Verbindung zwischen optischem System und Software her. So können während der Messung fortlaufend „live displays“ aufgezeichnet werden, auf denen die Änderungen des intrazellulären $Ca^{2+}$-Spiegels zu beobachten sind.

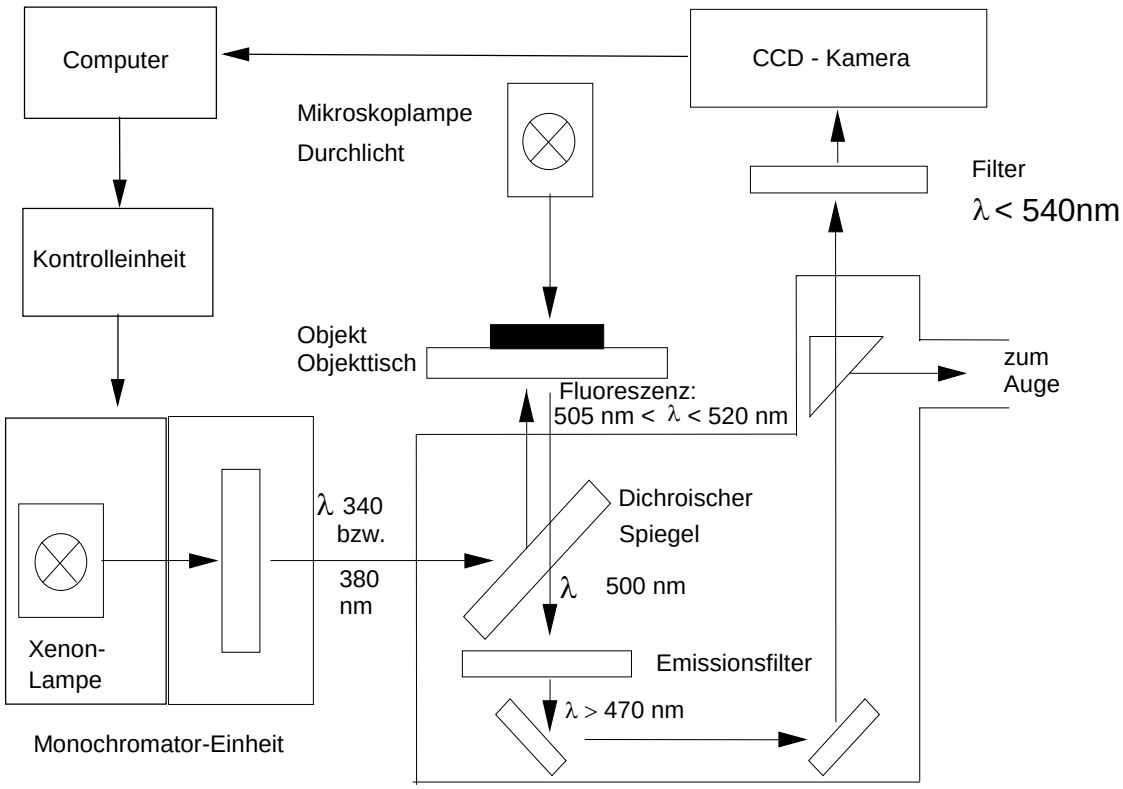



**Abbildung II.8:** Schematische Darstellung des optischen Systems für die $Ca^{2+}$-Messungen.

## 6.5. Messkammer und Perfusionssystem

Als Messkammern dienten Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland). In die Mitte des Schalenbodens wurde ein Loch von 10 mm Durchmesser gebohrt. Die zu untersuchenden Deckgläschen wurden mit Hilfe einer Silikonpaste (Baysilone®; Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) unter die gebohrte Öffnung der Zellkulturschalen geklebt. Die Schalen wurden in eine Halterung auf dem Objekttisch des Mikroskops eingesetzt. Die Standardlösungen wurden über Infusionsbestecke (LDKS Oversan Industria Biomedica S.p.A. Mailand, Italien), die in einer Kanüle endeten, hydrostatisch in die Messkammer geleitet. Der Zulauf erfolgte kontinuierlich mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 1 $ml \cdot min^{-1}$. Die meisten Stimulanzien und Blocker wurden manuell über ein Spritzen-Schlauch-System zugegeben. Um das Flüssigkeitsvolumen innerhalb der Messkammer konstant bei ungefähr 3 ml zu halten, war gegenüber dem Zulauf eine Absaugvorrichtung positioniert. Zu- und Ablaufvorrichtung waren mit einem Magneten am Objekttisch fixiert. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

## 6.6. Versuchsdurchführung

### *6.6.1 Messungen an isolierten Krypten*

Die Krypten wurden in den Vorinkubationsschalen entweder 1 h mit Fura-2 AM ($2{,}4 \cdot 10^{-6}$ $mol \cdot l^{-1}$) und 0,48 $g \cdot l^{-1}$ Pluronic® oder mit Mag-Fura-2 AM ($2{,}5 \cdot 10^{-6}$ $mol \cdot l^{-1}$) aufgeladen. Dann wurden die Deckgläschen in die Messkammer gebracht, und es wurde mit dem 20er Objektiv eine geeignete Krypte ausgewählt. Von der Krypte wurde mit Hilfe der Imagingsoftware ein Bild (= Snapshot) der Krypte auf den Monitor des Computers übertragen. Die Fluoreszenzintensität der Krypte wurde durch Falschfarben dargestellt, welche aufsteigend von schwarz bis rot reichten.

In diesem Bild wurden Messbereiche (= ROIs, regions of interest) markiert, deren Änderungen der $Ca^{2+}$-Konzentrationen im Verlauf des Experimentes aufgezeichnet wurden. Die ROIs wurden aus den drei Kryptenregionen Fundus, mittlere Region

und Oberflächenregion gewählt, so dass eine unterschiedliche Reaktion entlang der Kryptenachse untersucht werden konnte (siehe Abbildungen II.9).

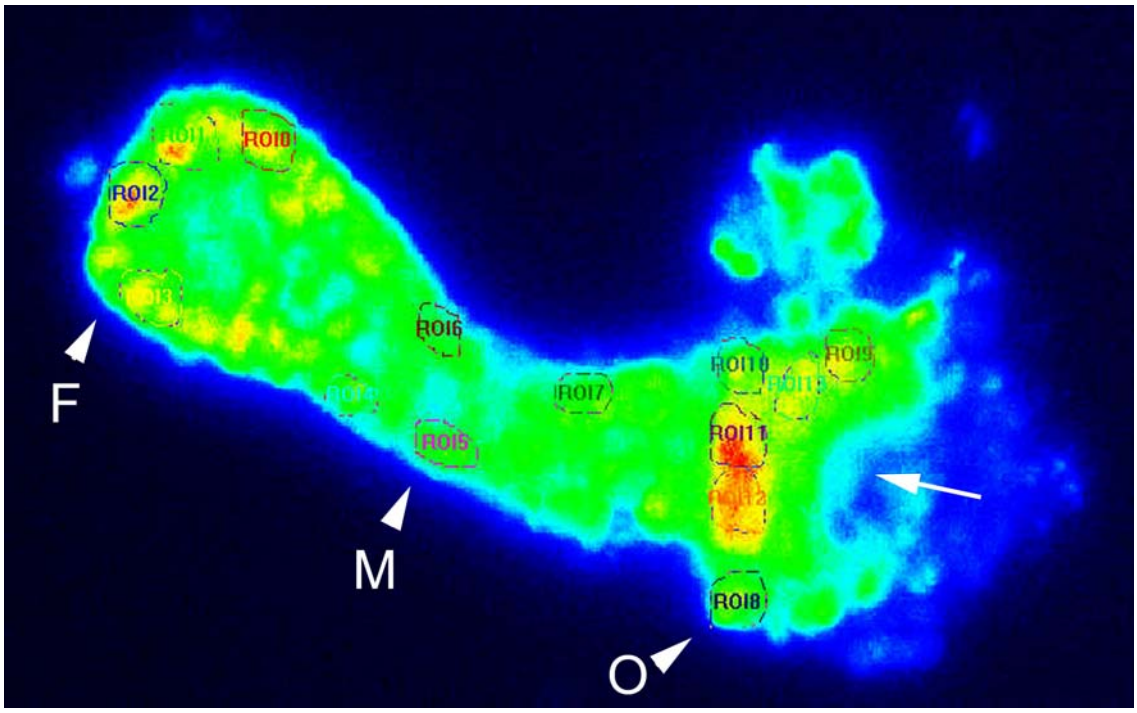



**Abbildung II.9:** Falschfarbendarstellung einer mit Mag-Fura-2 beladenen Krypte und die in den drei Regionen gekennzeichneten ROIs. F = Fundus, M = mittlere Region, O = Oberflächenregion, weißer Pfeil: Öffnung der Krypte zum Darmlumen.

Die Krypten wurden zu Beginn einer 140 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl/Tyrode-Lösung (siehe II.2.4.5) ausgesetzt, so dass sie sich in einem annährend physiologischen Milieu befanden. Erst nach Stabilisierung der Grundlinie wurden Lösungswechsel bzw. Substanzapplikationen vorgenommen.

### *6.6.2 Messungen an isolierten Zellkernen*

Die Zellkerne wurden in Vorinkubationsschalen in ICL mit ATP (siehe II.2.5.2) aufbewahrt. Zur Messung wurde der ATP-haltigen ICL 5 $\mu mol \cdot l^{-1}$ freies Fura-2 hinzugegeben und die Deckgläschen wurden in die Messkammer gebracht. Mit dem 63er Objektiv wurde eine Transmissionsaufnahme von den Zellkernen gemacht. Dadurch konnten die Zellkerne von Zelltrümmern unterschieden werden und es wurden ROIs markiert. Die Messungen wurden dann mit Fluoreszenzlicht der

Wellenlänge 340 bzw. 380 nm durchgeführt und es wurde die Ratio bestimmt. Die Messung wurde in der ICL mit ATP und mit 5 $\mu mol \cdot l^{-1}$ freiem Fura-2 gestartet, bis eine stabile Grundlinie erreicht war. Alle Substanzen wurden in dieser Lösung gelöst.

### *6.6.3 Stimulanzien*

#### *6.6.3.1 ATP*

Adenosin-5´-triphosphat ist ein Agonist von P2Y Purinoceptoren am Kolonepithel. Diese sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über eine Aktivierung der Phospholipase C die Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat bewirken (Fredholm et al. 1994; Ralevic and Burnstock 1998).

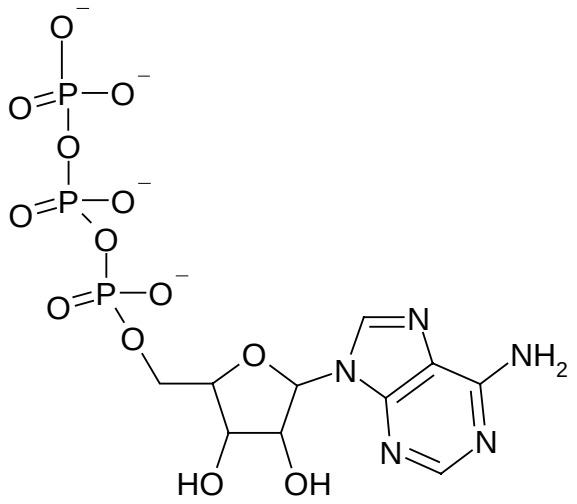



**Abbildung II.10:** Adenosin-5'-triphosphat

#### *6.6.3.2 $IP_3$*

Inositol-1,4,5-trisphosphat ist ein natürlicher Ligand des $IP_3$-Rezeptors. Durch die Bindung von $IP_3$ wird $Ca^{2+}$ aus den intrazellulären Speichern freigesetzt (Berridge 1993).

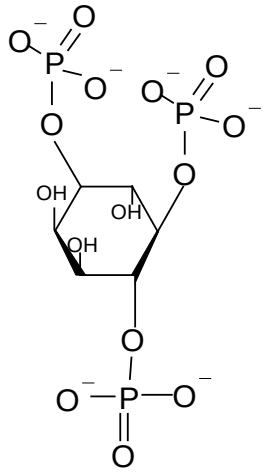


**Abbildung II.11:** Inositol-1,4,5-trisphosphat

*6.6.3.3 Adenophostin A*

Adenophostin A ist ein Agonist des $IP_3$-Rezeptors, welcher von Penicillium brevicompactum gebildet wird. Adenophostin A besitzt eine hundertfach stärkere Aktivität als der natürliche Ligand $IP_3$ (Takahashi et al. 1994).

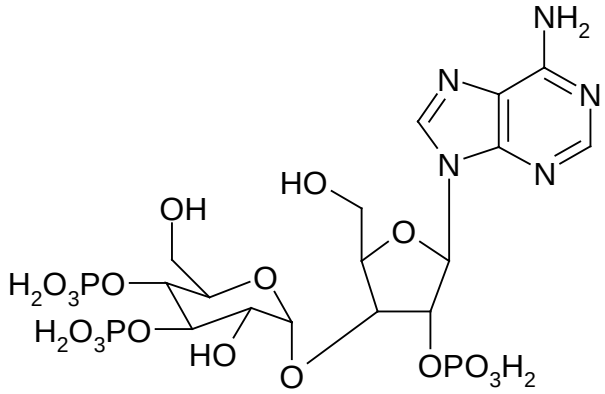


**Abbildung II.12:** Adenophostin A

### *6.6.4 Blocker*

*6.6.4.1 Heparin*

Heparin ist ein kompetitiver Antagonist des $IP_3$-Rezeptors, der besonders bei exogener Zugabe von $IP_3$ genutzt werden kann. Allerdings hat er noch weitere Wirkungen, wie zum Beispiel die Aktivierung von Ryanodinrezeptoren bei einer Konzentration über 0,4 $\mu mol \cdot l^{-1}$ (Taylor and Broad 1998).

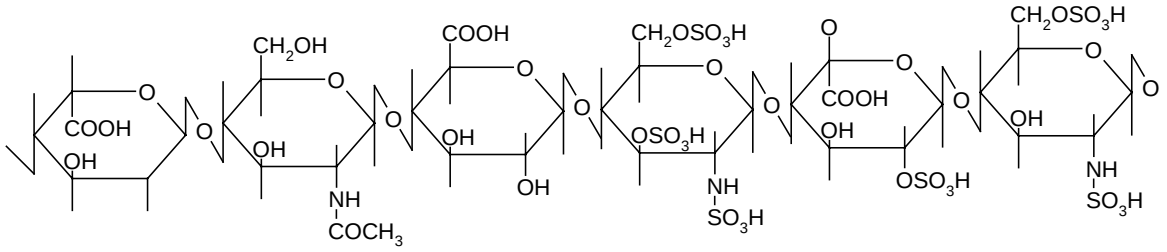



**Abbildung II.13:** Teil der Polysacharidkette, aus der Heparin besteht.

*6.6.4.2 2-APB*

2-APB (= 2-Aminoethoxy-diphenylborat) ist in vielen Zelltypen in der Lage, $IP_3$-Rezeptoren zu hemmen, ohne die Bindung von $IP_3$ an den Rezeptor zu unterbinden (Maruyama et al. 1997).

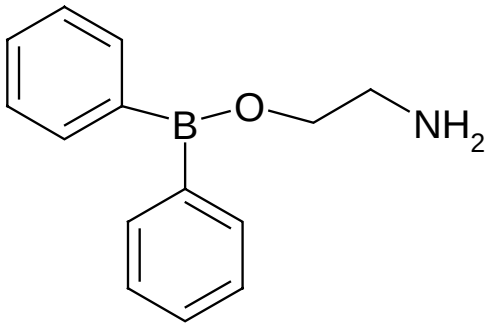



**Abbildung II.14:** 2-APB

## 6.7. Datenerfassung

Die Präparate wurden alternierend mit den Wellenlängen 340 und 380 nm angeregt. Für die Krypten wurde das 20er Objektiv verwendet und die Belichtungszeit betrug 20 ms. Die Zellkerne wurden nur 10 ms belichtet, da diese mit einem 63er Objektiv untersucht wurden. Die Sammelrate betrug 0,2 Hz, das heißt es wurden alle 5 s ein Bildpaar registriert. Die Emission wurde durch den dichroischen Spiegel zu einer CCD-Kamera geleitet und in digitale Bilder umgesetzt. Mit Hilfe der Imageanalysesoftware „TILLvisION“ (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) wurden die von der Kamera erfassten Daten in Zahlenwerte (= Fluoreszenzsignalstärke bzw. Ratiowerte) umgesetzt. Diese Daten wurden sowohl

tabellarisch als auch grafisch aufgezeichnet, so dass man anhand des Grafen kontinuierlich den Versuchsablauf verfolgen konnte. Zur weiteren Auswertung sind die Daten auf der Festplatte gespeichert worden.

### 6.8. Statistik

Die Ergebnisse wurden als Originalwerte oder als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (= SEM, standard error of the mean) dargestellt. In den Abbildungen sind die Fehlerbalken aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung dargestellt. Werden die Ergebnisse in Form von Messbalken gezeigt, so stellt die Höhe der Säule den Mittelwert, der Fehlerbalken den SEM dar.

N gibt die Anzahl der durchgeführten Kryptenpräparationen an und n die Anzahl der gemessenen Zellen bzw. Zellkerne. Der Vergleich der Daten mit den zeitabhängigen Kontrollen wurde mit dem paarigen t-Test durchgeführt. Sollten mehrere Gruppen miteinander verglichen werden, wurde eine Anova (= Analysis of variances) durchgeführt. Die Signifikanzen wurden dann durch eine lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test ermittelt (Sachs 1992). Gruppen, die sich in diesem Test als statistisch homogen erwiesen, wurden in den Abbildungen durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Berechnungen erfolgten mittels einer Statistik Software (Dataxiom Software Inc, Statmost 3,5 for Windows 95/NT).

# III. Ergebnisse

## 1 Immunhistochemische Untersuchung der Lokalisation der $IP_3$-Rezeptorsubtypen im Kolonepithel

In den ersten Experimenten wurde die Existenz und die Lokalisation der drei $IP_3$-Rezeptorsubtypen im Kolonepithel der Ratte anhand immunhistochemischer Färbungen (siehe Kapitel II.5) untersucht.

### 1.1. Lokalisation des $IP_3R1$ im Kolonepithel

Zur besseren Orientierung in den Gewebeschnitten wurden DAPI-Kernfärbungen durchgeführt. DAPI färbt die DNA der Zellkerne an, wodurch die Kerne blau dargestellt wurden. Die Nuklei der Kolonepithelzellen liegen im basalen Drittel der Zelle, der apikale Zellpol wird vom Zytoplasma gebildet. An den Epithelzellkernen orientiert bedeutet dies in den Bildern, dass sich der Großteil des Zytoplasmas vom Zellkern in Richtung Kryptenlumen erstreckt. Das Gewebe stellt sich in den Bildern A-I der Abbildung III.1 (sowie in allen folgenden Abbildungen der Kolonpräparate) mit dem Darmlumen nach unten weisend dar, so dass sich der Kryptenfundus im oberen Bildabschnitt befindet. Über dem Kryptenfundus liegt die Lamina muscularis mucosae, zwischen den Krypten zieht die Lamina propria bis zum Oberflächenepithel.

Der Typ 1 $IP_3$-Rezeptor konnte mit der Methodik der einfachen, indirekten Immunfluoreszenz nicht in den Epithelzellen des Kolons nachgewiesen werden. Die Bilder A und D zeigen starke $IP_3R1$-Signale in den glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae. Auch in den Myofibroblasten der Lamina propria waren Fluoreszenzsignale auszumachen. Dies zeigt, dass der Antikörper KM1112 (siehe Tabelle II.1) Epitope bei der Spezies Ratte erkennen kann. Die Bilder C und F verdeutlichen durch die Überlagerung der $IP_3R1$-Signale mit den DAPI-Bildern, dass die Fluoreszenzsignale nicht in den Epithelzellen zu finden sind, weder in den Kernen noch apikal davon im Zytoplasma.

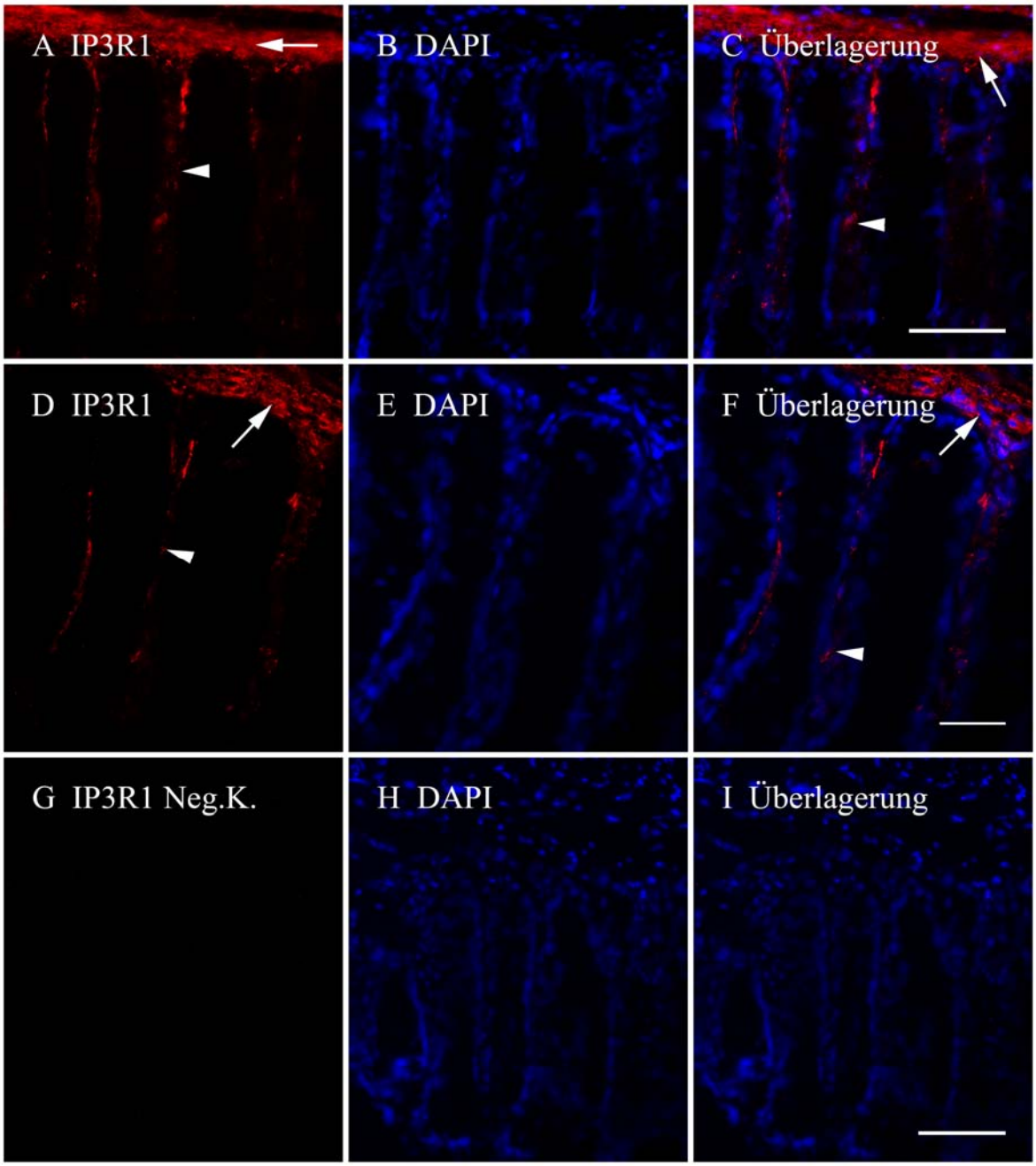



**Abbildung III.1:** Die Abbildung zeigt die Verteilung des $IP_3R1$ in der Kolonwand der Ratte. Im unteren Bildabschnitt befindet sich das Darmlumen, im oberen Bildabschnitt der Kryptenfundus und die Lamina muscularis mucosae. Die Bilder **A** und **D** stellen die Anfärbung des $IP_3R1$ dar, der durch die Ankopplung eines Cy3-Goat Anti-Mouse IgGs rot angefärbt ist. In den Bildern **B** und **E** sind die dazugehörigen DAPI-Färbungen abgebildet, wodurch sich die Zellkerne blau darstellen. **C** zeigt die Überlagerung von A und B, **F** die Überlagerung von D und E. In **G** ist die Negativkontrolle der $IP_3R1$-Färbung abgebildet, **H** zeigt die dazugehörige DAPI-Färbung und **I** die Überlagerung von G und H. Die Bilder C und F verdeutlichen, dass kein $IP_3R1$-Signal in den Epithelzellen nachzuweisen ist. Weiße Pfeile: Lamina muscularis mucosae; weiße Pfeilspitzen: Lamina propria; Eichbalken in C und I: 100 µm (gilt für A-C und G-I); Eichbalken in F: 50 µm (gilt für D-F).

### 1.2. Immunhistochemischer Nachweis des $IP_3R2$ im Kolonepithel

Im Unterschied dazu zeigte die Anfärbung des $IP_3R2$ mit dem Antikörper KM1083 ein deutliches Fluoreszenzsignal im Kolonepithel. Die Bilder A und D der Abbildung III.2 zeigen ein $IP_3R2$-Signal entlang der gesamten Kryptenachse, aber auch in der Lamina propria und in der Lamina muscularis mucosae. Die Überlagerung mit der DAPI-Kernfärbung in den Bildern C und F ergibt eine Überlagerung der $IP_3R2$-Signale mit den Epithelzellkernsignalen, wodurch es zu der violetten Mischfarbe kommt. Im Zytoplasma der Epithelzellen scheint kein Fluoreszenzsignal zu sein.

Um zu untersuchen, ob das dargestellte $IP_3R2$-Signal der Kernregion aus der Kernhülle oder aus dem Kernplasma stammt, wurde weiterführend eine Doppelfärbung mit dem Protein Lamin B1 durchgeführt. Dieses Protein ist Bestandteil einer elektronendichten Schicht, die zwischen der inneren Kernmembran und dem peripheren Chromatin liegt (Gerace et al. 1978). Da die nukleäre Lamina der inneren Kernmembran von innen anliegt, sollte die Lage des $IP_3R2$-Signals zu dem Lamin B1-Signal klären, aus welchem Teil des Kernes das Signal stammt.

Das Bild C der Abbildung III.3 zeigt, dass das $IP_3R2$-Signal vom Lamin B1-Signal umlagert wird, ohne dass es zu einer Signalüberlagerung und damit zu einem gelben Fluoreszenzsignal kommt. Das deutet darauf hin, dass das $IP_3R2$-Signal innerhalb der nukleären Lamina und damit im Kernplasma und nicht in der Kernhülle liegt (siehe auch Elektronenmikroskopie weiter unten).

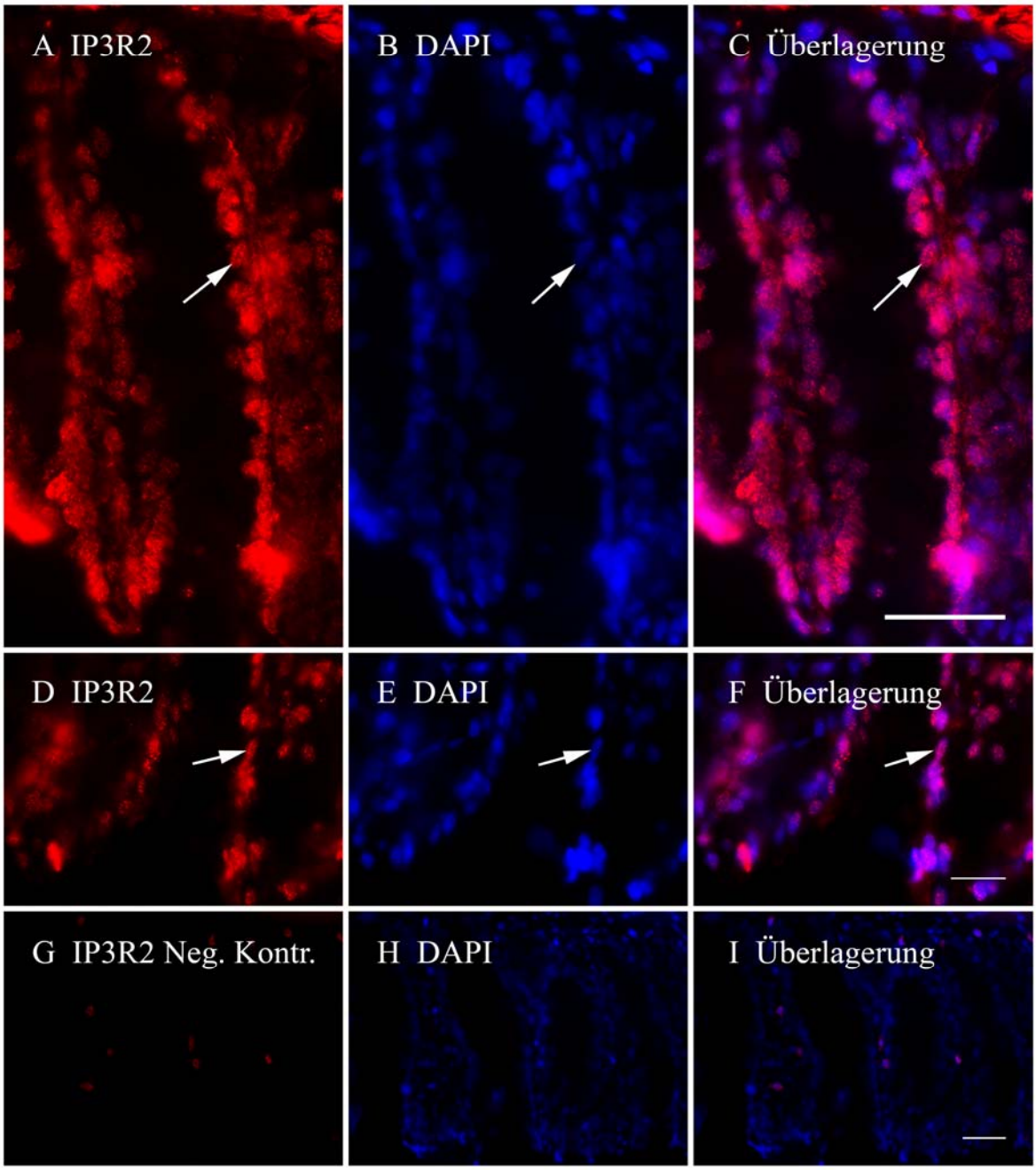



**Abbildung III.2:** Die Abbildung stellt die Verteilung des $IP_3R2$ im Kolonepithel der Ratte dar. In **A** und **B** ist der $IP_3R2$ rot dargestellt, da er mit einem Cy3-Goat Anti-Mouse IgG gekoppelt ist. **D** und **E** zeigen die dazugehörigen DAPI-Färbungen, in denen die Zellkerne blau angefärbt sind. Das Bild **C** zeigt die Überlagerung von A und B, das Bild **F** die Überlagerung von D und E. **G** zeigt die Negativkontrolle der $IP_3R2$-Färbung, **H** die entsprechende DAPI-Färbung und **I** die Überlagerung der beiden Bilder. Es wird deutlich, dass die roten $IP_3R2$-Signale (A und D, weiße Pfeile) mit den blauen Epithelzellkernsignalen (B und E, weiße Pfeile) überlagern und sich deswegen violett darstellen (C und F, weiße Pfeile). Unterer Bildabschnitt: Darmlumen; oberer Bildabschnitt: Kryptenfundus; Eichbalken in C und I: 50 µm (gilt für A-C und G-I); Eichbalken in F: 25 µm (gilt Für D-F).

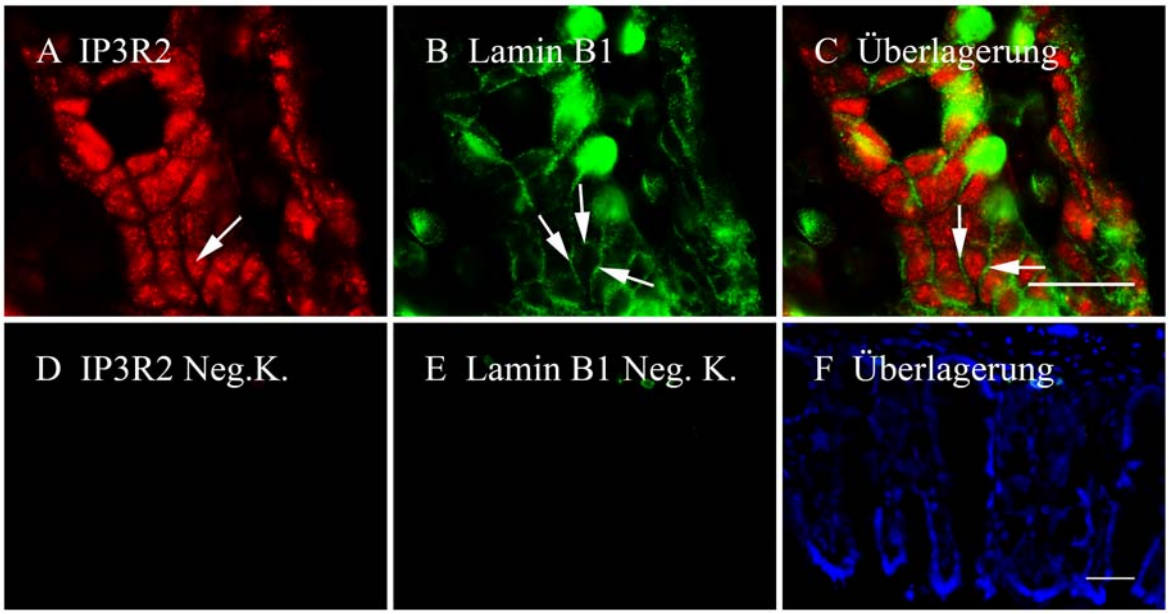



**Abbildung III.3:** Die Abbildung zeigt die Untersuchung der Lokalisation des $IP_3R2$ im Epithelzellkern. Im Bild **A** ist das $IP_3R2$-Signal durch die Kopplung mit einem Cy3-Goat Anti-Mouse IgG rot dargestellt. **B** zeigt das Lamin B1-Signal, welches durch die Bindung an Alexa Fluor® 488 goat anti-chicken IgG grün angefärbt ist. **C** zeigt die Überlagerung der Bilder A und B. **D** zeigt die Negativkontrolle der $IP_3R2$-Färbung, **E** die der Lamin B1-Färbung und **F** zeigt eine Überlagerung von D und E zusammen mit der DAPI-Kernfärbung, so dass sich die Zellkerne blau darstellen. In dem Bild C wird deutlich, dass die roten $IP_3R2$-Signale (A, weißer Pfeil) nicht mit den grünen Lamin B1-Signalen (B, weiße Pfeile) überlagern, da man hier das grüne Lamin B1-Signal deutlich um das rote $IP_3R2$-Signal lokalisiert sieht, ohne dass es zu einer Überlagerung und damit zu der Mischfarbe Gelb kommt (C, weiße Pfeile). Unterer Bildabschnitt: Darmlumen; oberer Bildabschnitt: Kryptenfundus; A-C: Anschnitt einer breiteren Epithelzellschicht; Eichbalken C: 25 µm (gilt für A-C); Eichbalken F: 50 µm (gilt für D-F).

Zur Verdeutlichung des Ergebnisses wurde eine Dreifachmarkierung mit $IP_3R2$, Lamin B1 und DAPI durchgeführt. In Bild D der Abbildung III.4 ist das überlagerte violette Fluoreszenzsignal des $IP_3R2$ und der Kerne deutlich vom grünen Fluoreszenzsignal des Lamin B1 abzugrenzen und von diesem umgeben.

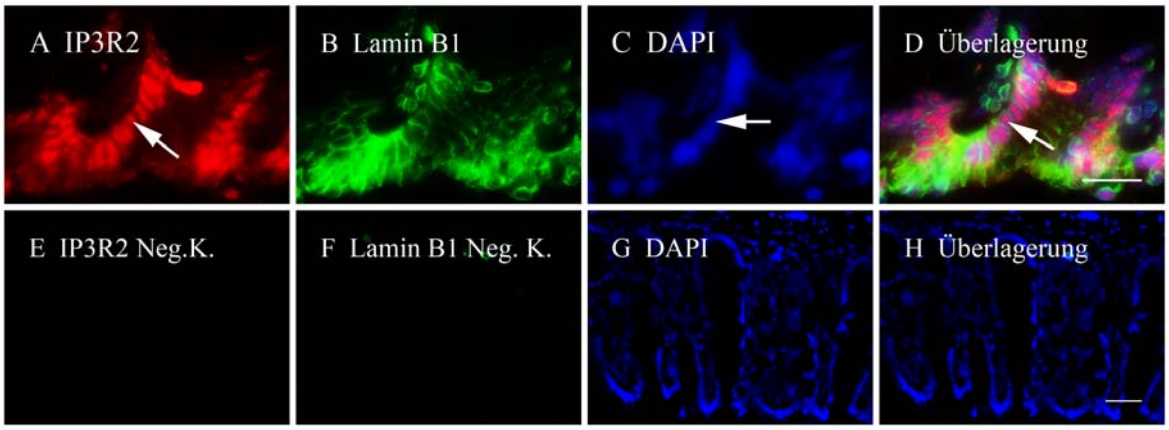



**Abbildung III.4:** Die Abbildung zeigt eine Dreifachfärbung des Epithelzellkernes zur Untersuchung des $IP_3R2$. Das Bild **A** zeigt das Signal des $IP_3R2$ durch die Ankopplung eines Cy3-Goat Anti-Mouse IgGs rot. In Bild **B** ist das Protein Lamin B1 mit einem Alexa Fluor® 488 goat anti-chicken IgG grün dargestellt. In Bild **C** sind die Zellkerne blau mit DAPI angefärbt. **D** zeigt eine Überlagerung der Bilder A, B und C. **E** zeigt die Negativkontrolle der $IP_3R2$-Färbung, **F** die Negativkontrolle der Lamin B1-Färbung und **G** die dazugehörige DAPI-Färbung. In **H** ist die Überlagerung der Bilder E, F und G dargestellt. In dem Bild D ist zu sehen, dass das rote $IP_3R2$-Signal (A, weißer Pfeil) mit dem blauen Kernsignal (C, weißer Pfeil) überlagert und ein violettes Signal ergibt (D, weißer Pfeil). Das grüne Lamin B1-Signal (B) ist dagegen weiterhin klar als grünes Signal zu erkennen, ohne eine Überlagerung mit den anderen Signalen aufzuweisen (D). Unterer Bildabschnitt: Darmlumen; oberer Bildabschnitt: Kryptenfundus; Eichbalken in D: 25 µm (gilt für A-D), Eichbalken in H: 50 µm (gilt für E-H).

Um die Lokalisation des $IP_3R2$ innerhalb des Epithelzellkernes zu untersuchen, wurde eine Immunogoldmarkierung auf elektronenmikroskopischer Ebene durchgeführt. In Abbildung III.5 ist eine elektronenmikroskopische Darstellung des Kolongewebes abgebildet, um eine Übersicht über das Gewebe zu geben. In A und C sind elektronenmikroskopische Bilder dargestellt. Zum besseren Verständnis des Gewebes wurden in B und D schematische Zeichnungen der elektronen-mikroskopischen Bilder gezeigt, in denen der Inhalt der Bilder A und C grob dargestellt ist.

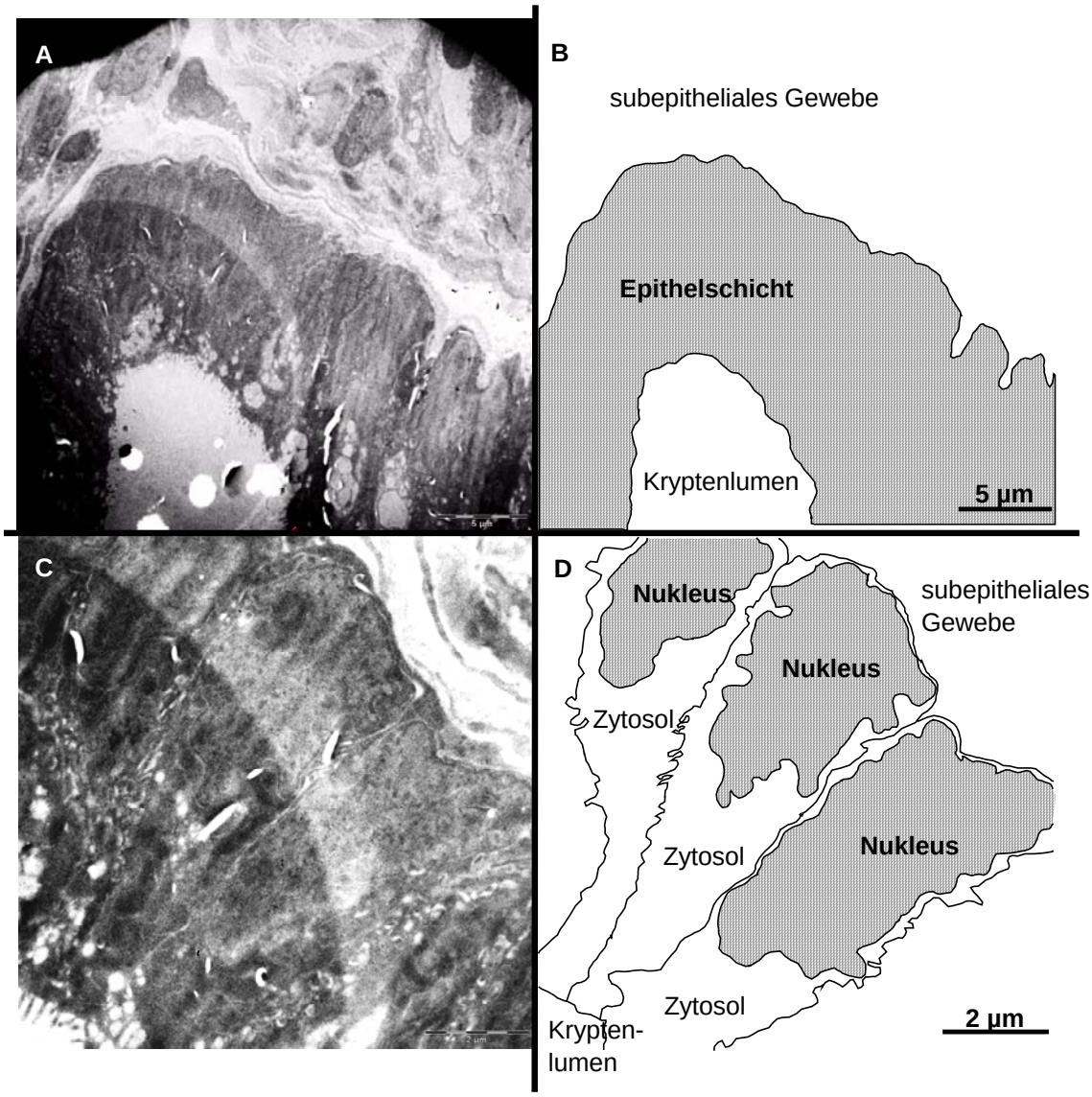



**Abbildung III.5:** Dargestellt sind Übersichtsaufnahmen der $IP_3R2$-Immunogoldmarkierung. Bild **A** zeigt den Queranschnitt einer Krypte, mit einzusehendem Kryptenlumen und angeschnittenem subepithelialem Gewebe. **B** zeigt eine schematische Zeichnung zu Bild A, um die angeschnittenen Strukturen zu verdeutlichen. In der Epithelzellschicht sind sowohl Enterozyten als auch Becherzellen zu sehen, wobei in der weiteren Untersuchung die Enterozyten betrachtet werden. Das Bild **C** zeigt eine größere Aufnahme von drei Enterozyten, das Bild **D** zeigt eine entsprechende schematische Darstellung. Links unten ist das Kryptenlumen mit hineinreichenden Mikrovilli erkennbar. Die Zellkerne der Enterozyten sind gut abgrenzbar, außerdem sieht man einige Vakuolen im Zytoplasma. Zum Teil ist der Intrazellularspalt zwischen den Interdigitationen (= fingerförmige Verzahnungen der Zellmembranen) geweitet und hier als weiße Räume gut zu sehen. Rechts oben ist ein Teil des subepithelialen Gewebes zu erkennen. Goldpartikel sind bei dieser geringen Vergrößerung nicht zu erkennen.

A zeigt eine quer angeschnittene Krypte. Im unteren Bildteil ist das Kryptenlumen zu sehen. Mittig liegt eine Epithelzellschicht mit Becherzellen und Enterozyten, deren Mikrovilli in das Kryptenlumen reichen. Unterhalb der Epithelschicht (im oberen Teil des Bildes) schließt sich das subepitheliale Gewebe mit Gefäßen, Nerven, lymphatischem Gewebe, Muskelzellen und Fibroblasten an. Bild C zeigt eine stärkere Vergrößerung von drei Enterozyten, die im weiteren Verlauf näher untersucht wurden. Die Zellkerne der Enterozyten sind gut abzugrenzen. Im Zytoplasma können bis auf einige Vakuolen keine Strukturen angesprochen werden. Im oberen Bildabschnitt ist subepitheliales Gewebe erkennbar. Links unten im Bild sind in das Kryptenlumen reichende Mikrovilli erkennbar. Bei Vergrößerungen dieser Stärke können noch keine Goldpartikel detektiert werden.

Abbildung III.6 zeigt in Bild A und C zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen einer starken Vergrößerung, in denen Zellkerne von Enterozyten dargestellt sind. In B und D sind schematische Zeichnungen der elektronenmikroskopischen Bilder gezeigt, um die abgebildeten Strukturen zu verdeutlichen.

Bild A zeigt deutlich eine Anreicherung von Goldpartikeln im Nukleoplasma eines Enterozytenkernes. Die Goldpartikel stellen sich elektronendicht und von gleichmäßiger Form dar. Zur Hervorhebung der Signale wurde eine Ausschnittsvergrößerung eingeblendet, in der die Goldpartikel gut zu detektieren sind. Einige Goldpartikel stellen sich im Zytoplasma dar, in dem keine Zellstrukturen erkennbar sind. An der Kernhülle sind keine Goldpartikel lokalisiert. In Bild C ist ein Enterozytenkern mit einer stärkeren Kontrastierung dargestellt. Im Nukleoplasma finden sich zahlreiche Goldpartikel. Durch eine Ausschnittsvergrößerung werden die Goldcluster deutlicher sichtbar. Auch die in diesem Bild besser abzugrenzenden Kernmembranen weisen keine Goldmarkierung auf.

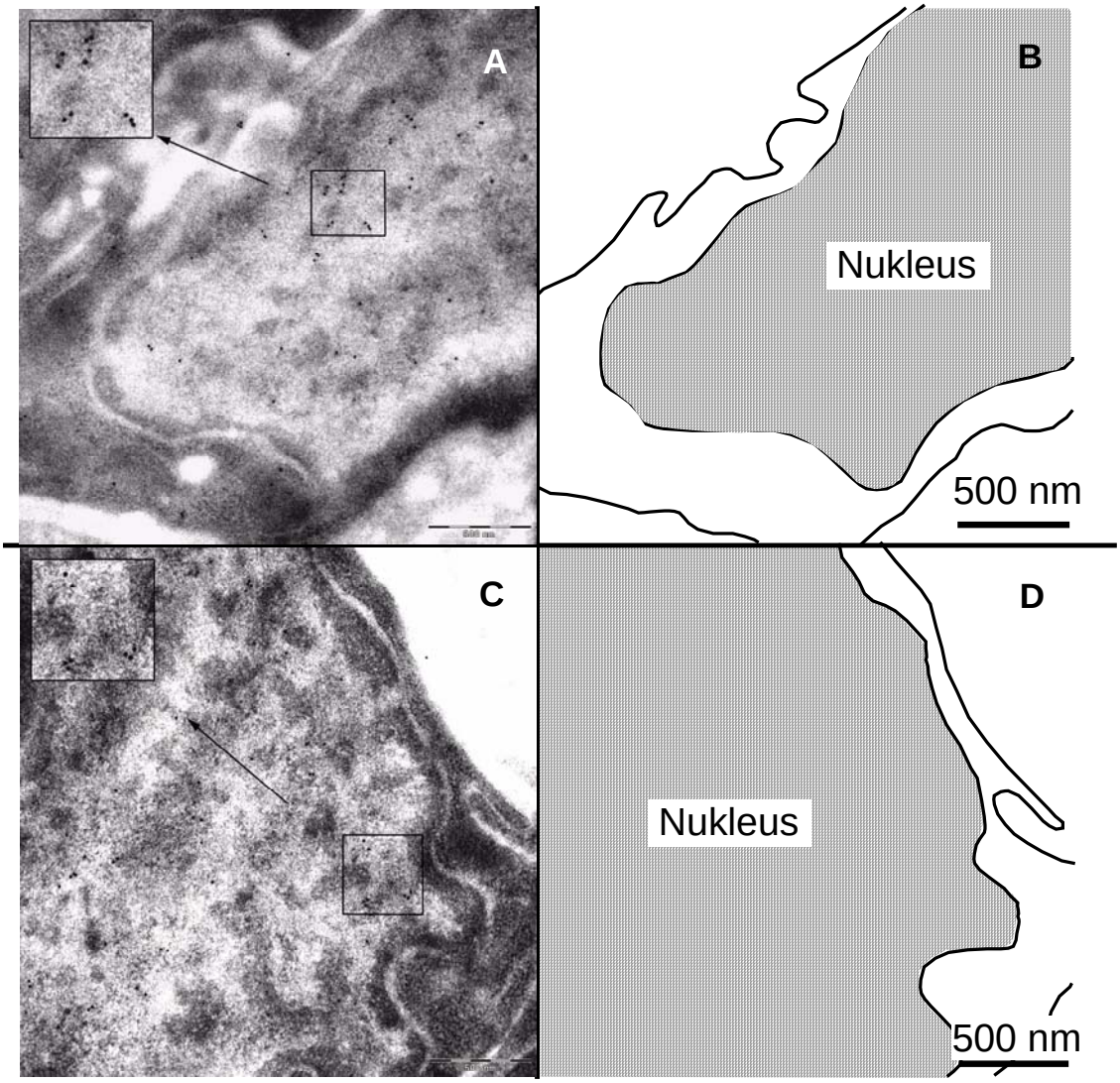



**Abbildung III.6:** Die Bilder **A** und **C** zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Enterozytenzellkernen. **B** und **D** stellen schematische Zeichnungen von A und C dar. In Bild **A** ist eine große Anzahl der 10 nm großen Goldkörner im Zellkern zu erkennen. Diese sind durch ihre Elektronendichte und ihre gleichmäßige Form gut als solche einzuordnen. Links oben im Bild ist eine Ausschnittsvergrößerung dargestellt. Auch im Zytoplasma sind einige Goldkörner zu sehen. In B ist der Zellkern mit dem umliegenden Zytoplasma und der Zellmembran dargestellt. Bild C zeigt einen anderen Enterozytenkern, bei dem die Goldpartikel durch die stärkere Kontrastierung schwerer zu erkennen sind. Auch hier wurde eine Ausschnittsvergrößerung vorgenommen, wodurch man die kleinen Goldcluster gut erkennen kann. In Bild **D** ist der Zellkern, das Zytoplasma und die Zellmembran schematisch dargestellt.

### 1.3. Lokalisation des $IP_3R3$ im Kolonepithel

Die Markierung der Typ 3 $IP_3$-Rezeptoren mit dem Anti-$IP_3R3$-Antikörper bewies das Vorhandensein des $IP_3R3$ in den Epithelzellen des Kolons. Die Bilder A und D der Abbildung III.7 zeigen das $IP_3R3$-Signal, welches eine unterschiedliche Verteilung entlang der Kryptenachse aufweist. Im Oberflächenepithel und im oberen Drittel der Krypte zeigt sich ein deutliches $IP_3R3$-Signal, welches sich entlang der Kryptenachse in Richtung Fundus stark dezimiert bzw. dort mit dieser Methodik gar nicht nachweisbar ist.

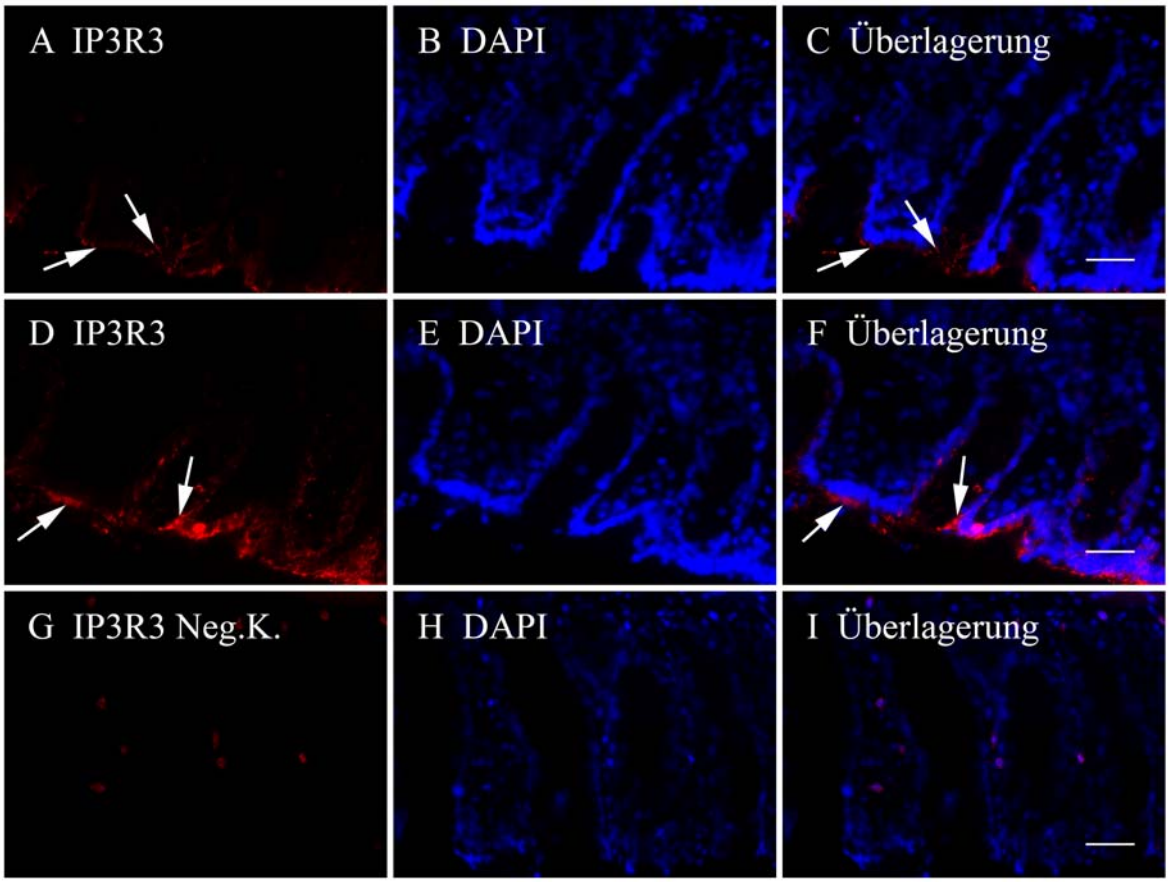



**Abbildung III.7:** Die Abbildung zeigt die Verteilung des $IP_3R3$ im Kolonepithel. In **A** und **D** ist der $IP_3R3$ durch den Farbstoff Cy3 rot dargestellt. **B** und **E** zeigen die entsprechenden DAPI-Färbungen, wodurch die Zellkerne blau gefärbt sind. **C** zeigt die Überlagerung von A und B, **F** die Überlagerung von D und E. In Bild **G** ist die Negativkontrolle der $IP_3R3$-Färbung gezeigt. **H** zeigt die dazugehörige DAPI-Färbung, **I** die Überlagerung von G und H. Unterer Bildabschnitt: Darmlumen; oberer Bildabschnitt: Kryptenfundus; weiße Pfeile: $IP_3R3$-Signal; Eichbalken C, F und I: 50 µm (gilt für A-I).

Um die genauere Lokalisation des $IP_3R3$ in der Epithelzelle zu untersuchen, wurde eine Doppelmarkierung mit Lamin B1 durchgeführt. Das Bild C der Abbildung III.8 zeigt, dass die $IP_3R3$-Markierung keine Überlagerung und damit keine Kolokalisation mit der Lamin B1-Markierung aufweist, da es zu keiner Mischfarbenbildung kommt. Die Bilder A bis C zeigen Oberflächenepithel, wobei sich das Darmlumen im unteren Bildabschnitt befinden würde. Das $IP_3R3$-Signal liegt also im apikalen Pol der Epithelzelle.

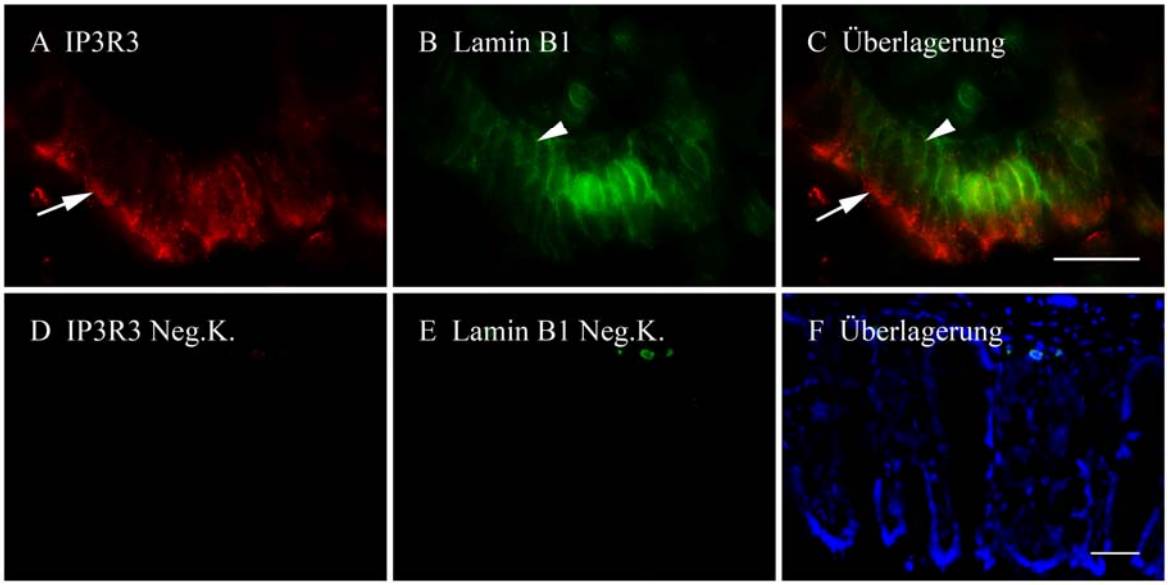



**Abbildung III.8:** Die Abbildung zeigt die Lokalisation des $IP_3R3$ in der Kolonepithelzelle. Das Bild **A** zeigt den $IP_3R3$ durch die Färbung mit Cy3-Goat Anti-Mouse IgG rot. In **B** ist das Protein Lamin B1 mit Alexa Fluor® 488 goat anti-chicken IgG grün gefärbt. **C** zeigt die Überlagerung von A und B. In Bild **D** ist die Negativkontrolle der $IP_3R3$-Färbung dargestellt, in **E** die Negativkontrolle der Lamin B1-Färbung und in **F** die Überlagerung von D und E zusammen mit der entsprechenden DAPI-Färbung, wodurch die Zellkerne blau dargestellt sind. Das Bild C zeigt deutlich, dass das rote $IP_3R3$-Signal (A, weißer Pfeil) und das grüne Lamin B1-Signal (B, weiße Pfeilspitze) nicht kolokalisiert sind (C, weiße Pfeilspize und weißer Pfeil). Unterer Bildabschnitt: Darmlumen; oberer Bildabschnitt: Kryptenfundus; Eichbalken in C: 25 µm (gilt für A-C), Eichbalken in F: 50 µm (gilt für D-F).

## 2 Funktionelle Auswirkungen des $IP_3R3$-Gradienten entlang der Kryptenachse

### 2.1. Rezeptorvermittelte Stimulation des $IP_3$-Signalweges

Um zu untersuchen, ob der morphologisch nachgewiesene $IP_3R3$-Gradient einen funktionellen Gradienten entlang der Kryptenachse verursacht, wurden mittels der $Ca^{2+}$-Imaging-Technik die $Ca^{2+}$-Konzentrationsänderungen in unterschiedlichen Kryptenabschnitten (Fundus, mittlere Region, Oberflächenregion) gemessen und miteinander verglichen.

Es wurde eine rezeptorvermittelte Stimulation des $IP_3$-Signalweges durchgeführt, indem mit Fura-2 AM aufgeladene isolierte Krypten mit ATP (siehe Kap.II.6.6.3.1) stimuliert wurden. ATP bindet an der basolateralen Membran der Krypten des distalen Kolons an P2Y-Rezeptoren (Leipziger et al. 1997).

ATP (0,1 $mmol \cdot l^{-1}$) induzierte in allen drei Kryptenregionen einen signifikanten Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}$-Konzentration. Die Mittelwerte zeigten Tendenzen zu einer stärkeren Antwort im Fundusbereich, die zur Oberfläche hin kleiner zu werden scheint (siehe Abbildung III.9). Die Unterschiede in der Höhe des $Ca^{2+}$-Konzentrationsanstieges an den drei Kryptenabschnitten waren aber, bedingt gerade durch die hohe Variabilität im Fundus- und Mittelbereich, nicht signifikant ($P > 0,05$; Scheffé-Test).

Daher wurden Experimente mit einer höheren ATP-Konzentration durchgeführt (1 $mmol \cdot l^{-1}$), um zu untersuchen, ob sich durch den stärkeren Stimulus die angedeutete Tendenz vergrößern ließe. An allen drei Abschnitten der Krypte induzierte ATP in dieser hohen Konzentration einen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses, und zwar um $8,37 \cdot 10^{-2} \pm 1,48 \cdot 10^{-2}$ ($n = 19$) im Bereich des Fundus, um $7,76 \cdot 10^{-2} \pm 1,42 \cdot 10^{-2}$ ($n = 13$) im Bereich der Mitte und um $6,50 \cdot 10^{-2} \pm 1,36 \cdot 10^{-2}$ ($n = 12$) im Bereich der Oberfläche. Die Unterschiede in der Höhe der Antwort waren statistisch nicht signifikant ($P > 0,05$; Scheffé-Test); mit anderen Worten, der immunhistochemisch nachgewiesene $IP_3R3$-Gradient hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Höhe des durch ATP-induzierten Anstiegs der zytosolischen $Ca^{2+}$-Konzentration.

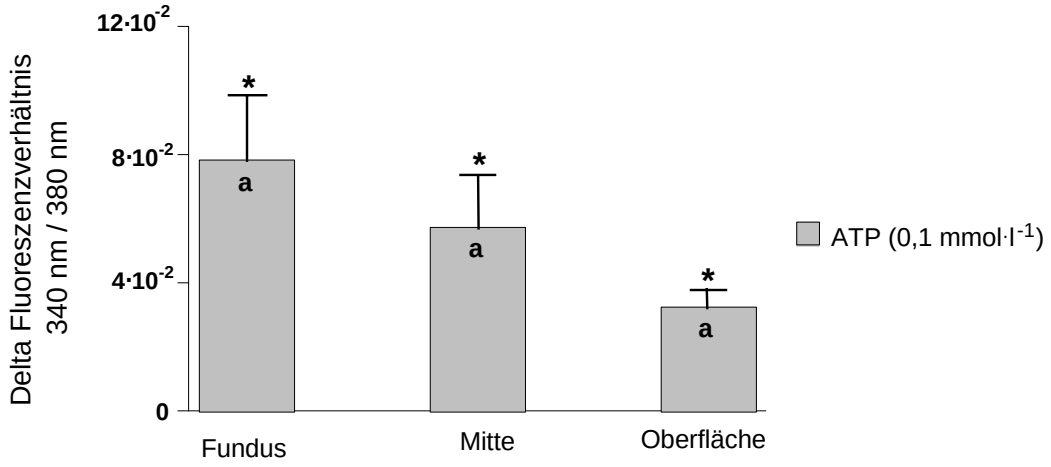



**Abbildung III.9:** ATP induzierte in der Konzentration 0,1 mmol·l$^{-1}$ in allen drei Kryptenregionen einen Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}$-Konzentration. In diesem Diagramm ist die Differenz zwischen der Grundlinie des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses vor der Stimulation und dem Fluoreszenzverhältnis nach ATP-Gabe dargestellt; Fundus: $7{,}86 \cdot 10^{-2} \pm 2{,}03 \cdot 10^{-2}$ mit n = 32; Mitte: $5{,}76 \cdot 10^{-2} \pm 1{,}65 \cdot 10^{-2}$, n = 22; Oberfläche: $3{,}24 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}57 \cdot 10^{-2}$ mit n = 19; N = 7. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM; * = P < 0,05 (paariger t-Test) vs. Grundlinie vor Stimulation. Gleiche Buchstaben kennzeichnen statistisch homogene Gruppen (lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test). Wegen der problematischen Kalibrierung von Fura-2-Daten (Baylor and Hollingworth 2000; siehe Methodik), wurde auf eine Umrechnung der Ratio-Daten in zytoplasmatische $Ca^{2+}$-Konzentrationen verzichtet.

Um herauszufinden, ob sich der $IP_3R3$-Gradient eventuell auf die Schnelligkeit der $Ca^{2+}$-Freisetzung auswirken kann, wurde die Geschwindigkeit der $Ca^{2+}$-Freisetzung mittels Differenzierung des Fura-2-Signals gegen die Zeit errechnet.

Betrachtet man die Veränderungen des Fluoreszenzverhältnisses pro Sekunde, so zeigten die Antworten nach Stimulation mit 0,1 mmol·l$^{-1}$ ATP ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kryptenregionen (Fundus: $1{,}11 \cdot 10^{-3} \pm 0{,}17 \cdot 10^{-3}$ s$^{-1}$, n = 32; Mitte: $1{,}18 \cdot 10^{-3} \pm 0{,}19 \cdot 10^{-3}$ s$^{-1}$, n = 22; Oberfläche: $0{,}79 \cdot 10^{-3} \pm 0{,}05 \cdot 10^{-3}$ s$^{-1}$, n = 19; N = 7; P > 0,05 (Scheffé-Test). Nach der Stimulation mit 1 mmol·l$^{-1}$ ATP reagierten die Fundusregion ($1{,}58 \cdot 10^{-3} \pm 0{,}31 \cdot 10^{-3}$ s$^{-1}$, n = 19) und die mittlere Region ($1{,}88 \cdot 10^{-3} \pm 0{,}36 \cdot 10^{-3}$ s$^{-1}$, n = 13) gleich schnell (P > 0,05; Scheffé-Test). Die Oberflächenregion ($0{,}55 \cdot 10^{-3} \pm 0{,}24 \cdot 10^{-3}$ s$^{-1}$, n = 12) reagierte langsamer und zeigte gegenüber der höheren Reaktionsgeschwindigkeit der mittleren Region

eine Signifikanz (P < 0,05; Scheffé-Test). Zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit der Oberflächenregion und der Fundusregion bestand dagegen keine Signifikanz (P > 0,05; Scheffé-Test, siehe Abbildung III.10).

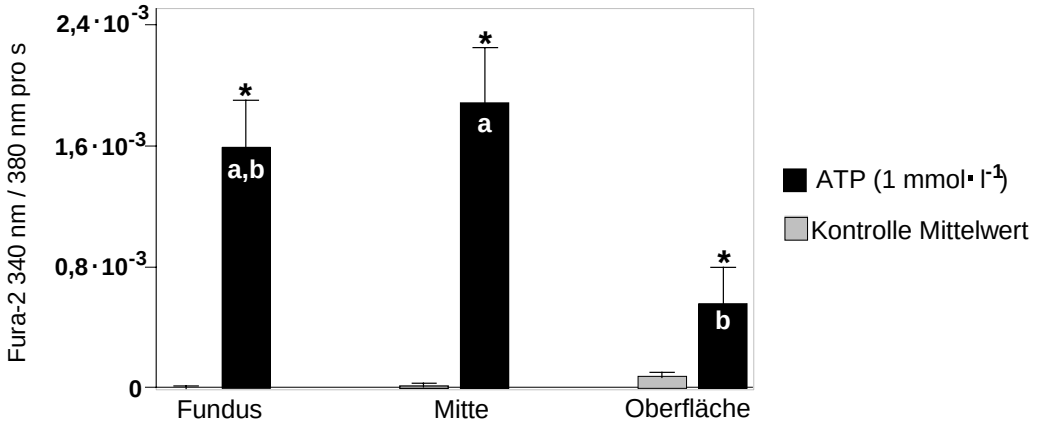



**Abbildung III.10:** Geschwindigkeit der Änderung des Fura-2-Verhältnissignals nach Stimulation mit 1 mmol·l$^{-1}$ ATP in den drei Abschnitten der Krypte. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM; N = 4; n = 12 - 19. Gleiche Buchstaben kennzeichnen statistisch homogene Gruppen (lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test); das bedeutet, dass die Zellen an der Oberfläche signifikant (P < 0.05) langsamer reagieren als diejenigen in der Mitte, wohingegen zwischen Fundus und Mitte bzw. Fundus und Oberfläche kein statistisch signifikanter Unterschied besteht. Die grauen Säulen zeigen die Änderungen von $\Delta$ F 340nm / 380 nm pro s der zeitabhängigen Kontrollen.

Die gleichstarken Änderungen des Fluoreszenzverhältnisses in den drei Kryptenregionen nach ATP-Stimulation und die langsamere Reaktionsgeschwindigkeit in der Oberflächenregion stehen dem morphologischen $IP_3R3$-Gradienten entlang der Kryptenachse entgegen. Dies kann durch eine unterschiedliche Verteilung der P2Y-Rezeptoren im Kryptenepithel bedingt sein. So beschreibt Leipziger et al. eine starke Reaktion auf ATP in der Fundusregion, die zur Oberfläche hin signifikant abnimmt (Leipziger et al. 1997).

## 2.2. Direkte Stimulation der $IP_3$-Rezeptoren

Um bei der Untersuchung eines möglichen funktionellen $IP_3$-Rezeptorgradienten entlang der Kryptenachse eine Beeinflussung durch membranständige Rezeptoren auszuschließen, wurden Experimente mit Inositol-1,4,5-trisphosphat (= $IP_3$, siehe II.6.6.3.2) durchgeführt. Da $IP_3$ aufgrund seiner mehrfach negativ geladenen

Struktur membranimpermeabel ist, mussten die Zellen vor der Stimulation permeabilisiert werden. Da die Permeabilisierung im Falle von Fura-2 auch zu einem Farbstoffverlust führen würde, wurde bei den Experimenten an permeabilisierten Kolonkrypten mit Mag-Fura-2 AM gearbeitet. Dieser Farbstoff reichert sich zum größten Teil in intrazellulären Kompartimenten und nur geringgradig im Zytosol an. Die Krypten wurden mittels 5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ Saponin permeabilisiert. Saponin ist ein nicht-ionisches Detergens, welches mit Cholesterin (und anderen unkonjugierten β-Hydroxysterolen) Komplexe bildet, wodurch ca. 8 nm große Poren entstehen. Bei Saponinkonzentrationen unter 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$ wird nur die Plasmamembran permeabilisiert. Die intrazellulären Membranen bleiben intakt (Schulz 1990).

Der Fluoreszenzfarbstoff Mag-Fura-2 reichert sich in den intrazellulären $Ca^{2+}$-Speichern an. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem gemessenen Mag-Fura-2-Signal um ein reines Speichersignal handelt, wurde zuerst ein Mangan-Quench-Experiment durchgeführt. Bei diesem Experiment wurde zuerst eine Permeabilisierung der Krypten mittels 5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ Saponin durchgeführt. Durch die Poren wird ein Teil des Farbstoffes ausgewaschen, wodurch es zu einem Abfall des Fluoreszenzwertes bei 340 nm Anregungswellenlänge kommt. Da das Saponin nur die Zellmembran permeabilisiert, muss der ausgewaschene Farbstoff aus dem Zytosol stammen. Aufgrund der gegebenen Abnahme des Fluoreszenzwertes 340 nm nach Saponingabe, kann man sagen, dass sich mehr als 94 % des Farbstoffes in den intrazellulären Speichern befinden und nur knapp 6 % im Zytosol. Um zu überprüfen, ob sich nach der Permeabilisierung noch Farbstoff im Zytosol befindet, wurde dem Kryptenpräparat $Mn^{2+}$ (0,5 $mmol \cdot l^{-1}$) zugeführt. Durch das $Mn^{2+}$ konnten 1,2 % des zytosolischen Fluoreszenzsignals gequencht werden. In den angeführten Experimenten kann also nur ein sehr geringer Teil des Fluoreszenzsignals aus dem Zytosol stammen. Dieser geringe Anteil an dem Fluoreszenzsignal ist vernachlässigbar klein; es kann also in der Tat davon ausgegangen werden, dass das Mag-Fura-2-Signal aus intrazellulären Kompartimenten stammt.

Nach diesen Vorversuchen zur Validierung der Methode wurden permeabilisierte Krypten mit 24 $\mu mol \cdot l^{-1}$ $IP_3$ stimuliert. Wiederum wurde die Antwort in allen drei Kryptenregionen (Fundus, Mitte, Oberfläche) miteinander verglichen.
$IP_3$ induzierte in den untersuchten Kryptenabschnitten eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern (siehe Abbildung III.12). Da sich das Mag-Fura-2 in den Organellen akkumuliert, zeigt sich eine $Ca^{2+}$-Speicherentleerung in einem Abfall des Fluoreszenzwertes 340 nm. In Abbildung III.11 ist exemplarisch ein Originalkurvenverlauf aus der Fundusregion dargestellt. Man sieht einen deutlichen Abfall des Fluoreszenzwertes nach der Applikation von Saponin, da es zu einer Auswaschung des zytosolischen Farbstoffes kam. Durch den $IP_3$-Stimulus wurden $Ca^{2+}$-Speicher geleert, wodurch ein weiterer Abfall des Fluoreszenzwertes verursacht wurde.

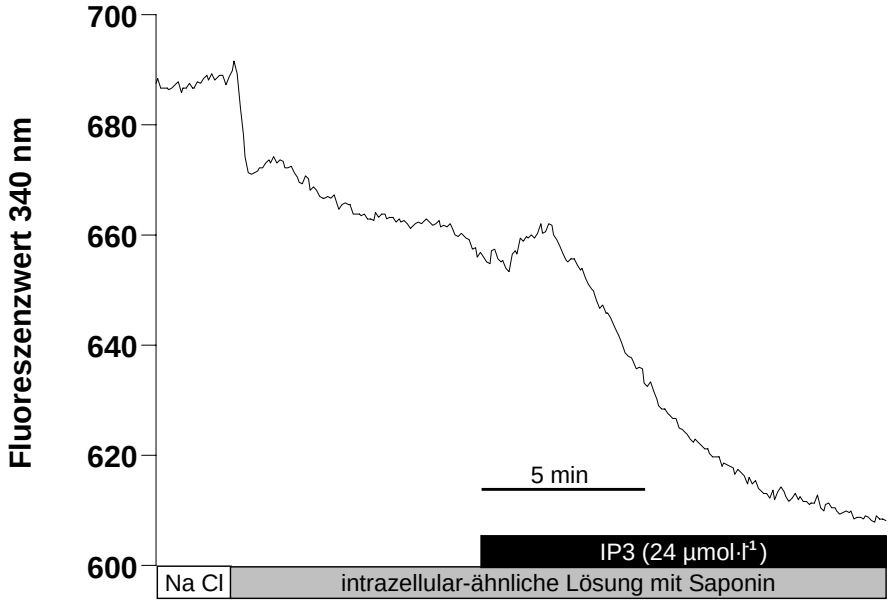



**Abbildung III.11:** $IP_3$ bewirkte im Kryptenfundus eine Entleerung der intrazellulären $Ca^{2+}$-Speicher. Dieses Absinken der $Ca^{2+}$-Konzentration in den Organellen ist in dem Abfall des Mag-Fura-2-Signals zu beobachten. Dargestellt ist ein Originalkurvenverlauf, der repräsentativ für N = 5 ist. Aufgetragen ist der Fluoreszenzwert bei 340 nm, der dem gebundenen Farbstoff entspricht.

Vergleicht man die Reaktionsstärke der unterschiedlichen Kryptenregionen miteinander, zeigt die Oberflächenregion mit einem Abfall von -31,89 ± 4,38 (n =

29) eine tendenziell stärkere Antwort auf die $IP_3$-Stimulation als die Fundusregion mit einem Abfall von -25,50 ± 3,07 (n = 34) und die mittlere Region mit -19,43 ± 3,03 (n = 27). Diese Tendenz erreicht nach dem Scheffé-Test keine Signifikanz (siehe Abbildung III.12).

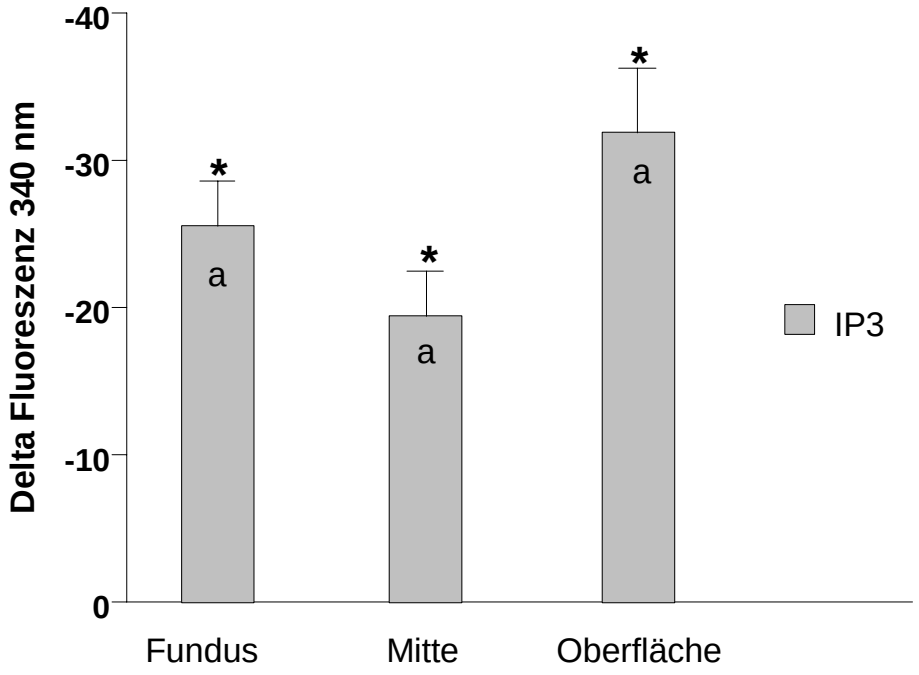



**Abbildung III.12:** Dargestellt ist der Abfall des Fluoreszenzwertes von Mag-Fura-2 (Anregung bei 340 nm) nach dem $IP_3$-Stimulus (24 $\mu mol \cdot l^{-1}$ $IP_3$) im Vergleich zum Mittelwert des Mag-Fura-2-Fluoreszenzwertes 340 nm vor der Stimulation, welcher die Veränderungen der $Ca^{2+}$-Konzentrationen widerspiegelt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM; N = 5; n = 27 - 34; * = $P < 0,05$ (paariger t-Test) vs. Grundlinie vor Stimulation. Gleiche Buchstaben kennzeichnen statistisch homogene Gruppen (lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test, $P > 0.05$); das bedeutet, dass die Zellen in allen Abschnitten der Krypte gleich stark auf $IP_3$ reagierten.

Nachdem die Stimulation mit ATP durch die Verteilung der P2Y-Rezeptoren verfälscht sein könnte, wurde untersucht, ob der $IP_3R3$-Gradient bei direkter Stimulation durch $IP_3$ Unterschiede in der Schnelligkeit der $Ca^{2+}$-Speicherentleerung entlang der Kryptenachse bewirkt. Die Geschwindigkeit der Speicherentleerung wurde mittels Differenzierung des Mag-Fura-2-Fluoreszenzwertes gegen die Zeit errechnet. Berechnet man die Veränderung des Mag-Fura-2-Fluoreszenzwertes 340 nm pro Sekunde, so erreichen die Werte der

Kryptenabschnitte im Vergleich miteinander keine Signifikanz (Fundus: -0,29 ± 0,03 $s^{-1}$; Mitte: -0,22 ± 0,02 $s^{-1}$; Oberfläche: -0,35 ± 0,05 $s^{-1}$; N = 5; n = 27 - 34; P > 0,05; Scheffé-Test, siehe Abbildung III.13).

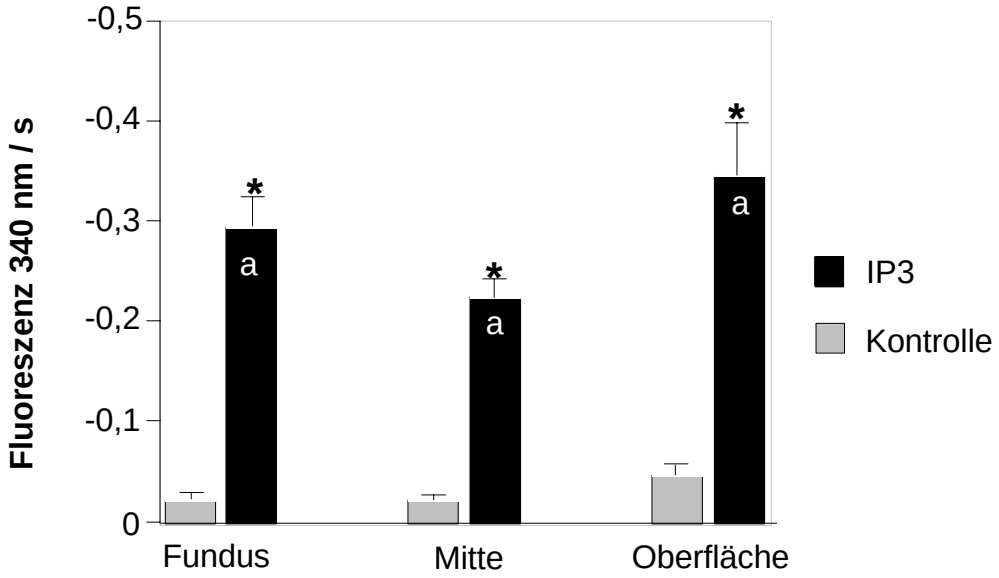



**Abbildung III.13:** Die Fluoreszenzwertänderungen pro Sekunde von Mag-Fura-2 (Anregung bei 340 nm) zeigen in allen drei Kryptenregionen einen deutlichen Anstieg nach $IP_3$-Stimulation (24 $\mu mol \cdot l^{-1}$ $IP_3$) im Vergleich zum Steigungsmittelwert vor $IP_3$-Gabe. Mittelwerte ± SEM; * = P < 0,05 (paariger t-Test) vs. Mittelwert Δ Fluoreszenz 340 nm $s^{-1}$ vor $IP_3$-Gabe; N = 5; n = 27 - 34. Vergleicht man die Reaktionsgeschwindigkeit der Regionen miteinander, so erreichen die Unterschiede in der Geschwindigkeit keine Signifikanz. Gleiche Buchstaben kennzeichnen statistisch homogene Gruppen (lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test; P > 0,05). Die grauen Säulen zeigen die Änderungen von Δ F 340 nm / s der zeitabhängigen Kontrollen.

Obwohl die unterschiedlichen Antworten der drei Kryptenregionen auf den $IP_3$-Stimulus keine Signifikanz erreichten, ließ sich doch eine leichte Tendenz bei der Oberfläche zu einer größeren und schnelleren Antwort erkennen. Um zu untersuchen, ob sich diese Tendenz verstärken ließe, wurden Experimente mit einem stärkeren $IP_3$-Rezeptoragonisten durchgeführt. Adenophostin A (siehe II.6.6.3.3) besitzt eine 50- bis 100-fach höhere Affinität zu $IP_3$-Rezeptoren als $IP_3$ selbst (Takahashi et al. 1994) und könnte dadurch stärkere Unterschiede in den Antworten der Kryptenabschnitte bewirken.

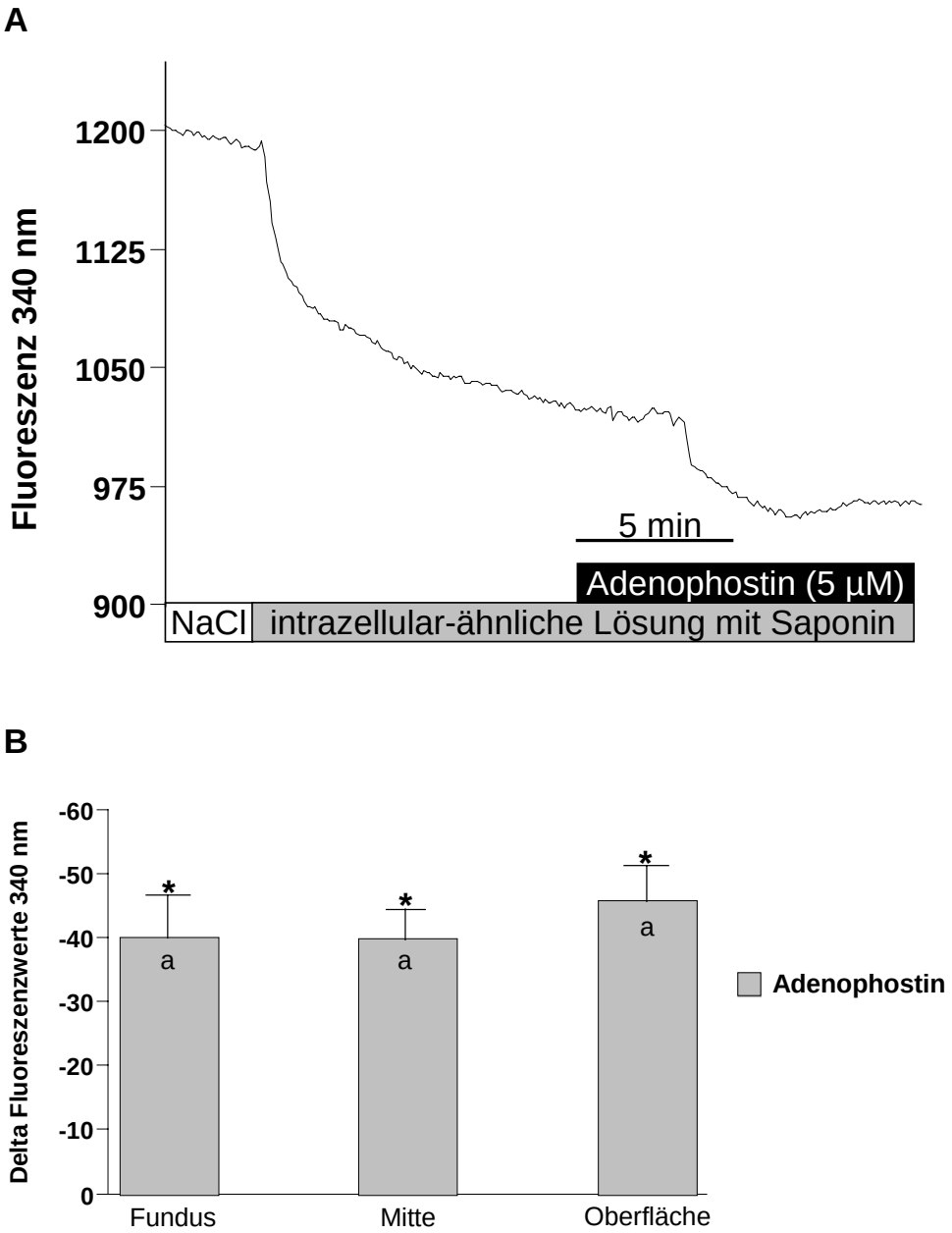



**Abbildung III.14 A:** Durch die Adenophostin A-Stimulation (5 µmol·l$^{-1}$) wurden die $Ca^{2+}$-Speicher entleert, was sich in einen Abfall des Fluoreszenzwertes von Mag-Fura-2 (Anregung bei 340 nm) in diesem Originalkurvenverlauf widerspiegelte. **B**: Dargestellt ist der Fluoreszenzwertabfall nach Adenophostin A-Gabe in den drei Kryptenregionen, der einen Abfall des $Ca^{2+}$-Spiegels anzeigt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM; N = 4; n = 25 - 29; * = P < 0,05 (paariger t-Test) vs. Mittelwert vor Adenophostin A-Gabe. Der Vergleich zwischen den drei Regionen ergibt, dass alle Antworten gleichstark sind, auch wenn die Oberfläche eine Tendenz zu einer größeren Antwort zeigt. Gleiche Buchstaben kennzeichnen statistisch homogene Gruppen (lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test; P > 0,05).

Die Adenophostin A-Stimulation (5 $\mu mol \cdot l^{-1}$) verursachte in den Kryptenregionen eine stärkere $Ca^{2+}$-Freisetzung aus den intrazellulären $Ca^{2+}$-Speichern als die $IP_3$-Stimulation. Die Abbildung III.14 A zeigt im Originalkurvenverlauf einen deutlichen Abfall des Fluoreszenzwertes 340 nm nach Saponingabe, welcher durch das Auswaschen des zytosolischen Farbstoffes bedingt war. Nach der Adenophostingabe ließ sich ein weiterer Abfall des Signals beobachten, der das Absinken der $Ca^{2+}$-Konzentration durch die Speicherentleerung anzeigte. Dennoch reagierten die Kryptenregionen (Fundus -40,03 ± 6,47, n = 29; mittlere Region -39,83 ± 4,59, n = 29; Oberflächenregion -45,66 ± 5,47, n = 25) im Vergleich untereinander nach dem Scheffé-Test gleich stark (siehe Abbildung III:14 B).

Um zu untersuchen, ob Adenophostin A mit seiner größeren Affinität zu $IP_3$-Rezeptoren als $IP_3$ die Tendenz der schnelleren Speicherentleerung in der Oberflächenregion verstärken und damit eine unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit entlang des $IP_3R3$-Gradienten verursachen kann, wurde die Geschwindigkeit der $Ca^{2+}$-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern berechnet.

Adenophostin A bewirkte in allen Kryptenabschnitten eine schnellere $Ca^{2+}$-Freistzung als $IP_3$. Alle drei Regionen zeigten eine deutlich höhere Steigung nach der Stimulation im Vergleich zum Mittelwert vor der Stimulation. Vergleicht man die Antworten der Kryptenregionen bezüglich ihrer Reaktionsgeschwindigkeit so zeigten die Fundusregion (-0,59 ± 0,05 $s^{-1}$, n = 29) und die mittlere Region (-0,58 ± 0,05 $s^{-1}$, n = 29) keinen Unterschied in ihrer Antwort. Die Antwort in der Oberflächenregion (-0,93 ± 0,11 $s^{-1}$, n = 25) war deutlich schneller als die der Fundusregion und die der mittleren Region ($P < 0,05$, Scheffé-Test; siehe Abbildung III.15).

Die Agonisten der $IP_3$-Rezeptoren bewirken in allen drei Kryptenregionen eine gleich starke $Ca^{2+}$-Freisetzung. Nur Adenophostin A löst in der Oberflächenregion, die neben $IP_3R2$ auch $IP_3R3$ exprimiert, eine schnellere Speicherentleerung aus, so dass der $IP_3R3$-Gradient offensichtlich nur eine sehr geringe funktionelle Relevanz besitzt.

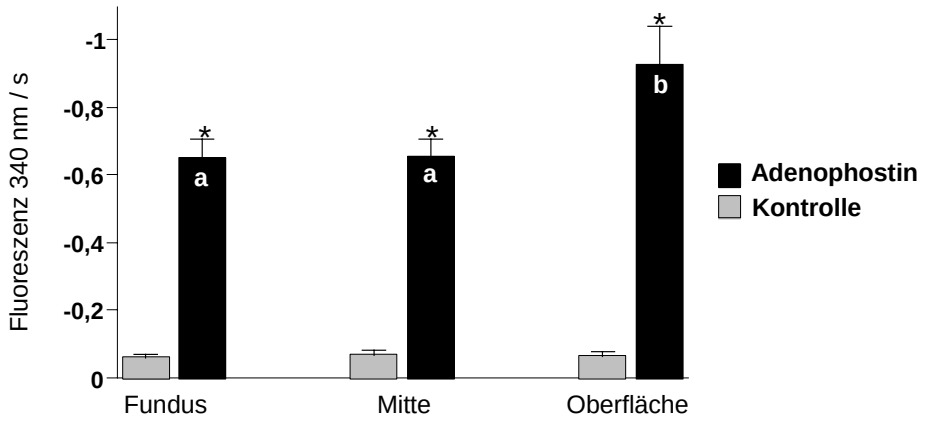



**Abbildung III.15:** Die Fundusregion und die mittlere Region reagierten gleich schnell mit einem Fluoreszenzabfall von Mag-Fura-2 (Anregung bei 340 nm) auf die Stimulation mit Adenophostin A (5 $\mu mol \cdot l^{-1}$). Die Oberflächenregion zeigte einen schnelleren Fluoreszenzabfall als die Fundusregion und als die mittlere Region; N = 4; n = 25 - 29. Die Δ Fluoreszenzwerte 340 nm $s^{-1}$ sind Mittelwerte ± SEM; * = $P < 0,05$ (paariger t-Test) vs. Grundlinie vor Stimulus; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch verschiedene Gruppen (lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test; $P < 0,05$). Die grauen Säulen zeigen die Änderungen von Δ F 340 nm / s der zeitabhängigen Kontrollen.

## 3 Funktioneller Nachweis des $IP_3$-Rezeptors im Epithelzellkern

Nachdem der Typ 2 $IP_3$-Rezeptor durch immunhistochemische Versuche in den Epithelzellkernen nachgewiesen wurde und die Untersuchung der Kryptenreaktion auf $IP_3$ keinen deutlichen Gradienten entlang der Kryptenachse gezeigt hat, wurde untersucht, ob dem $IP_3R2$, der ja eine gleichmäßige Verteilung entlang der Kryptenachse im Bereich der Zellkerne zeigt (siehe Abbildung III.2), eine funktionelle Rolle bei der Signaltransduktion zukommt. Epithelzellkerne wurden aus Krypten isoliert, um $Ca^{2+}$-Imaging-Experimente an ihnen durchzuführen. Hierfür wurden die Zellkerne in einer intrazellular-ähnlichen Lösung (ICL) mit ATP aufbewahrt. Da es nicht möglich war, die isolierten Zellkerne mit Fura-2 AM oder mit Mag-Fura-2 AM aufzuladen (vielleicht aufgrund fehlender Esterasen, die zur Hydrolyse des Farbstoffes benötigt werden), mussten die Experimente mit dem Pentakaliumsalz der freien Fura-2-Säure durchgeführt werden. Das freie Fura-2 ist membranimpermeabel und wurde in der ICL Lösung gelöst, die die Zellkerne umgab. Die Messregionen wurden so gewählt, dass sie einen kleinen Rand um den Zellkern bildeten und das freie Fura-2 dort Veränderungen des $Ca^{2+}$-Spiegels

messen konnte. Die Zellkerne wurden dann mit 24 $\mu mol \cdot l^{-1}$ $IP_3$ stimuliert. In den ersten Experimenten löste $IP_3$ bei den Epithelzellkernen eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus, welche durch einen Anstieg des Fura-2-Signals gemessen werden konnte, wie der Originalkurvenverlauf der Abbildung III.16 A zeigt. $IP_3$ verursachte im Mittel einen Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses um $1{,}53 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}16 \cdot 10^{-2}$ ($P < 0{,}05$ (paariger t-Test) vs. Grundlinie Fluoreszenzverhältnis vor $IP_3$-Gabe, N = 4, n = 28).

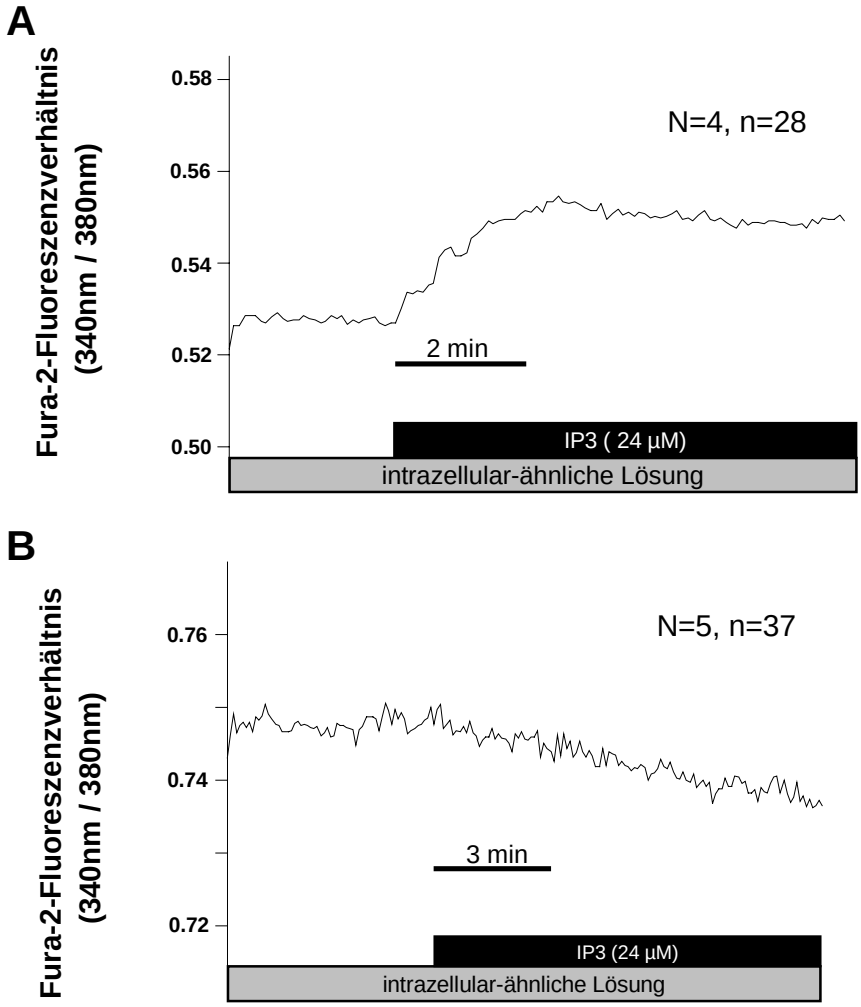



**Abbildung III.16:** $IP_3$ induzierte an isolierten Epithelzellkernen einen $Ca^{2+}$-Fluss, der sich in einem Anstieg bzw. einem Abfall des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses widerspiegelt. Der Originalkurvenverlauf in A ist repräsentativ für n = 28, der in B gezeigte ist repräsentativ für n = 37 (Statistik siehe Text).

Trotz gleichbleibender Präparation der Zellkerne änderte sich die Zellkernantwort auf $IP_3$ im Laufe der Versuchsreihe. In den späteren Versuchen zeigten die Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse einen Abfall nach $IP_3$-Stimulation. Dieser kann durch einen

$Ca^{2+}$-Einstrom aus der intrazellular-ähnlichen Lösung in den Zellkern hervorgerufen werden (siehe Diskussion). $IP_3$ bewirkte einen mittleren Fluoreszenzverhältnisabfall um $-1{,}11 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}10 \cdot 10^{-2}$ ($P < 0{,}05$ (paariger t-Test) vs. Grundlinie Fluoreszenzverhältnis vor $IP_3$-Gabe, $N = 5$, $n = 37$). $IP_3$ rief aber in allen Experimenten eine Reaktion bei den Zellkernen hervor, das heißt entweder eine $Ca^{2+}$-Freisetzung oder eine $Ca^{2+}$-Aufnahme.

Zum weiteren Beweis der funktionellen Expression eines $IP_3$-Rezeptors am Epithelzellkern wurden bekannte $IP_3$-Blocker eingesetzt. Zunächst wurde Heparin angewendet, um den $IP_3$-Effekt zu blocken. Heparin ist ein kompetitiver Antagonist der $IP_3$-Rezeptoren, der die $IP_3$ vermittelte $Ca^{2+}$-Freisetzung vollständig blockt (Ghosh et al. 1988; Hofer and Machen 1993; Taylor and Broad 1998). Heparin wurde in den Zellkern-Experimenten in mehreren Konzentrationen eingesetzt (6 $\mu mol \cdot l^{-1}$ mit $n = 32$, 12 $\mu mol \cdot l^{-1}$ mit $n = 15$ und 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ mit $n = 13$), wobei das Heparin, gelöst in der intrazellular-ähnlichen Lösung, unabhängig von seiner Konzentration zu einem starken Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses führte. Die Ursache hierfür lag in einem starken Quench der 380 nm Fluoreszenz durch das Heparin, wodurch ein Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses hervorgerufen wurde. Aufgrund dieses Nebeneffektes des Heparins konnte ein eventuell vorhandener Einfluss auf die $IP_3$-Antwort der Zellkerne nicht ausgewertet werden.

Um die Funktionalität des $IP_3$-Rezeptors im Epithelzellkern dennoch zu testen, wurde der Blocker 2-Aminoethoxy-diphenylborat (= 2-APB) eingesetzt. 2-APB hemmt die $IP_3$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung ohne die $IP_3$-Bindung an seinen Rezeptor zu unterbinden. Außerdem hemmt 2-APB speichergesteuerte $Ca^{2+}$-Kanäle, ein Effekt, der in Zellkernpräparaten unbeachtet bleiben kann (Maruyama et al. 1997; Schindl et al. 2002).

Nachdem sich in der intrazellular-ähnlichen Lösung eine stabile Grundlinie gebildet hatte, wurden 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ 2-APB zu den Zellkernen gegeben. Die Zellkerne wurden mehrere Minuten mit 2-APB inkubiert. Dann wurde die Lösung durch eine 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ 2-APB- und 24 $\mu mol \cdot l^{-1}$ $IP_3$-Lösung ersetzt (siehe Original-verlaufskurve in Abbildung III.17). Der $IP_3$ Stimulus bewirkte eine Änderung im

Fura-2-Fluoreszenzverhältnis von lediglich $-0.1 \cdot 10^{-2} \pm 0.07 \cdot 10^{-2}$ (n = 56 Nuclei aus N = 8 Kryptenpräparationen, gemessen wurde parallel zu den Kontrollversuchen ohne Inhibitor; $P < 0,05$ (Scheffé-Test) vs. $IP_3$-Gabe in Abwesenheit von 2-APB). Die Wirkung von $IP_3$ auf isolierte Epithelzellkerne wurde in Anwesenheit von 2-APB also vollständig unterdrückt.

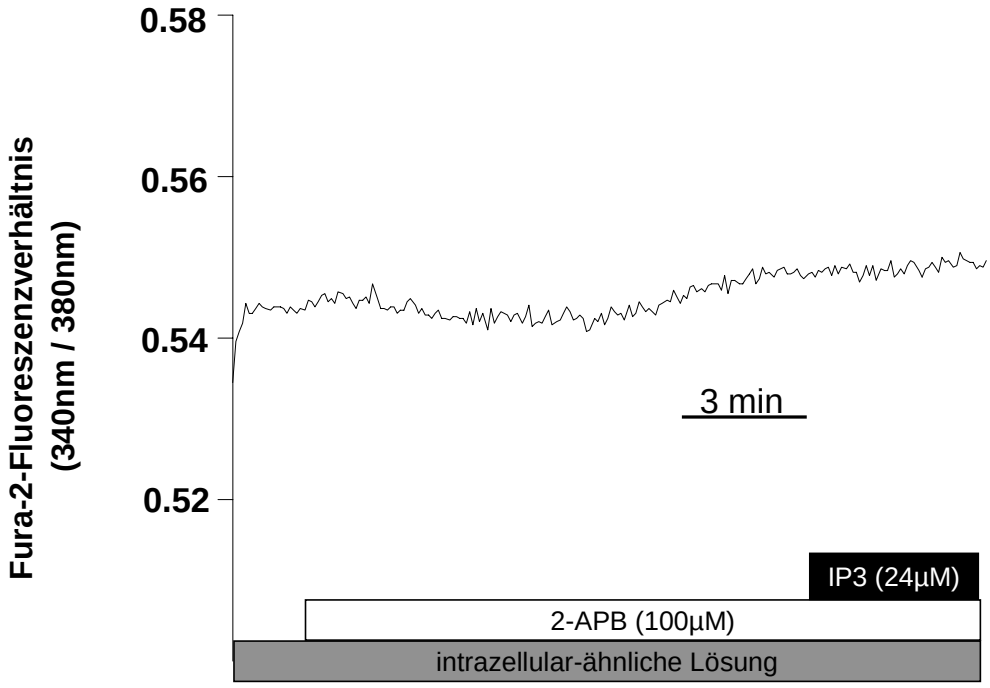



**Abbildung III.17:** Der Originalkurvenverlauf zeigt, dass sich das Fura-2-Fluoreszenzverhältnis nach $IP_3$-Gabe nicht verändert. Die Wirkung von $IP_3$ wird also in Anwesenheit von 2-APB vollständig unterdrückt, das heißt es finden keine $Ca^{2+}$-Fluxe statt. Statistik siehe Text.

## IV. Diskussion

Die zytosolische $Ca^{2+}$-Konzentration ist ein wichtiger Modulator der Enterozytenfunktion im Kolonepithel, da eine Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration eine $Cl^{-}$-Sekretion induziert (Lindqvist et al. 1998). Die $Cl^{-}$-Sekretion wird zum einen passiv vermittelt, da durch eine Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration $Ca^{2+}$-aktivierte $K^{+}$-Kanäle geöffnet werden. Durch den $K^{+}$-Strom kommt es zur Hyperpolarisation der Zelle, die die Triebkraft für eine $Cl^{-}$-Sekretion über cAMP-stimulierte apikale $Cl^{-}$-Kanäle bildet (Böhme et al. 1991; Strabel and Diener 1995). Zum anderen aktiviert der Anstieg der zytoplasmatischen $Ca^{2+}$-Konzentration apikale $Ca^{2+}$-abhängige $Cl^{-}$-Kanäle (Schultheiss et al. 2005).

Für das Kolonepithel sind bisher verschiedene Mechanismen zur Regulierung der zytosolischen $Ca^{2+}$-Konzentration nachgewiesen worden. Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt über Aktivierung einer Phospholipase C zur $IP_3$-Bildung, welches an intrazelluläre $IP_3$-Rezeptoren bindet und dadurch einen $Ca^{2+}$-Kanal öffnet (Dharmsathaphorn and Pandol 1986). Für das Kolonepithel ist das Expressionsmuster der $IP_3$-Rezeptoren, von denen drei Subtypen bekannt sind (Thrower et al. 2001), allerdings noch nicht geklärt. Die Speicherentleerung über $IP_3$-Rezeptoren führt zu einem so genannten kapazitativen $Ca^{2+}$-Einstrom (Übersicht siehe Parekh and Penner 1997), welcher im Kolonepithel durch nicht-selektive Kationenkanäle vermittelt wird (Frings et al. 1999). Weiterhin exprimieren Enterozyten $Na^{+}/Ca^{2+}$-Austauscher, um die intrazelluläre $Ca^{2+}$-Konzentration zu regulieren (Seip et al. 2001), und Ryanodinrezeptoren, die eine $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung vermitteln (Kocks et al. 2002; siehe Abbildung I.6).

Meine Arbeit zeigt, dass nur zwei Subtypen des $IP_3$-Rezeptors im Kolonepithel der Ratte exprimiert werden. Der $IP_3R2$ wird entlang der gesamten Kryptenachse und im Oberflächenepithel gebildet, wobei er im Zellkern lokalisiert ist (siehe Abbildung III.2). Der $IP_3R3$ hingegen weist eine intrazelluläre Lokalisation im apikalen Zytoplasma der Epithelzellen auf und zeigt in seiner Expression einen deutlichen Gradienten entlang der Kryptenachse, der von der Oberflächenregion zur Fundusregion stark abnimmt (siehe Abbildung III.7). Der $IP_3R1$ konnte im Kolonepithel nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung III.1).

# 1 Die $IP_3$-Rezeptorsubtypen

## 1.1. Typ 1 $IP_3$-Rezeptor

Der $IP_3R1$ ist der dominante Subtyp der im zentralen Nervensystem (= ZNS) exprimierten $IP_3$-Rezeptoren (Wojcikiewicz 1995; Sharp et al. 1999; Taylor et al. 1999). Es wurde berichtet, dass der $IP_3R1$ in den Purkinje Zellen von Mäusen an der Vermittlung der so genannten Long-Term Depression (= LTD, Reduktion der Synapsenaktivität, die Stunden bis Tage andauert und z.B. das Erlernen von Bewegungsabläufen vermittelt) beteiligt ist (Inoue et al. 1998). Um die Bedeutung des $IP_3R1$ im ZNS zu untersuchen, wurden $IP_3R1$ Knock-out-Mäuse gezüchtet, welche Ataxien und Epilepsien entwickeln sofern sie lebend geboren werden. Diese ausgeprägten Ausfallerscheinungen belegen die funktionelle Relevanz des $IP_3R1$ im ZNS (Matsumoto et al. 1996). Der $IP_3R1$ wird allerdings nicht nur im ZNS exprimiert, sondern er wurde auch in peripheren Organen nachgewiesen. In der Rattenniere wird der $IP_3R1$ in glomerulären Mesangiumzellen gefunden (Monkawa et al. 1998). Außerdem konnte er über die Immunoblotmethode in der Lunge der Ratte nachgewiesen werden (Wojcikiewicz 1995). Auch vaskuläre, glatte Muskelzellen der Ratte exprimieren den $IP_3R1$(Vermassen et al. 2003). Häufig wird dieser Rezeptorsubtyp im Zytosol der Zellen nachgewiesen. Diese Lokalisation korreliert mit einer Expression auf den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, einem typischen intrazellulären $Ca^{2+}$-Speicher (Pozzan et al. 1994; Ashby and Tepikin 2001).

Im Kolon der Ratte wurde die Lokalisation des $IP_3R1$ von mir mit der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Der $IP_3R1$ wurde mit dem Antikörper KM1112, der gegen eine Aminosäuresequenz des C-terminalen Endes gerichtet ist (Sugiyama et al. 1994), detektiert und mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die Anfärbung glatter Muskelzellen in der Lamina muscularis mucosae und von Myofibroblasten in der Lamina propria der Kolonwand zeigen, dass der Antikörper in der Lage war, das Antigen spezifisch zu erkennen und zu binden. Es konnte aber kein $IP_3R1$-Signal in den Epithelzellen des Rattenkolons gefunden werden (siehe Abbildung III.1). Trotz der Wichtigkeit des $IP_3R1$ in anderen Organsystemen, wie

etwa dem ZNS, wird der $IP_3R1$ offensichtlich nicht im Kolon exprimiert und trägt dementsprechend keine Rolle in dessen $Ca^{2+}$-Signalwegen.

### 1.2. Typ 2 $IP_3$-Rezeptor

Der $IP_3R2$ wurde mit dem Antikörper KM1083 detektiert. Dieser erkennt eine Aminosäuresequenz im C-terminalen Ende des Rezeptors (Sugiyama et al. 1994). Die einfache Fluoreszenzmarkierung zeigte bei einer Überlagerung mit einem DNA-Fluoreszenzmarker (DAPI), dass das $IP_3R2$-Signal aus der nukleären Region der gesamten Krypte und des Oberflächenepithels stammt (siehe Abbildung III.2, violettes Signal in C). Das Zytoplasma der Epithelzellen zeigte keine Anfärbung. Da diese einfache Färbemethode keine Unterscheidung zwischen Kernhülle und Kernplasma erlaubt, habe ich eine Doppelmarkierung mit dem Protein Lamin B1 durchgeführt. Dieses ist an der Bildung der nukleären Lamina beteiligt, welche der inneren Kernmembran von innen anliegt (Moir et al. 2000). Die Doppelmarkierung der zwei Antigene zeigte, dass das $IP_3R2$-Signal von dem Lamin B1-Signal umgeben ist, ohne dass es zu einer Überlagerung der beiden Signale kommt (siehe Abbildung III.3). Die zusätzliche Markierung der DNA durch DAPI ließ darauf schließen, dass das $IP_3R2$-Signal aus dem Nukleoplasma stammt, da das nun violette Kernsignal vom grünen Lamin B1-Signal umlagert wurde (siehe Abbildung III.4). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde eine Immunogoldmarkierung für eine elektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Die in der Abbildung III.6 dargestellten Enterozytenkerne zeigen im Nukleoplasma gebundene Goldpartikel. Die Kernmembranen der Enterozyten haben hingegen keine Goldpartikel gebunden, das heißt, dass in der Kernhülle der Enterozyten scheinbar keine $IP_3$-Rezeptoren exprimiert werden.

Dieses Ergebnis ist in sofern erstaunlich, als dass der $IP_3R2$ bisher in verschiedenen Geweben mit einer Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum und in der Kernhülle nachgewiesen wurde; soweit mir bekannt ist, wurde er aber noch nicht im Nukleoplasma von nativem Gewebe nachgewiesen. Wojcikiewicz konnte den Typ 2 $IP_3$-Rezeptor in Gehirn, Pankreas, Lunge und Leber der Ratte nachweisen, ohne jedoch die genauere Lokalisation des Rezeptors in der Zelle zu untersuchen

(Wojcikiewicz 1995). Auch in der Rattenniere wurde der $IP_3R2$ untersucht, wo er in Tubuluszellen gefunden wurde (Monkawa et al. 1998). In Ventrikelmyozyten der Ratte wurde der $IP_3R2$ in der Kernhülle nachgewiesen (Bare et al. 2005).
Auch wenn $IP_3$-Rezeptoren bisher noch nicht im Nukleoplasma von nativem Gewebe beobachtet wurden, gibt es dennoch Evidenzen für eine Expression von $IP_3$-Rezeptoren im Nukleoplasma von kultivierten Säugetierzellen. So wurde in bovinen Endothelzellen, in Zellen der bovinen Nebennierenrinde und in COS-7 Zellen (einer Fibroblasten-Zelllinie aus der Affenniere) eine intranukleäre Lokalisation des $IP_3R2$, das heißt eine Expression im Nukleoplasma, eindeutig festgestellt (Laflamme et al. 2002). Auch in den glatten Muskelzellen der Aorta der Ratte wurde eine $IP_3R2$-Immunreaktivität nachgewiesen, die der Lokalisation des Kernes entsprach (Tasker et al. 2000). In den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes wurde sogar von einer intranukleären Lokalisation aller drei $IP_3$-Rezeptorsubtypen berichtet (Huh and Yoo 2003). Diese Evidenzen bestätigen, dass die intrazelluläre Verteilung des Typ 2 $IP_3$-Rezeptors im Kolonepithel der Ratte nicht ungewöhnlich ist und in verschiedenen kultivierten Zelltypen vorkommt.

### 1.3. Typ 3 $IP_3$-Rezeptor

Die Verteilung dieses Subtyps im Kolonepithel wurde mit einem kommerziellen, gegen den N-Terminus der Aminosäurekette gerichteten Antikörper untersucht.
Der $IP_3R3$ wird häufig in nicht-neuronalen Geweben exprimiert und wurde in verschiedenen Organen nachgewiesen. So wurde er in der Niere der Ratte sowohl in den kortikalen Sammelrohren als auch in den glomerulären Mesangiumzellen gefunden (Monkawa et al. 1998). Auch die Lunge und das Pankreas exprimieren diesen Rezeptorsubtyp (Wojcikiewicz 1995). Zusätzlich konnte er in Fettgewebe und in vaskulären, glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Blondel et al. 1993; Tasker et al. 2000). Seine intrazelluläre Lokalisation entspricht meistens der perinukleären Region und dem Endoplasmatischen Retikulum (Tasker et al. 2000; Laflamme et al. 2002). Im Jejunum der Ratte wurde in den Villuszellen eine $IP_3R3$-Immunreaktivität in der Nähe des Terminalen Netzes (= terminal web), direkt unter

dem Bürstensaum nachgewiesen, während die Immunreaktivität in den Kryptenzellen diffuser im Zytoplasma verteilt war (Maranto 1994). Auch im Kolonepithel der Ratte zeigt der $IP_3R3$ eine Lokalisation im apikalen Zytoplasma der Zellen (siehe Abbildung III.8), vergleichbar mit den Ergebnissen aus dem Jejunum. Der $IP_3R3$ weist im Kolonepithel einen deutlichen Gradienten von der Darmoberfläche zum Kryptenfundus auf, wo das Signal stark abnimmt bzw. nicht mehr zu detektieren ist (siehe Abbildung III.7). Auch im Dünndarm der Ratte ist eine stärkere Immunreaktivität in den Villuszellen als in den Kryptenzellen zu beobachten und im Kryptenfundus zeigte sich nur ein sehr schwaches Signal (siehe Fig. 7 bei Maranto 1994).

## 2 Funktionelle Charakterisierung der $IP_3$-Rezeptoren im Kolonepithel

Nachdem das Expressionsmuster der $IP_3$-Rezeptorsubtypen am Kolonepithel der Ratte geklärt war, stellte sich die Frage der funktionellen Konsequenz aus dieser Subtypverteilung. Daher wurden $Ca^{2+}$-Imaging-Experimente durchgeführt, welche die funktionelle Rolle der Subtypen klären sollten.

### 2.1. Isolierte Epithelzellkerne antworten auf $IP_3$-Stimuli

Um zu untersuchen, ob der $IP_3R2$ im Zellkern funktionell aktiv ist, wurden die Zellkerne aus den Krypten isoliert. Änderungen in der $Ca^{2+}$-Konzentration mussten mit dem Pentakaliumsalz der freien Fura-2-Säure gemessen werden, da die Kerne weder mit Fura-2 AM noch mit Mag-Fura-2 AM aufgeladen werden konnten. Der Grund hierfür sind möglicherweise fehlende Esterasen, die benötigt werden, um die Acetoxymethylester der Farbstoffe zu hydrolysieren. Entweder ist der Zellkern nicht in der Lage solche Esterasen zu bilden, oder sie gehen ihm während der Isolation verloren. Das freie Fura-2 wurde in die intrazellular-ähnliche Lösung gegeben, mit der die Zellkerne umspült wurden und die Messungen wurden dann in der unmittelbaren Umgebung des isolierten Zellkernes durchgeführt.

Stimuliert wurden die Kerne mit dem natürlichen Agonisten des Rezeptors, dem $IP_3$. Das $IP_3$ rief in der Versuchsserie zwei verschiedene Reaktionen hervor, welche in den Änderungen des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses abzulesen waren. Ein Teil der Kerne reagierte mit einem Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses, bei den

anderen hingegen kam es zu einem Abfall des Fluoreszenzverhältnisses (siehe Abbildung III.16). Dies deutet darauf hin, dass der angewendete Isolationsprozess den Füllungszustand des nukleären $Ca^{2+}$-Speichers in eine Art und Weise beeinflusst, die nicht hinreichend kontrollierbar war. Auch Petersen et al. erklären, dass es durch die Zellkernisolation zum Abreißen des Endoplasmatischen Retikulums von der Kernhülle und somit zu Lecks in der äußeren Kernmembran kommt, wodurch die $Ca^{2+}$-Konzentration ungewöhnlich niedrig ist. Außerdem scheinen die $Ca^{2+}$-Pumpen des Zellkernes wenig effektiv zu sein (Petersen et al. 1998). Dadurch ergaben sich in meinen Versuchen offensichtlich zwei verschiedene Ausgangssituationen im nukleären $Ca^{2+}$-Speicher. In der einen Situation bewahrte der Kernspeicher eine $Ca^{2+}$-Konzentration, die über der $Ca^{2+}$-Konzentration der intrazellular-ähnlichen Lösung lag, so dass eine Aktivierung der $IP_3$-Rezeptoren eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem Kern in die intrazellular-ähnliche Lösung bewirkte. Die andere Ausgangssituation brachte nukleäre $Ca^{2+}$-Speicher hervor, deren $Ca^{2+}$-Konzentration nach der Isolierung unter der $Ca^{2+}$-Konzentration der umgebenden Lösung lag, so dass die Öffnung der $IP_3$-Rezeptoren zu einem $Ca^{2+}$-Einstrom aus dem umgebenden Medium in den Zellkern führte. Beide Antworten wurden vollständig durch 2-APB unterdrückt (siehe Abbildung III.17), eine Substanz, die als $IP_3$-Rezeptorantagonist wirkt (Maruyama et al. 1997). Diese Experimente wurden streng parallel zu den Kontroll-Experimenten ohne den Inhibitor durchgeführt. Natürlich ist bekannt, dass 2-APB auch andere an $Ca^{2+}$-Signalen beteiligte Kanäle, wie zum Beispiel speichergesteuerte $Ca^{2+}$-Kanäle in der Plasmamembran (Schindl et al. 2002; Xu et al. 2005) beeinflusst; diese unspezifischen Effekte sollten an isolierten Zellkernen aber ausgeschlossen werden können, da in den Kernmembranen keine solchen speichergesteuerten $Ca^{2+}$-Kanäle exprimiert werden dürften. Daher erlauben diese Experimente die Schlussfolgerung, dass in den Zellkernen des Kolonepithels Typ 2 $IP_3$-Rezeptoren existieren, die funktionell wirksam sind.

Dass eine $Ca^{2+}$-Freisetzung aus Zellkernen möglich ist, wurde bereits an anderen Zellarten gezeigt. So erreichten Gerasimenko et al. eine $IP_3$-abhängige $Ca^{2+}$-Freisetzung aus der Kernhülle isolierter Leberzellen der Maus in das Nukleoplasma, ohne die genauere Lokalisation des $IP_3$-Rezeptors in der Kernmembran zu

bestimmen. Sie konnten in den Experimenten auch zeigen, dass die Kernporen für $Ca^{2+}$ sehr gut durchlässig sein müssen (Gerasimenko et al. 1995). In späteren Untersuchungen konnten an isolierten Leberzellkernen der Ratte $IP_3$-Rezeptoren an der inneren Kernmembran nachgewiesen werden (Humbert et al. 1996). Auch an isolierten Purkinje Neuronen wurden $IP_3$-aktivierte $Ca^{2+}$-Kanäle gefunden. Diese sind in der inneren Kernmembran lokalisiert und setzen $Ca^{2+}$ aus der Kernhülle in das Nukleoplasma frei (Marchenko et al. 2005). Die Kernhülle wird im Regelfall als ein $Ca^{2+}$-Speicher betrachtet, der mit dem Endoplasmatischen Retikulum verbunden ist (Petersen et al. 1998). Es wurden aber auch tubuläre Strukturen im Nukleoplasma beschrieben, die möglicherweise aus tiefen Einstülpungen der Kernhülle in das Kerninnere resultieren und an $Ca^{2+}$-Signalen beteiligt sind. Diese Strukturen wurden sowohl histologisch als auch durch $Ca^{2+}$-sensitive Fluoreszenzmarker dargestellt und zum Teil wurden an ihnen $IP_3$-Rezeptoren beschrieben (Fricker et al. 1997; Lui et al. 1998; Echevarria et al. 2003).

Zellkerne exprimieren nicht nur $IP_3$-Rezeptoren, sondern sie sind im Besitz des gesamten $IP_3$-Produktionsapparates. So konnten die beiden Kinasen, die für die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol zu Phosphatidylinositol-4-Phosphat und für die Phosphorylierung des letzteren zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat benötigt werden, im Zellkern nachgewiesen werden. Auch eine Phospholipase C wurde im Kern gefunden, welche dort $PIP_2$ (= Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu Diacylglycerin und $IP_3$ spaltet (Irvine and Divecha 1992; Leite et al. 2003). $PIP_2$ liegt nicht nur als Bestandteil der Kernmembran vor, sondern es ist auch im Nukleoplasma lokalisiert (Mazzotti et al. 1995). Es ist bekannt, dass $Ca^{2+}$ im Zellkern an der Regulation der Gentranskription (Hardingham et al. 1997) und des Zellwachstums und an der Induktion von Apoptose beteiligt ist (Berridge et al. 2000; Leite et al. 2003). Die genauen Signalkaskaden hierfür sind aber weiterhin unklar.

Die Eigenschaften des Typ 2 $IP_3$-Rezeptors, der in den Zellkernen des Kolonepithels exprimiert wird, lassen ihn ideal für eine Erzeugung langanhaltender $Ca^{2+}$-Signale erscheinen, die z.B. die Gentranskription beeinflussen können, da er eine relativ hohe Offenwahrscheinlichkeit zeigt (= beschreibt die Wahrscheinlichkeit, den Rezeptor in einer vorgegebenen Zeitspanne offen

vorzufinden; siehe Tab. IV.1) und er in seinem Schaltverhalten von der zytosolischen bzw. nukleosolischen ATP-Konzentration unabhängig ist (Tu et al. 2005).

### 2.2. Der $IP_3R2$ muss in den zytosolischen $Ca^{2+}$-Signalwegen involviert sein

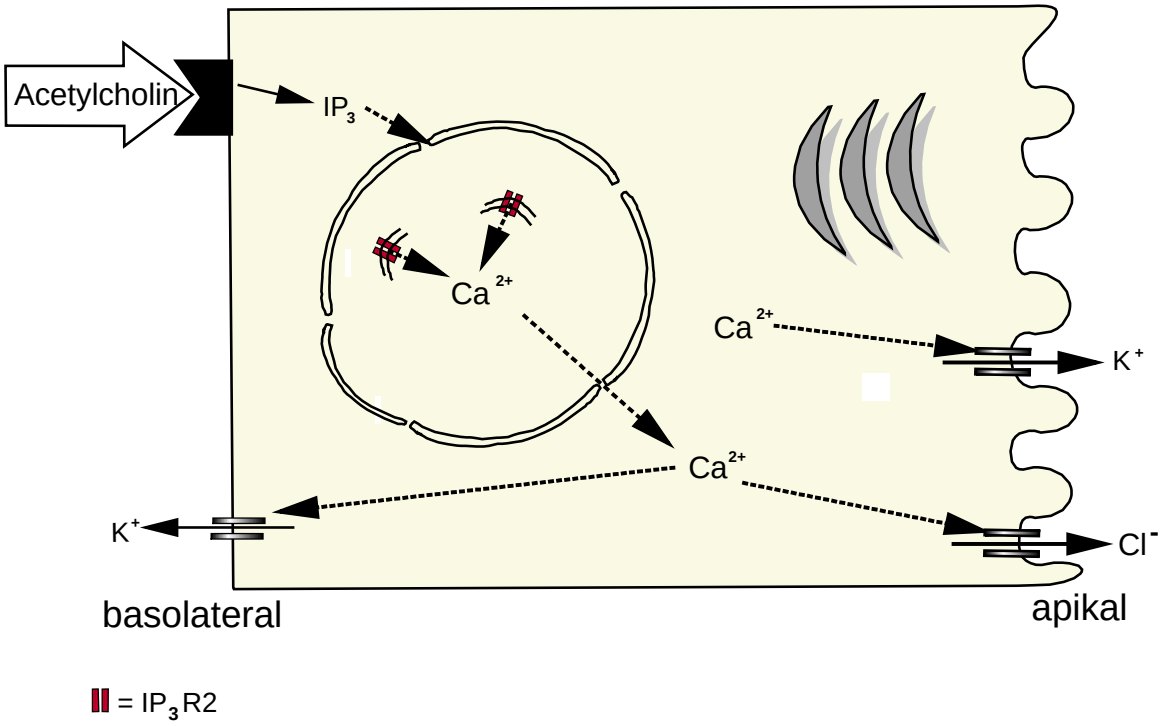



**Abbildung IV.1:** Enterozyt aus dem Kryptenfundus. $IP_3$ aktiviert Typ 2 $IP_3$-Rezeptoren im Zellkern, wodurch es wahrscheinlich zu einer $Ca^{2+}$-Freisetzung aus der Kernhülle kommt. Das $Ca^{2+}$ kann Prozesse im Nukleoplasma regulieren, es kann aber auch durch die Kernporen ins Zytoplasma diffundieren und von dort aus basolaterale und apikalen Ionenkanäle aktivieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der nukleäre $IP_3R2$ auch in den klassischen, das heißt den zytosolischen $Ca^{2+}$-Signalwegen, involviert ist. Im Kolonepithel vermittelt die Bindung des muscarinergen Agonisten Carbachol an G-Protein-gekoppelte muscarinerge Rezeptoren durch die Aktivierung der $Ca^{2+}$-abhängigen $K^+$-Kanäle eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Diese Hyperpolarisation stellt sich in den verschiedenen Kryptenabschnitten gleich stark dar (Böhme et al. 1991; Greger et al. 1997). Obwohl der $IP_3R3$ in der Fundusregion

der Krypte nicht exprimiert wird, wird der $Ca^{2+}$-Signalweg dadurch also nicht beeinträchtigt. Bei einer Stimulation von purinergen P2Y-Rezeptoren mit ATP in Fura-2-Experimenten findet in der Fundusregion, in welcher nur der $IP_3R2$ exprimiert wird, sogar ein stärkerer Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses als in dem Oberflächenepithel statt (siehe Abbildung III.9) - eine Beobachtung, die bereits von Leipziger et al. gemacht worden ist (Leipziger et al. 1997). Mit anderen Worten, der $Ca^{2+}$-Anstieg ist in den Kryptenzellen, die nur über den $IP_3R2$ verfügen, sogar größer als in den Oberflächenzellen, die zusätzlich über den $IP_3R3$ verfügen. Da diese Ergebnisse aber auch durch eine unterschiedliche Verteilung der purinergen Rezeptoren entlang der Kryptenachse hervorgerufen werden könnten, wurden $Ca^{2+}$-Imaging-Experimente an permeabilisierten Krypten durchgeführt. Diese wurden direkt mit $IP_3$ stimuliert. Aber auch $IP_3$ rief in allen Kryptenabschnitten eine gleich starke Antwort mit einer gleichen Reaktionsgeschwindigkeit hervor (siehe Abbildung III.12). Nur die Stimulation mit dem zu $IP_3$-Rezeptoren hoch affinen Adenophostin A (Takahashi et al. 1994) induzierte eine schnellere $Ca^{2+}$-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern der Oberflächenregion, das heißt in der Region, in der neben dem nukleären $IP_3R2$ auch der zytoplasmatische $IP_3R3$ gefunden wurde (siehe Abbildung III.15).

| | **$IP_3$-Affinität** | **$Ca^{2+}$-Affinität** | **ATP-Affinität** | **Offenwahrscheinlichkeit** | **Offenzeit-konstante** |
|---|---|---|---|---|---|
| **$IP_3R1$** | mittel | niedrig | hoch | 0,3 | 7-8 ms |
| **$IP_3R2$** | hoch | mittel | unabhängig | 0,3 | 7-8 ms |
| **$IP_3R3$** | niedrig | hoch | niedrig | < 0,05 | ? |

**Tabelle IV.1:** Die Tabelle zeigt die wichtigsten Eigenschaften der $IP_3$-Rezeptorsubtypen (Daten aus Bezprozvanny 2005; Tu et al. 2005).

Die Ergebnisse der $Ca^{2+}$-Imaging Versuche weisen also darauf hin, dass der nukleäre $IP_3R2$ für eine rezeptorvermittelte $Ca^{2+}$-Freisetzung in den Kolonkrypten der Ratte ausreichend ist. Da der Zellkern bei den Enterozyten des Kolonepithels im basalen Drittel und damit nahe den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der basolateralen Membran gelegen ist, die durch die Bindung eines Agonisten über die

Aktivierung einer Phospholipase C eine $IP_3$-Freisetzung ins Zytosol vermitteln, verfügt er über eine nahe Lokalisation zum Bildungsort des $IP_3$. Mit seiner hohen Affinität zu $IP_3$, einer Offenwahrscheinlichkeit von 0,3 und einer Offenzeitkonstante von 7-8 ms (siehe Tabelle IV.1) scheint der $IP_3R2$ ideal geeignet zu sein, um langanhaltende $Ca^{2+}$-Signale zu initialisieren, die sich dann möglicherweise ins Zytoplasma ausbreiten können (siehe Abbildung IV.1).

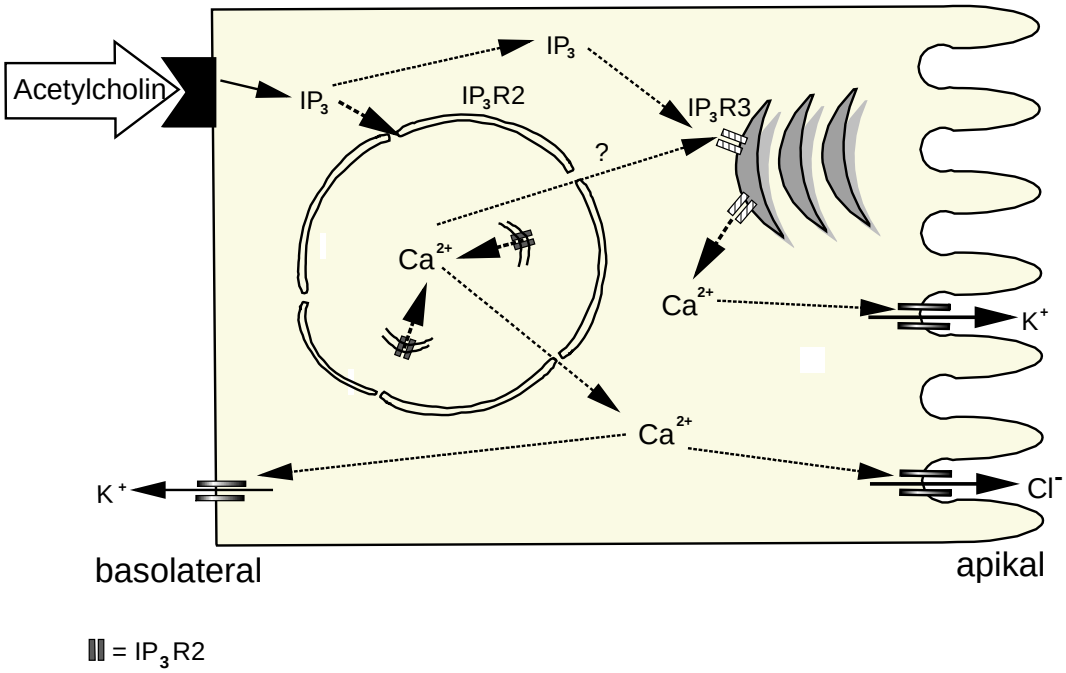



**Abbildung IV.2**: Enterozyt im Oberflächenepithel. $IP_3$ aktiviert nukleäre $IP_3R2$, wodurch $Ca^{2+}$ ins Nukleoplasma freigesetzt wird, welches zum einen nukleäre Prozesse steuert, zum anderen in das Zytoplasma diffundiert. Dort aktiviert es membranständige Ionenkanäle. Der zytoplasmatische $IP_3R3$ könnte durch das $IP_3$ aktiviert werden, eventuell löst das schneller durchs Zytoplasma diffundierende $Ca^{2+}$ aber auch eine $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung aus.

So könnte eine Bindung von $IP_3$ an den nukleären Typ 2 $IP_3$-Rezeptor zu einer Freisetzung von $Ca^{2+}$ aus dem nukleären $Ca^{2+}$-Speicher ins Nukleosol führen. Die Calciumionen könnten dann wiederum durch die Kernmembranporen in das Zytosol diffundieren und so an der apikalen und an der basolateralen Membran $Ca^{2+}$-abhängige $K^+$-Kanäle (Bleich et al. 1996; Schultheiss et al. 2003) und an der apikalen Membran $Ca^{2+}$-abhängige $Cl^-$-Kanäle (Schultheiss et al. 2005) aktivieren. Eventuell löst das über den nukleären $IP_3R2$ freigesetzte $Ca^{2+}$ auch eine $Ca^{2+}$-

induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung an den im Oberflächenepithel exprimierten zytoplasmatischen Typ 3 $IP_3$-Rezeptoren aus, da diese eine sehr hohe $Ca^{2+}$-Affinität besitzen (Bezprozvanny 2005). Außerdem diffundiert $Ca^{2+}$ aufgrund seiner geringen Molekülgröße (40,08 Da) schneller durch das Zytosol, z.B. in Azinuszellen des Pankreas mit einer Geschwindigkeit von 16,1 $\mu m \cdot s^{-1}$ (Gonzalez et al. 1998), während das zehnmal größere $IP_3$ (ca. 414 Da) langsamer diffundieren muss, da die Diffusionsgeschwindigkeit von Molekülen von ihrem Molekulargewicht abhängig ist (Hille 1992).

### 2.3. Bedeutung des $IP_3R3$-Gradienten entlang der Kryptenachse

Nachdem der $IP_3R2$ eine große funktionelle Rolle im Kolonepithel zu übernehmen scheint, stellt sich die Frage, welche Bedeutung dem Typ 3 $IP_3$-Rezeptor in der Oberflächenregion der Krypte zukommt und warum er nur dort exprimiert wird.

Der $IP_3R3$ besitzt eine sehr geringe $IP_3$-Affinität und bei einer physiologischen ATP-Konzentration des Zytosols zeigt er eine Offenwahrscheinlichkeit von kleiner 0,05 (siehe Tabelle IV.1). Damit stellt der $Ca^{2+}$-Speicher, der über $IP_3R3$ entleert wird, einen eher unempfindlichen $Ca^{2+}$-Speicher dar, der nur durch starke Stimuli und unter besonderen zytosolischen Bedingungen aktiviert wird, dafür aber nahe der apikalen Zellmembran liegt. Seine Expression könnte funktionell mit der Eigenschaft der Enterozyten im oberen Teil der Krypten verbunden sein, hauptsächlich Elektrolyte und Wasser zu resorbieren (Köckerling et al. 1993), wohingegen in den Zellen des Kryptenepithels, in denen nur der $IP_3R2$ exprimiert wird, hauptsächlich eine Sekretion von Elektrolyten und Wasser stattfindet (Köckerling and Fromm 1993). Da die $Cl^-$-Sekretion im Kolon $Ca^{2+}$-abhängig ist, könnte das wechselnde Expressionsmuster während der Differenzierung der Enterozyten damit zusammenhängen.

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Transporteigenschaften der Enterozyten im Oberflächen- und im Kryptenepithel sind die Zellen des Oberflächenepithels, in denen neben dem $IP_3R2$ auch der $IP_3R3$ gefunden wurde, einer mechanischen Stimulation während des Weitertransportes der Ingesta ausgesetzt. Da sich isolierte Bürstensaummembranvesikel auf Stimulation mit $Ca^{2+}$ hin kontrahieren (Keller and

Mooseker 1982), könnte der $IP_3R3$ zum Beispiel an der lokalen Reaktion der Mikrovilli auf Kontakt mit Darminhalt beteiligt sein.

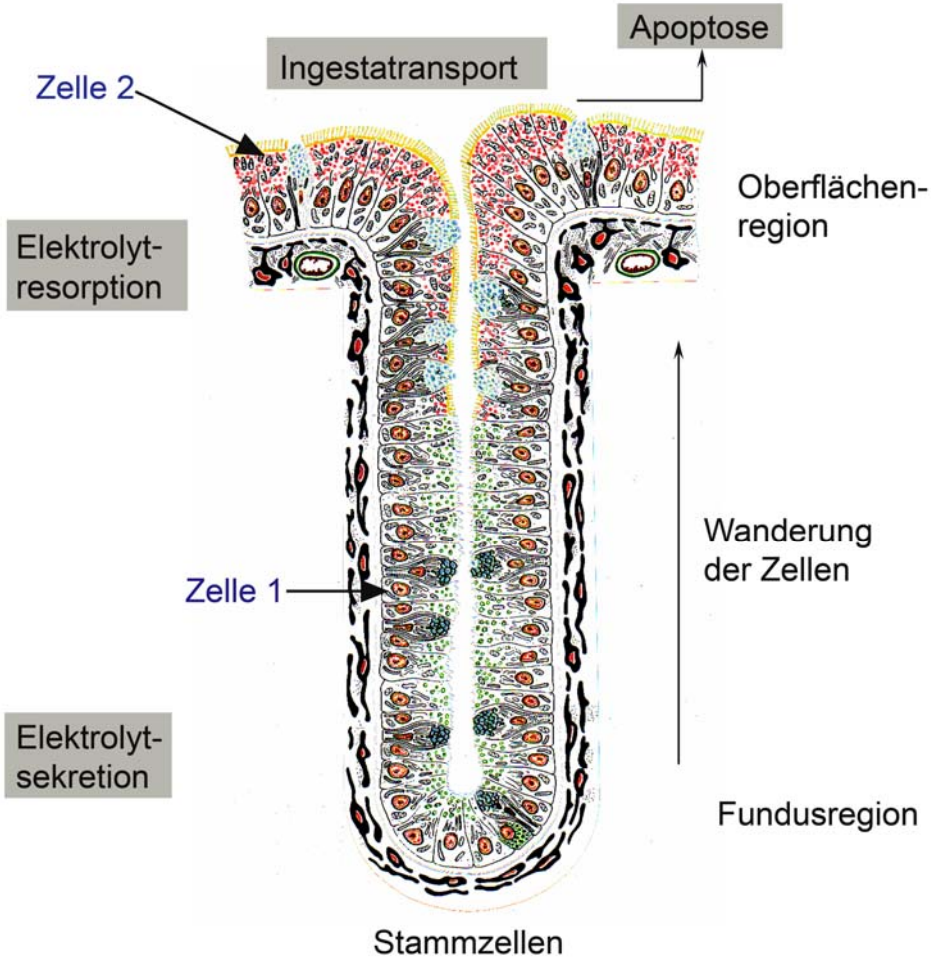



**Abbildung IV.3:** Dargestellt ist eine Kolonkrypte im Längsschnitt. In der Fundusregion befinden sich die Stammzellen, die dort proliferieren und deren Tochterzellen zur Oberflächenregion wandern und dabei weiter ausdifferenzieren. Mit der Differenzierung verändern sich auch ihre Eigenschaften: im Fundus findet hauptsächlich eine Elektrolytsekretion statt, im Oberflächenepithel eine Resorption. Der Mikrovillisaum bildet sich erst im oberen Drittel der Krypte vollständig aus. In den unteren zwei Dritteln der Krypte treten vakuolisierte Zellen auf. Außerdem erfahren die Oberflächenzellen eine mechanische Reizung durch den Ingestatransport. Erreichen die Zellen die Oberfläche, wird die Apoptose eingeleitet und die Zellen schilfern ins Darmlumen ab. Mikrovilli = gelb; Becherzellen = blau; vakuolisierte Zellen = grün; $IP_3R2$ = orange im Zellkern; $IP_3R3$ = rot im apikalen Zytoplasma des oberen Kryptendrittels; Zellen 1 und 2 sind exemplarisch für die schematisch dargestellten Zellen in den Abbildungen IV.1 und IV.2 markiert.

Auch der Bürstensaum, der durch die Mikrovilli der Enterozyten gebildet wird, entwickelt sich erst im Laufe der Enterozytendifferenzierung und erreicht seine vollständige Ausprägung erst im Oberflächenepithel (Specht 1977), so dass die Ausprägung des Bürstensaumes mit der Lokalisation des $IP_3R3$ korreliert und dieser vielleicht zur Regulation der Mikrovillibildung benötigt wird. Dieser Zusammenhang wird durch die Beobachtung im Jejunum verstärkt, wo die $IP_3R3$ im Terminalen Netz der Villuszellen gefunden wurden, das heißt direkt unter den Mikrovilli (Maranto 1994).

In den unteren zwei Dritteln des Kryptenepithels befinden sich vakuolisierte Zellen (nicht mit Becherzellen gleichzusetzen), die Schleim produzieren und diesen in das Kryptenlumen abgeben (Specht 1977), so dass das Vorkommen der vakuolisierten Zellen entgegen der $IP_3R3$-Expression verläuft, das heißt, dass der $IP_3R3$ in dem Kryptenabschnitt exprimiert wird, in dem keine vakuolisierten Zellen vorkommen (siehe Abbildung IV.3).

Gleichermaßen mit der Differenzierung der Zellen nimmt natürlich auch das Zellalter vom Kryptenfundus zum Oberflächenepithel hin zu, an dem es schließlich zur Apoptose, dem programmierten Zelltod kommt, und die Zellen in das Darmlumen abschilfern (Lipkin 1985; Potten et al. 1997). Morphologisch ist die Apoptose an der Schrumpfung der Zelle, einer Chromatin- und Zytoplasmakondensation mit anschließender Fragmentierung des Kernes und der gesamten Zelle zu erkennen. $Ca^{2+}$ ist an der Einleitung der Apoptose beteiligt. Steigt nämlich die $Ca^{2+}$-Konzentration der mitochondrialen Matrix stark an, führt dies zu Schädigungen der Mitochondrienstruktur, das heißt es kommt zu Schwellungen, Rupturen und zur Freisetzung von pro-apoptotische Faktoren, wie z.B. Cytochrom C und Apoptosis-inducing factor (= AIF), über die Permeability transition pore (Hanson et al. 2004). Diese Faktoren führen zur Bildung eines Apoptosomens, wodurch Enzyme der Caspase Familie aktiviert werden (Potten et al. 1997). $IP_3$-Rezeptoren wird eine Rolle in der Apoptoseeinleitung zugeschrieben, wobei nicht bekannt ist, ob dies nur über die Bereitstellung von $Ca^{2+}$ geschieht, oder ob es zu einer direkten Interaktion zwischen $IP_3$-Rezeptoren und zur Apoptose benötigten Enzymen kommt (Hanson et al. 2004). An Dünndarmzotten wurde eine

Beteiligung des $IP_3R3$ an der Apoptoseregulierung beschrieben (Blackshaw et al. 2000), wobei dies für das Kolonepithel nicht bewiesen ist.
Die biologische Rolle dieses Subtyps für das Kolonepithel bleibt also noch unklar und muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den in meiner Arbeit erbrachten Ergebnissen ein weiterer Teil des $Ca^{2+}$-Signalsystems im Kolonepithel aufgeklärt worden ist. Der $IP_3R2$ wurde entlang der gesamten Kryptenachse im Zellkern gefunden, wo er auch funktionell aktiv ist, das heißt, dass er sowohl an isolierten Zellkernen eine $Ca^{2+}$-Freisetzung bewirkt als auch an der klassischen Signalkaskade beteiligt ist, da eine Stimulation isolierter Krypten mit Carbachol oder mit ATP zu einer Erhöhung des zytosolischen $Ca^{2+}$-Spiegels im Kryptenfundus führt, obwohl hier nur der nukleäre $IP_3R2$ exprimiert wird. Dem $IP_3R2$ kommt somit eine zentrale Rolle im $Ca^{2+}$-Signalweg des Kolonepithels zu.
Der $IP_3R3$ hingegen wurde im apikalen Zytoplasma der Enterozyten mit einem starken Gradienten entlang der Kryptenachse (Oberfläche >> Fundus) gefunden. Da der $IP_3R3$ eine sehr geringe $IP_3$-Affinität besitzt und unter physiologischen Bedingungen eine sehr niedrige Offenwahrscheinlichkeit zeigt, scheint er nur unter Einfluss sehr starker Stimuli aktiviert zu werden. Entweder wird dieser Subtyp im Oberflächenepithel sehr spät durch $IP_3$ aktiviert, das von seinem Entstehungsort einen langen Diffusionsweg zum Rezeptor überwinden muss, oder es findet eine $Ca^{2+}$-induzierte $Ca^{2+}$-Freisetzung statt, wobei das $Ca^{2+}$ durch die vorangehende Aktivierung des $IP_3R2$ im Zellkern bereit gestellt wird. Die funktionelle Rolle des $IP_3R3$ ist letztlich ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Diese dürften gerade in Hinblick auf die Involvierung des Kolonepithels in die Induktion der sekretorischen Diarrhoe durch Veränderungen des zytosolischen $Ca^{2+}$-Spiegels und der möglichen Beteiligung von $IP_3$-Rezeptoren an Apoptosevorgängen, welche letztlich auch an der Tumorentstehung beteiligt sind, von hohem Interesse bei der weiteren Untersuchung der physiologischen und pathophysiologischen Rolle von $IP_3$-Rezeporen am Darmepithel sein.

## V. Zusammenfassung

Die Stimulation einer Reihe von G-Protein-gekoppelter Rezeptoren löst am Kolonepithel, vermittelt durch die Aktivierung einer Phospholipase C und daraus resultierender Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (= $IP_3$), eine Freisetzung von $Ca^{2+}$-Ionen aus intrazellulären Speichern aus, woraus funktionell eine sekretorische Diarrhoe entsteht. Ziel der Arbeit war es, am Kolonepithel der Ratte die exprimierten $IP_3$-Rezeptorsubtypen, ihre Lokalisation innerhalb des Kolonepithels sowie die mögliche funktionelle Bedeutung der verschiedenen Subtypen zu identifizieren.

Der Typ 1 $IP_3$-Rezeptor (= $IP_3R1$) konnte immunhistochemisch im Kolonepithel nicht nachgewiesen werden, während der Typ 2 $IP_3$-Rezeptor (= $IP_3R2$) in den Epithelzellkernen der Krypte und des Oberflächenepithels gefunden wurde. Durch Doppelfärbungen mit Lamin B1 und elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor im Nukleoplasma exprimiert wird. Der Typ 3 $IP_3$-Rezeptor (= $IP_3R3$) hingegen ist im apikalen Zytoplasma der Epithelzellen lokalisiert. Dieser Subtyp zeigt einen Gradienten entlang der Kryptenachse, da seine Expression von der Oberflächenregion zur Fundusregion hin massiv abnimmt, wo dieser Rezeptorsubtyp nicht mehr detektiert werden konnte.

Um die funktionelle Rolle der beiden Subtypen zu untersuchen, wurden $Ca^{2+}$-Imaging-Experimente durchgeführt. Zuerst sollte geklärt werden, ob sich der $IP_3R3$-Gradient entlang der Kryptenachse auf $Ca^{2+}$-Signale, die durch Stimulation des Phospholipase C / $IP_3$-Signalweges entstehen, auswirkt. Stimulation von purinergen Rezeptoren mit ATP an intakten, isolierten Kolonkrypten löste aber in allen untersuchten Kryptenabschnitten (Oberflächenregion, Mitte, Fundus) eine gleich starke sowie gleich schnelle $Ca^{2+}$-Antwort aus. Auch eine Stimulation von saponin-permeabilisierten Krypten mit $IP_3$ selbst oder dem $IP_3$-Agonisten Adenophostin A rief gleich starke Antworten in allen Kryptenabschnitten hervor. Nur das hoch affine Adenophostin konnte eine schnellere Antwort in der Oberflächenregion hervorrufen, also in dem Kryptenabschnitt, in dem sowohl nukleäre $IP_3R2$ als auch zytoplasmatische $IP_3R3$ exprimiert werden. Die Verteilung des $IP_3R3$ bedingt damit keinen wesentlichen funktionellen Gradienten entlang der Kryptenachse; der nukleäre $IP_3R2$ scheint also für die Stimulation des $Ca^{2+}$-Signalweges am

Kolonepithel ausreichend zu sein. Diese Schlussfolgerung wurde durch Imaging-Experimente an isolierten Epithelzellkernen untermauert, an denen eine $IP_3$-Exposition Änderungen in der $Ca^{2+}$-Konzentration hervorrief, die sich durch den $IP_3$-Rezeptorblocker 2-Aminoethoxy-diphenylborat (2-APB) unterdrücken ließen. Dem nukleären $IP_3R2$ scheint damit eine zentrale Rolle im $Ca^{2+}$-Signalweg des Kolonepithels zuzukommen.

## VI. Summary

At colonic epithelium, the stimulation of G-protein coupled receptors induces the activation of a phospholipase C and the production of inositol 1,4,5-trisphosphate (= $IP_3$), which causes a $Ca^{2+}$ release from intracellular stores. The functional consequence is the induction of a secretory diarrhea. The aim of this study was to identify in rat colonic epithelium the expressed $IP_3$ receptor (= $IP_3R$) subtypes, their localization inside the colonic epithelium and the putative functional role of the different subtypes.

The type 1 $IP_3$-receptor (= $IP_3R1$) could not be detected immunohistochemically in the colonic epithelium, whereas the type 2 $IP_3$-receptor (= $IP_3R2$) was found in the nuclei of the crypt and the surface epithelium. A double labelling with lamin B1 and electron microscopy showed that the $IP_3R2$ is localized in the nucleoplasm. In contrast, the type 3 $IP_3$-receptor (= $IP_3R3$) is expressed in the apical cytoplasm of the epithelial cells. This receptor shows a pronounced gradient along the crypt axis, because its expression decreases from the surface to the crypt fundus, where the receptor could not be detected.

To reveal the functional role of the receptor subtypes, $Ca^{2+}$ imaging experiments were performed. It should be investigated whether the $IP_3R3$ gradient along the crypt axis affects $Ca^{2+}$ signals, which are induced by stimulation of the phospholipase C / $IP_3$ signalling pathway. Stimulation of purinergic receptors with ATP at intact, isolated colonic crypts induced an increase in the intracellular $Ca^{2+}$ concentration of similar amplitude and time course in all investigated regions of the crypt (surface region, middle, fundus). Also a stimulation of saponin-permeabilized crypts with $IP_3$ itself or the $IP_3$-agonist, adenophostin A, resulted in a $Ca^{2+}$ release of similar size. Only adenophostin A with its high affinity for $IP_3Rs$ evoked a faster reaction in the surface region, i.e. the region which expresses both the nuclear $IP_3R2$ and the cytoplasmic $IP_3R3$. Consequently, the unequal distribution of the $IP_3R3$ along the crypt axis causes no essential functional gradient; the nuclear $IP_3R2$ seems to be sufficient for the stimulation of the $Ca^{2+}$ signalling pathway in the colonic epithelium. This conclusion could be confirmed by imaging experiments at isolated nuclei, which showed changes in the $Ca^{2+}$ concentration after exposure to $IP_3$. These effects could be suppressed by the $IP_3$ receptor blocker 2-aminoethoxy-

diphenylborate (= 2-APB). Therefore, the nuclear $IP_3R2$ seems to bear a central role in $Ca^{2+}$ signalling pathways at the colonic epithelium.

## VII. Literaturverzeichnis

Abdel-Latif AA (1986) Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. Pharmacol Rev 38:227-72

Ashby MC, Tepikin AV (2001) ER calcium and the functions of intracellular organelles. Semin Cell Dev Biol 12:11-7

Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM, Mignery GA (2005) Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. J Biol Chem 280:15912-20

Barrett KE, Keely SJ (2000) Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. Annu Rev Physiol 62:535-72

Baylor SM, Hollingworth S (2000) Measurement and interpretation of cytoplasmic [$Ca^{2+}$] signals from calcium-indicator dyes. News Physiol Sci 15:19-26

Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 361:315-25

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium-a life and death signal. Nature 395:645-8

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 1:11-21

Bezprozvanny I (2005) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Cell Calcium 38:261-72

Binder HJ, Sandle GI (1994) Electrolyte transport in the mammalian colon. In: Johnson LR (ed) Physiology of the gastrointestinal tract. Vol 2. Raven Press, New York, pp 2133-2171

Binder HJ, Sandle GI, Rajendran VM (1991) Colonic fluid and electrolyte transport in health and desease. In: Philips SF, Pemperton JH, Shorter RG (eds) The large intestine: physiology, pathophysiology and desease. Raven Press, New York, pp 141-168

Blackshaw S, Sawa A, Sharp AH, Ross CA, Snyder SH, Khan AA (2000) Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates cell death. FASEB J 14:1375-9

Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. Physiol Rev 79:763-854

Bleich M, Riedemann N, Warth R, Kerstan D, Leipziger J, Hor M, Driessche WV, Greger R (1996) $Ca^{2+}$ regulated $K^+$ and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells. Pflügers Arch 432:1011-22

Bleich M, Warth R (2000) The very small-conductance $K^+$ channel KvLQT1 and epithelial function. Pflügers Arch 440:202-6

Blondel O, Takeda J, Janssen H, Seino S, Bell GI (1993) Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. J Biol Chem 268:11356-63

Böhme M, Diener M, Rummel W (1991) Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. Pflügers Arch 419:144-51

Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL (2002) Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. Curr Biol 12:R563-5

Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P (2001) Calcium signalling-an overview. Semin Cell Dev Biol 12:3-10

Brini M, Carafoli E (2000) Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. Cell Mol Life Sci 57:354-70

Bush KT, Stuart RO, Li SH, Moura LA, Sharp AH, Ross CA, Nigam SK (1994) Epithelial inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Multiplicity of localization, solubility, and isoforms. J Biol Chem 269:23694-9

Coons AH (1958) Fluorescent antibody methods. In: J.F. D (ed) General cytochemical methods. Academic Press, New York, pp 399-422

Denk H (1988) Immunhistochemische Färbemethoden. In: Böck P (ed) Mikroskopische Technik, 17. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, pp 251-261

Dharmsathaphorn K, Pandol SJ (1986) Mechanism of chloride secretion induced by carbachol in a colonic epithelial cell line. J Clin Invest 77:348-54

Diener M, Nobles M, Rummel W (1992) Activation of basolateral $Cl^-$ channels in the rat colonic epithelium during regulatory volume decrease. Pflügers Arch 421:530-8

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

Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. Nat Cell Biol 5:440-6

Ecke D, Bleich M, Schwartz B, Fraser G, Greger R (1996) The ion conductances of colonic crypts from dexamethasone-treated rats. Pflügers Arch 431:419-26

Ehrlich BE, Watras J (1988) Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. Nature 336:583-6

Field M, Semrad CE (1993) Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. Annu Rev Physiol 55:631-55

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. Pharmacol Rev 46:143-56

Fricker M, Hollinshead M, White N, Vaux D (1997) Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. J Cell Biol 136:531-44

Frings M, Schultheiss G, Diener M (1999) Electrogenic $Ca^{2+}$ entry in the rat colonic epithelium. Pflügers Arch 439:39-48

Genazzani AA, Galione A (1997) A $Ca^{2+}$ release mechanism gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP. Trends Pharmacol Sci 18:108-10

Gerace L, Blum A, Blobel G (1978) Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. J Cell Biol 79:546-66

Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH (1995) ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of $Ca^{2+}$ from the nuclear envelope. Cell 80:439-44

Ghosh TK, Eis PS, Mullaney JM, Ebert CL, Gill DL (1988) Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium release by heparin. J Biol Chem 263:11075-9

Gonzalez A, Pfeiffer F, Schmid A, Schulz I (1998) Effect of intracellular pH on acetylcholine-induced $Ca^{2+}$ waves in mouse pancreatic acinar cells. Am J Physiol 275:C810-7

Greger R (2000) Role of CFTR in the colon. Annu Rev Physiol 62:467-91

Greger R, Bleich M, Leipziger J, Ecke D, Mall M, Kunzelmann K (1997) Regulation of Ion Transport in Colonic Crypts. News Physiol Sci 12:62-66

Griffiths G (1993) Fine structure immunocytochemistry. Springer Verlag

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of $Ca^{2+}$ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260:3440-50

Hamada K, Miyata T, Mayanagi K, Hirota J, Mikoshiba K (2002) Two-state conformational changes in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulated by calcium. J Biol Chem 277:21115-8

Hanson CJ, Bootman MD, Roderick HL (2004) Cell signalling: $IP_3$ receptors channel calcium into cell death. Curr Biol 14:R933-5

Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. Nature 385:260-5

Harlow ELD (1988) Antibodies- A laboratory manual. Cold Spring Habour Laboratory, New York

Hille B (1992) Elementary properties of ions in solution. In: Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates INC, Sunderland, Massachusetts, pp 261-290

Hofer AM, Machen TE (1993) Technique for in situ measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores using the fluorescent indicator mag-fura-2. Proc Natl Acad Sci U S A 90:2598-602

Hofer AM, Machen TE (1994) Direct measurement of free Ca in organelles of gastric epithelial cells. Am J Physiol 267:G442-51

Hofer AM, Schulz I (1996) Quantification of intraluminal free [Ca] in the agonist-sensitive internal calcium store using compartmentalized fluorescent indicators: some considerations. Cell Calcium 20:235-42

Huh YH, Yoo SH (2003) Presence of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor isoforms in the nucleoplasm. FEBS Lett 555:411-8

Humbert JP, Matter N, Artault JC, Koppler P, Malviya AN (1996) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. J Biol Chem 271:478-85

Hyrc KL, Bownik JM, Goldberg MP (2000) Ionic selectivity of low-affinity ratiometric calcium indicators: mag-Fura-2, Fura-2FF and BTC. Cell Calcium 27:75-86

Inoue T, Kato K, Kohda K, Mikoshiba K (1998) Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar Purkinje neurons. J Neurosci 18:5366-73

Irvine RF, Divecha N (1992) Phospholipids in the nucleus--metabolism and possible functions. Semin Cell Biol 3:225-35

Joseph SK, Boehning D, Pierson S, Nicchitta CV (1997) Membrane insertion, glycosylation, and oligomerization of inositol trisphosphate receptors in a cell-free translation system. J Biol Chem 272:1579-88

Joseph SK, Pierson S, Samanta S (1995) Trypsin digestion of the inositol trisphosphate receptor: implications for the conformation and domain organization of the protein. Biochem J 307 ( Pt 3):859-65

Keller TC, 3rd, Mooseker MS (1982) $Ca^{2+}$-calmodulin-dependent phosphorylation of myosin, and its role in brush border contraction in vitro. J Cell Biol 95:943-59

Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. Nature 427:360-4

Köckerling A, Fromm M (1993) Origin of cAMP-dependent $Cl^-$ secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. Am J Physiol 264:C1294-301

Köckerling A, Sorgenfrei D, Fromm M (1993) Electrogenic $Na^+$ absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium: a voltage-scanning study. Am J Physiol 264:C1285-93

Kocks S, Schultheiss G, Diener M (2002) Ryanodine receptors and the mediation of $Ca^{2+}$-dependent anion secretion across rat colon. Pflügers Arch 445:390-7

Kubista M, Akerman B, Norden B (1987) Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. Biochemistry 26:4545-53

Laflamme K, Domingue O, Guillemette BI, Guillemette G (2002) Immunohistochemical localization of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to the nucleus of different mammalian cells. J Cell Biochem 85:219-28

Leipziger J, Kerstan D, Nitschke R, Greger R (1997) ATP increases $[Ca^{2+}]i$ and ion secretion via a basolateral P2Y-receptor in rat distal colonic mucosa. Pflügers Arch 434:77-83

Leite MF, Thrower EC, Echevarria W, Koulen P, Hirata K, Bennett AM, Ehrlich BE, Nathanson MH (2003) Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. Proc Natl Acad Sci U S A 100:2975-80

Lindqvist SM, Sharp P, Johnson IT, Satoh Y, Williams MR (1998) Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis. Gastroenterology 115:1131-43

Lindstroem CG, Rosengren J-E, Fork F-T (1977) Colon of the rat: An anatomic, histologic and radiographic investigation. Acta Radiologica Diagnosis Stockholm 20:523-536

Lipkin M (1985) Growth and development of gastrointestinal cells. Annu Rev Physiol 47:175-97

Lui PP, Kong SK, Kwok TT, Lee CY (1998) The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for $Ca^{2+}$ signalling. Biochem Biophys Res Commun 247:88-93

Maeda N, Kawasaki T, Nakade S, Yokota N, Taguchi T, Kasai M, Mikoshiba K (1991) Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. J Biol Chem 266:1109-16

Maranto AR (1994) Primary structure, ligand binding, and localization of the human type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expressed in intestinal epithelium. J Biol Chem 269:1222-30

Marchenko SM, Yarotskyy VV, Kovalenko TN, Kostyuk PG, Thomas RC (2005) Spontaneously active and $InsP_3$-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. J Physiol 565:897-910

Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P3-induced $Ca^{2+}$ release. J Biochem (Tokyo) 122:498-505

Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, Takano H, Minowa O, Kuno J, Sakakibara S, Yamada M, Yoneshima H, Miyawaki A, Fukuuchi Y, Furuichi T, Okano H, Mikoshiba K, Noda T (1996) Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Nature 379:168-71

Mazzotti G, Zini N, Rizzi E, Rizzoli R, Galanzi A, Ognibene A, Santi S, Matteucci A, Martelli AM, Maraldi NM (1995) Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate localization sites within the nucleus. J Histochem Cytochem 43:181-91

Miyakawa T, Maeda A, Yamazawa T, Hirose K, Kurosaki T, Iino M (1999) Encoding of $Ca^{2+}$ signals by differential expression of $IP_3$ receptor subtypes. EMBO J 18:1303-8

Moir RD, Spann TP, Lopez-Soler RI, Yoon M, Goldman AE, Khuon S, Goldman RD (2000) Review: the dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle-- relationship between structure and function. J Struct Biol 129:324-34

Monkawa T, Hayashi M, Miyawaki A, Sugiyama T, Yamamoto-Hino M, Hasegawa M, Furuichi T, Mikoshiba K, Saruta T (1998) Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the rat kidney. Kidney Int 53:296-301

Nathanson MH, Padfield PJ, O'Sullivan AJ, Burgstahler AD, Jamieson JD (1992) Mechanism of $Ca^{2+}$ wave propagation in pancreatic acinar cells. J Biol Chem 267:18118-21

Parekh AB, Penner R (1997) Store depletion and calcium influx. Physiol Rev 77:901-30

Parsons DS, Paterson CR (1965) Fluid and solute transport across rat colonic mucosa. J. Exp. Physiol. 50:220-231

Patel S, Joseph SK, Thomas AP (1999) Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Cell Calcium 25:247-64

Patterson RL, Boehning D, Snyder SH (2004) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. Annu Rev Biochem 73:437-65

Petersen OH, Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Mogami H, Tepikin AV (1998) The calcium store in the nuclear envelope. Cell Calcium 23:87-90

Petersen OH, Petersen CC, Kasai H (1994) Calcium and hormone action. Annu Rev Physiol 56:297-319

Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R (1998) The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive $Ca^{2+}$ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. EMBO J 17:5298-308

Potten CS, Booth C, Pritchard DM (1997) The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. Int J Exp Pathol 78:219-43

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. Physiol Rev 74:595-636

Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev 50:413-92

Ribeiro CM, Paradiso AM, Carew MA, Shears SB, Boucher RC (2005) Cystic fibrosis airway epithelial $Ca^{2+}{}_{i}$ signaling: the mechanism for the larger agonist-mediated $Ca^{2+}{}_{i}$ signals in human cystic fibrosis airway epithelia. J Biol Chem 280:10202-9

Ringer S (1883) A further contribution regarding the influence of different constituents of the blood on the concentration of the heart. J Physiol (Lond) 4:29-43

Sachs L (1992) Beurteilung linearer Kontraste nach Scheffé. In: Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 626-631

Schindl R, Kahr H, Graz I, Groschner K, Romanin C (2002) Store depletion-activated CaT1 currents in rat basophilic leukemia mast cells are inhibited by 2-aminoethoxydiphenyl borate. Evidence for a regulatory component that controls activation of both CaT1 and CRAC ($Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$ channel) channels. J Biol Chem 277:26950-8

Schultheiss G, Diener M (1998) $K^+$ and $Cl^-$ conductances in the distal colon of the rat. Gen Pharmacol 31:337-42

Schultheiss G, Lan Kocks S, Diener M (2002) Methods for the study of ionic currents and Ca2+-signals in isolated colonic crypts. Biol Proced Online 3:70-78

Schultheiss G, Ribeiro R, Schäfer KH, Diener M (2003) Activation of apical $K^+$ conductances by muscarinic receptor stimulation in rat distal colon: fast and slow components. J Membr Biol 195:183-96

Schultheiss G, Siefjediers A, Diener M (2005) Muscarinic receptor stimulation activates a $Ca^{2+}$-dependent $Cl^-$ conductance in rat distal colon. J. Membrane Biol. 204:117-127

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

Seip G, Schultheiss G, Kocks SL, Diener M (2001) Interaction between store-operated non-selective cation channels and the $Na^+$-$Ca^{2+}$ exchanger during secretion in the rat colon. Exp Physiol 86:461-8

Serysheva, II, Bare DJ, Ludtke SJ, Kettlun CS, Chiu W, Mignery GA (2003) Structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor revealed by electron cryomicroscopy. J Biol Chem 278:21319-22

Sharp AH, Nucifora FC, Jr., Blondel O, Sheppard CA, Zhang C, Snyder SH, Russell JT, Ryugo DK, Ross CA (1999) Differential cellular expression of isoforms of inositol 1,4,5-triphosphate receptors in neurons and glia in brain. J Comp Neurol 406:207-20

Sharp AH, Snyder SH, Nigam SK (1992) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Localization in epithelial tissue. J Biol Chem 267:7444-9

Singh SK, Binder HJ, Boron WF, Geibel JP (1995) Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. J Clin Invest 96:2373-9

Sobotta J, Becher H (1972) Verdauungsapparat. In: Ferner H, Staubesand J (eds) Atlas der Anatomie des Menschen. Vol 2. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, pp 61-143

Spassova MA, Soboloff J, He LP, Hewavitharana T, Xu W, Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Gill DL (2004) Calcium entry mediated by SOCs and TRP channels: variations and enigma. Biochim Biophys Acta 1742:9-20

Specht W (1977) Morphology of the intestinal wall. In: Kramer M, Lauterbach F (eds) Intestinal permeation. Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, pp 4-40

Strabel D, Diener M (1995) Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. Eur J Pharmacol 274:181-91

Sugiyama T, Furuya A, Monkawa T, Yamamoto-Hino M, Satoh S, Ohmori K, Miyawaki A, Hanai N, Mikoshiba K, Hasegawa M (1994) Monoclonal antibodies distinctively recognizing the subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: application to the studies on inflammatory cells. FEBS Lett 354:149-54

Surroca A, Wolff D (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate but not ryanodine-receptor agonists induces calcium release from rat liver Golgi apparatus membrane vesicles. J Membr Biol 177:243-9

Takahashi M, Tanzawa K, Takahashi S (1994) Adenophostins, newly discovered metabolites of Penicillium brevicompactum, act as potent agonists of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. J Biol Chem 269:369-72

Tasker PN, Taylor CW, Nixon GF (2000) Expression and distribution of $InsP_3$ receptor subtypes in proliferating vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 273:907-12

Taylor CW, Broad LM (1998) Pharmacological analysis of intracellular $Ca^{2+}$ signalling: problems and pitfalls. Trends Pharmacol Sci 19:370-5

Taylor CW, Genazzani AA, Morris SA (1999) Expression of inositol trisphosphate receptors. Cell Calcium 26:237-51

Thorn P, Lawrie AM, Smith PM, Gallacher DV, Petersen OH (1993) Local and global cytosolic $Ca^{2+}$ oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. Cell 74:661-8

Thrower EC, Hagar RE, Ehrlich BE (2001) Regulation of Ins(1,4,5)$P_3$ receptor isoforms by endogenous modulators. Trends Pharmacol Sci 22:580-6

Tsien R, Poenie M (1986) Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling. TIBS 11:450-455

Tsien RW, Tsien RY (1990) Calcium channels, stores, and oscillations. Annu Rev Cell Biol 6:715-60

Tsien RY (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. Biochemistry 19:2396-404

Tu H, Wang Z, Nosyreva E, De Smedt H, Bezprozvanny I (2005) Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. Biophys J 88:1046-55

Vermassen E, Parys JB, Mauger JP (2004) Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. Biol Cell 96:3-17

Vermassen E, Van Acker K, Annaert WG, Himpens B, Callewaert G, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB (2003) Microtubule-dependent redistribution of the type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in A7r5 smooth muscle cells. J Cell Sci 116:1269-77

Warth R, Hamm K, Bleich M, Kunzelmann K, von Hahn T, Schreiber R, Ullrich E, Mengel M, Trautmann N, Kindle P, Schwab A, Greger R (1999) Molecular and functional characterization of the small $Ca^{2+}$-regulated $K^+$ channel (rSK4) of colonic crypts. Pflügers Arch 438:437-44

Warth R, Riedemann N, Bleich M, Van Driessche W, Busch AE, Greger R (1996) The cAMP-regulated and 293B-inhibited $K^+$ conductance of rat colonic crypt base cells. Pflügers Arch 432:81-8

Welsh MJ, Smith PL, Fromm M, Frizzell RA (1982) Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. Science 218:1219-21

Wojcikiewicz RJ (1995) Type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. J Biol Chem 270:11678-83

Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L (2003) PMR1/SPCA $Ca^{2+}$ pumps and the role of the Golgi apparatus as a $Ca^{2+}$ store. Pflügers Arch 446:148-53

Xu SZ, Zeng F, Boulay G, Grimm C, Harteneck C, Beech DJ (2005) Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. Br J Pharmacol 145:405-14

Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S, Worley PF (2003) Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by $IP_3$ receptors. Cell 114:777-89

Zucchi R, Ronca-Testoni S (1997) The sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. Pharmacol Rev 49:1-51

**Danksagung**

Allen, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben, sei herzlich gedankt:

An erster Stelle möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Martin Diener** für die Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Durch seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und seine Ideen habe ich viele Anregungen erhalten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank geht an die **H. Wilhelm Schaumann-Stiftung**, die mich mit einem Stipendium unterstützt hat.

Danke an Dr. Martin Hardt für die anregenden fachlichen Diskussionen und die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie.

Danke an Prof. K. Mikoshiba aus Tokyo, Japan für die Bereitstellung der $IP_3$-Rezeptor Antikörper.

Sabine Agel danke ich für die Geduld bei der Einführung in die Probenpräparation der Elektronenmikroskopie und für die Anfertigung der Ultradünnschnitte.

Danke an Daniela Hild und Dr. Thomas Hübschele für die Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft bei der Einführung in die Immunhistochemie.

Danke an Gabi Kiefer für die Durchführung der Gewebeeinbettung mit der PLT-Methode.

Danke an Brigitta Brück, Eva-Maria Haas und Alice Metternich für die Einführung in die wissenschaftliche Laborarbeit und an Bärbel Schmidt für die Unterstützung bei der Durchführung der Probenpräparation.

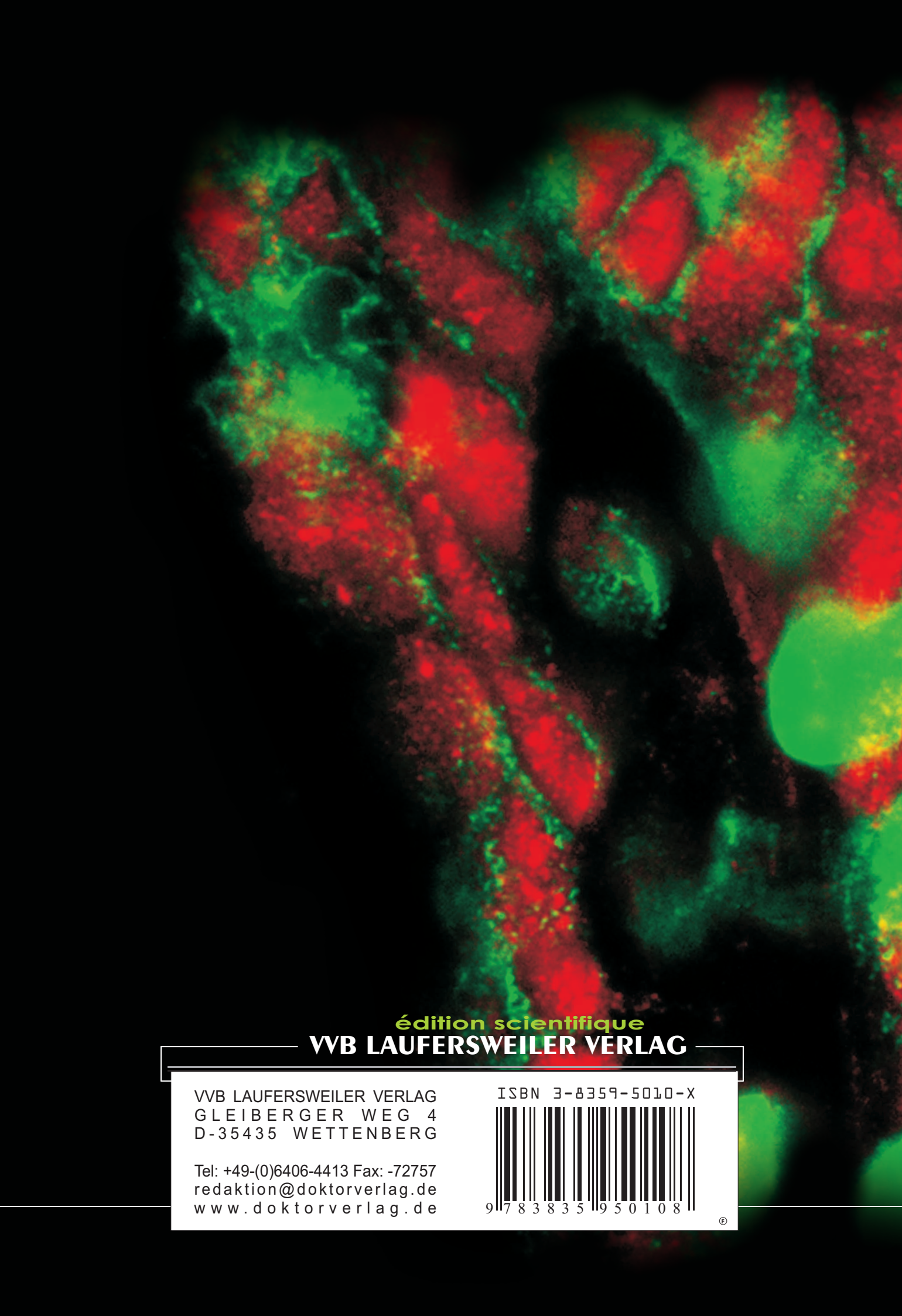
Danke an Michael Haas für die gewissenhafte Pflege und Versorgung der Versuchstiere und an Karl-Hermann Maurer für die Hilfsbereitschaft bei der Lösung technischer Probleme.

Ein Dankeschön an alle Mitarbeiter des Instituts für Veterinär-Physiologie für das gute Arbeitsklima.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinem Freund, die mich während meines Studiums und während meiner Promotion immer unterstützt haben.

## Erklärung

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



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5010-X

9 783835 950108