



**INTRAZELLULÄRE Ca^{2+} -TRANSPORTER IM
KOLONEPITHEL DER RATTE:**

**UNTERSUCHUNGEN VON RYANODIN-
REZEPTOREN SOWIE SERCAS**

GUNDULA PRINZ

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

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 2007

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 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

**Intrazelluläre Ca²⁺-Transporter im Kolonepithel der Ratte:
Untersuchungen von Ryanodinrezeptoren sowie SERCAs**

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

eingereicht von

Gundula Prinz

Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2007

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

Dekan: Prof. Dr. M: Reinacher

Gutacher:

Prof. Dr. M. Diener

Prof. Dr. G. Reiner

Tag der Disputation: 31.08.2007

Abkürzungen	V
I. Einleitung	1
1. Das Kolon – Darstellung als funktionelle Einheit	1
2. Kalzium als intrazellulärer Botenstoff	4
2.1. Kalziumtransport an exzitativem Gewebe	8
2.2. Transportprozesse am Kolon	10
3. Ryanodinrezeptoren	12
4. Sarkoplasmatische-Endoplasmatische Retikulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)	16
5. Eigene Fragestellung	18
II. Material und Methoden	20
1. Versuchstiere	20
2. Chemikalien	21
3. Lösungen	22
3.1. Lösungen für die Immunhistochemie	22
3.1.1. Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung	22
3.1.2. Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung	22
3.1.3. Phosphatpuffer (= PB)	22
3.1.4. Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)	23
3.1.5. Paraformaldehyd-Lösung (PFA 4 %)	23
3.1.6. Saccharose-Lösung (20 %)	23
3.1.7. Blocking-Lösung	23
3.1.8. Avidin-Biotin-Blocking-Lösung	23
3.1.9. Permeabilisierungs-Lösung	23
3.1.10. Avidin-Peroxidase-Lösung	23
3.1.11. 3,3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)-Lösung	24
3.1.12. Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)-Lösung	24
3.1.13. Primärantikörper-Lösung	24
3.1.14. Sekundärantikörper-Lösung	24
3.1.15. DAPI-Lösung	24
3.2. Lösungen für den Western Blot	25
3.2.1. Tris-Puffer (TBS)	25
3.2.2. Wasch-Puffer	25
3.2.3. Lysis-Puffer	25
3.2.4. Histidin-Puffer	25
3.2.5. Transfer-Puffer	25
3.2.6. Trenngelpuffer	25
3.2.7. Sammelgelpuffer	26
3.2.8. Laufpuffer	26
3.2.9. Probenpuffer	26
3.2.10. Blocking-Lösung	26
3.2.11. Lösung für die Immunpräzipitation	26

3.3. Lösungen für die Kryptenisolation	26
3.3.1. Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung	26
3.3.2. Isolationslösung	27
3.3.3. Auffang-Tyrode	27
3.4. Lösungen für die Imaging-Messungen	27
3.4.1. Fura-2 AM-Stammlösung	27
3.4.2. Pluronic F-127-Stammlösung	27
3.4.3. Mag-Fura-2 AM-Stammlösung	27
3.4.4. Kalziumfreie NaCl-Tyrode	28
4. Präparation der Darmschleimhaut	28
5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
5.1. Grundlage der PCR	29
5.2. Isolation von mRNA	31
5.3. Quantitative Bestimmung der Gesamt-RNA	32
5.4. Synthese von cDNA	32
5.5. Oligonukleotide (Primer)	33
5.5.1. Ryanodinrezeptoren	34
5.5.2. SERCAs	34
5.6. Versuchsdurchführung	35
5.6.1. Ryanodinrezeptor Subtyp-1	35
5.6.2. Ryanodinrezeptor Subtyp-2 und -3	36
5.6.3. Sarkoplasmatische-Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase Subtyp-1 bis -3	37
5.7. Gel-Elektrophorese	38
6. Immunhistochemische Analyse des Darmpräparates	38
6.1. Grundlage der Immunfluoreszenz	39
6.2. Grundlage der indirekten ABC-Komplexfärbung mit DAB als Detektionssystem	39
6.3. Verwendete Antikörper	41
6.3.1. Detektion des Ryanodinrezeptors/IP ₃ -Rezeptors	41
6.3.2. Detektion der CD38/ADP-Ribosyl Zyklase	42
6.3.3. Detektion der SERCAs	43
6.4. Negativkontrollen	43
6.5. Fluoreszenzmarkierungen	44
6.5.1. Kryofixation des Kolons	44
6.5.2. Kryofixation des Skelettmuskels	44
6.5.3. Perfusion	45
6.5.4. Herstellung der Gewebeschnitte	46
6.5.5. Fluoreszenz-Kernfarbstoff	46
6.5.6. Versuchsdurchführung/Färbeprotokolle	46
6.5.7. Mikroskopie	50
6.6. ABC-Komplex-Färbung mit DAB-Detektionssystem	51
6.6.1. Versuchsdurchführung/Färbeprotokoll	51
6.6.2. Mikroskopie	53

7. Western Blot	53
7.1. Das Prinzip des Western Blots	53
7.2. Eingesetzte Antikörper und Leiter	54
7.3. Proteinextraktion	54
7.3.1. Präparation der Kolonkrypten und Separation der Mikrosomenfraktion	54
7.3.2. Präparation des Skelettmuskelgewebes und Separation der Mikrosomenfraktion	55
7.4. Immunopräzipitation (IP)	56
7.5. Proteinbestimmung	56
7.6. Versuchsdurchführung	57
7.6.1. SDS-PAGE (Natriumdedecylsulfat-Poly Acrylamid Gel Electrophorese) nach Lämmli	57
7.6.2. Protein Blotting (semi-dry)	58
7.6.3. Färbeprotokoll, Filmentwicklung und Dokumentation	59
8. Imaging-Messungen	60
8.1. Allgemeines zur Ca^{2+} -Messung mittels Ca^{2+} -sensitiver Farbstoffe	60
8.2. Kryptenpräparation	63
8.3. Verwendete Farbstoffe	63
8.3.1. Fura-2	63
8.3.2. Mag-Fura-2	66
8.4. Messstand	67
8.5. Messkammer und Perfusionssystem	69
8.6. Versuchsdurchführung	69
8.6.1. Messungen an isolierten Krypten	69
8.6.2. Stiumlanzen	71
8.6.3. Blocker	73
8.7. Datenerfassung	74
8.8. Statistik	74
III. Ergebnisse	75
1. Molekularbiologischer Nachweis des Ryanodinrezeptors (RyRs) im Kolonepithel mittels PCR	75
2. Immunhistochemische Untersuchungen in den Kryptenzellen des Kolons	77
2.1. Verteilung des RyR-1 entlang der Kryptenachse	77
2.1.1. Einfachmarkierung	77
2.1.2. Doppelmarkierung RyR-1/IP ₃ R-3	80
2.2. Einfachmarkierung der CD38/ADP-Ribosyl Zykase in den Epithelzellen des Kolons	83
3. Western Blot	85
3.1. Nachweis des Ryanodinrezeptors Subtyp-1 im Kolonepithel	85
4. Funktionelle Auswirkungen der gleichmäßigen Verteilung des RyR-1 entlang der Kryptenachse	86
4.1. Wirkung des Ryanodinrezeptor-Agonisten Monochloramin auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel	86

4.2. Auswirkungen auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel durch Blockade des Ryanodinrezeptors mit Ruthenium Rot	88
4.3. Wirkung von Arachidonsäure auf den intrazellulären Kalziumspiegel	90
4.4. Koloalokalisation des Ryanodinrezeptors mit den IP_3 -Rezeptoren?	91
5. Untersuchung der Sarkoplasmatisch-Endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA) im Kolonepithel der Ratte	95
5.1. Molekularbiologischer Nachweis mittels PCR	95
5.2. Immunhistochemische Färbemethode zur Darstellung ihrer Lokalisation im Kolonepithel	96
5.2.1. SERCA-2b	96
5.2.2. SERCA-3	98
<i>IV. Diskussion</i>	99
1. Der Ryanodinrezeptor im Kolonepithel der Ratte	100
1.1. Molekularbiologischer Nachweis	100
1.2. Nachweis des RyR-1 und Vergleich zum IP_3R -3	101
2. Die SERCA im Kolonepithel der Ratte	104
3. Funktionelle Charakterisierung des RyR-1 im Kolonepithel	106
4. Physiologische Bedeutung von RyRs und IP_3Rs in den Enzerozyten des Kolons der Ratte	108
<i>V. Zusammenfassung</i>	113
<i>VI. Summary</i>	115
<i>VII. Literaturverzeichnis</i>	117
<i>Danksagung</i>	127
<i>Erklärung</i>	128

Abkürzungen

AM	Acetoxymethylester
2-APB	2-Aminoethoxy-diphenylborat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches (cyclic)-3',5'-Adenosin-Monophosphat
cADPR	zyklische (cyclic) Adenosindiphosphoribose
cGMP	zyklisches (cyclic) Guanosin-Monophosphat
CCD-Kamera	charge coupled device Kamera
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung (Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ release)
CPA	Cyclopiazonsäure
DAB	3,3 Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (= desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F _{ab}	antigen-bindendes Fragment
F _c	kristallisierbares Fragment
Gew/Vol	Gewichtsanteil (= Gewicht pro Volumen)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish peroxidase = Meerrettich-Peroxidase
ICL	Intrazellular-ähnliche (= intracellular-like) Lösung
IgG	Immunglobulin G (= Antikörper)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptor
K _d	Dissoziationskonstante
MCA	Monochloramin
MCU	Ca ²⁺ -Uniporter der Mitochondrien
MOCC	mechanisch aktivierte Ca ²⁺ -Kanäle (= mechanical operated Ca ²⁺ channel)
NAADP	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCX	Na ²⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NGS	Normales Ziegen Serum (= normal goat serum)
NSKK	nicht-selektiver Kationenkanal
NSOCC	nicht-speichergesteuerte Ca ²⁺ -Kanäle (= non-store operated Ca ²⁺ channels)
PB	Phosphatpuffer
PIC	Protein-Inhibitoren-Cocktail
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pS	piko Siemens
ROCC	rezeptorgesteuerte Ca ²⁺ -Kanäle (= receptor operated Ca ²⁺ channels)
ROI	Messfeld bei Imaging-Experimenten (= region of interest)
RyR	Ryanodinrezeptor
SCaMPER	sphingolipid Ca ²⁺ -mediating protein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERCA	Sarkoplasmatische-Endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase

SOCC	speichergesteuerte Ca ²⁺ -Kanäle (= store operated Ca ²⁺ channels)
SPCA	Secretory Pathway Ca ²⁺ /Mn ²⁺ -ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TEMED	Trimethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VOCC	spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle (= voltage-operated Ca ²⁺ channels)
Vol/Vol	Volumenanteil (= Volumen pro Volumen)
ZNS	zentrales Nervensystem

I. Einleitung

1. Das Kolon – Darstellung als funktionelle Einheit

Makroskopisch kann der Dickdarm der Ratte in fünf Abschnitte gegliedert werden: Zäkum, proximales Kolon, große Flexur, distales Kolon und Rektum. *Haustren* und *Taenien* sind nicht ausgebildet. Das proximale Kolon weist eine charakteristische Querstreifung auf, die den Übergang in das distale Kolon leicht erkennen lässt (Lindstrom et al. 1979).

Dieser Teil der Verdauungsorgane bildet bei den Säugetieren das Ende des Gastrointestinaltraktes und damit die letzte Möglichkeit, die Zusammensetzung der Faeces zu verändern. Der Dickdarm ist neben dem Weitertransport der Ingesta maßgeblich am Wasser- und Elektrolythaushalt beteiligt und sorgt für die bakterielle Aufspaltung unverdaulicher Kohlenhydrate. Etwa 1,3-1,8 l elektrolytreiche Flüssigkeit werden physiologisch pro Tag im menschlichen Kolon resorbiert. Das entspricht ca. 90 % des Salzes und Wassers, das in das proximale Kolon eintritt (Kunzelmann & Mall 2002). Die maximale Transportkapazität beträgt jedoch 5000-6000 ml pro Tag, was die enorme Anpassungsfähigkeit des Organismus ausdrückt. Wenn der Flüssigkeitseintritt in den Dickdarm diese Resorptionsleistung überschreitet, kommt es zur Ausbildung einer klinisch manifesten Diarrhoe (Binder et al. 1991; Binder & Sandle 1994). Da das Kolon nicht nur zur Resorption, sondern auch zur Sekretion befähigt ist, kann eine Steigerung dieser Funktion ebenfalls zur Diarrhoe führen (Field & Semrad 1993).

Die Wand des Kolons, dessen Epithel eine wichtige Barriere zwischen Körper und Außenwelt darstellt, ist wie in Abbildung I.1. dargestellt aufgebaut:

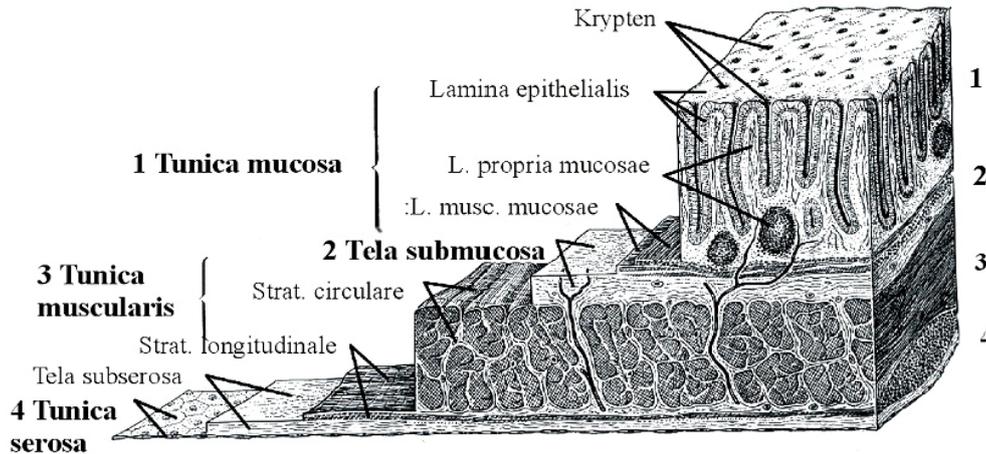


Abbildung I.1.: Schemazeichnung der Kolonwand in Lupenvergrößerung (Sobotta & Becher 1972). Strat. = Stratum; L. = Lamina

Sie besteht aus vier Schichten, wobei die *Tunica mucosa* die innerste bildet. Diese setzt sich zusammen aus der *Lamina epithelialis mucosae*, in die sich die sog. Lieberkühn'schen Krypten einsenken (Potten et al. 1997), der *Lamina propria mucosae*, die fingerförmig in die Zwischenräume der Krypten zieht, und der *Lamina muscularis mucosae*, die die beiden Erstgenannten mit ihren glatten Muskelzellen unterlagert. Als zweite Schicht folgt die *Tela submucosa*, die eine Bindegewebsschicht mit zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen darstellt. Die *Tunica muscularis* mit einem *Stratum circulare* und einem *Stratum longitudinale* bildet die dritte Schicht, und den bindegewebigen Abschluss des Darms zum Abdomen formt die *Tunica serosa* (Abb. I.1.).

In dieser Arbeit steht die *Lamina epithelialis mucosae* im Mittelpunkt (Abb. I.2.). Sie wird von unterschiedlichen Zelltypen gebildet, wobei die Enterozyten den größten Anteil ausmachen – sie bilden die Grundlage des Epithels. Ihr Zellkern liegt im basalen Drittel der Zelle, und in der Oberflächenregion der Krypten tragen sie Mikrovilli, die durch regelmäßige Anordnung von Aktin- und Myosinfilamenten beweglich sind. Sie vergrößern die mukosale Oberfläche um den Faktor 30, wodurch die Resorptionskapazität erheblich erhöht wird. In die äußerste Schicht der Mikrovilli-Plasmamembran ist die Glykokalix integriert. Sie besteht aus ultrafeinen, haarförmigen und verzweigten Filamenten und ist der wichtigste Ort von endständiger Verdauung und Resorption. Ein weiterer Zelltyp des Kryptenepithels sind die

Becherzellen. Sie sezernieren Muzine, die den Weitertransport der Ingesta erleichtern und dem Schutz der epithelialen Oberfläche dienen (Potten et al. 1997) – nicht zuletzt durch ihre antibakteriellen Eigenschaften. Neben den Bürstensaumzellen, deren büschelartig angeordnete Mikrovilli in das Darmlumen reichen, bleiben die enteroendokrinen Zellen zu erwähnen. Sie produzieren verschiedene Hormone wie Somatostatin, Vasoaktives Intestinales Peptid (= VIP) und Serotonin (Specht 1977). Wie in Abbildung I.2. dargestellt, lassen sich die Krypten in drei Regionen – Oberfläche, Mitte und Fundus – einteilen (Greger et al. 1997).

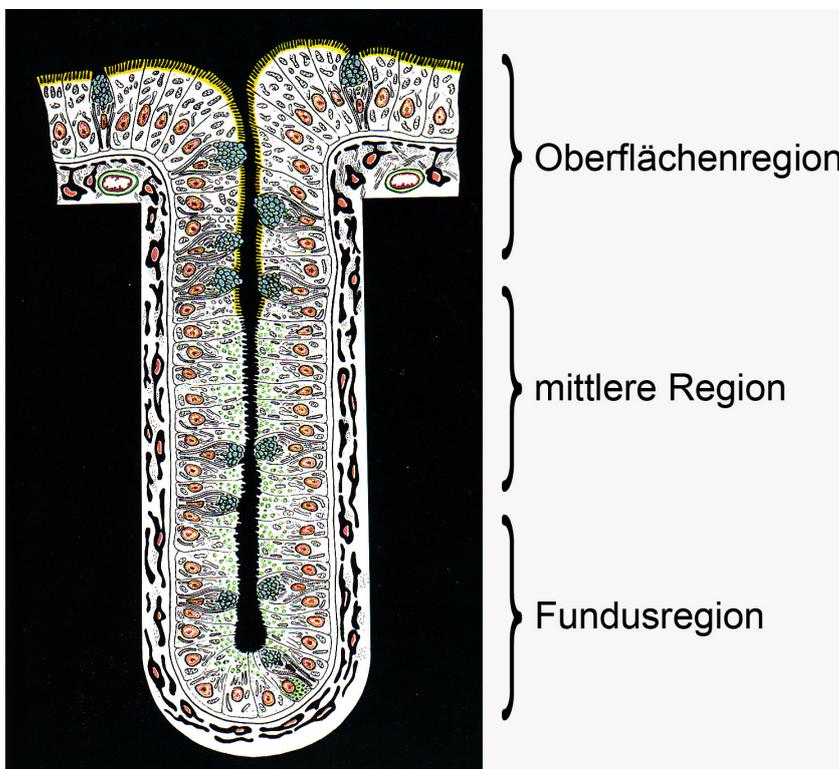


Abbildung I.2.: Longitudinaler Schnitt durch eine Krypte, halbschematische Darstellung (nach Specht 1977)

Alle epithelialen Zellen des Kolons werden von Stammzellen, die an der Kryptenbasis sitzen, hervorgebracht. Die Zellen wandern im Laufe ihres Lebens an die Oberfläche der Krypte, differenzieren sich, reifen und erlangen so ihre spezifische Funktion (Barrett & Keely 2000). Im Anschluss unterliegen sie ihrem natürlichen apoptotischen Programm und schilfern in das Darmlumen ab (Potten et al. 1997). Ein solcher Zyklus hat bei Nagern eine Länge von 2-3 Tagen (Lipkin 1985).

Wegen des unterschiedlichen Grades der Ausdifferenzierung der Zellen entlang der Kryptenachse besteht die Frage, ob es aufgrund dieser Tatsache auch funktionelle Unterschiede zwischen Oberflächenepithel und Krypte gibt. Bereits 1982 zeichnete sich ab, dass tatsächlich eine funktionelle Heterogenität besteht. Welsh et al. zeigten, dass das Oberflächenepithel resorbierende Fähigkeiten besitzt, der Kryptenfundus sezernierende (Welsh et al. 1982). Dies wurde jedoch 1993 widerlegt, als experimentelle Daten belegten, dass die Fähigkeit der Sekretion nicht nur auf den Kryptenfundus beschränkt ist, sondern auch im Oberflächenepithel stattfindet (Köckerling & Fromm 1993) und resorptive Prozesse auch im Fundus der Krypte vonstatten gehen (Singh et al. 1995). Heutzutage weiß man, dass die Epithelzellen des Kolons je nach Differenzierungsgrad Hauptaufgaben haben, aber jederzeit zwischen Resorption und Sekretion umschalten können (Greger et al. 1997).

2. Kalzium als intrazellulärer Botenstoff

Fast alles, was wir tun, wird durch Kalzium gesteuert – wie wir uns bewegen, wie unser Gehirn Informationen verarbeitet und speichert und wie unser Herz schlägt. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts postulierte Sidney Ringer, dass Kalzium essentiell für den Herzschlag ist (Ringer 1883). Allerdings sollte bald erkannt werden, dass die Bedeutung von Kalzium nicht auf erregbare Gewebe beschränkt, sondern ebenfalls auf nicht-erregbaren Gewebe ausgedehnt ist (Brini & Carafoli 2000). So spielt das Ion z. B. bei der Fertilisation, der Entwicklung und Differenzierung von Zellen und beim Zelltod eine wichtige Rolle (Berridge et al. 2000; Berridge 2004). Die lebenswichtige Bedeutung des Botenstoffes Kalzium ergibt sich zu großen Teilen daraus, dass die Zellen in der Lage sind, Ca^{2+} -Signale zu verschlüsseln, indem sie die Parameter Raum, Zeit und Amplitude nutzen (Bootman et al. 2001). So kann Kalzium entweder aus dem Extrazellularraum über die Plasmamembran ins Zytosol gelangen oder aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Es sind Ca^{2+} -Wellen bekannt, die räumlich begrenzt bleiben, und solche, die sich über die gesamte Zelle oder sogar zellübergreifend ausbreiten. Zeitlich betrachtet können es vorübergehende Signale sein oder solche, die über längere Perioden bestehen bleiben (Petersen et al. 1994; Berridge et al. 1998).

Diese Steigerungen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels auf Werte von ca. $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ können nur so effektiv sein, weil die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Ruhe mit einem Wert von $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ relativ gering ist (Bootman et al. 2001). Durch die spezifische „Ausstattung“ jeder Zelle werden die für den Zellstoffwechsel notwendigen, schnell wechselnden Ionenkonzentrationen überhaupt erst ermöglicht. Sie besitzen Organellen, wie das Endoplasmatische (Sarkoplasmatische) Retikulum (ER/SR) (Ashby & Tepikin 2001) und den Golgi-Apparat (Missiaen et al. 2004), die neben anderen für die Speicherung von Kalzium verantwortlich sind. Um diese Ca^{2+} -Speicher nach Entleerung wieder zu füllen, sind Sarkoplasmatische-Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPasen (SERCAs) in den Membranen des ERs/SRs (Gélébart et al. 2002) und Secretory Pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPasen (SPCAs) in den Membranen des Golgi-Apparats exprimiert (Wuytack et al. 2003). Ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Rückführung des zytosolischen Kalziums in intrazelluläre Speicher spielen die Mitochondrien. Mit ihrem in der inneren Membran lokalisierten Ca^{2+} -Uniporter (MCU) werden Ca^{2+} -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten aufgenommen (Kirichok et al. 2004). Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), der in allen tierischen Zellen vorhanden ist, kann seine Transportrichtung anpassen. Normalerweise transportiert er Kalzium aus der Zelle, genau wie die ATP-verbrauchende Ca^{2+} -Pumpe in der Plasmamembran (PMCA) (Brini & Carafoli 2000). Verändern sich allerdings die Na^+ -, Ca^{2+} - und K^+ -Gradienten entlang der Plasmamembran oder auch das Membranpotential, kehrt sich der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher um und transportiert Ca^{2+} in die Zellen hinein und Na^+ heraus (Blaustein & Lederer 1999). Neben den erwähnten Pumpen und Kanälen sind auch Ca^{2+} -bindende Proteine wichtig für die Ca^{2+} -Speicherung. Diejenigen, die im Lumen des ERs lokalisiert sind, gehören zur Calsequestrin- und Calreticulin-Familie und sind mit zwei Basisfunktionen im Hinblick auf eine dynamische Ca^{2+} -Speicherung ausgestattet: Hohe Kapazität ($25\text{-}50 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) und niedrige Affinität (K_d im millimolaren Bereich) (Pozzan et al. 1994). Das wichtigste zytosolische Ca^{2+} -bindende Protein ist das Calmodulin, welches als Ca^{2+} -Sensor agiert und Signale modifiziert (Brini & Carafoli 2000; Berridge 2004).

Für die schnelle Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels sind ebenfalls viele Mechanismen miteinander verknüpft. Der IP_3 -Signalweg ist einer der wichtigsten

in diesem Zusammenhang. Beispielsweise kommt es durch Bindung von Acetylcholin an den M_3 -Rezeptor in der Plasmamembran intrazellulär zu einer Aktivierung der Phospholipase C, die die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert (Abdel-Latif 1986; Lindqvist et al. 1998). IP_3 bindet daraufhin an seinen Rezeptor, den intrazellulären IP_3 -Rezeptor, der auf verschiedenen Ca^{2+} -Speicherorganellen lokalisiert ist und als Kalziumkanal fungiert (Siefjediers et al. 2007). IP_3 -Rezeptoren sind Tetramere, die aus homogenen oder heterogenen Untereinheiten bestehen, welche windmühlenartig mit zentraler Pore angeordnet sind (Serysheva et al. 2003). Es sind drei Subtypen bekannt (IP_3R -1 bis IP_3R -3) (Taylor & Laude 2002), die von drei unterschiedlichen Genen codiert sind (Sorrentino 1995) und gewebespezifisch exprimiert werden. Ihre Primärstruktur beinhaltet konstante Regionen und solche, die variabel sind. In diesen Abschnitten sind die regulativen Domänen des Rezeptors lokalisiert, wie die Ca^{2+} - und die ATP-bindende Region. Die Regulation durch Kalzium stellt sich biphasisch dar: niedrige Konzentrationen aktivieren den Rezeptor, hohe hemmen ihn (Patterson et al. 2004). Die Wirkungsweise von ATP ist ähnlich, denn niedrige Konzentrationen führen wiederum zur Aktivierung des IP_3 -Rezeptors (Maeda et al. 1991), millimolare Konzentrationen führen eine Hemmung herbei (Bezprozvanny 2005).

Hat eine Ca^{2+} -Freisetzung über den IP_3 -Signalweg stattgefunden, kommt es zur Aktivierung der Ryanodinrezeptoren (RyR) und damit zur Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) (Leite et al. 2002). Durch diesen Mechanismus wird das initiale IP_3 -Signal verstärkt. Eine direkte Aktivierung der RyRs ist durch seine physiologischen Agonisten zyklische Adenosindiphosphoribose (cADP-Ribose) (Bai et al. 2005) und Arachidonsäure ebenfalls möglich (Woolcott et al. 2006) (Kap. II.3.).

Ein weiterer Rezeptortyp, der in der Membran des ER lokalisiert ist, ist das Sphingolipid Ca^{2+} -Mediating Protein (SCaMPER). Es ist ein Kalziumkanal, der von Sphingolipiden aktiviert wird. SCaMPER hat keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem IP_3R oder RyR und ist mit einem Molekulargewicht von 20 kDa wesentlich kleiner als diese. Obwohl es in sehr vielen Geweben exprimiert wird, ist über seine physiologische Funktion zum heutigen Zeitpunkt wenig bekannt (Bootman et al. 2001).

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung, die von NAADP stimuliert wird, ist ebenfalls bekannt, wobei weder IP_3Rs noch RyRs involviert sind. Allerdings ist noch unklar, aus welchem Ca^{2+} -Pool über diesen Signalweg Kalzium freigesetzt wird, wobei die Vermutung besteht, dass es sich nicht um eine der klassischen Ca^{2+} -Speicherorganellen handelt (Genazzani & Galione 1997).

Auf der Plasmamembran befinden sich eine Reihe von Kanälen, die alle zum Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma beitragen. Die „store-operated Ca^{2+} channels“ (SOCCs) öffnen sich, wenn die Ca^{2+} -Konzentration im Endoplasmatischen Retikulum sinkt (Parekh 2003). Dieser Mechanismus wird auch als kapazitativer Kalzium-Einstrom bezeichnet; er ermöglicht die Ausbildung von länger andauernden Ca^{2+} -Signalen und trägt zur Kalziumhomöostase bei, indem es dem ER die Möglichkeit der „Auffüllung“ gibt (Spasova et al. 2004). Der präzise molekulare Mechanismus, wie die SOCCs den Füllungsstatus des ER wahrnehmen, war lange unklar. Drei Hauptmechanismen der Aktivierung wurden vermutet: Zum einen die Möglichkeit, dass ein diffusionsfähiger Botenstoff eine Rolle spielt, zum anderen intrazelluläre Vesikel als Auslöser der Aktivierung und zum dritten eine direkte Interaktion zwischen IP_3 -Rezeptor und SOCC (Liu & Ambudkar 2001). Seit kurzem ist dieser Mechanismus aufgedeckt: Zwei Proteine, STIM1 und Orai1, sind nun als bisher fehlende Elemente der SOCCs identifiziert worden. STIM1 trägt dabei die Rolle des ER Ca^{2+} -Sensors und Orai1 bildet den Ca^{2+} -Kanal (Taylor 2006). Neben diesem Rezeptortyp ist ebenfalls ein nicht-SOCC (NSOCC) bekannt. SOCC und NSOCC transportieren Kalzium nicht simultan – der zuletzt genannte ist für den Ca^{2+} -Eintritt zuständig, wenn der spezifische Stimulus gering ist und geht dann auf die SOCCs über, sobald der Stimulus stärker und das ER entleert ist (Bootman et al. 2002). Rezeptor-operierende Ca^{2+} -Kanäle (ROCCs) sind Kalziumkanäle in der Plasmamembran von sekretorischen Zellen und Neuronen. Sie öffnen sich, wenn ein externer Ligand bindet, wodurch es zu einem schnellen Einstrom von Kalzium kommt. In vielen Zellen sind auch mechanisch aktivierte Ca^{2+} -Kanäle (MOCCs) vorhanden, die sich öffnen, sobald die Zelle deformiert wird (Tsien & Tsien 1990; Bootman et al. 2001).

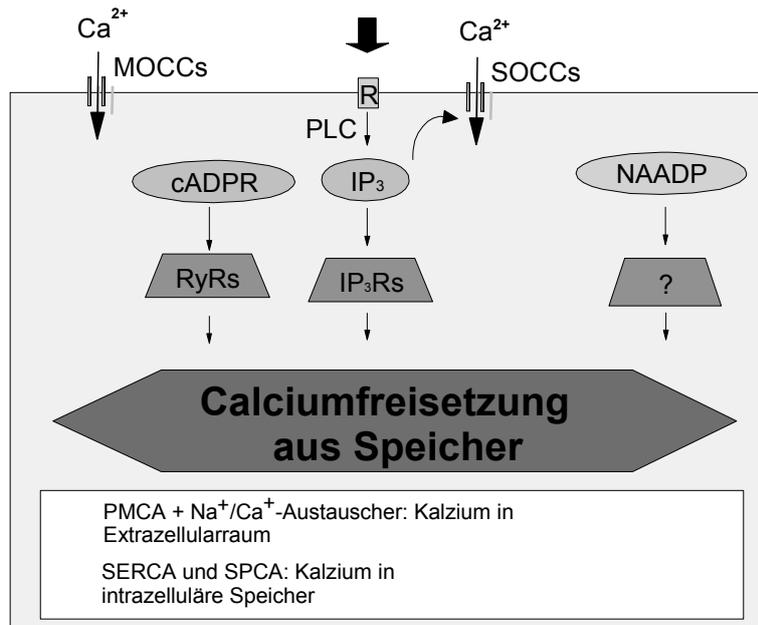


Abbildung I.3.: Darstellung der Signalwege zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

In der Plasmamembran sind mechanosensitive Ca²⁺-Kanäle (MOCCs) und speichergesteuerte Ca²⁺-Kanäle (SOCCs) dargestellt. Ihre jeweilige Aktivierung führt zu einem Kalziumeinstrom aus dem Extrazellularraum in das Zytosol. Ebenfalls dort lokalisiert sind rezeptorgesteuerte Ca²⁺-Kanäle (ROCCs), bei denen es sich um G-Protein aktivierte Kanäle (R) handelt. Bindet ein Agonist, wird die Bildung der Phospholipase C katalysiert, die wiederum die Bildung von IP₃ initialisiert. IP₃ bindet an seinen Rezeptor, den IP₃R, und es kommt zur Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER. cADP-Ribose (cADPR) wird im Zytosol der Zelle durch das Enzym CD38 synthetisiert. Es bindet als Agonist an den RyR und veranlasst ebenfalls die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern. Das NAADP wird ebenfalls von CD38 gebildet, allerdings ist noch unklar, an welchen Rezeptor es bindet und aus welchem Ca²⁺-Pool Kalzium freigesetzt wird. Die zur Erniedrigung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels benötigten Ca²⁺-ATPasen, der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher sowie der SCA_{MPER} und die NOCCS sind graphisch nicht dargestellt.

2.1. Kalziumtransport an exzitativem Gewebe

Charakteristisch für erregbare Gewebe sind die spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle (voltage-operated Ca²⁺ channels = VOCCs), die durch Depolarisierung der Plasmamembran aktiviert werden (Bootman et al. 2001). Sie werden in zwei Unterklassen unterteilt: die T(tiny)-Kanäle, die durch niedrige Membranpotentiale aktiviert und inaktiviert werden, und solche Kanäle, die durch hohe Membranpotentiale gesteuert werden. Die zuletzt genannte Gruppe kann wiederum in vier Klassen unterteilt werden: Die B(brain)-, L(long-lasting)-, N(neuronal)- und P(Purkinje)-Kanäle. Die relevantesten sind hier die L-Typ Kanäle, mit einer Leitfähigkeit von 15-25 pS. Pharmakologisch sind sie von Wichtigkeit, da sie durch

viele Klassen von Ca^{2+} -Antagonisten gehemmt werden. Die wohl bekanntesten Inhibitoren sind die Dihydropyridine, nach denen der Dihydropyridinrezeptor (DHPR) auch benannt wurde (Schneider 1994). Dieser besteht aus den 5 Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ und δ , wobei $\alpha 2$ und δ durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Tsien & Tsien 1990; Brini & Carafoli 2000).

Der höchstspezialisierteste Mechanismus in diesem Zusammenhang ist in der quergestreiften Muskelzelle lokalisiert. Dort sind der DHPR und der RyR-1 über eine Art Protein-Protein Verbindung direkt miteinander verknüpft und stehen im Mittelpunkt der sog. elektro-mechanischen Kopplung (excitation-contraction [E-C] coupling). Die Membranen des transversalen Tubulus und des SR sind nebeneinander angeordnet und nur durch einen schmalen, 10 nm breiten Spalt voneinander getrennt. Die DHPRs im transversalen Tubulus sind in Gruppen von jeweils vier Rezeptoren und die RyR-1 in korrespondierender Reihenfolge angeordnet, so dass jeder RyR-1 mit einem DHPR assoziiert ist (Protasi et al. 1998). Der DHPR kontaktiert direkt die sog. Fußregion des RyR-1, um die Information, dass eine Depolarisation der Plasmamembran stattgefunden hat, aus dem transversalen Tubulus weiterzuleiten (Inui et al. 1987; Franzini-Armstrong & Protasi 1997) (Abb. I.4.). Solch eine Depolarisation der transversalen Tubulusmembran induziert eine Konformationsänderung des DHPR, was unmittelbar zu einer Aktivierung des RyR-1 im SR führt. Dies hat einen massiven Ausstrom von Kalzium in das Zytosol und damit eine Muskelkontraktion zur Folge. Ein herausragender Vorteil dieser Art der Kopplung ist die enorme Geschwindigkeit (ca. 2 ms), mit der sich das Signal von der Oberfläche der Zelle ins Innere ausbreitet (Fill & Copello 2002).

Im Herzmuskel spielt diese Form der elektro-mechanischen Kopplung hingegen keine Rolle, obwohl ebenfalls DHPRs und – in diesem Fall - RyR-2 interagieren. Ein DHPR kommuniziert hier mit 5-10 RyR-2, wobei keine hochorganisierte Anordnung der Rezeptoren zueinander besteht. Während des langen Aktionspotentials des Herzens (ca. 100 ms) öffnet sich der DHPR, und es kommt zu einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum. Dies aktiviert die in der Nähe gelegenen RyR-2 über Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung, woraufhin es zum Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR kommt (Fill & Copello 2002).

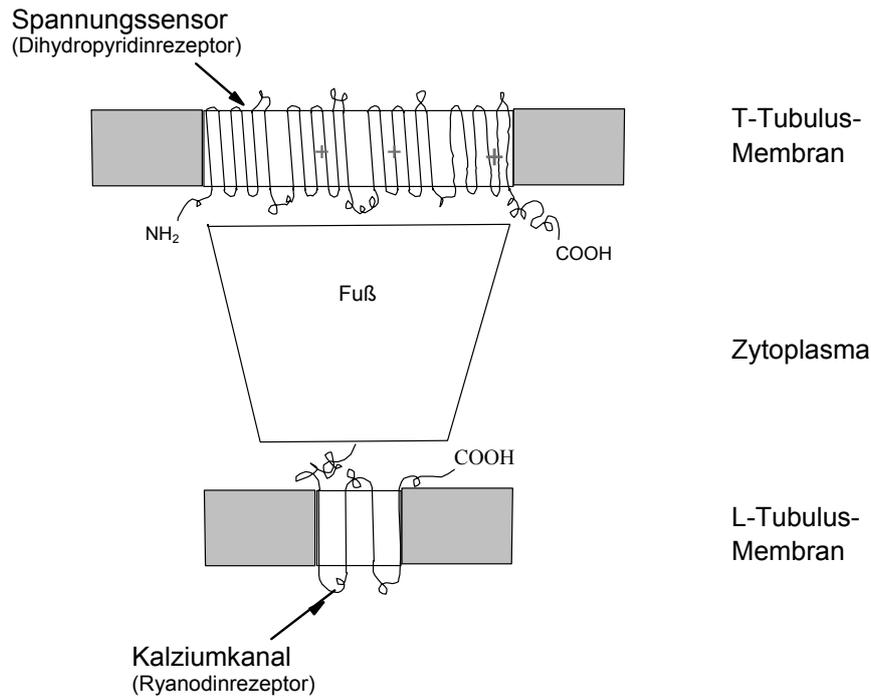


Abbildung I.4.: Schematische Darstellung der Interaktion des RyR-1 mit dem DHPR im Skelettmuskel

Der Ryanodinrezeptor steht über seine Fußregion in engem Kontakt zum membranären Spannungssensor, dem Dihydropyridinrezeptor. Im Skelettmuskel geht man davon aus, dass eine physikalische Verbindung zwischen diesen beiden Rezeptoren besteht (McPherson & Campbell 1993). T-Tubulus = transversaler Tubulus (Plasmamembran); L-Tubulus = longitudinaler Tubulus (Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums).

2.2. Transportprozesse am Kolon

Einem nicht-erregbaren Gewebe wie dem Kolonepithel stehen eine Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung, den intrazellulären Kalziumspiegel zu erhöhen. Die Epithelzellen tragen auf der basolateralen Seite ihrer Plasmamembran M₃-Rezeptoren, an die Acetylcholin oder Carbachol als Agonisten binden. Ist dies der Fall, kommt es zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Dharmasathaphorn & Pandol 1986), indem aus den Zellorganellen Kalzium freigesetzt wird. Dies wird hauptsächlich über zwei unterschiedliche Rezeptortypen vermittelt: 1. den Ryanodinrezeptor (Kap. I.3.) und 2. den IP₃-Rezeptor (Abb. I.5.). Der RyR ist bisher lediglich funktionell an diesem Gewebe beschrieben (Kocks et al. 2002), wohingegen der IP₃R bereits genauer charakterisiert worden ist. In den Epithelzellen des Kolons werden nur Subtyp-2 und -3 dieses Rezeptors exprimiert. Dabei ist Subtyp-2 gleichmäßig über die Kryptenachse verteilt und ausschließlich im Nukleus lokalisiert, wohingegen Subtyp-3 im Zytoplasma vorliegt und einem deutlichen Gradienten

entlang der Kryptenachse unterliegt (Siefjedi et al. 2007). Nach Ablauf dieser Signalkaskade kommt es zur Öffnung von SOCCs in der basolateralen Epithelzellmembran (Liu & Ambudkar 2001) – dies sind nicht-selektive Kationenkanäle (NSKKs), deren Leitfähigkeit für Na^+ -Ionen höher ist als für Ca^{2+} -Ionen (Frings et al. 1999). Außerdem kommt es zur Aktivierung von K^+ -Kanälen, die sich ebenfalls auf der basolateralen Zellseite befinden. Hierbei handelt es sich um SK4-K^+ -Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 16 pS (Bleich et al. 1996; Warth et al. 1999). Durch Öffnung dieser Kanäle kommt es zu einer Hyperpolarisierung der Zellmembran, was wiederum als Antriebskraft für die apikale Cl^- -Sekretion dient. Die an dieser Sekretion beteiligten Cl^- -Kanäle sind cAMP- und nicht Ca^{2+} -abhängig (Böhme et al. 1991; Schultheiss & Diener 1998). Es ist dieser Cl^- -Kanal vom CFTR-Typ (= cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), der am Kolonepithel die Hauptrolle für die Cl^- -Sekretion spielt (Greger 2000).

Bei dem Krankheitsbild der sekretorischen Diarrhoe ist die gesteigerte Cl^- -Sekretion verantwortlich für den Verlust von intestinaler Flüssigkeit. Dieser kann enorme Mengen erreichen, z.B. durch eine Infektion mit *Vibrio cholerae*. Auf der anderen Seite kann ein Fehlen der Cl^- -Leitfähigkeit zum Krankheitsbild der Zystischen Fibrose führen. Durch nicht korrekte Expressierung des CFTR-Kanals kommt es bei diesen Patienten im Darm zur Ausprägung eines Mekonium Ileus oder zum Obstruktions-Syndrom (Köckerling & Fromm 1993).

Die Existenz eines Ca^{2+} -gesteuerten Cl^- -Kanals im Kolon blieb lange Zeit umstritten. In T_{84} -Zellen, einer intestinalen Tumorzelllinie, konnte gezeigt werden, dass eine direkte Öffnung apikaler Cl^- -Kanäle durch Kalzium möglich ist. Allerdings gelang dies lange nicht an nativen intestinalen Epithelzellen (Strabel & Diener 1995). Vor kurzem konnte Schultheiss et al. diesen Kanal funktionell am Kolonepithel der Ratte nachweisen (Schultheiss et al. 2005).

Um die Ca^{2+} -Homöostase aufrechtzuerhalten, sind in den Epithelzellen des Kolons ebenfalls Ca^{2+} -ATPasen exprimiert. Die SERCA (Kap. I.4.), die in der Membran des ERs lokalisiert ist, sorgt für die Rückführung des freigesetzten Kalziums in die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher (Gélébart et al. 2002).

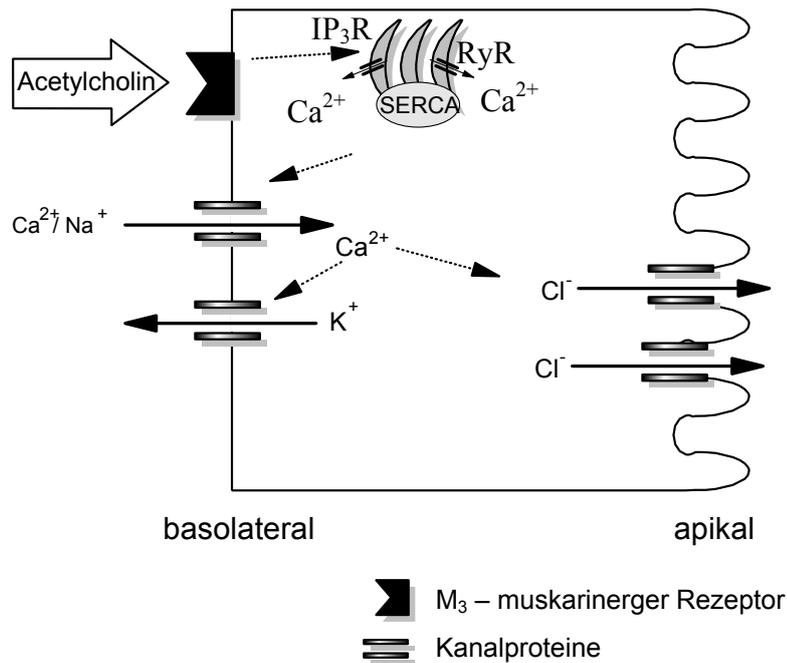


Abbildung I.5.: Klassisches Modell des kapazitiven Kalziumeinstroms und direkte bzw. indirekte Auswirkung des erhöhten Ca^{2+} -Spiegels auf die K^+ - und Cl^- -Leitfähigkeiten

Acetylcholin aktiviert durch Bindung an einen muskarinergen M_3 -Rezeptor einen intrazellulären IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Kanal (= IP_3R). Der resultierende erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel zieht 1. die Öffnung von RyR s durch eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) und 2. die Aktivierung von basolateralen nicht-selektiven Kationenkanälen (NSKKs) nach sich. Außerdem kommt es zur Öffnung von K^+ -Kanälen in der basolateralen und Cl^- -Kanälen in der apikalen Zellmembran. Die durch den K^+ -Ausstrom verursachte Hyperpolarisation der Zellmembran erhöht die Antriebskraft für den Chloridtransport über den apikal lokalisierten CFTR-Kanal. Durch SERCAs werden die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen wieder zurück in ihre Speicher gepumpt, wodurch die Ca^{2+} -Homöostase aufrecht erhalten wird.

3. Ryanodinrezeptoren

Bei der Entstehung von Ca^{2+} -Signalen, die zelluläre Prozesse steuern, spielen die Ryanodinrezeptoren neben den Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptoren (IP_3R) die bedeutendste Rolle als intrazelluläre Ca^{2+} -Kanäle (Leite et al. 2002).

Der Ryanodinrezeptor wurde Mitte der 80er Jahre im Skelett- und Herzmuskel identifiziert – seinen Namen trägt er aufgrund der hohen Affinität und Spezifität zu dem pflanzlichen Alkaloid Ryanodin (Fleischer et al. 1985; Pessah et al. 1985). In Säugetieren sind die drei Subtypen RyR -1 bis RyR -3 bekannt, die von drei unterschiedlichen Genen codiert werden und eine gewebsspezifische Verteilung aufweisen (Sorrentino 1995). Die cDNAs der RyR -Subtypen codieren jeweils Proteine

mit ca. 5000 Aminosäuren, die eine Sequenzhomologie von 66-70 % aufweisen (Meissner 1994). Dies drückt nicht nur deren funktionelle Ähnlichkeit aus, sondern verdeutlicht die gleichartige Membrantopologie aller drei Isoformen. Das RyR-Protein besteht aus einem kurzen, zytoplasmatischen C-Terminus und vier bis zehn transmembranären Domänen im C-terminalen Fünftel des Moleküls. Der Rest des Proteins umfasst die sog. „Fußregion“, womit der zytoplasmatische Teil des Rezeptors bezeichnet wird (McPherson & Campbell 1993) (Abb. I.6.).

Der funktionelle Kanal des RyRs besteht aus vier Untereinheiten, die jeweils ein Molekulargewicht von ca. 565 kDa haben, zusammen eine kleeblattartigen Struktur bilden und einen Kationen-selektiven Kanal formen (Lai et al. 1989; Ludtke et al. 2005). Die kleine, zentrale Region des Rezeptors besteht aus vier Lappen, die um 45° zu den Hauptdomänen rotiert sind. Man nimmt an, dass sie den intramembranären Teil des Rezeptors bilden (Franzini-Armstrong & Protasi 1997). Zusätzlich ist der RyR-1 noch dauerhaft mit einem kleinen Protein, dem FKBP12 (12 kDa), verbunden. Dieses gehört zur Immunophilin-Familie (Franzini-Armstrong & Protasi 1997).

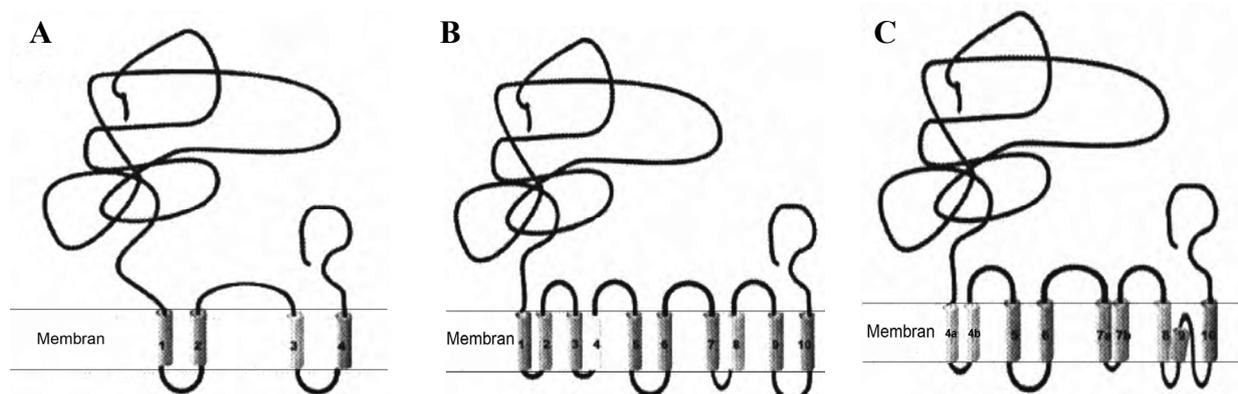


Abbildung I.6.: Modelle der transmembranären Regionen des RyRs (nach Hamilton 2005)

A zeigt das Modell des RyRs mit 5, B: mit 10 und C mit 8 transmembranären Domänen.

Der zu den ligandengesteuerten Rezeptoren zählende RyR weist im Skelett- und Herzmuskel zwei Bindungsstellen für seinen Agonisten Ryanodin auf. Bindet das Ryanodin an die hochaffine Bindungsstelle (K_d im nanomolaren Bereich), führt dies zur Öffnung des Kanals, seine Wechselwirkung mit der niederaffinen Bindungsstelle ruft hingegen das Schließen des RyRs hervor. In nicht-erregbaren Geweben sind bisher

lediglich RyRs mit hochaffiner Bindungsstelle für Ryanodin identifiziert worden (Ozawa 2001). Ein weiterer physiologischer Agonist des Ryanodinrezeptors ist neben der cADP-Ribose das Kalzium. In niedrigen Konzentrationen ($1-10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) öffnet es den Ca^{2+} -Kanal und es kommt zur Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (Bootman et al. 2002; Fill & Copello 2002). Die cADP-Ribose wirkt unabhängig von ihrer Konzentration als Agonist des RyR (Ozawa & Nishiyama 1997; Perez et al. 1998). Es ist ein Metabolit des Nikotinamid-Adenin-Nukleotids (NAD^+) und damit ein Nukleotidderivat (Sorrentino 1995). Synthetisiert wird sie von der CD38/ADP-Ribosyl Zyklase, die in Säugetier-Zellen ubiquitär verteilt ist und eine Größe von 42-45 kDa hat (Khoo et al. 2000). Es handelt sich um ein Membran-gebundenes Protein, das in den 80er Jahren bei der Typisierung von monoklonalen Antikörpern identifiziert und als Lymphozytenantigen beschrieben wurde. Es ist in der Lage, drei verschiedene Reaktionen zu katalysieren: Es kann 1. NAD^+ zu cADP-Ribose zyklieren, 2. eine „Basen-Austausch-Reaktion“ katalysieren, wobei als Produkt NAADP entsteht und 3. die Hydrolyse von cADP-Ribose und NAD^+ zu ADP-Ribose katalysieren (Bai et al. 2005). Eine ebenfalls agonistische Wirkung am RyR weisen Koffein (Morton-Jones et al. 2006), Arachidonsäure (Döring et al. 1990) und Monochloramin (Zima et al. 2004) auf. Die Arachidonsäure aktiviert den RyR in Konzentrationen zwischen $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Die Freisetzung erfolgt direkt aus Membran-Phospholipiden durch Aktivierung der Phospholipase A_2 und wird indirekt durch die Phospholipase C (PLC) freigesetzt. PLC spaltet Diacylglycerol (DAG) von Phosphatidylinositol ab, welches deacyliert wird, um Arachidonsäure freizusetzen (Döring et al. 1990). Monochloramin wirkt dagegen indirekt über Redoxreaktionen am RyR. Der Rezeptor enthält in seiner zytoplasmatischen Seite reaktive Sulfhydrylgruppen, die möglicherweise eine redox-sensitive Rolle spielen. Durch Oxidation dieser Thiolgruppen wird der Rezeptor aktiviert, während dessen Reduktion den Kanal inhibiert (Zima et al. 2004). Der Redoxstatus dieser entscheidenden Sulfhydryle des RyRs kann sowohl die Leitfähigkeit als auch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals modulieren (Oba et al. 2002).

Inhibitorische Wirkung auf den RyR hat neben dem oben beschriebenen Ryanodin in hoher Konzentration auch das Ruthenium Rot. Dies ist ein

polykationischer Farbstoff, der die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium via RyRs blockiert (Imagawa et al. 1987; Xu et al. 1999). Ähnlich wie das Ryanodin verhält sich auch Kalzium in seiner Wirkungsweise am RyR bivalent. Hohe Konzentrationen ($1-10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) führen zur Hemmung des Kanals (Fill & Copello 2002).

Die Verteilung der Subtypen der Ryanodinrezeptoren ist gewebespezifisch und das Wissen diesbezüglich noch sehr unvollständig. Im Groben lässt sich zusammenfassen, dass RyR-1 der dominante Subtyp in der Skelettmuskulatur ist, RyR-2 diese Rolle im Herzmuskel spielt (Kap. I.2.1.) und RyR-3 weit verteilt über viele Zelltypen vorkommt (Laver 2006). Näher betrachtet bedeutet dies, dass der RyR-1 ebenfalls in Teilen des ZNS, des Testis, des Oesophagus (Ledbetter et al. 1994; Giannini et al. 1995; O'Connell et al. 2002) und auch in der Leber nachgewiesen ist (Pierobon et al. 2006) und Subtyp-2 über den Herzmuskel hinaus z. B. auch in glatter Muskulatur, ZNS und dem Pankreas exprimiert wird (Ledbetter et al. 1994; Giannini et al. 1995; Leite et al. 1999). Mittels RT-PCR wurde RyR-2 zusätzlich in Epithelzellen des Darms (T_{84} -Zellen) identifiziert (Verma et al. 1996). Der Ryanodinrezeptor Subtyp-3 ist in vielen Geweben wie z. B. ZNS, glatter Muskel, Skelettmuskel, Testis, Lunge und Epithelzellen des Darms (T_{84}) ausgeprägt (Ledbetter et al. 1994; Giannini et al. 1995; Verma et al. 1996). Dieses breit gefächerte Verteilungsmuster der Ryanodinrezeptoren lässt vermuten, dass ihnen größere Bedeutung an der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase zukommt als bisher angenommen.

Neben der gewebsspezifischen Expression ist auch der Differenzierungsgrad der Zellen entscheidend dafür, welche RyR-Subtypen exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass in undifferenzierten PC12-Zellen (Phäochromozyten) sowohl RyR-1 als auch RyR-2 vorhanden sind. Sobald die Zellen differenziert sind, wird nur noch RyR-1 exprimiert (Bennett et al. 1996).

Pathologische Bedeutung hat der Ryanodinrezeptor im Krankheitskomplex der Malignen Hyperthermie. Seine Existenz im ZNS stellt hierfür möglicherweise die ätiologische Grundlage bereit (Ledbetter et al. 1994). Bei der Malignen Hyperthermie handelt es sich um eine autosomal-vererbte Myopathie, die durch unkontrollierte Muskelkontraktionen, Hypermetabolismus, Hyperthermie, Hyperkaliämie und Herzrhythmusstörungen charakterisiert ist (Zucchi & Ronca-Testoni 1997).

4. Sarkoplasmatische-Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)

SERCAs, die zu der Familie der $\text{P}_{2\text{A}}$ -Typ Ca^{2+} -ATPasen zählen, helfen nicht nur die zytosolische, freie Ca^{2+} -Konzentration nach einer Zellaktivierung auf einen Ruhewert zu bringen, sondern halten auch die hohe Ca^{2+} -Konzentration im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), die die Grundvoraussetzung für normale Zellfunktionen ist, aufrecht (Wuytack et al. 2002).

Es sind drei eng verwandte Isoformen bekannt, SERCA-1 bis -3, die durch drei verschiedene Gene codiert werden. Da unterschiedliche „Splice-Varianten“ der Primärtranskripte vorhanden sind, erhöht sich die Zahl der SERCA-Subtypen auf insgesamt sieben: SERCA-1a/-1b, SERCA-2a/-2b und SERCA-3a/-3b/-3c (East 2000). Diese integralen Membranproteine haben ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa (Ogawa et al. 1998) und bestehen aus 10 transmembranären Helizes und einem zytoplasmatischen Segment, das in eine A-, N- und eine P-Domäne gegliedert ist (East 2000). Während des ATP-abhängigen Ca^{2+} -Transports wechselt die Ca^{2+} -ATPase zwischen zwei strukturellen, stabilen Zuständen. Dies führte zur Formulierung des E_1 - E_2 Modells (Martonosi 1995):

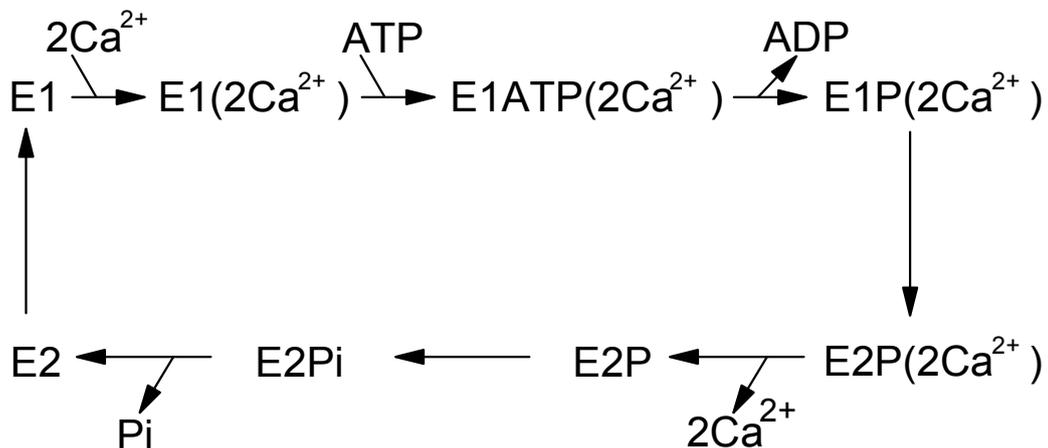


Abbildung 1.7.: Reaktionsschema für den Ca^{2+} -Transport durch SERCAs (nach East 2000)

Die E₁-Form bindet mit hoher Affinität zwei Ca²⁺-Ionen aus dem Zytoplasma. Nachdem ATP gebunden wurde, wird die Pumpe phosphoryliert, und das Kalzium wird nachfolgend auf der luminalen Seite der Membran entlassen. Gleichzeitig kommt es zur Konformationsänderung der SERCA in die niedrig-affine E₂-Form. Ihre Dephosphorylierung folgt, und sie kehrt in die E₁-Form zurück (MacLennan et al. 1997).

Die Gewebeverteilung der SERCA-Subtypen ist spezifisch. Die Expression beider SERCA-1-Splicevarianten, SERCA-1a und SERCA-1b, ist ausschließlich auf „fast-twitch“ Muskelfasern beschränkt (Shull 2000). SERCA-2a ist die dominante Isoform im Herzmuskel und in „slow-twitch“ Muskelfasern (Dode et al. 1996), wohingegen SERCA-2b in glatter Muskulatur und nicht-muskulären Geweben auftritt (Gunteski-Hamblin et al. 1988). Sie ist ubiquitär vorhanden und spielt daher in sehr vielen Geweben eine wichtige Rolle in deren Ca²⁺-Homöostase (Burk et al. 1989). SERCA-3 zeigt ebenfalls ein breites Auftreten, wenn auch ein eingrenzbares. Sie wird zusammen mit Subtyp-2b in den hämatopoetischen Zellen und in Mastzellen, Lymphozyten und Thrombozyten koexprimiert (Wuytack et al. 1995).

Der Grund des Auftretens dieser vielen SERCA-Subtypen wird in deren unterschiedlichen Eigenschaften vermutet. SERCA-1a und -2a haben sehr ähnliche Affinitäten für Kalzium und gleiche Transportraten. Im Vergleich dazu hat SERCA-2b eine geringere Transportrate. Vergleicht man wiederum SERCA-2a und -2b miteinander, wird deutlich, dass SERCA-2b eine doppelt so hohe Ca²⁺-Affinität und eine halb so hohe Transportrate wie SERCA-2a hat (East 2000). SERCA-3 nimmt in diesem Themenkomplex eine Art Sonderstellung ein. Sie hat eine kleinere Affinität zu Kalzium, ist sensitiver für den Hemmstoff Vanadat als die anderen Isoformen und hat ein anderes pH-Optimum (Lytton et al. 1992; Dode et al. 1998).

Es gibt einige Substanzen, die in der Lage sind, die Ca²⁺-Aufnahme über SERCAs zu blockieren. Cyclopiazonsäure (CPA) gilt als potenter Inhibitor, gebildet als sekundärer Metabolit von *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten (Seidler et al. 1989). Die Affinität der SERCAs zu CPA ist nicht immer gleich. Sie ist zum einen abhängig von der Konformation, in dem sich die SERCA gerade befindet. CPA stabilisiert die E₂-Konformation (Abb. I.7.) der Ca²⁺-ATPase (Karon et al. 1994). Zum anderen hängt sie von der Ca²⁺-Konzentration ab, was bedeutet, dass sie in Abwesenheit von

Kalzium hoch ist und in dessen Anwesenheit niedrig. Des weiteren hemmt CPA die ATP-abhängige Phosphorylierung des Enzyms (Soler et al. 1998). Ähnlich wie das CPA bindet auch Thapsigargin spezifisch an alle Subtypen der SERCAs, was deren Inhibition zur Folge hat (Lytton et al. 1991). Thapsigargin ist ein natürlich vorkommendes Sesquiterpen-Lacton, welches aus der doldentragenden Pflanze *Thapsia garganica* isoliert werden kann (Thastrup 1990). Durch irreversible Blockade der SERCAs erhöht es die Konzentration an intrazellulärem freiem Kalzium, was wiederum einen kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom nach sich zieht (Thastrup et al. 1990). Dies hat Konsequenzen im Hinblick auf die biologischen Zellfunktionen, wie z. B. Änderungen der Zellproliferation und Apoptose oder der Genexpression (Hussain & Inesi 1999).

5. Eigene Fragestellung

Dass Kalzium als intrazellulärer Botenstoff im Kolonepithel der Ratte eine bedeutende Rolle spielt, ist unumstritten. Daher fokussierten sich in den letzten Jahren die Forschungen unter anderem darauf, Strukturen zu untersuchen, die Kalzium rekrutieren. Hierbei lässt sich zwischen intrazellulären Prozessen der Freisetzung und der Aufnahme von Kalzium unterscheiden. Freigesetzt werden intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen einerseits über IP_3 -Rezeptoren, die bereits genauer charakterisiert worden sind (Siefjediers et al. 2007). Andererseits sind die Subtypen der RyRs, die funktionell synergistisch zu den IP_3 -Rezeptoren wirken, in den Epithelzellen des Rattenkolons beschrieben worden (Kocks et al. 2002). Über sie liegen bisher allerdings noch keine weiteren Daten vor. Um die Ca^{2+} -Homöostase der Zellen aufrecht zu erhalten, muss nach Freisetzung von Kalzium eine Wiederaufnahme der Ionen in intrazelluläre Speicher folgen - die SERCAs übernehmen ubiquitär diese Aufgabe. Sie sind an einer Reihe von Zelltypen hinlänglich beschrieben, wobei das Expressionsmuster im Kolonepithel noch nicht bekannt ist.

Daher sollen folgende Fragen durch meine Untersuchungen beantwortet werden:

- Welche Subtypen des Ryanodinrezeptors werden im Kolonepithel der Ratte exprimiert?
- Können RyRs immunhistochemisch nachgewiesen werden und wenn ja, welche Lokalisation haben sie in den Epithelzellen?
- Wie stellt sich die Verteilung dieses Rezeptortyps entlang der Kryptenachse dar?
- Besteht eine Kolo­kalisation zwischen RyRs und IP₃-Rezeptoren?
- Lässt sich das Enzym, das den physiologischen Agonisten cADPR synthetisiert, ebenfalls immunhistochemisch in den Kolonepithelzellen nachweisen?
- Ist es möglich, die Spezifität des in der Immunhistochemie eingesetzten RyR-Primä­rantikörpers durch einen Western Blot zu bestätigen?
- Bestehen je nach Lokalisation des RyR in der Kryptenachse entsprechende Unterschiede in der Ca²⁺-Freisetzung?
- Beeinflussen sich RyRs und IP₃-Rezeptoren funktionell?
- Welche SERCA-Subtypen werden im Kolonepithel exprimiert, und welche Lokalisation zeigen sie in diesen Zellen?

II. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Alle Ratten, die für die durchgeführten Versuche verwendet wurden, sind im Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gezüchtet worden. Gehalten in nach Geschlechtern sortierten Kleingruppen, stand ihnen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Ein Lichtprogramm mit einem 12-Stunden-hell-dunkel-Rhythmus sorgte für eine standardisierte Atmosphäre.

Für die Immunhistochemie und die Imaging-Messungen kamen Wistar-Ratten zum Einsatz. Zur Isolierung von Kolonkrypten für die Imaging-Experimente wurden Tiere verwendet, die maximal 6 Wochen alt waren und ein Gewicht zwischen 120 und 150 g hatten. Intakte Krypten können bis zu einem Gewicht von 180 g und einem Alter bis zu 9 Wochen isoliert werden (Schultheiss et al. 2002). Für die immunhistochemischen Untersuchungen hatten Alter und Gewicht der Ratten keine Bedeutung.

2. Chemikalien

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

- Acrylamid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ammoniumpersulfat (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Avidin-Biotin Blocking Kit, SP – 2001 (Linaris GmbH, Wertheim, Deutschland)
- BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, USA)
- Bovines Serum Albumin (BSA Fraction V, lyophil (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Citifluor (Plano, Wetzlar, Deutschland)
- 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat (DAPI; Invitrogen, Leiden, Niederlande)
- Dokumol SW-Entwickler (Tetenal, Norderstedt, Deutschland)
- Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Fura-2 Acetoxymethylester (= Fura-2 AM; Invitrogen, Leiden, Niederlande)
- Glycin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Harnstoff (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Haushaltsgelatine (RUF, Quakenbrück, Deutschland)
- Magermilchpulver (Sucofin; TSI GmbH&Co.KG, Zeven, Deutschland)
- Normal Goat Serum (Jackson Immunoresearch, West Grove, USA)
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Peroxidase-Blocking (Dako Cytomation, Carpinteria, USA)
- Pierce ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Rockford, USA)
- Poly-L-Lysin (Gebrauchslösung: 0,1 mg·ml⁻¹; Biochrom KG, Berlin, Deutschland)
- Natriumdodecylsulfat (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Superfix Odourless (Tetenal, Norderstedt, Deutschland)

- Tetramethylethyldiamin (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Tissue Tec, O.C.T. Compound (Miles, Elkhart, USA)
- Tween-20 (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Universal Agarose (PeqLab, Erlangen, Deutschland)
- Vectastain-Elite-ABC-Kit-Standard, PK - 6001 (Linaris GmbH, Wertheim, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid 30 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3. Lösungen

3.1. Lösungen für die Immunhistochemie

3.1.1. Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung

5 g·l⁻¹ Gelatine (300 bloom; die Einheit bloom ist ein Indikator für die Festigkeit der erkalteten Form der Gelatine) wurden in Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde unter ständigem Rühren auf 60 °C erhitzt, und bei 54 °C wurden 0,5 g·l⁻¹ Chromkaliumsulfat hinzugefügt.

3.1.2. Gelatinelösung zur Gewebereinbettung

Es wurden 100 g·l⁻¹ Speisegelatine in Aqua dest. unter Rühren gelöst und nach 10 min quellen unter ständigem Rühren auf 37 °C erwärmt. Die fertige Lösung wurde vor Gebrauch filtriert.

3.1.3. Phosphatpuffer (= PB)

Es wurden eine 0,2 mol·l⁻¹ NaH₂PO₄-Stammlösung und eine 0,2 mol·l⁻¹ Na₂HPO₄-Stammlösung hergestellt. Ein Volumenteil NaH₂PO₄-Stammlösung wurde mit vier Volumenteilen Na₂HPO₄-Stammlösung gemischt. Um eine Endkonzentration von 0,1 mol·l⁻¹ zu erhalten, wurde die Lösung noch mit fünf Volumenteilen Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

3.1.4. Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)

Zur Herstellung wurden $9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Aqua dest. gelöst.

3.1.5. Paraformaldehyd-Lösung (PFA 4 %)

Das Paraformaldehyd wurde unter dem Abzug abgewogen ($40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) und unter Rühren auf $120\text{-}150 \text{ }^\circ\text{C}$ in PB gelöst. Nach Aufklaren der Lösung wurde sie filtriert und auf Eis auf $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt.

3.1.6. Saccharose-Lösung (20 %)

20 g Saccharose wurden in 100 ml PB unter Rühren gelöst und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank gelagert.

3.1.7. Blocking-Lösung

In $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurden $5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ Triton-X-100, $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ bovines Serumalbumin (= BSA) und $100 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ normales Ziegenserum (= normal goat serum [NGS]) gelöst.

3.1.8. Avidin-Biotin-Blocking-Lösung

Die Avidin- bzw. Biotin-Blocking Substanz wurden jeweils 1:20 in $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer verdünnt.

3.1.9. Permeabilisierungs-Lösung

$3 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ Triton-X-100 wurden in $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer gelöst.

3.1.10. Avidin-Peroxidase-Lösung

Eine halbe Stunde vor Inkubation wurden die gebrauchsfertig im Vectastain-Elite-ABC-Kit-Standard enthaltenen Lösungen Avidin und biotinylierte Meerrettich-Peroxidase jeweils im Verhältnis 1:200 in $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer gelöst.

3.1.11. 3,3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)-Lösung

In $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurden $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ DAB gelöst.

3.1.12. Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Lösung

Die 30 %ige (Gew/Vol) H_2O_2 -Stammlösung wurde im Verhältnis 1:2 mit Aqua dest. zur 10 %igen Gebrauchslösung verdünnt.

3.1.13. Primärantikörper-Lösung

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

3.1.14. Sekundärantikörper-Lösung

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

3.1.15. DAPI-Lösung

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

3.2. Lösungen für den Western Blot

3.2.1. Tris-Puffer (TBS)

In Aqua dest. wurden $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris und $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,6 eingestellt.

3.2.2. Wasch-Puffer

$1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ Tween-20 wurden in TBS (Kap. II.3.2.1.) gelöst.

3.2.3. Lysis-Puffer

Zur Lyse von Zellen unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde dieser Puffer wie folgt zusammengesetzt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 150; Na_2EDTA 1; EGTA 1; Natriumpyrophosphat 2,5; β -Glycerophosphat 1; Na_3VO_4 1. Hinzugefügt wurden außerdem $10 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ Triton X-100 und $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Leupeptin, welches der Proteaseinhibition dient. Die pH-Wert Einstellung erfolgte mit Tris-HCl auf 7,5.

3.2.4. Histidin-Puffer

$0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl wurden mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Histidin in Aqua dest. gelöst und auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt.

3.2.5. Transfer-Puffer

Die Lösung setzte sich aus $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glycin und $200 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ Methanol zusammen. Der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt.

3.2.6. Trenngelpuffer

Es wurden $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl und $4 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ Natriumdodecylsulfat (SDS) in Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 8,8 eingestellt.

3.2.7. Sammelgelpuffer

In Aqua dest. wurden $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl und $4 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS gelöst. Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt.

3.2.8. Laufpuffer

$20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glycin und $1 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS wurden in Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert beträgt ca. 8,3 und soll nicht eingestellt werden.

3.2.9. Probenpuffer

Der Probenpuffer enthielt: $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, $40 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS, $200 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ Glycerin, $0,5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ Bromphenolblau, $400 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Dithiothreitol (DTT), $100 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ β -Mercaptoethanol und $100 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl. Der pH-Wert liegt bei 8.

3.2.10. Blocking-Lösung

$50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Milchpulver wurden in Wasch-Puffer (Kap. II.3.2.2.) gelöst.

3.2.11. Lösung für die Immunpräzipitation

3.2.11.1. Extraktions-Puffer

Der Extraktionspuffer setzte sich in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ folgendermaßen zusammen: NaCl 150; MgCl_2 10; EDTA 1; DTT 2. Zugesezt wurden außerdem noch $10 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ Glycerol; $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA; $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Leupeptin und $0,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Pepstatin, welches der Proteaseinhibition dient. Der pH-Wert wurde mit TRIS/HCl auf 7,4 eingestellt.

3.3. Lösungen für die Kryptenisolation

3.3.1. Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung

Die Lösung enthielt (Parsons & Paterson 1965) in $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$: NaCl 107; NaHCO_3 25; NaH_2PO_4 0,2; Na_2HPO_4 1,8; KCl 4,5; CaCl_2 1,25; MgSO_4 1; Glucose 12.

Sie wurde mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂; Vol/Vol) begast und der pH-Wert mit NaHCO₃/HCl auf 7,4 eingestellt.

3.3.2. Isolationslösung

Inhaltsstoffe der Lösung in mmol·l⁻¹: NaCl 107; NaHCO₃ 25; NaH₂PO₄ 0,2; Na₂HPO₄ 1,8; KCl 4,5; Glucose 12; EDTA (= Ethylendiamintetraessigsäure) 10 und 1 g·l⁻¹ BSA. Sie wurde mit Carbogen begast und mit TRIS bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Im Anschluss wurde die Lösung im Wasserbad auf 42 °C erwärmt.

3.3.3. Auffang-Tyrode

Die Lösung enthielt in mmol·l⁻¹ folgende Inhaltsstoffe: Kaliumgluconat 100; KCl 30; HEPES (= N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-2-ethansulfonsäure) 10; NaCl 20; MgCl₂ 1; CaCl₂ 1,25; Glucose 12; Natriumpyruvat 5 und 1 g·l⁻¹ BSA. Der pH-Wert wurde mit KOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

3.4. Lösungen für die Imaging-Messungen

3.4.1. Fura-2 AM-Stammlösung

Es wurde eine 1 mmol·l⁻¹ Lösung in DMSO hergestellt.

3.4.2. Pluronic F-127-Stammlösung

200 g·l⁻¹ wurden in DMSO gelöst.

3.4.3. Mag-Fura-2 AM-Stammlösung

Angesetzt wurde eine 1 mmol·l⁻¹ Lösung mit DMSO.

3.4.4. Kalziumfreie NaCl-Tyrode

Diese Lösung wurde zur Superfusion der isolierten Krypten eingesetzt und enthielt in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$: NaCl 140; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 5; MgCl_2 5. Mit NaOH/HCl wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

4. Präparation der Darmschleimhaut

Die Betäubung der Tiere erfolgte durch einen Genickschlag mit anschließender zervikaler Dislokation – getötet wurden die Tiere durch Entbluten (genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen). Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte über einen Schnitt in der Linea alba, wobei zwei Entlastungsschnitte – jeweils entlang der Rippenbögen – den Zugang erleichterten. Das Kolon wurde nun durch einen Scherenschlag an seinem distalen Ende, welches durch einen Lymphknoten gekennzeichnet ist (Lindstrom et al. 1979), abgesetzt. Das Mesenterium wurde der Länge nach stumpf abgelöst und das proximale Ende ebenfalls durch einen Scherenschlag am Übergang zum Zäkum abgetrennt. Das entnommene Kolon wurde sofort in eiskalten, carbogenbegasteten Parsons-Puffer überführt und mit diesem durchgespült, sodass keinerlei Kotreste im Darmlumen verblieben. Im Anschluss wurde der Darm auf einen Kunststoffstab mit einem Durchmesser von 5 mm aufgezogen. Am distalen Kolonende wurde nun mit einem stumpfen Skalpell eine zirkuläre Inzision gesetzt, um mit dem Daumen die *Muscularis propria* zusammen mit der Serosa abzustreifen. Diese Mucosa-Submucosa-Präparate konnten in ca. 2-3 cm lange Sektionen unterteilt werden, um sie für die Experimente zu nutzen. Für die immunhistochemischen Analysen wurden sowohl intakte Kolonpräparate als auch Mucosa-Submucosa-Präparate verwendet.

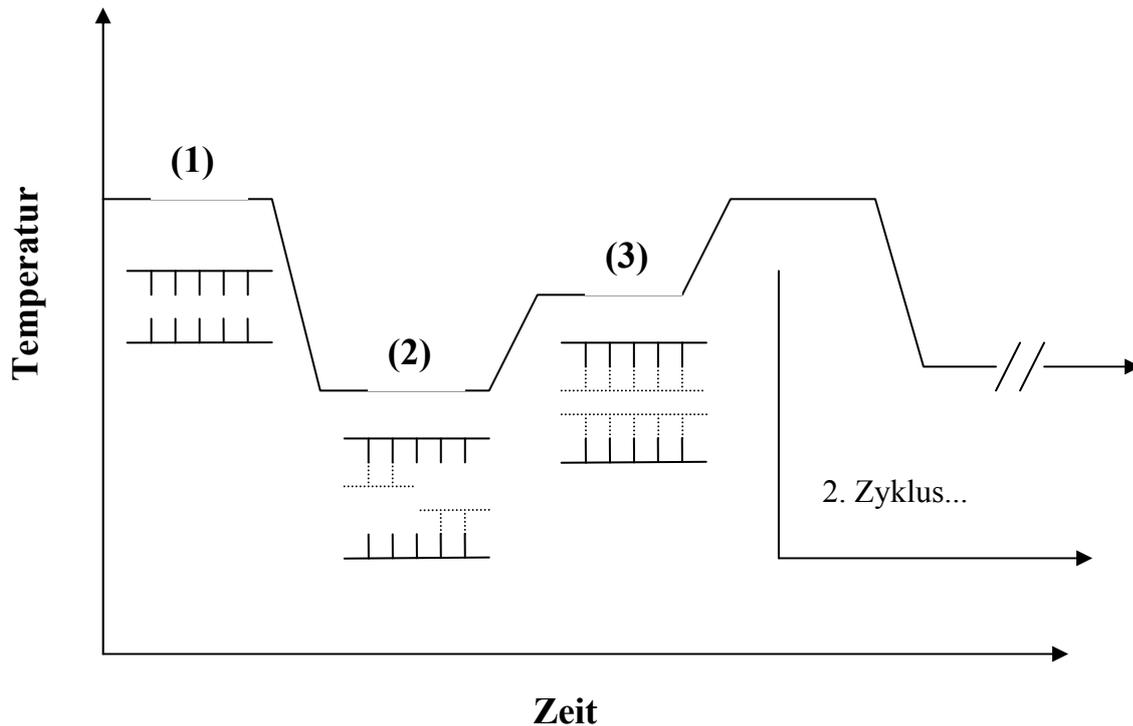
5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

5.1. Grundlage der PCR

Diese Methode zur Amplifizierung von Nucleinsäuren wurde im Jahre 1983 von Kary B. Mullis (Mullis 1990) entwickelt und zählt zu den größten wissenschaftlichen Errungenschaften in den vergangenen Jahren. Die PCR hatte gegenüber den bis dahin bekannten Techniken den Vorteil, dass über eine Vervielfältigung des gewünschten Nucleinsäureabschnittes (sog. *Targetamplifikation*) eine sehr hohe Sensitivität erlangt werden konnte. Hinzu kommt, dass die Amplifikation exponentiell verläuft – es können also mühelos große Mengen der zu vervielfältigenden DNA entstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR genutzt, um im Kolonepithel der Ratte einen bisher nur funktionell dargestellten Rezeptor (Kocks et al. 2002), den Ryanodinrezeptor, molekularbiologisch nachzuweisen. Voraussetzung, um eine PCR erfolgreich durchzuführen, ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, der dann entsprechend verlängert werden kann. Mullis fand heraus, dass es möglich war, genau diesen Abschnitt künstlich herzustellen, indem man dem Reaktionsansatz DNA-Fragmente von ca. 20 Nucleotiden Länge hinzufügt – sie werden als Primer bezeichnet. Diese lagern sich an die Matrizen-DNA an (= Annealing) und werden durch ein bestimmtes Enzym, die DNA-Polymerase, entsprechend verlängert (= Elongation). In den hier durchgeführten Versuchen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* eingesetzt, da sie eine hohe Prozessivität und eine sehr gute Temperaturstabilität (bei 95 °C) besitzt. Um die Amplifikation zu wiederholen, wird die neu synthetisierte doppelsträngige DNA denaturiert, das heißt durch Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge gespalten. Dadurch wird die Anlagerung neuer Primer ermöglicht, und der Zyklus kann von vorne beginnen. Gibt man zwei solche Primer in jeden PCR-Ansatz – einen, der am *sense*-Strang, und einen, der am *antisense*-Strang bindet, erhält man mit jedem Zyklus eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts.

Ein typischer PCR-Zyklus stellt sich folgendermaßen dar:



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

Abbildung II.1.: Temperaturverlauf einer Polymerase-Kettenreaktion

Pro PCR-Zyklus wird die Anzahl der Zielmoleküle verdoppelt.

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

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

- Sequenzspezifische Primer
- Degenerierte Primer
- Oligo-(dT)-Primer (nur für RNA)
- Kurze Random-Primer (zumeist für RNA)

In diesen Versuchen wurden sequenzspezifische Primer eingesetzt. Es wird ein „backward“- und ein „forward“-Primer pro Versuch benötigt, um die zu vervielfältigende Sequenz zu bestimmen. Damit diese tatsächlich spezifisch an ihre Zielsequenzen binden können, müssen einige Rahmenbedingungen erfüllt sein: Die Primer sollten mindestens 17 Nukleotide lang sein und einen ausgeglichenen G/C- u A/T-Gehalt haben; der Schmelzpunkt sollte zwischen 55 und 80 °C liegen, und die Schmelzpunkte der beiden verwendeten Primer sollten möglichst gleich sein.

Die vier Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sollten in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen, wobei die Konzentration meist zwischen 0,1 und 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ liegt.

5.2. Isolation von mRNA

Um mRNA zu isolieren, wurden zum einen die Proben der Kontrollgewebe (Skelettmuskel, Herzmuskel, Gehirn; jeweils ca. 30 mg) kurz nach dem Töten der Ratte entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff gelagert. Zum anderen wurden Krypten isoliert, um ausschließlich mRNA aus den Epithelzellen des Darms zu gewinnen. Hierfür wurde zunächst ein Mucosa-Submucosa-Präparat (Kap. II.4.) hergestellt. Es wurde ausschließlich das distale Kolon verwendet, welches sich leicht vom quergestreiften, proximalen Teil abgrenzen ließ (Lindstrom et al. 1979). Das Darmpräparat wurde entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten und mit Cyanacrylklebstoff auf Plexiglashalter aufgeklebt. Anschließend wurde es, je nach Alter und Gewicht des Tieres, für 6-8 Minuten in kalziumfreier, EDTA-haltiger,

carbogenbegaster Isolationslösung (Kap. II.3.3.2.), die auf 42 °C erwärmt war, inkubiert. Um die Krypten vom Mucosa-Submucosa-Präparat abzulösen, wurden die Halter nun in einen Vibromischer (Chemap, Volketswil, Schweiz) eingespannt und die Krypten in Auffangtyrode (Kap. II.3.3.3.) geschüttelt. Durch Zentrifugation (5 min bei 300·g) wurden die jeweiligen Zellen angereichert und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Daraus wurde dann jeweils für die einzelnen Gewebe mit Hilfe des RNeasy Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) Gesamt-RNA gewonnen. Anschließend konnte daraus – ebenfalls mit einem Kit der Firma Qiagen (Oligotex™ Kit) – die polyadenylierte mRNA (= Poly-A⁺-RNA) isoliert werden. Sie wurde bis zum Umschreiben in komplementäre DNA (= cDNA) bei -20 °C gelagert.

5.3. Quantitative Bestimmung der Gesamt-RNA

Vor Isolation der mRNA wurde die Konzentration der Gesamt-RNA mit einem Spektrophotometer (Firma Biorad, München, Deutschland) bestimmt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 260 nm (A_{260}), wobei eine Einheit gleichbedeutend mit einer Konzentration von 33 µg RNA·cm⁻¹ war (Lottspeich & Zorbas 1998). Proben, deren Messwerte unter 0,1 lagen, konnten nicht zur Gewinnung von mRNA genutzt werden.

5.4. Synthese von cDNA

Um cDNA aus der isolierten polyadenylierten mRNA zu gewinnen, wurde eine rtPCR (reverse Transkription) durchgeführt. Hierfür werden T₁₅-Primer verwendet, die aus 15 Thymidylat-Resten bestehen. Sie bilden mit dem Poly-A⁺-Schwanz der mRNA DNA/RNA-Heterohybride. Je Probe wurden 2 µl dieser Oligo dT Primer mit 6 µl Poly-A⁺-RNA gemischt und für fünf Minuten bei 65 °C im Thermomischer (Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland) präinkubiert. In dieser Zeit konnte sich der Primer an die Poly-A⁺-RNA anlagern. Die Probe wurde im Anschluss sofort auf Eis

gestellt, bis der Mastermix (Promega, Mannheim, Deutschland) zum RNA/Primer-Gemisch gegeben wurde. Er wurde angesetzt aus:

Mastermix	Volumen
RNase-freies Wasser	3,5 μ l
RTplusPCR Buffer (25 mmol·l ⁻¹ Mg ²⁺)	4 μ l
dNTPs (10 mmol·l ⁻¹)	2 μ l
cMASTER Rt Enzym	2 μ l
Primer RNase Inhibitor	0,5 μ l
<i>Summe</i>	<i>12 μl</i>

Tabelle II.1.: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese

12 μ l Mastermix wurden dann dem RNA/Primer-Gemisch zugefügt, sodass die Summe des Reaktionsansatzes 20 μ l betrug. Mit einer Pipette wurde der Reaktionsansatz gut durchmischt und anschließend kurz abzentrifugiert und bei 42 °C für 60 min im Thermocycler (Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die resultierende cDNA wurde 1:10 mit Rnase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

5.5. Oligonukleotide (Primer)

Die Primerauswahl wurde durch das Programm Oligo 6.0 (Medprobe, Oslo, Norwegen) unterstützt, z.B. durch die Berechnung der Primer-Schmelztemperatur (T_m -Wert).

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Primerpaare sind im Folgenden, einschließlich ihres Zielmoleküls und der Länge des von ihnen amplifizierten Fragments, tabellarisch aufgeführt (Tab. II.2. und Tab. II.3.).

5.5.1. Ryanodinrezeptoren

Ziel-molekül	Oligonukleotid-Sequenz	bp	Quelle
RyR-1	5'-GGTGGCCTTCAACTTCTTCC-3' 5'-ACTTGCTCTTGTTGGTCTCG-3'	20 20	www.ncbi.nlm.nih.gov/ Eintrag XM_341818
RyR-2	5'-GAGAACTATCCTGTCCTCAG-3' 5'-CTTGCTCTTGTTGGTCTCTG-3'	20 20	www.ncbi.nlm.nih.gov/ Eintrag XM_341821
RyR-3	5'-GTTGCAACCTGTGGAAGCTC-3' 5'-CTACTGGGCTAAAGTCAAGG-3'	19 20	www.ncbi.nlm.nih.gov/ Eintrag XM_342491

Tabelle II.2.: Sequenzen der verwendeten Primer

5.5.2. SERCAs

Ziel-molekül	Oligonukleotid-Sequenz	bp	Quelle
SERCA-1a/ SERCA-1b	5'-TTCCATCTGCCTGTCCATGTC-3' 5'-CTGGTACTTCCTTCTTTCGTCTT-3'	21 24	www.ncbi.nlm.nih.gov/ Eintrag M_99223
SERCA-1/ SERCA-2	5'-TGAGTTTGGGGAACAGCT-3' 5'-GAGGTGGTGATGACAGCAGG-3'	18 20	www.ncbi.nlm.nih.gov/ Eintrag NM_058213
SERCA-2b/ SERCA-3	5'-TGCCTGGTAGAGAAGATGAA-3' 5'-CCCTTCACAAACATCTTGCT-3'	20 20	www.ncbi.nlm.nih.gov/ Eintrag NM_012914

Tabelle II.3.: Sequenzen der verwendeten Primer

5.6. Versuchsdurchführung

Die synthetisierte cDNA aus den Krypten wurde mittels PCR zum einen auf die Existenz eines für den Ryanodinrezeptors kodierenden Nukleinsäureabschnittes untersucht. Zum anderen wurde die cDNA der Krypten auf das Vorhandensein eines für die SERCA kodierenden Nukleinsäureabschnittes geprüft. Entscheidend war, ob und wenn ja, welcher Subtyp des Ryanodinrezeptors bzw. der SERCA in den Epithelzellen des Kolons exprimiert wird. Zur Kontrolle wurden bei jedem Versuchsansatz sogenannte Leerproben angesetzt. Das bedeutet, dass statt der cDNA Aqua dest. vorgelegt wurde.

Die PCR wurde mit Hilfe eines Thermocyclers (Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Über eine integrierte Software konnte der Ablauf der PCR jeweils spezifisch programmiert werden.

Der Mastermix (2,5 x) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) setzte sich jeweils folgendermaßen zusammen:

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

Tabelle II.4.: Zusammensetzung des Mastermixes für die rtPCR

5.6.1. Ryanodinrezeptor Subtyp-1

Die Reaktionsansätze für den Nachweis des RyR-1 wurden wie in Tabelle II.5. angegeben zusammengestellt.

Substanz	Volumen
cDNA, Krypte	1 µl
cDNA, Skelettmuskel	1 µl
Primer, (3'→5')	2 µl
Primer, (5'→3')	2 µl
Mastermix	10 µl
Rnase-freies Wasser	12 µl

Tabelle II.5.: PCR-Reaktionsansatz zum Nachweis von RyR-1

Das spezifische Thermocycler-Programm für RyR-1 ist in Tabelle II.6. aufgeführt:

1. Zyklus			2.-45. Zyklus		
Denaturierung	95 °C	10 min			
Denaturierung	94 °C	30 s	Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	55 °C	30 s	Annealing	55 °C	30 s
Elongation	72 °C	1 min	Elongation	72 °C	1 min

Tabelle II.6.: Darstellung des PCR-Protokolls für RyR-1

Im ersten Zyklus wird eine Denaturierung über 10 min vorgeschaltet, um eine ausreichende Trennung des cDNA-Doppelstranges sicherzustellen.

5.6.2. Ryanodinrezeptor Subtyp-2 und -3

Die Reaktionsansätze für den Nachweis des RyR-2 und RyR-3 wurden wie folgt zusammengestellt:

Substanz	Volumen
cDNA, Krypte	1 µl
cDNA, Gehirn	1 µl
RyR-2-Primer, (3'→5')	2 µl
RyR-2-Primer, (5'→3')	2 µl
RyR-3-Primer, (3'→5')	2 µl
RyR-3-Primer, (5'→3')	2 µl
Mastermix	10 µl
RNase-freies Wasser	12 µl

Tabelle II.7.: PCR-Reaktionsansatz zum Nachweis von RyR-2 und RyR-3

Das spezifische Cycler-Programm für RyR-2 und RyR-3 ist in Tabelle II.8. aufgeführt:

1. Zyklus			2.-45. Zyklus		
Denaturierung	95 °C	10 min			
Denaturierung	95 °C	1 min	Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	60 °C	2 min	Annealing	60 °C	2 min
Elongation	74 °C	2,5 min	Elongation	74 °C	2,5 min

Tabelle II.8.: Darstellung des PCR-Protokolls für RyR-2 und RyR-3

5.6.3. Sarkoplasmatische-Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase Subtyp-1 bis -3

Die Reaktionsansätze für den Nachweis der SERCA waren folgendermaßen zusammengesetzt:

Substanz	Volumen
cDNA, Krypte	2 μl
cDNA, Skelettmuskel für SERCA-1a/-1b	2 μl
cDNA, Herzmuskel für SERCA-1/-2 und SERCA-2b/-3	2 μl
SERCA-Primer, (3'→5') jeweils	2 μl
SERCA-Primer, (5'→3') jeweils	2 μl
Mastermix	10 μl
RNase-freies Wasser	11 μl

Tabelle II.9.: PCR-Reaktionsansatz zum Nachweis von RyR-2 und RyR-3

Das spezifische Cycler-Programm für SERCA-1 bis -3 lief folgendermaßen ab:

1. Zyklus		
Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	60 °C; G: 7 °C	1 min *
Elongation	72 °C	1 min

2.-45. Zyklus		
Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	60 °C; G: 7 °C	1 min *
Elongation	72 °C	1 min

Tabelle II.10.: Darstellung des PCR-Protokolls für SERCA-1 bis -3

*G = Temperaturgradient; bei Proben mit SERCA-1/-2- bzw. SERCA-1a/-1b-Primern wurde das Annealing bei 60 °C durchgeführt; Proben, die SERCA-2b/-3-Primer enthielten, wurden während der Annealing-Phase bei 55 °C inkubiert.

5.7. Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese diente der Auftrennung der PCR-Amplifikate. Die Proben wurden mit einem Farbstoff gemischt und anschließend auf ein 2 %iges Agarosegel (2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 80 V angelegt, die Laufzeit betrug 1 h 15 min. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in Aqua dest.) gefärbt, so dass die DNA-Banden mittels Fluoreszenzlicht (Anregungswellenlänge 312 nm) sichtbar wurden. Die Dokumentation erfolgte digital mit Hilfe des Windows-Programms BioCapt 11.03, das mit einem Gel-Dokumentationssystem der Firma Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland) gekoppelt war.

6. Immunhistochemische Analyse des Darmpräparates

Das Ziel immunhistochemischer Untersuchungen ist es, Proteine nachzuweisen. Im Rahmen dieser Arbeit handelte es sich um den Nachweis des Ryanodinrezeptors im Kolonepithel der Ratte. Dies gelingt, indem man hochspezifische mono- bzw. polyklonale Antikörper (meist IgG) einsetzt, die mit dem nachzuweisenden Antigen interagieren – dadurch entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe, die durch multiple, nichtkovalente Bindungen aneinander haften (Harlow & Lane 1988). Damit es zwischen Antigen und Antikörper zu einer spezifischen Bindung kommen kann, haben diese spezielle Bindungsregionen. So besitzen Antigene sog. Epitope, die von der F_{ab} -Region (= antigen-bindendes Fragment) des Antikörpers erkannt und gebunden werden. Der Sekundärantikörper bindet hingegen mit seiner F_{ab} -Region an die F_c -Region des Primärantikörpers. Zur Detektion dieser Komplexe stehen grundsätzlich mehrere Methoden zur Verfügung. In diesen Studien erfolgte der Nachweis des Ryanodinrezeptors auf lichtmikroskopischer Ebene, durch indirekte Immunfluoreszenz.

6.1. Grundlage der Immunfluoreszenz

Die Methodik der indirekten Immunfluoreszenz (Coons 1958) basiert darauf, dass an einen Primärantikörper, der spezifisch an das nachzuweisende Antigen bindet, ein sog. Sekundärantikörper bindet. Dieser trägt einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt wird – es entsteht eine längerwellige Emissionsstrahlung, durch die die optische Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes ermöglicht wird (Abb. II.2.).

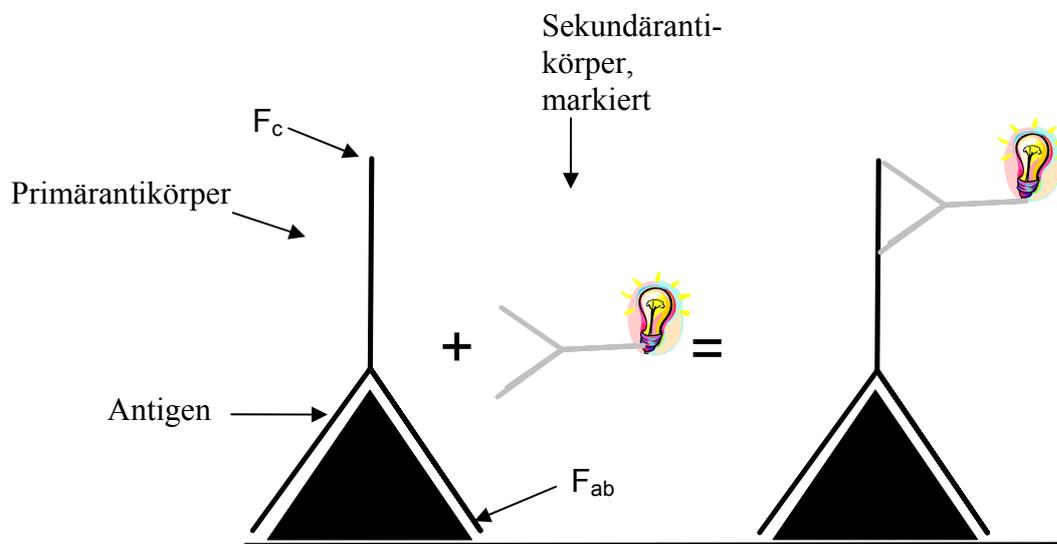


Abbildung II.2.: Indirekte Immunfluoreszenz

6.2. Grundlage der indirekten ABC-Komplexfärbung mit DAB als Detektionssystem

Diese Methode beruht auf einer hohen Bindungsaffinität von Streptavidin, einem Protein das von *Streptomyces avidinii* synthetisiert wird (Denk 1989). Bei der indirekten Komplexfärbung wird an den eingesetzten Primärantikörper ein biotinylierter Sekundärantikörper gekoppelt. An diesen wird wiederum Streptavidin, das eine biotinylierte Meerrettich-Peroxidase (HRP) trägt, gebunden. Wird nun 3,3 Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Substrat für die HRP angeboten, kommt es in Bereichen der Antikörperbindungen infolge hoher Enzymaktivität zur Umsetzung

des DAB, welches als brauner Niederschlag ausfällt. Diese Reaktion wird durch Zugabe von 10 %igem (Gew/Vol) Wasserstoffperoxid gestartet. Die Sensitivität dieser Methode ist gegenüber indirekten Färbemethoden erhöht, da mehrere ABC-Komplexe am Sekundärantikörper binden können. Somit werden auch mehrere Marker-Enzymmoleküle am Ort des gewebsgebundenen Antigens nachweisbar.

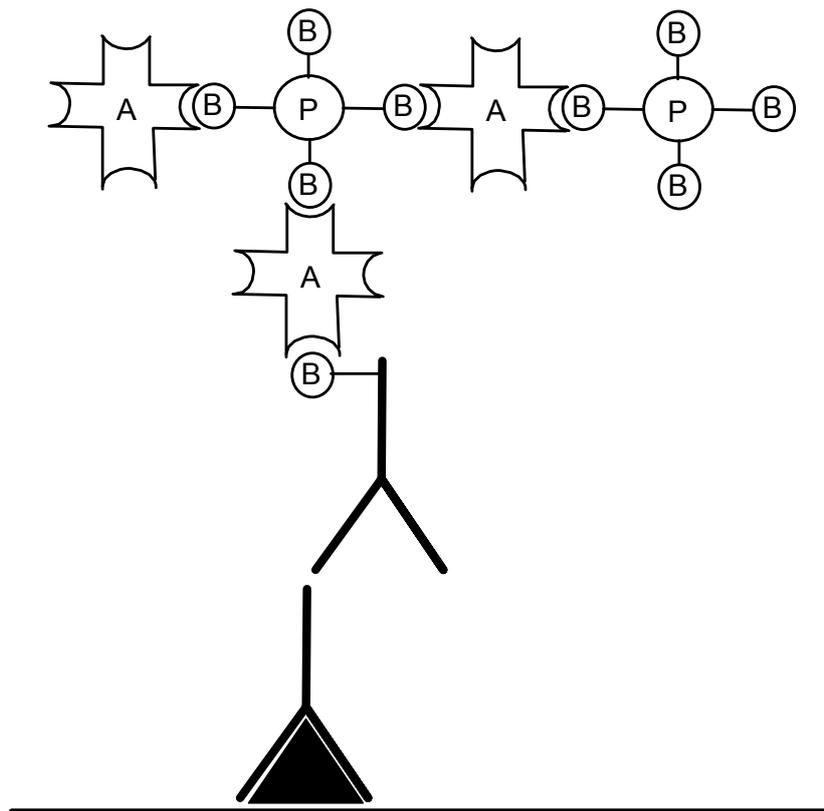


Abbildung II.3.: Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Methode

Ein Avidin(A)-Biotin(B)-Peroxidase(P)-Komplex wird an einen biotinylierten (B) sekundären Antikörper unter Ausnutzung der Affinität von Avidin zu Biotin gebunden; (modifiziert nach Denk 1989).

6.3. Verwendete Antikörper

Bei dem für die immunhistochemischen Färbungen eingesetzten Gewebe handelte es sich sowohl um kryofixierte als auch um Paraformaldehyd-fixierte (4 %ig, Gew/Vol) Präparate.

6.3.1. Detektion des Ryanodinrezeptors/IP₃-Rezeptors

Primärantikörper	Konjugierter Sekundärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
RyR-AK	Cy3-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG	Maus	1:2000	Dianova, Hamburg, Deutschland
	Biotin-conjugated goat anti-mouse IgG			
	EM goat anti-mouse IgG: 6 nm Gold			
IP ₃ R3-AK	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Maus	1:100	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tabelle II.11.: Auflistung der verwendeten Antikörper in der Immunhistochemie

Wirt, Verdünnung und Hersteller beziehen sich jeweils auf dem Primärantikörper; AK = Antikörper.

Zur Detektion des Ryanodinrezeptors Subtyp-1 im Kryptenepithel wurde ein monoklonaler Antikörper (IgG1) aus der Maus verwendet. Er kann neben der Immunfluoreszenz auch erfolgreich für die Immunpräzipitation und den Western Blot eingesetzt werden (Marius et al. 2006).

Der bei der Doppelmarkierung verwendete IP₃R-3-Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen eine Aminosäuresequenz des N-terminalen Endes (ragt in das Zytoplasma) des humanen IP₃R-3 gerichtet ist und diesen auch spezifisch in der Ratte detektiert (Angabe des Herstellers).

Zur Detektion des RyR-1 wurde zum einen der Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

Dieser Sekundärantikörper bindet spezifisch an die schweren und leichten Ketten von Maus IgG. Eine unspezifische Gewebefixierung ist unwahrscheinlich, da er gegen Ratte adsorbiert wurde.

Zum anderen wurde zur Detektion des RyR-1 ein biotinylierter Sekundärantikörper (IgG, Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt, der aus dem Pferd stammt und gegen Ratte abgesättigt wurde.

Zur Detektion des IP₃R-3 wurde der Alexa Fluor[®]488-gekoppelte Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) mit einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt. Dieser reagiert mit den schweren und leichten Ketten von Maus IgG.

6.3.2. Detektion der CD38/ADP-Ribosyl Zyklase

Primärantikörper	Konjugierter Sekundärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
CD38-AK	Cy3-conjugated AffiniPure donkey anti-goat IgG	Ziege	1:50	Santa Cruz, Californien, USA

Tabelle II.12.: In der Immunhistochemie eingesetzte Antikörper

Wirt, Verdünnung und Hersteller beziehen sich jeweils auf dem Primärantikörper; AK = Antikörper.

Bei dem zur Detektion des CD38-Moleküls eingesetzten Primärantikörper handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper aus der Ziege. Er ist gegen den C-Terminus des CD38-Proteins von Ratte und Maus gerichtet.

Um den Primärantikörper und damit CD38 sichtbar zu machen, wurde ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper (IgG, Dianova, Hamburg, Deutschland) mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, der im Esel hergestellt wurde und gegen Ziege gerichtet ist.

6.3.3. Detektion der SERCAs

Primärantikörper	Konjugierter Sekundärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
SERCA-2b-AK	Cy3-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit IgG	Kaninchen	1:1000	Geschenk von Frank Wuytack, Leuven, Belgien (Wuytack et al. 1989)
SERCA-3-AK	Cy3-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit IgG	Kaninchen	1:1000	Geschenk von Frank Wuytack, Leuven, Belgien (Wuytack et al. 1994)

Tabelle II.13.: Auflistung der verwendeten Antikörper in der Immunhistochemie

Wirt, Verdünnung und Hersteller beziehen sich jeweils auf den Primärantikörper; AK = Antikörper.

Um die SERCA Subtyp-2b in den Krypten des Kolons zu detektieren, wurde ein polyklonaler Antikörper, der gegen das C-terminale Ende (Aminosäure 1031-1042) der SERCA-2b aus dem Schwein gerichtet ist, eingesetzt. Der Antikörper, der spezifisch an SERCA-3 bindet, ist ebenfalls polyklonal und gegen Aminosäure 29-39 des N-terminalen Endes der SERCA-3 der Ratte gerichtet.

Um SERCA-2b und -3 sichtbar zu machen, wurde in beiden Fällen ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper (IgG, Dianova, Hamburg, Deutschland) mit einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt, der im Esel hergestellt wurde und gegen Kaninchen gerichtet ist.

6.4. Negativkontrollen

Zum Nachweis der Spezifität der eingesetzten Primärantikörper wurden bei jeder Versuchsdurchführung sog. Negativkontrollen angefertigt. Bei deren Herstellung wurde Inkubation mit der Primärantikörper-Lösung ohne Zusatz des Primärantikörpers durchgeführt. So konnte überprüft werden, ob der Sekundärantikörper unspezifische Bindungen mit dem Gewebe eingegangen war. Das Auftreten von Fluoreszenzsignalen

in den Negativkontrollen würde auf unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers hinweisen.

6.5. Fluoreszenzmarkierungen

6.5.1. Kryofixation des Kolons

Um das Gewebe durch Einfrieren zu konservieren, wurde das Kolon auf einen Kunststoffstab aufgezogen, mit dem Skalpell entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten und mit Cyanacrylklebstoff auf Plexiglashalter aufgeklebt (Schultheiss et al. 2002). Dieses Präparat wurde dann horizontal in eine mit warmer Gelatinelösung gefüllte Glasschale eingelegt, sodass es oben und unten jeweils 1 cm mit Gelatine beschichtet wurde. Die Ränder des Präparates wurden mit einer Kanüle in einem Abstand von 5 mm perforiert, um eine Verbindung der oberen mit der unteren Gelatineschicht sicherzustellen. Nach Erkalten und damit Erstarren der Gelatine wurde die Glasschale auf Eis gestellt und die Gelatine-Kolon-Blöcke (Größe: 1 x 1 x 0,3 cm) mit Hilfe eines spitzen Skalpells herauspräpariert; anschließend wurden sie sagittal zweigeteilt.

Jede Hälfte wurde einzeln mit Gewebeeinbettmedium (Tissue Tec[®]) auf einen Korken aufgeblockt und für 2 min in stickstoffgekühltes Isopentan (Temperatur ca. -160 °C) eingetaucht bis der Gelatine-Gewebe-Block vollständig gefroren war. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Präparat bei -70 °C gelagert.

6.5.2. Kryofixation des Skelettmuskels

Um die Skelettmuskelpräparate vor Gefrierschäden zu schützen, wurden sie vor der Kryofixation mit einem Gefrierschutz versehen. Hierfür wurden sie direkt nach der Präparation in eine 20 %ige (Gew/Vol) kühlschrankkalte Saccharose-Lösung eingelegt. Zu Beginn schwammen sie an der Oberfläche der Lösung, sanken dann nach 4-6 Stunden auf den Boden des Gefäßes ab und wurden daraufhin aus der Lösung genommen. Jedes dieser Muskelpräparate wurde einzeln mit dem Gewebeklebstoff Tissue Tec[®] auf einen Korken aufgeblockt und für 3 min in stickstoffgekühltes

Isopentan (Temperatur ca. $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$) eingetaucht, bis der Gewebeblock vollständig gefroren war. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Präparat bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

6.5.3. Perfusion

Neben der reinen Kryofixation wurde auch eine chemische Fixation zur Herstellung der Gewebelöcke angewandt. Durch dieses Verfahren steigerte sich im Vergleich zur reinen Kryofixation die Strukturhaltung des Gewebes enorm. Dies ermöglichte die Anfertigung der immunhistochemischen Doppelmarkierung (Kap. II.6.5.6.2.).

Die Tiere wurden mit einer Überdosis Narcoren ($0,1\text{ ml}/100\text{ g}$ Körpergewicht) in eine tiefe Narkose gelegt, wobei die Narkosetiefe durch Zwicken der Tiere in der Kniefalte mit einer Pinzette überprüft wurde. Nach Erreichen der Narkosetiefe, wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Perfusionswanne fixiert, die Bauchhöhle präumbilikal eröffnet und der Schnitt zügig bis in den Rippenbereich verlängert. Mit einer Schere wurde das Diaphragma beiderseits vom Rippenbogen gelöst und, ohne Lunge oder Herz zu perforieren, wurden die Rippen im ventralen Drittel durchtrennt. Um das Herz deutlich darzustellen, wurde nun das Sternum auf der kranialen Seite des Tieres fixiert. Nach Einreißen und Ablösen des Herzbeutels vom Herzen wurde mit einer 40 mm langen 18-G -Einmal-Kanüle (Sterican 1.2×40 ; Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) im Bereich der Herzspitze in den linken Ventrikel eingestochen (Tiefe: ca. $0,5\text{ cm}$), wobei die Kanüle mit dem Perfusionssystem in Verbindung stand. Mit einer Knieschere wurde nun der rechte Vorhof eröffnet und gleichzeitig das Ventil zur Kochsalzlösung ($0,9\%$, Gew/Vol) geöffnet.

$400\text{-}500\text{ ml}$ der Lösung wurden mit einem Druck von $110\text{-}120\text{ mm Hg}$ durch den Kreislauf des Tieres gespült. Der Zeitraum richtete sich danach, wie lange es dauerte, bis das Abfließen von Erythrozyten aus dem rechten Vorhof sichtbar verebbt war. Als weiterer Indikator für eine ausreichende Entblutung galt die Farbe der Leber, die gleichmäßig blass erscheinen musste. Dann wurde das Ventil auf die gekühlte Fixierungslösung Paraformaldehyd (PFA 4% , Gew/Vol) umgestellt. Es waren $400\text{-}500\text{ ml}$ der Lösung zur ausreichenden Fixierung nötig. Eine erfolgreiche Durchführung der Perfusion war begleitet von Steifwerden des Tierkörpers und eine

fester werdende Konsistenz der Leber. Anschließend wurde das Kolon wie in Kapitel II.4. beschrieben entnommen. Die Kryofixation wurde wie in Kapitel II.6.5.1. durchgeführt.

6.5.4. Herstellung der Gewebeschnitte

In einem Kryostaten (HM 500 O, MICROM, Walldorf, Deutschland) wurden bei einer Betriebstemperatur von -18 °C in der Kühlkammer und -16 °C für den Objekthalter aus den Gewebeblöcken 16 µm starke Schnitte angefertigt. Hierfür wurden die gefrorenen Präparate mit Tissue Tec[®] auf einen beweglichen Objekthalter aufgeblickt. Die Schnitte wurden auf gelatinebeschichtete (Kap. II.3.1.1.), raumtemperierte Objektträger aufgezoogen. Diese wurden in Objektträgerhalter gestellt und bis zur Färbung 1 h auf Eis getrocknet.

6.5.5. Fluoreszenz-Kernfarbstoff

Um eine bessere Orientierung auf dem Gewebeschnitt zu ermöglichen, wurden die Zellkerne mit DAPI (= 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat), einem Fluoreszenzfarbstoff, angefärbt. Diese Substanz färbt Kerne unabhängig von der Zellart an (Kubista et al. 1987).

6.5.6. Versuchsdurchführung/Färbeprotokolle

6.5.6.1. Einfachmarkierung

Die Einfachmarkierungen wurden durchgeführt, um den Ryanodinrezeptor Subtyp-1, CD38/ bzw. die SERCAs Subtyp-2 und -3 im Kolonepithel zu lokalisieren.

Die mit Gewebeschnitten gefüllten Objektträgerhalter wurden in Färbeküvetten überführt, die mit 200 ml raumtemperiertem Phosphatpuffer gefüllt waren. Die Rehydrierung erfolgte für 3 x 5 min auf einem Schüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Deutschland), wobei nach jeweils 5 min der PB durch frischen Puffer ersetzt wurde. Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen folgte die Inkubation mit Blocking-Lösung für 2 h bei Raumtemperatur mittels Plattentechnik. Die Objektträger wurden *upside-down* auf dafür speziell angefertigte

Inkubationsplatten gelegt, die beiderseits erhöhte Kanten besaßen. Zwischen Gewebeschnitt und Platte befand sich ein schmaler Spalt, welcher durch Kapillarkräfte leicht mit 200 µl Lösung gefüllt werden konnte. Um die Austrocknung der Schnitte zu verhindern, wurden die Platten während der Inkubationszeiten in Blechkammern mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre überführt. Zur Inkubation mit dem ersten Antikörper (Tab. II.11., II.12. und II.13.) wurde ebenfalls die Plattentechnik angewandt. Die Inkubationszeit betrug 24 h bei 4 °C.

Um ungebundenen, überschüssigen Primärantikörper vom Präparat zu entfernen, wurden die Objektträger wiederum in Objektträgerhalter und dann in Färbeküvetten überführt, um sie 3 x 5 min in PB auf dem Schüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwalbach, Deutschland) zu waschen. Der Phosphatpuffer wurde jeweils nach 5 min ausgetauscht. Um den Primärantikörper zu markieren, wurden die Schnitte auf die Inkubationsplatten überführt, mit der zweiten Antikörperlösung unterschichtet und in den Blechdosen für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Objektträger wieder in ihre Halter sortiert, in Färbeküvetten überführt und für 3 x 5 min auf dem Schüttler in PB gewaschen. Um die Zellkerne anzufärben, wurden die Schnitte in eine Färbeküvette, die eine 300 nmol·l⁻¹ DAPI-Lösung enthielt, umgesetzt und für 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach anschließendem fünfmaligem Waschen in Phosphatpuffer für jeweils 5 min unter Lichtschutz wurden die Objektträger mit anhaftenden Schnitten eingedeckt. Hierfür wurde auf jeden Schnitt ein Tropfen Citiflour[®] vorgelegt und darauf vorsichtig und luftblasenfrei ein Deckglaschen aufgelegt. Die Präparate wurden innerhalb der nächsten 12 h ausgewertet.

Bei jeder Versuchsreihe wurden Negativkontrollen, wie in Kapitel II.6.4. beschrieben, angefertigt.

	Ausführung	Reagenz	Temperatur	Zeit
1	Rehydrierung	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
2	Blockung unspezifischer Bindungsstellen	Blocking-Lösung	Raumtemperatur	2 h
3	1. Inkubation	Primärantikörper-Lösung + Primär-AK	4 °C	24 h
4	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
5	2. Inkubation	Sekundärantikörper-Lösung + Cy3 goat anti-mouse	Raumtemperatur	1 h
6	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
7	Kernfärbung	DAPI-Lösung	Raumtemperatur	5 min
8	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	5 x 5 min
9	Eindeckeln	1 Tropfen Citiflour / Schnitt	Raumtemperatur	
10	Lagerung	Im Dunkeln	4 °C	2 Tage

Tabelle II.14.: Färbeprotokoll für die einfache Fluoreszenzmarkierung

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind in Kapitel II.3.1. beschrieben, AK = Antikörper.

6.5.6.2. Doppelmarkierung

Um zu untersuchen, ob im Kolonepithel Kollokationen zwischen RyR-1 und IP₃R-3 vorliegen, wurden Doppelmarkierungen angefertigt.

Die Schwierigkeit bestand darin, dass beide eingesetzten Primärantikörper aus der Maus stammten. Dadurch war es nicht möglich, in einem Schritt beide Primärantikörper mit unterschiedlichen Sekundärantikörpern zu markieren. Technisch bedeutete das, dass das Protokoll der Einfachmarkierung (Kap. II.6.5.6.1.) zweimal direkt hintereinander durchgeführt wurde: Beim ersten Durchlauf wurden als Primärantikörper der RyR-Antikörper und als Sekundärantikörper das Cy3 eingesetzt, im zweiten dann der IP₃R3-Antikörper, der mit Alexa Fluor[®] 488 markiert wurde.

Um die Orientierung am Gewebeschnitt zu erleichtern, wurde wiederum eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt.

Für die Wasch- und Inkubationsschritte wurden dieselben Techniken wie bei der Einfachmarkierung (Kap. II.6.5.6.1.) verwendet.

	Ausführung	Reagenz	Temperatur	Zeit
1	Rehydrierung	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
2	Blockung unspezifischer Bindungsstellen	Blocking-Lösung	Raumtemperatur	2 h
3	1. Inkubation	Primärantikörper-Lösung + RyR-1-AK	4 °C	24 h
4	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
5	2. Inkubation	Sekundärantikörper-Lösung + Cy3 goat anti-mouse	Raumtemperatur	1 h
6	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
7	Kernfärbung	DAPI-Lösung	Raumtemperatur	5 min
8	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	5 x 5 min
9	Blockung unspezifischer Bindungsstellen	Blocking-Lösung	Raumtemperatur	2 h
10	1. Inkubation	Primärantikörper-Lösung + IP ₃ R-3-AK	4 °C	24 h
11	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
12	2. Inkubation	Sekundärantikörper-Lösung + Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse	Raumtemperatur	1 h
13	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
14	Eindeckeln	1 Tropfen Citiflour / Schnitt	Raumtemperatur	
15	Lagerung	Im Dunkeln	4 °C	2 Tage

Tabelle II.15.: Färbeprotokoll für die doppelte Fluoreszenzmarkierung

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind in Kapitel II.3.1. beschrieben, AK = Antikörper.

Als Kontrolle, dass sich der zweite Sekundärantikörper (Alexa Fluor[®] 488) nicht auch an die Bindungsstellen des ersten Primärantikörpers (RyR-Antikörper) setzte, wurde eine Doppelmarkierung angefertigt, bei der kein IP₃R-3-Antikörper eingesetzt wurde.

	Ausführung	Reagenz	Temperatur	Zeit
1	Rehydrierung	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
2	Blockung unspezifischer Bindungsstellen	Blocking-Lösung	Raumtemperatur	2 h
3	1. Inkubation	Primärantikörper-Lösung + RyR-1-AK	4 °C	24 h
4	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
5	2. Inkubation	Sekundärantikörper-Lösung + Cy3 goat anti-mouse	Raumtemperatur	1 h
6	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
7	Kernfärbung	DAPI-Lösung	Raumtemperatur	5 min
8	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	5 x 5 min
9	Blockung unspezifischer Bindungsstellen	Blocking-Lösung	Raumtemperatur	2 h
10	1. Inkubation	Primärantikörper-Lösung	4 °C	24 h
11	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
12	2. Inkubation	Sekundärantikörper-Lösung + Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse	Raumtemperatur	1 h
13	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	5 x 5 min
14	Eindeckeln	1 Tropfen Citiflour / Schnitt	Raumtemperatur	
15	Lagerung	Im Dunkeln	4 °C	2 Tage

Tabelle II.16.: Färbeprotokoll für die doppelte Fluoreszenzmarkierung ohne Verwendung des IP₃R-3-Primärantikörpers

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind in Kapitel II.3.1. beschrieben, AK = Antikörper.

Bei jeder Versuchsreihe der Doppelmarkierungen wurden ebenfalls Negativkontrollen (Kap. II.6.4.) angefertigt.

6.5.7. Mikroskopie

Die Analyse der Gewebeschnitte erfolgte durch ein Olympus BX50 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland). Spezielle Filter erzeugten Licht geeigneter Wellenlänge, um die verwendeten Fluorophoren anzuregen, sodass eine längerwellige Emissionsstrahlung entstand. Die Cy3-gekoppelten Antikörper wurden durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 510-530 nm angeregt. Die Emissionswellenlänge

betrug 630-660 nm, die sich optisch als rotes Licht darstellt. 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 mit einer Wellenlänge von 510-530 nm. Der Kernfarbstoff DAPI emittierte blaues Licht mit einer Wellenlänge von 461 nm, nachdem er durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 358 nm angeregt worden war.

Eine digitale Schwarzweißkamera (Spot Insight, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) mit zugehöriger Software (Spot Insight Software, Diagnostic Instruments, Michigan, USA) wurde eingesetzt, um die mikroskopischen Bilder zu dokumentieren. Je nach emittierter Lichtfarbe entstanden Schwarzweißphotos, deren Graustufen mit Hilfe des Softwareprogramms Metamorph (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) eingefärbt wurden. Somit erschienen die RyR-Signale rot, die IP₃R-3-Signale grün und die DAPI-Signale blau. Ob eine Kolo-kalisation der Einzelsignale vorlag oder nicht, konnte eruiert werden, indem die Einzelbilder einer Region übereinandergelegt wurden.

Zur Erstellung von Bildtafeln, die als Befunddokumentation dienten, wurde die Adobe Photoshop Imaging-Software genutzt. Diese ermöglichte zugleich eine gegebenenfalls notwendige Bildbearbeitung, um die Qualität der Bilder aufzuarbeiten.

6.6. ABC-Komplex-Färbung mit DAB-Detektionssystem

Diese Studie wurde an kryofixiertem Kolon durchgeführt (Kap. II.6.5.1.), um die Verteilung des RyR-1 in dessen Epithel darzustellen. Die Schnitte wurden wie in Kapitel II.5.4. beschrieben angefertigt.

6.6.1. Versuchsdurchführung/Färbeprotokoll

Die Ausführung der Reaktionsschritte gestaltete sich wie in Kapitel II.6.5.6.1. angeführt.

	Ausführung	Reagenz	Temperatur	Zeit
1	Rehydrierung	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
2	Permeabilisierung	Permeabilisierungslösung	Raumtemperatur	1 h
3	Blockung der intrinsischen Peroxidase	Peroxidase Blocking Kit	Raumtemperatur	10 min
4	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
5	Blockung unspezifischer Bindungsstellen	Blocking-Lösung	Raumtemperatur	2 h
6	1. Inkubation	Primärantikörper-Lösung + RyR-1-AK	4 °C	24 h
7	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
8	Avidin-Biotin-Blocking	Avidin-Blocking-Lösung	Raumtemperatur	15 min
9	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
10	Avidin-Biotin-Blocking	Biotin-Blocking-Lösung	Raumtemperatur	15 min
11	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
12	2. Inkubation	Sekundärantikörper-Lösung + biotin conjugated goat anti-mouse	Raumtemperatur	2 h
13	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
14	Inkubation mit ABC-Komplex	Avidin-Peroxidase-Lösung	Raumtemperatur	1 h
15	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
16	DAB-Vorinkubation	DAB-Lösung	Raumtemperatur	15 min
17	DAB-Reaktion	H ₂ O ₂	Raumtemperatur	4 – 6 min
18	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
19	Eindeckeln	1 Tropfen Entellan/Schnitt	Raumtemperatur	
20	Lagerung	Im Dunkeln	4 °C	2 Tage

Tabelle II.17.: Färbeprotokoll für die DAB-Reaktion zum Nachweis des RyR-1

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind in Kapitel II.3.1. beschrieben, AK = Antikörper.

Bei jeder Versuchsreihe der Peroxidasereaktion wurden ebenfalls Negativkontrollen (Kap. II.6.4.) angefertigt.

6.6.2. Mikroskopie

Die Auswertung der DAB-Schnitte erfolgte an einem Olympus BX50 Mikroskop (Olympus Optical, Hamburg, Deutschland). Die Aufnahmen digitaler Bilder ermöglichte eine Olympus Camedia C-3030 Kamera; diese wurden mit der Camedia Master 2.0 Software von Olympus dokumentiert wurden.

7. Western Blot

7.1. Das Prinzip des Western Blots

Die Methodik des Western Blots besteht darin, elektrophoretisch separierte Proteine auf eine Trägermembran zu transferieren (blotten), welche im Anschluss durch verschiedene Reaktionen nachgewiesen werden können (Abb. II.4.). Eingeführt wurde die Methode von J. Renart (Renart et al. 1979) für Diazobenzoyloxymethyl-Papier. Towbin (Towbin et al. 1979) stellte sie dann auf Nitrozellulosemembran um und schuf somit die Grundlage für die heute noch aktuelle Vorgehensweise. Namensgebend für dieses Verfahren ist der Erfinder der Blotting-Technik Edwin Southern (Southern 1975), der 1975 die Methode für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit nachfolgender Hybridisierung als Southern Blot eingeführt hat. In Anlehnung an seinen Namen wurde das Proteinblotting als Western Blot bezeichnet.

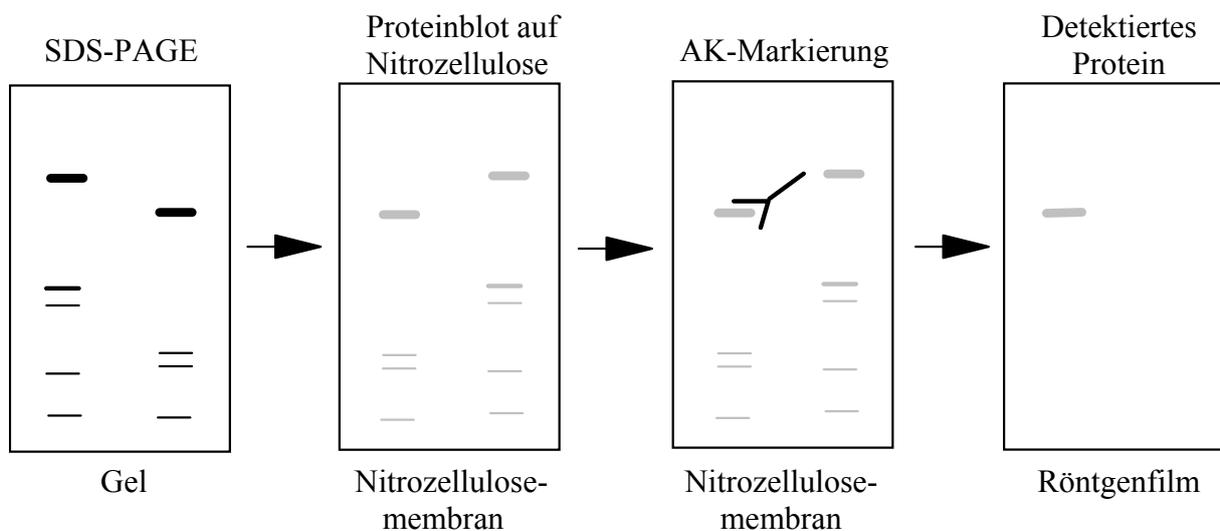


Abbildung II.4.: Prinzip des Western Blots
AK = Antikörper

Wichtige Vorteile dieser Technik sind die einfache Durchführbarkeit und die hohe Sensitivität. Hinzu kommt, dass man mit dem Western Blot einzelne Proteine sehr genau nach Größe und Gewicht charakterisieren kann (Bleisiegel 1986).

7.2. Eingesetzte Antikörper und Leiter

Primärantikörper	Konjugierter Sekundärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
RyR-AK	HRP-conjugated anti-mouse IgG	Maus	1:1000	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle II.18.: Auflistung der verwendeten Antikörper im Western Blot

Wirt, Verdünnung und Hersteller beziehen sich jeweils auf dem Primärantikörper; HRP =Meerrettichperoxidase; AK = Antikörper.

Um auf dem angefertigten Polyacrylamidgel eine Orientierung zu ermöglichen, wurde eine biotinylierte Protein-Leiter der Firma Cell Signalling, Danvers, USA eingesetzt. Diese wurde mit einem HRP-konjugierten Anti-Biotin-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 markiert, der ebenfalls von der Firma Cell Signalling bezogen wurde. Dieser Antikörper wurde ebenfalls eingesetzt, um den RyR-Antikörper zu binden.

7.3. Proteinextraktion

7.3.1. Präparation der Kolonkrypten und Separation der Mikrosomenfraktion

Zunächst wurden, wie in Kap. II.5.2. beschrieben, Krypten isoliert. Die gewonnene Suspension aus Auffangtyrode und Krypten wurde in ein 50 ml Nunc-Röhrchen (Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) überführt und bei 300-g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das entstandene Pellet in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Durch Vertikal- und Drehbewegungen eines Stößels wurden die isolierten Krypten mechanisch

zermahlen. Danach wurde Lysis-Puffer (Kap. II.3.2.3.) zugegeben, der zusätzlich noch $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) als Proteaseinhibitor enthielt. Um die Proteinextraktion aus den Krypten zu optimieren, erfolgte nun eine Inkubationszeit von 5 min bei $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Im Anschluss folgte eine Homogenisierung durch das Ultraschallgerät Bandelin Sonoplus (Geräte-Typ UW 2070, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) in 4 Zyklen à 5 s. Für 10 min wurde das Homogenat bei 2000-g zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde für 30 min bei 13000-g zentrifugiert, wobei in diesem Fall der Überstand verworfen und das Pellet mit $200 \text{ }\mu\text{l}$ Lysis-Puffer resuspendiert wurde.

7.3.2. Präparation des Skelettmuskelgewebes und Separation der Mikrosomenfraktion

Um Skelettmuskelgewebe zu isolieren, wurde eine Ratte wie in Kapitel II.4. beschrieben getötet. Direkt im Anschluss wurde die Haut oberhalb des Musculus popliteus mit einem ca. $1,5 \text{ cm}$ langen Schnitt durchtrennt und der Muskel freipräpariert. Es wurden etwa 5 Stücke des Muskels mit einer Kantenlänge von $5 \times 5 \text{ mm}$ präpariert, entnommen und mit Hilfe eines Skalpells in noch kleinere Stücke zerteilt. Diese wurden in ein 50 ml Nunc-Röhrchen überführt und mit $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Histidin-Puffer (Kap. II.3.2.4.) und $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt. Das Röhrchen wurde auf Eis gestellt und der Inhalt mit einem Ultra-Turrax (RZR 2020, Roth, Karlsruhe, Deutschland) vollständig homogenisiert. Die anschließende Zentrifugation dieser Suspension erfolgte für 20 min bei 1000-g . Der dabei entstandene Überstand wurde dann bei 8000-g wiederum für 20 min zentrifugiert; dieser Überstand wurde wiederum bei 8000-g für 20 min zentrifugiert. Zum Abschluss wurde der zuletzt entstandene Überstand für 60 min bei 29000-g zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde mit $500 \text{ }\mu\text{l}$ Lysis-Puffer (Kap. II.3.2.3.) resuspendiert.

7.4. Immunopräzipitation (IP)

Eine Immunopräzipitation ist eine molekularbiologische Nachweismethode von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Der Nachweis der Protein-Interaktion erfolgt, indem ein Antikörper ein spezifisches Protein inklusive Interaktionspartner aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert. Dieses Protein wird anschließend im Western Blot nachgewiesen.

Um die Immunopräzipitation durchzuführen, wurde die Mikrosomenfraktion der Kolonkrypten gewonnen (Kap. II.7.3.1.). Nach Lysis der Zellen, wurde der Ryanodinantikörper (Kap. II.7.2.) hinzugefügt und für 4 h bei 4 °C im „Head-over-head rotator“ inkubiert. Es folgte die Zugabe von Protein-G Sepharose mit einer Inkubationszeit von 12 h bei 4 °C. Über den RyR-Antikörper wurde das Protein des Ryanodinrezeptors mitsamt Interaktionspartner herausgezogen. Hierbei machte man sich die spezifischen Eigenschaften von Protein G zunutze, welches ein Bestandteil der Zellwand bestimmter Streptokokken-Stämme ist. Es bindet mit hoher Spezifität an die F_c-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline. Die Antikörper-Protein-Komplexe wurden über Zentrifugations- und Waschschriffe isoliert. Das Ryanodinrezeptorprotein wurde durch Denaturierung von den Sepharose-Beads gelöst und über einen Western Blot nachgewiesen.

7.5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte, um die genaue Menge der Krypten- bzw. Skelettmuskelsuspension, die auf das Gel aufzutragen ist, zu ermitteln.

Zur Analyse des genauen Proteingehalts jeder Präparation wurde das BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, USA) verwendet. Die BSA-Standards und die Proben wurden exakt nach Firmenanweisung (Handblatt) verdünnt und inkubiert. Die Proben wurden mit einem Photometer (iEMS Reader MF, Labsystems, Egelsbach, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 540 nm ausgelesen. Die ermittelten Zahlenwerte konnten in das Computerprogramm GraphPadPrism (GraphPad Software, San Diego, Ca, USA) eingetragen werden; dieses errechnete, wie viel $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Protein in jeder Probe enthalten sind.

7.6. Versuchsdurchführung

7.6.1. SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Poly Acrylamid Gel Elektrophorese) nach Lämmli

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese ist eine Standardmethode, um Proteine aufzureinigen und zu analysieren (Towbin et al. 1979). Es ist eine Variante der Gel-Elektrophorese, die Moleküle im elektrischen Feld trennt. Der Bereich, in dem die Proteine detektierbar sind, liegt zwischen 1 und 100 kDa (Schagger & von Jagow 1987).

Trenn- und Sammelgel sind Gele auf Acrylamidbasis, die zusätzlich Natriumdodecylsulfat (SDS) enthalten. Dieses anionische Detergens überdeckt die Eigenladungen von Proteinen – pro 1 g Protein binden ca. 1,4 g SDS, so dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Vor der Elektrophorese muss zunächst das Trenngel gegossen werden. Hierzu wird die Trenngel-Mischung (5 %ig, bestehend aus H₂O, 40 %igem Acrylamid und Trenngelpuffer (Kap. II.3.2.6.)) mit dem Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und dem Polymerisierungs-Katalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED) versetzt und zügig zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, die durch einen Abstandhalter (Spacer) voneinander getrennt sind. Die Glasscheiben wurden im Vorfeld mit Ethanol entfettet, und das gegossene Gel wurde mit Isobutanol überschichtet. Nach ca. 45 min, als das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isobutanol mit einem Filterpapier abgesaugt. Zwischen die Glasscheiben wurde dann auf dem Trenngel ein spezieller Kamm eingesteckt, um die Taschen zum Einfüllen der Proben zu erhalten. Im Anschluss folgte die Herstellung des Sammelgels (5 %ig, bestehend aus H₂O, Acrylamid (40%ig), Sammelgelpuffer (Kap. II.3.2.7.), APS (0,21%ig) und TEMED) das ca. einen Zentimeter hoch über das Trenngel pipettiert wurde. Nach etwa 20 min ist auch dieses Gel auspolymerisiert, und der Kamm kann entfernt werden.

Bei der Probenvorbereitung wurde SDS mit dem Probenpuffer (Kap. II.3.2.9.) im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben. Die Probe wurde im Anschluss auf 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken aufzubrechen. Durch Reduktion können Disulfidbrücken gespalten werden, wodurch sich die Moleküle strecken und dadurch besser trennbar

sind. Deshalb enthält der Probenpuffer auch Thiolverbindungen wie β -Mercaptoethanol und Dithiothreitol (DTT).

Zur Auftrennung wurden jeweils 10 μ g Protein der denaturierten Proben und 4 μ l der Leiter in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München, Deutschland) eingespannt und diese mit Laufpuffer (Kap. II.3.2.8.) befüllt. Dann wurde eine Spannung von 120 V angelegt, die Laufzeit betrug 1 h 25 min. Diese Spannung bewirkte eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel, wobei das Gel als eine Art Sieb fungierte. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen, wohingegen große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern. Am Ende der elektrophoretischen Auftrennung sind die Proteine der Größe nach sortiert und können durch weitere Verfahren, wie in dieser Arbeit durch immunologische Verfahren, sichtbar gemacht werden. Die aufgetragene Leiter diente als Größenmarker, welcher die Abschätzung der Größe der Proteine und damit die Orientierung auf dem Gel ermöglicht.

7.6.2. Protein Blotting (semi-dry)

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen von Polyacrylamid-Gelen auf Nitrozellulosemembranen ermöglicht es, Proteine zu detektieren (Towbin et al. 1979). Dies ist allerdings nur problemlos möglich, wenn die entstandenen Abdrücke des Gels nicht verzerrt sind und die darzustellenden Antigene nicht während der Prozedur denaturiert worden sind (Burnette 1981).

Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die proteinbindende Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 85, Reinforced NC, 0,45 μ m, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) erfolgte durch Elektrophorese. Hierbei wurde eine Blotting-Kammer (Trans-Blot SK, Semi-dry transfer cell, Bio-Rad, München, Deutschland) eingesetzt, durch die ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt wurde, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran gezogen und dort gebunden wurden. Bei diesem Semi-dry Blot wurden Gel und Membran, sandwichartig eingefasst von Filterpapieren, die bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienten, zwischen die Elektroden gelegt. Die Filterpapiere waren vor

Gebrauch in Transfer-Puffer (Kap. II.3.2.5.) eingeweicht worden. Das im Puffer enthaltene Methanol diene dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.

7.6.3. Färbeprotokoll, Filmentwicklung und Dokumentation

Nach dem Blot wurde die Nitrozellulosemembran aus der Blotting-Kammer entnommen, um die Immunodetektion anzuschließen. Dabei bindet der gegen RyR-1 gerichtete Primär-Antikörper (Kap. II.7.2.) an die Epitope des Ryanodinrezeptors. An diesen Primär-Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, über welchen die Detektion erfolgt.

Das Verfahren erforderte folgende Schritte:

	Ausführung	Reagenz	Temperatur	Zeit
1	Rehydrierung	Tris-Puffer (TBS)	Raumtemperatur	1 x 5 min
2	Blockung unspezifischer Bindungsstellen	Blocking-Lösung	Raumtemperatur	1 h
3	Waschen	Tris-Puffer (TBS)	Raumtemperatur	3 x 5 min
4	1. Inkubation	Blocking-Lösung + RyR-1-AK	4 °C	24 h
4	Waschen	Tris-Puffer (TBS)	Raumtemperatur	3 x 5 min
5	2. Inkubation	Blocking-Lösung + HRP-conjugated goat anti-mouse IgG + biotinylierte Protein-Leiter	Raumtemperatur	1 h
6	Waschen	Tris-Puffer (TBS)	Raumtemperatur	3 x 5 min

Tabelle II.19.: Färbeprotokoll für den Western Blot

Die eingesetzten Lösungen sind in Kapitel II.3.2. aufgeführt; HRP = Meerrettichperoxidase; AK = Antikörper.

Im Anschluss an dieses Färbeprotokoll erfolgte die Visualisierung der Proben durch eine Chemolumineszenzreaktion (Abb. II.5.). Dieser Versuchsteil fand im Dunkeln statt. Es wurden jeweils 5 ml der beiden Reaktionsdetergenzien des Pierce ECL Western Blotting Substrates (Pierce, Rockford, USA) gemischt, die Nitrozellulosemembran hineingelegt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Membran in eine mit einem Röntgenfilm (Kodak Biomax light film, Kodak,

Stuttgart, Deutschland) bestückten Röntgenkassette gelegt und für 15 min inkubiert. Zum Schluss wurde der Film entwickelt und stand zur Auswertung bereit.

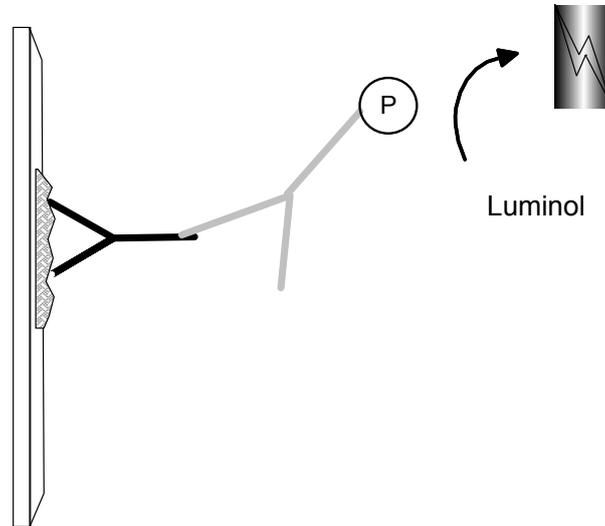


Abbildung II.5.: Chemoluminiszenzreaktion

Auf einer Nitrozellulosemembran bindet ein Primärantikörper an sein spezifisches Protein. Der Primärantikörper wird wiederum von einem Sekundärantikörper, an den eine Peroxidase (P) gekoppelt ist, gebunden. Das Enzym oxidiert Luminol, wodurch es detektierbar wird.

8. Imaging-Messungen

8.1. Allgemeines zur Ca²⁺-Messung mittels Ca²⁺-sensitiver Farbstoffe

Um die intrazelluläre Konzentration freier Kalziumionen zeitlich und damit kontinuierlich zu erfassen, bedarf es eines hohen technischen Standards, wobei die Ratio-Imaging-Technik exakt diesen Sachverhalt dokumentieren kann (Baylor & Hollingworth 2000). Durch Anwendung selektiver Fluoreszenzfarbstoffe, erstmals von Tsien (Tsien 1980) entwickelt, stellt diese Methode eine effiziente Möglichkeit zur Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion in lebenden Zellen dar.

Tsien gelang es nach zahlreichen Versuchen, 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (= BAPTA) herzustellen, indem er den Ca²⁺-Chelator EGTA modifizierte. BAPTA zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu Kalzium aus (K_d von 0,1 µmol·l⁻¹ in einer einfachen Salz-Lösung) (Baylor & Hollingworth 2000),

ist nur in geringem Maße pH-sensitiv und bildet das Grundgerüst unterschiedlichster Ca^{2+} -chelatbildender Fluoreszenzfarbstoffe.

Zwei große Gruppen von Fluoreszenzfarbstoffen werden unterschieden: Die wellenlängen-stabilen (*wavelength stable dyes*) und die wellenlängen-ändernden (*wavelength shifting dyes*) Fluoreszenzfarbstoffe. Die wellenlängen-stabilen Indikatoren ändern die Emissionsintensität, sobald Kalzium gebunden wurde, Exzitations- und Emissionsspektrum bleiben konstant. Sobald dagegen Mitglieder der Gruppe der wellenlängen-ändernden Farbstoffe Kalzium binden, verschiebt sich ihr Emissions- oder Exzitationsspektrum, und sie erweisen sich damit als besonders geeignet für die Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen.

Fura-2 und Mag-Fura-2, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, gehören der letztgenannten Farbstoffgruppe an. Der Vorteil dieser wellenlängen-ändernden Indikatoren ist die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Ca^{2+} -freiem und Ca^{2+} -gesättigtem Farbstoffanteil – so kann eine Verhältnis(Ratio)-Messung durchgeführt werden, wobei die Emissionswerte des ionengebundenen Anteils durch die des freien Farbstoffes dividiert werden. Im Falle von Fura-2 wird der Quotient aus der Emission bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm gebildet, wobei der zeitliche Abstand der Anregung nur wenige Millisekunden beträgt. Aus diesem Quotienten lässt sich die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration ablesen.

Gemäß des Massenwirkungsgesetzes verhält sich die Ratio proportional zur Konzentration des vorhandenen freien bzw. gebundenen Kalziums. Aus der im Versuch gemessenen Ratio (Emission [340 nm]/Emission [380 nm]) kann mit Hilfe folgender Gleichung die intrazelluläre Kalziumkonzentration theoretisch errechnet werden (Grynkiewicz et al. 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \times \frac{Sf2}{Sb2}$$

Formellegende:

K_d = Dissoziationskonstante des Fura-2 für Kalzium

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

R_{\min} = Ratio bei kalziumfreiem Fura-2

R_{\max} = Ratio bei kalziumgesättigtem Fura-2

Sf2 = Emissionswerte des kalziumfreien Fura-2 bei einer ARW von 380 nm

Sb2 = Emissionswerte des kalziumgesättigten Fura-2 bei einer ARW von 380 nm

In der vorliegenden Arbeit wurde aus den gemessenen Ratios allerdings nicht die Ca^{2+} -Konzentration errechnet, da dies mit vielen Ungenauigkeiten behaftet wäre: Das Fluoreszenzsignal ist beispielsweise abhängig vom pH-Wert oder der Osmolarität (Baylor & Hollingworth 2000). Es war ausreichend, die Änderung der Ratio als Zeichen einer Reaktion heranzuziehen.

Die Ratiomessung bietet Vorteile im Vergleich zu einfachen Messungen, da eventuell auftretende negative Faktoren sich immer auf beide Wellenlängen auswirken – bei der Quotientenbildung kürzen sie sich somit wieder heraus. Die Messungen werden so unabhängig von der intrazellulär vorhandenen Menge an Indikatorsubstanz, einer eventuell ungleichmäßigen Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs sowie der Zelldicke und einem Ausbleichen („photo bleaching“) oder Austreten des Farbstoffs (Tsien 1986).

Für die Auswahl des Fluoreszenzfarbstoffes ist die Dissoziationskonstante (= K_d) ein weiteres wichtiges Kriterium. Sie drückt aus, bei welcher Ionenkonzentration 50 % des Farbstoffes das Ziel-Ion gebunden haben – somit ist sie ein Maß für die Affinität des Chelators zum Ion.

8.2. Kryptonpräparation

Die Kryptonisolation erfolgte wie in Kap. II.5.2. beschrieben. In der Zwischenzeit wurden Deckgläschen vorbereitet: Auf jedes Deckgläschen wurde eine 1 cm hohe Silikonkammer mit 6 mm Durchmesser gesetzt und leicht angedrückt, bis sie sich lückenlos an das Deckglas angesaugt hatte. Anschließend wurden die Deckgläser auf eine warme Heizplatte gelegt und 30 µl Poly-L-Lysin in das Zentrum jedes Plättchens getropft. Nach vollständigem Verdampfen des Poly-L-Lysins wurden mit Hilfe einer Mikropipette 30 µl der kryptonhaltigen Auffangtyrode auf die beschichteten Plättchen gegeben. Im Anschluss wurden in jede Kammer 70 µl Auffangtyrode pipettiert, sodass ein Endvolumen von 100 µl entstand. Die Präparate konnten bis zu sechs Stunden bei 4 °C aufbewahrt werden.

8.3. Verwendete Farbstoffe

8.3.1. Fura-2

Um die kalziumabhängige Signaltransduktion am Kolonepithel der Ratte zu untersuchen, wurde der Indikatorfarbstoff Fura-2 sowie Mag-Fura-2 eingesetzt. Das Grundgerüst des Chelators (griech.: Chele = Klaue) im Fura-2 Molekül ist 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (= BAPTA). Es handelt sich, genau wie bei Mag-Fura-2, um ein stark negativ geladenes Molekül, das die Zellmembran nicht permeieren kann. Aus diesem Grund wurden lipophile und damit membranpermeable Acetoxymethylesterderivate entwickelt, mit denen eine Farbstoffbeladung der zu untersuchenden Zellen ermöglicht wurde, ohne die Zellwand zu schädigen. Sobald der Fura-2 bzw. Mag-Fura-2 Acetoxymethylester im Zytosol bzw. im Inneren von Zellorganellen angelangt ist, wird er durch Esterasen in ein membranimpermeables Molekül umgewandelt, das die Zelle nicht mehr verlassen kann (Tsien 1986). Nur dieses aktive Molekül kann zweiwertige Kationen, besonders Kalzium, binden. (Abb. II.6.).

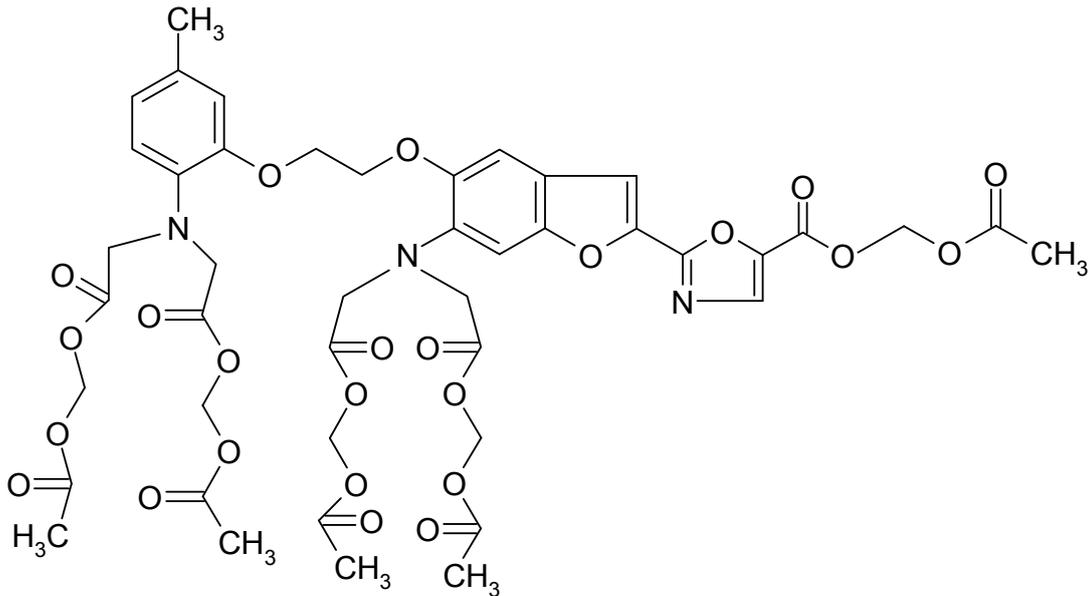


Abbildung II.6.: Fura-2 Acetoxymethyl(= AM)ester

Die K_d für Fura-2 beträgt $224 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, der optimale Messbereich liegt somit zwischen $22,4 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $2240 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (siehe Abb. II.7.). Der maximale Messbereich hingegen kann Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen $2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $22400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ erfassen. In einer Zelle, die sich im Ruhezustand befindet, liegt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration bei ca. $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – dieser Wert liegt im optimalen Messbereich von Fura-2 und kann damit einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bei Entleerung der intrazellulären Speicher genauestens erfassen. Ein Übertreten von Farbstoff in die Organellen, die als Ca^{2+} -Speicher dienen, führt zu keiner Abfälschung der Ergebnisse, da hier eine Ca^{2+} -Konzentration von ca. $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ herrscht. Diese Konzentration liegt außerhalb des maximalen Messbereichs von Fura-2; der Farbstoff ist in diesem Bereich gesättigt.

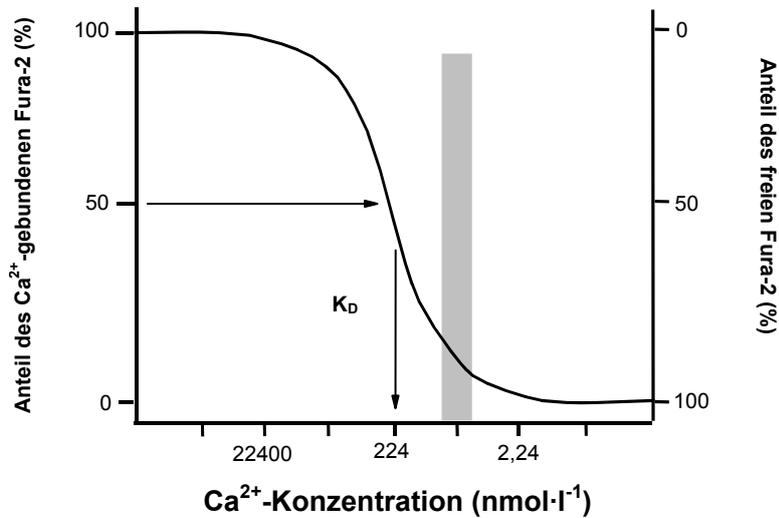


Abbildung II.7.: Fura-2-Bindungskurve in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration
Die graue Säule markiert die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration unter Ruhebedingungen.

Das Exzitationsverhalten des Fluoreszenzfarbstoffs stellt sich folgendermaßen dar (Abb. II.8.): Das Exzitationsmaximum der freien, polyanionischen Form des Fura-2 liegt bei 362 nm. Durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen vermindert es sich auf eine Wellenlänge von 335 nm (Grynkiewicz et al. 1985). Das Emissionsmaximum bleibt mit 505-510 nm konstant (Tsien 1986). In der Praxis werden zur Messung der Fluoreszenzintensität des kalziumfreien Farbstoffes allerdings nicht die optimalen Anregungswellenlängen von 362 nm genutzt, sondern Licht einer Wellenlänge von 380 nm. Der Grund hierfür ist, dass die Wellenlänge 362 nm sehr nah am sogenannten isoemissiven Punkt des Fura-2-spezifischen Spektralverhaltens liegt, bei dem die Fluoreszenzintensität des Fura-2 unabhängig von der Kalziumkonzentration immer gleich ist. Bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm ist die Differenz der Fluoreszenzintensität für kalziumfreies und kalziumgesättigtes Fura-2 am größten.

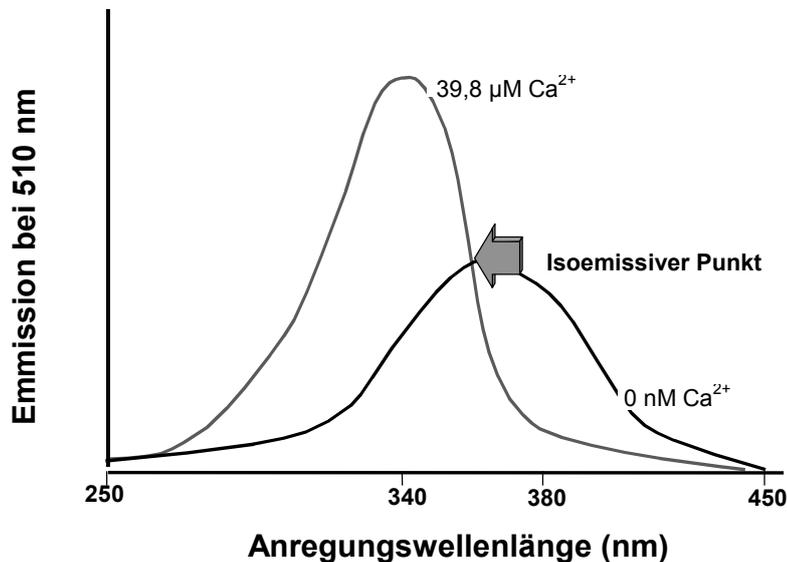


Abbildung II.8.: Exzitationsspektren von Fura-2 bei verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen

Bei der Ratio-Imaging-Technik wird der Quotient (Ratio) aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei den beiden Anregungswellenlängen 340 und 380 nm gemessen. Dieser Quotient spiegelt das Verhältnis von gebundenem zu freiem Indikator wider (Tsien 1980).

8.3.2. Mag-Fura-2

Das Mag-Fura-2, auch Furapta genannt, zählt zur Gruppe der „lower-affinity-indicators“. Das Tricarboxylat, welches bei diesem Farbstoff als Grundgerüst fungiert, bindet Kalzium mit drei Carboxylgruppen und verleiht somit dem Mag-Fura-2 eine niedrige Ca²⁺-Affinität (Baylor & Hollingworth 2000). Die K_d für Kalzium liegt bei 53 µmol·l⁻¹, wodurch Ca²⁺-Konzentrationen ab 5 µmol·l⁻¹ gemessen werden können (Hofer & Schulz 1996). Mit einer K_d von 2 mmol·l⁻¹ für Magnesium (in Abwesenheit von Ca²⁺) hat Mag-Fura-2 ebenfalls eine Sensitivität gegenüber diesem Ion. Da in ruhenden Zellen die Mg²⁺-Konzentration zwischen 0,5 - 2 mmol·l⁻¹ liegt, kann diese mit Mag-Fura-2 erfasst werden (Hyrc et al. 2000).

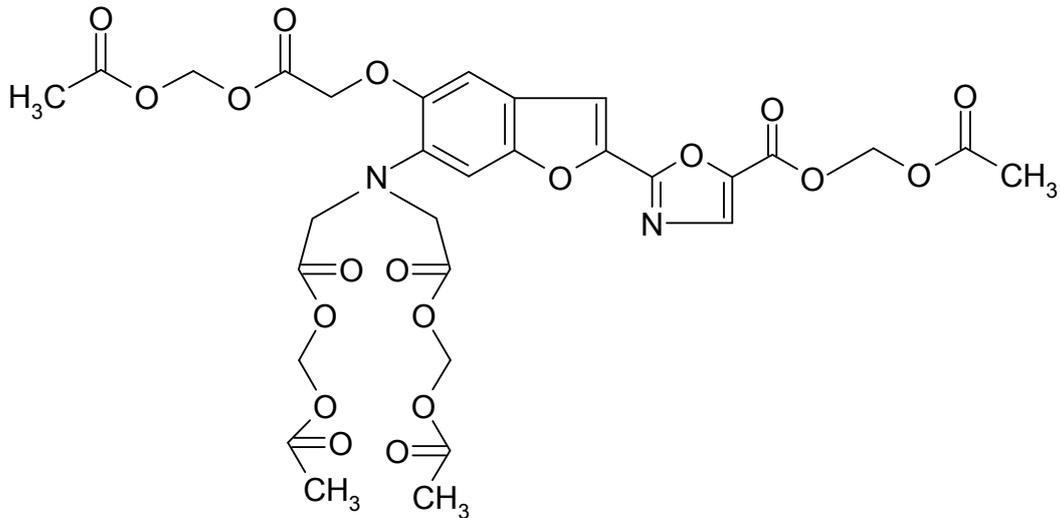


Abbildung II.9: Mag-Fura-2 Acetoxymethyl(=AM)ester

Der Farbstoff reichert sich vor allem in intrazellulären Speichern an (Hofer & Machen 1993). Das gemessene Mag-Fura-2 Signal könnte durch Kalzium und Magnesium gleichermaßen hervorgerufen werden. Es wurde allerdings gezeigt, dass Magnesium keine (Hofer & Machen 1993) bzw. nur sehr geringe (Hofer & Schulz 1996) Effekte bei Ca^{2+} -freien Mag-Fura-2 Messungen hatte.

An Mag-Fura-2 ist das gleiche Fluorophor gekoppelt wie an Fura-2. Es zählt ebenfalls zu den wellenlängenändernden Farbstoffen und zeigt den selben Shift, von 340 nm zu 380 nm, wie Fura-2.

8.4. Messstand

Die Kalzium-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 (Abb. II.10.). Eine Monochromatoreinheit (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) wurde eingesetzt, um den Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff mit Licht entsprechender Wellenlänge anzuregen. Eine integrierte Xenon-Lichtquelle diente zur Erzeugung von Lichtwellen, die über Spiegel in einen

Lichtleiter gelenkt werden. Der Lichtleiter ist über einen Epifluoreszenz-Kondensator 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 an das Mikroskop angeschlossenen CCD-Kamera (= charge coupled device; Till Photonics, Martinsried, Deutschland) detektiert werden. Die Kamera stellt die Verbindung zwischen optischem System und Software her. Auf diese Art und Weise können sog. „live displays“ fortlaufend während der gesamten Messung aufgezeichnet werden. Auf ihnen ist es möglich, die Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu beobachten.

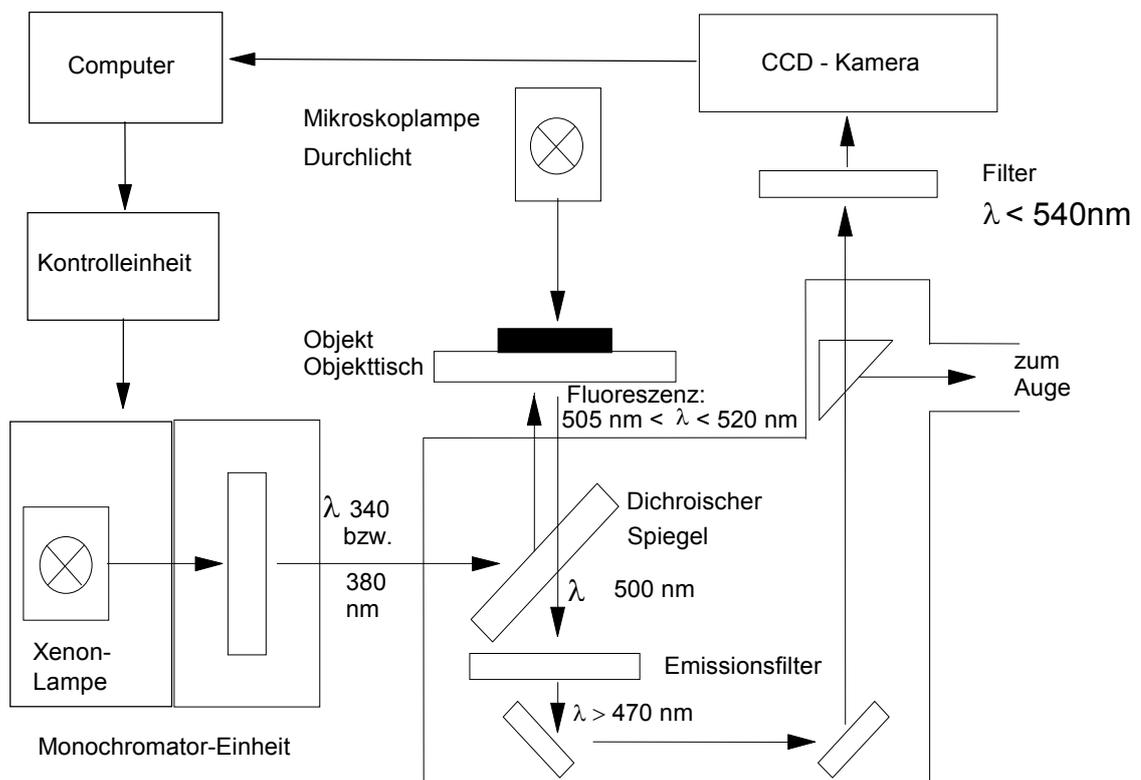


Abbildung II.10.: Schematische Darstellung des optischen Systems für die Ca^{2+} -Messungen

8.5. Messkammer und Perfusionssystem

Als Messkammern dienten Teflonschalen mit einem Durchmesser von 36 mm (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland). Im Zentrum des Schalenbodens wurde ein Loch von 18 mm Durchmesser gebohrt. Diese Schale wurde auf vier Schrauben gesteckt, die sich fest auf einer Halterung für das Mikroskop befanden. Zwischen Halterung und Schale wurden – mittig unter das Loch – die zu untersuchenden Deckgläschen gelegt und mit den vier Schrauben fest angezogen, sodass eine flüssigkeitsdichte Kammer entstand.

Die Kammer wurde dann auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert und die Standardlösungen über Infusionsbestecke (LDKS Oversan Industria Biomedica, Mailand, Italien), die in einer Kanüle endeten, in die Messkammer geleitet. Der Zulauf erfolgte kontinuierlich, wobei die Fließgeschwindigkeit von etwa $1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durch eine Pumpe (Typ 11; OSC.618.CH5B; Ole Dich Instrumentmakers, Hvidovre, Dänemark) gewährleistet wurde. Die eingesetzten Stimulanzen und Blocker wurden manuell über ein Spritzen-Schlauch-System zugegeben. Um das Flüssigkeitsvolumen innerhalb der Messkammer auf einem konstanten Volumen von 2-3 ml zu halten, befand sich gegenüber des Zulaufes eine Absaugvorrichtung. Die Kanülen der Zu- und Ablaufvorrichtung waren durch 2 cm hohe Teflonpins an der Messkammer befestigt. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

8.6. Versuchsdurchführung

8.6.1. Messungen an isolierten Krypten

Die isolierten Krypten wurden mit Fura-2 AM ($2,4\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und $0,48 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Pluronic[®] für 1 h bei Raumtemperatur aufgeladen. Im Anschluss wurden die Deckgläschen in die Messkammer eingespannt und diese auf den Objektisch verbracht. Im 20er Objektiv wurde im Folgenden eine geeignete Krypte justiert. Davon wurde mit Hilfe der Imaging-Software ein Bild (= Snapshot) erstellt und dieses auf den Monitor des Computers übertragen. Die Fluoreszenzintensität der Krypte wurde darin durch Falschfarben dargestellt: Den geringst fluoreszierenden Bereichen

der Krypte wurde die Farbe Blau, den etwas stärkeren Grün bis Gelb und den am stärksten fluoreszierenden Bereichen Rot zugeordnet.

Um nun eine Messung durchzuführen, wurden Messbereiche (ROIs = regions of interest) definiert. Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration innerhalb dieser Bereiche wurden im Verlauf des Experimentes aufgezeichnet. Um unterschiedliche Reaktionen entlang der Kryptenachse erfassen zu können, wurden die ROIs so gewählt, dass sie sowohl in der Oberflächenregion, der mittleren Region als auch im Kryptenfundus lagen (Abb. II.11.).

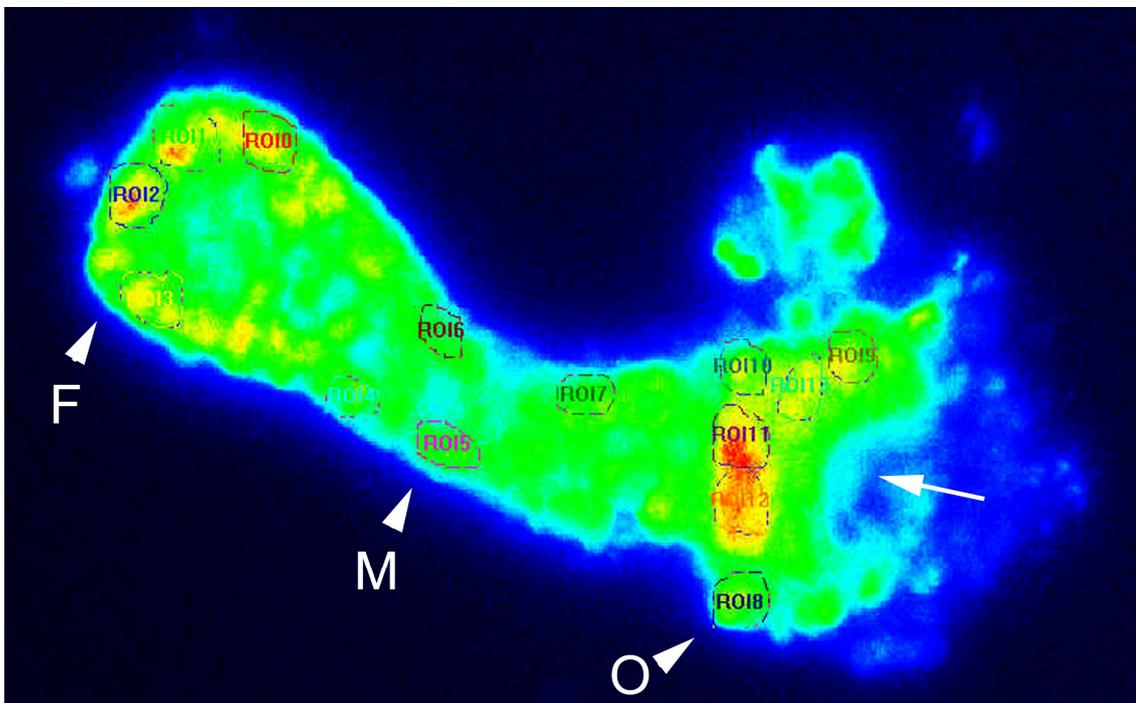


Abbildung II.11.: Falschfarbendarstellung einer mit Mag-Fura-2 beladenen Krypte

Mit Kreisen gekennzeichnet sind die ROIs. F = Fundus; M = mittlere Region; O = Oberflächenregion, weißer Pfeil: Öffnung der Krypte zum Darmlumen.

Zu Beginn jedes Versuches wurden die Krypten mit einer kalziumfreien, $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl-Tyrode (Kap. II.3.4.4.) umspült – ein physiologisches Milieu ist für sie essentiell, um vital zu bleiben. Sobald sich die Grundlinie (Baseline) stabilisiert hatte, wurden die entsprechenden Lösungswechsel bzw. Substanzapplikationen vorgenommen.

8.6.2. Stiumlanzien

8.6.2.1. Monochloramin (MCA)

Monochloramin (NH_2Cl) wurde jeden Tag frisch synthetisiert. Es wurden 5 ml einer $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4Cl Lösung und 20 ml einer $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaH_2PO_4 Lösung gemischt. Zu 10 ml dieser Lösung wurde in einem Abstand von 30 s $50 \mu\text{l}$ NaOCl zugefügt. Während der gesamten Zeit wurde die Lösung mit Hilfe einer Pipette durchmischt. Die entstandene Konzentration von NH_2Cl wurde nach der Synthese mit einem Photometer (Spektrophotometer, Typ DU[®] 640, Beckman Coulter, USA) mit einem Extinktionskoeffizienten von $429 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ bei 242 nm ermittelt (Tamai et al. 1991).

Monochloramin verändert den Redoxstatus von Ryanodinrezeptoren und erhöht damit die Öffnungswahrscheinlichkeit, woraufhin es zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern kommt (Oba et al. 2002; Schultheiss et al. 2005).

8.6.2.2. Cyclopiazonsäure (CPA)

Die Cyclopiazonsäure ist ein Mykotoxin, das von bestimmten Stämmen der Familie *Penicillium cyclopium* und *Aspergillus flavus* gebildet wird. Es ist ein potenter Hemmstoff der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität und des ATP-abhängigen Ca^{2+} -Transports des Sarkoplasmatischen Retikulums. Neben Thapsigargin gehört auch CPA zu der Gruppe der hochspezifischen Inhibitoren der Sarkoplasmatisch-Endoplasmatischen Retikulum Calcium ATPase (SERCA) (Plenge-Tellechea et al. 1997).

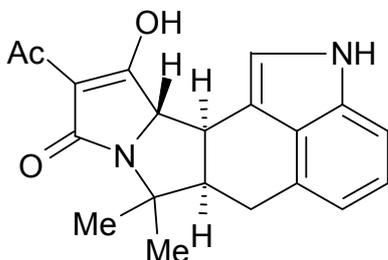


Abbildung II.12: Cyclopiazonsäure

8.6.2.3. Adenosintri-phosphat (ATP)

Adenosin-5'-triphosphat ist ein Agonist von P2Y Purinozeptoren am Kolonepithel der Ratte. Sie zählen zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Durch Aktivierung der Phospholipase C kommt es zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (Fredholm et al. 1994).

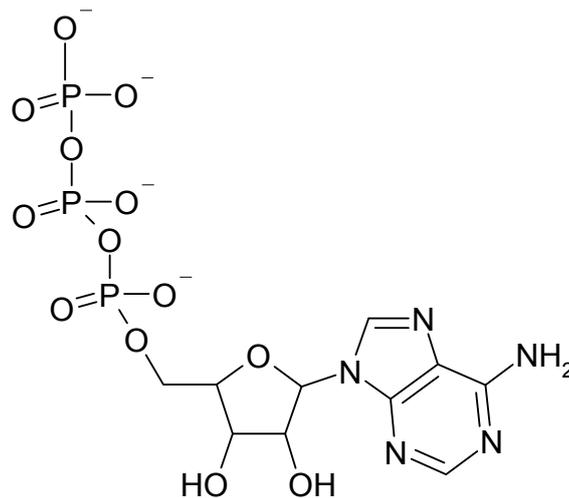


Abbildung II.13.: Adenosin-5'-triphosphat

8.6.2.4. Arachidonsäure

Die Arachidonsäure ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die vom Körper aus der essentiellen Linolsäure synthetisiert werden kann oder über die Nahrung aufgenommen wird. Sie ist in veresterter und damit in physiologisch inaktiver Form als Lipidbestandteil vor allem in den Zellmembranen lokalisiert und kann durch die regulierte Aktivität des Enzyms Phospholipase A₂ direkt freigesetzt werden. Die indirekte Freisetzung der Arachidonsäure wird durch die Phospholipase C initiiert, indem sie Diacylglycerol aus Phosphatidylinositol freisetzt. Diacylglycerol wird deacyliert, und die Diacylglycerol-Lipase setzt Arachidonsäure frei, welche dann zu Prostaglandinen oder Leukotrienen metabolisiert werden kann (Döring et al. 1990). Bei Entzündungsprozessen und der Entstehung von Schmerzsignalen spielt sie eine wichtige Rolle als Vorläuferin derjenigen Eikosanoide, die diese Prozesse verstärken.

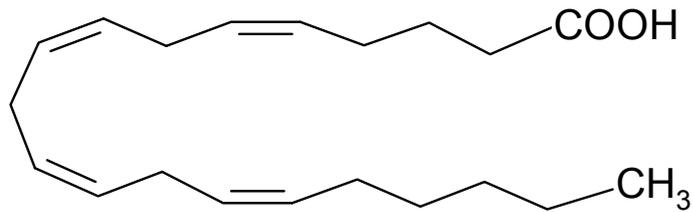


Abbildung II.14.: Arachidonsäure

8.6.3. Blocker

8.6.3.1. Ruthenium Rot

Ruthenium Rot ist ein mehrfach positiv geladener Farbstoff mit linearer Struktur, die drei Ruthenium Atome enthält. Es ist eines der potentesten Inhibitoren der Ca²⁺-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (Xu et al. 1999).

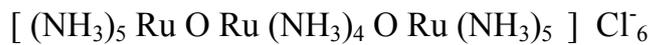


Abbildung II.15.: Ruthenium Rot

8.6.3.2. 2-APB

In unterschiedlichen Zelltypen ist 2-APB (= 2-Aminoethoxy-diphenylborat) in der Lage, IP₃-Rezeptoren reversibel zu hemmen, ohne die Bindung von IP₃ an den Rezeptor zu beeinflussen (Maruyama et al. 1997).

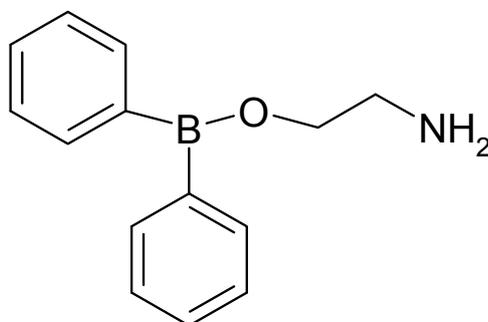


Abbildung II.16.: 2-APB

8.7. Datenerfassung

Für die Messung der Krypten wurde ein 20er Objektiv verwendet, wobei die Belichtungszeit – je nach Aufladung – zwischen 20 und 40 ms lag. Die Sammelrate lag bei 0,1 Hz, wodurch alle 10 s ein Bild entstand. Dies verhinderte ein zu rasches Ausbleichen der Fluoreszenz. Alle Präparate wurden im Wechsel mit den Wellenlängen 340 und 380 nm angeregt.

Die Emission wurde durch einen dichroischen Spiegel zu einer CCD-Kamera geleitet und in digitale Bilder umgesetzt. Die Imageanalysesoftware „TILLvisION“ (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) setzte die von der Kamera erfassten Daten in Zahlenwerte (= Ratiowerte) um. Eine gleichzeitige graphische Darstellung folgte automatisch, so dass die Veränderungen der Ratio kontinuierlich während des Versuches verfolgt werden konnten. Die Speicherung der Daten auf der Festplatte machte eine statistische Auswertung möglich.

8.8. Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Originalwerten oder als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (= SEM, standard error of the mean). In den Abbildungen sind die Fehlerbalken nur in eine Richtung dargestellt, um die Übersichtlichkeit zu erhalten. Werden die Ergebnisse in Form von Messbalken abgebildet, stellt die Höhe der Säule den Mittelwert dar, der Fehlerbalken den SEM.

N steht für die Anzahl der Kryptenpräparationen und n für die Anzahl der gemessenen Zellen. Um die Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde eine ANOVA (= Analysis of variances) durchgeführt. Die Signifikanzen wurden dann durch eine lineare Kontrastanalyse mit dem Scheffé-Test ermittelt (Sachs 1992). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Berechnungen erfolgten mit einer Statistik-Software (Dataxiom Software Inc., Statmost 3,5 für Windows 95/NT).

III. Ergebnisse

1. Molekularbiologischer Nachweis des Ryanodinrezeptors (RyRs) im Kolonepithel mittels PCR

Die Sequenz der Primer, die für den molekularbiologischen Nachweis der Ryanodinrezeptoren Subtyp-1 bis -3 eingesetzt wurden, stammen aus der Veröffentlichung von Lee et al. (Lee et al. 2002). Als Referenzgewebe für den RyR-1 diente Skelettmuskulatur (Ratte) (Fill & Copello 2002), für RyR-2 und RyR-3 jeweils Gehirnzellen (Ratte) (McPherson & Campbell 1993). Zur Kontrolle der Reaktion wurde je Primer eine Negativ(H₂O)-Kontrolle angelegt, um unspezifische Reaktionen auszuschließen. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2 %iges (Gew/Vol) Agarosegel aufgetragen und anschließend unter Fluoreszenzlicht beurteilt.

Abbildung III.1. A zeigt den Nachweis der Existenz der mRNA des Ryanodinrezeptors Subtyps-1 im Kolonepithel der Ratte. Sowohl in der cDNA, die aus der Skelettmuskulatur gewonnen wurde, als auch in der cDNA aus isolierten Krypten kann mit dem Primerpaar für den Ryanodinrezeptor Subtyp-1 eine Bande entsprechender Größe (287 bp) nachgewiesen werden.

Die Abbildung III.1. B zeigt, dass die Subtypen-2 und -3 des Ryanodinrezeptors im Kolonepithel nicht exprimiert werden. Die jeweils zugehörigen Positivkontrollen, das bedeutet die cDNA des Hirngewebes, bilden mit den Primerpaar für den RyR-2 bzw. RyR-3 Banden entsprechender Größe (RyR-2: 380 bp; RyR-3: 430 bp).

Die Negativkontrollen zeigen keine Banden, d.h., es sind keine unspezifischen Reaktionen abgelaufen.

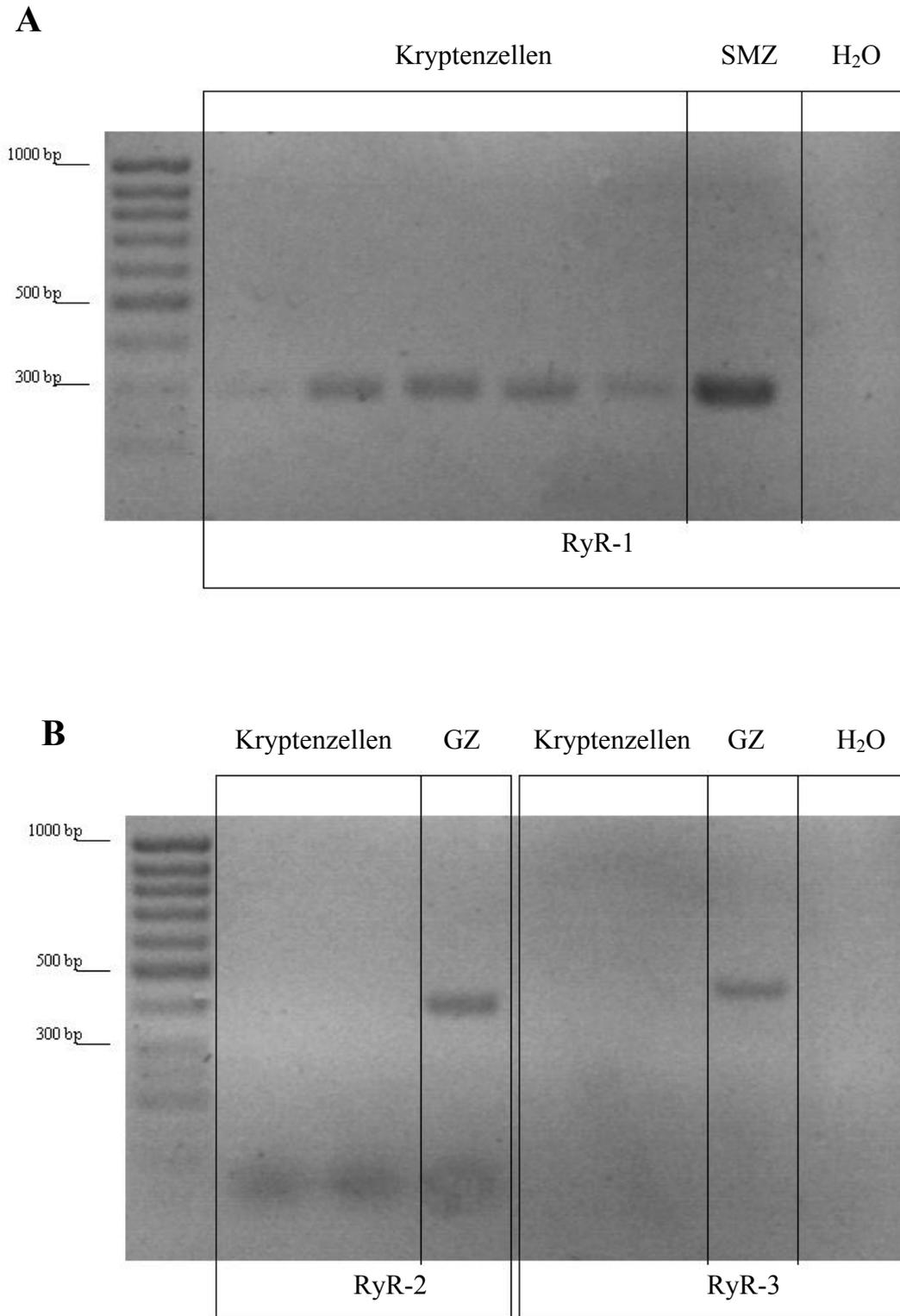


Abbildung III.1.: Agarose Gel mit DNA-Banden

Die Primerpaare für die Ryanodinrezeptor Subtypen amplifizieren innerhalb einer PCR-Reaktion DNA-Abschnitte in entsprechender Länge. **A:** In der cDNA der Epithelzellen des Rattenkolons konnte RyR-1 nachgewiesen werden; Skelettmuskelzellen (= SMZ) dienen als Positivkontrolle. **B:** In der cDNA der Kolonkrypten der Ratte wird kein RyR-2 oder RyR-3 exprimiert; hier dienen Gehirnzellen (= GZ) als Positivkontrolle. Typisches Ergebnis für N = 2 und n = 3. N = Anzahl der Kryptenpräparationen, n = Anzahl der angefertigten Gele.

2. Immunhistochemische Untersuchungen in den Kryptenzellen des Kolons

2.1. Verteilung des RyR-1 entlang der Kryptenachse

2.1.1. Einfachmarkierung

2.1.1.1. Nachweis mittels Immunfluoreszenz

Der RyR-1 konnte durch eine indirekte immunhistochemische Färbung in der *Lamina epithelialis mucosae* des Kolons (Abb. III.2.) nachgewiesen werden. Das rote Signal befindet sich im apikalen Pol der Epithelzellen. Abbildung III.2. zeigt weiterhin, dass das RyR-Signal gleichmäßig über die gesamte Kryptenachse verteilt ist. Die Bilder zeigen durch Überlagerung des RyR-Signals mit den DAPI-Bildern, dass die Fluoreszenzsignale nicht in den Zellkernen lokalisiert sind. Die Negativkontrolle zeigt keine rote Färbung und schließt damit unspezifische Signale aus.

Zur besseren Orientierung in den Präparaten wurden eine DAPI-Färbung (Kap. II.6.5.5.) angefertigt. Dadurch färbt sich die DNA aller Zellkerne blau an. So lässt sich in den Kryptenpräparaten leicht die Ausrichtung der Kryptenoberfläche nach oben erkennen. Die *Lamina muscularis* befindet sich somit im unteren Teil des Bildes, die *Lamina propria mucosae* zieht zwischen den Krypten bis zur Oberfläche. Die Zellkerne der Kolonepithelzellen liegen im basalen Drittel der Zellen, so dass der größte Teil des Zytoplasmas dieser Zellen zum Kryptenlumen hin orientiert ist.

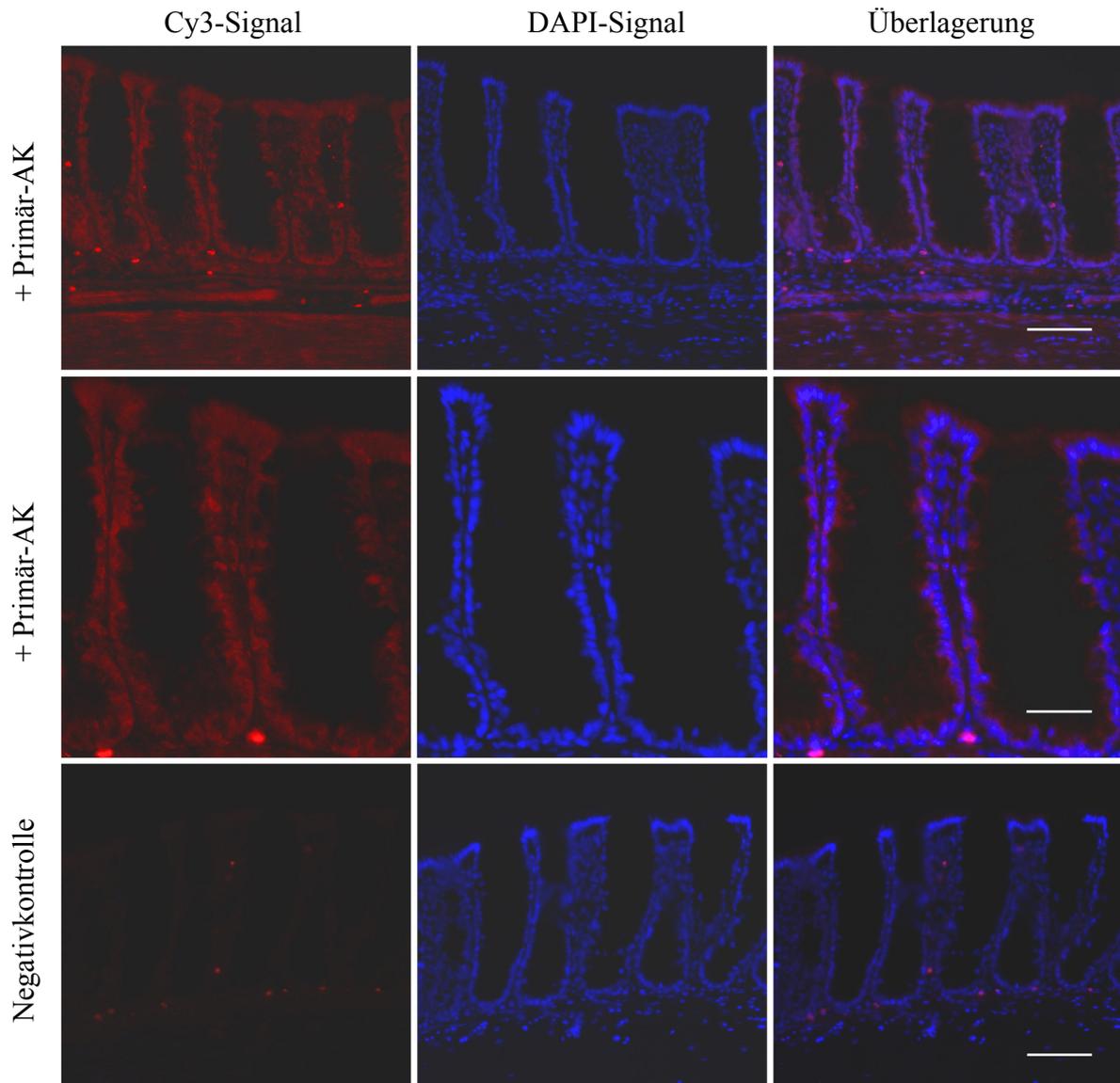


Abbildung III.2: Verteilung des RyR-1 im Kolonepithel der Ratte

Die Abbildung stellt die Verteilung des RyR-1 im Kolonepithel der Ratte dar. Die Bilder der ersten und zweiten Zeile der ersten Spalten zeigen den RyR-1 in roter Farbe, da er mit einem Cy3-goat anti-mouse IgG gekoppelt ist. Die Bilder der letzten Zeile stellen die Negativkontrollen dar. In der mittleren Spalte sind die Nuklei durch eine DAPI-Färbung blau dargestellt. Die Bilder der letzten Spalte ergeben sich jeweils aus den Überlagerungen der Bilder der vorhergehenden Spalten. Unterer Bildbereich: Kryptenfundus; oberer Bildbereich: Darmlumen; Eichbalken: 100 μm (gilt für Zeile 1 und 3); Eichbalken 50 μm (gilt für Zeile 2). N = > 5, n = > 5. N = Anzahl der Mukosa-Submukosa-Präparationen; n = Anzahl der Färbungen.

Dass der Ryanodinrezeptor Subtyp-1 im Skelettmuskelgewebe in großen Mengen exprimiert wird, ist hinlänglich bekannt (Sorrentino 1995). So konnte dieses Gewebe als Referenz für die Immunfluoreszenzfärbung genutzt werden.

Die Bilder der Abbildung III.3. stellen Skelettmuskelgewebe dar, in welchem die Nuklei ebenfalls mit DAPI gefärbt wurden. In der Skelettmuskulatur sind die Zellen länglich, 10-100 μm dick und mehrere Zentimeter lang. Jede Zelle besitzt mehrere Zellkerne, die perlschnurartig aufgereiht und peripher lokalisiert sind. Die Bilder der oberen Zeile zeigen starke Fluoreszenzsignale im gesamten Sarkoplasma der Zellen. Wie auch in den Kryptenzellen sind hier keine Fluoreszenzsignale in den Nuklei auszumachen.

Die Negativkontrolle (untere Zeile) zeigt keine rote Färbung und schließt damit unspezifische Signale aus.

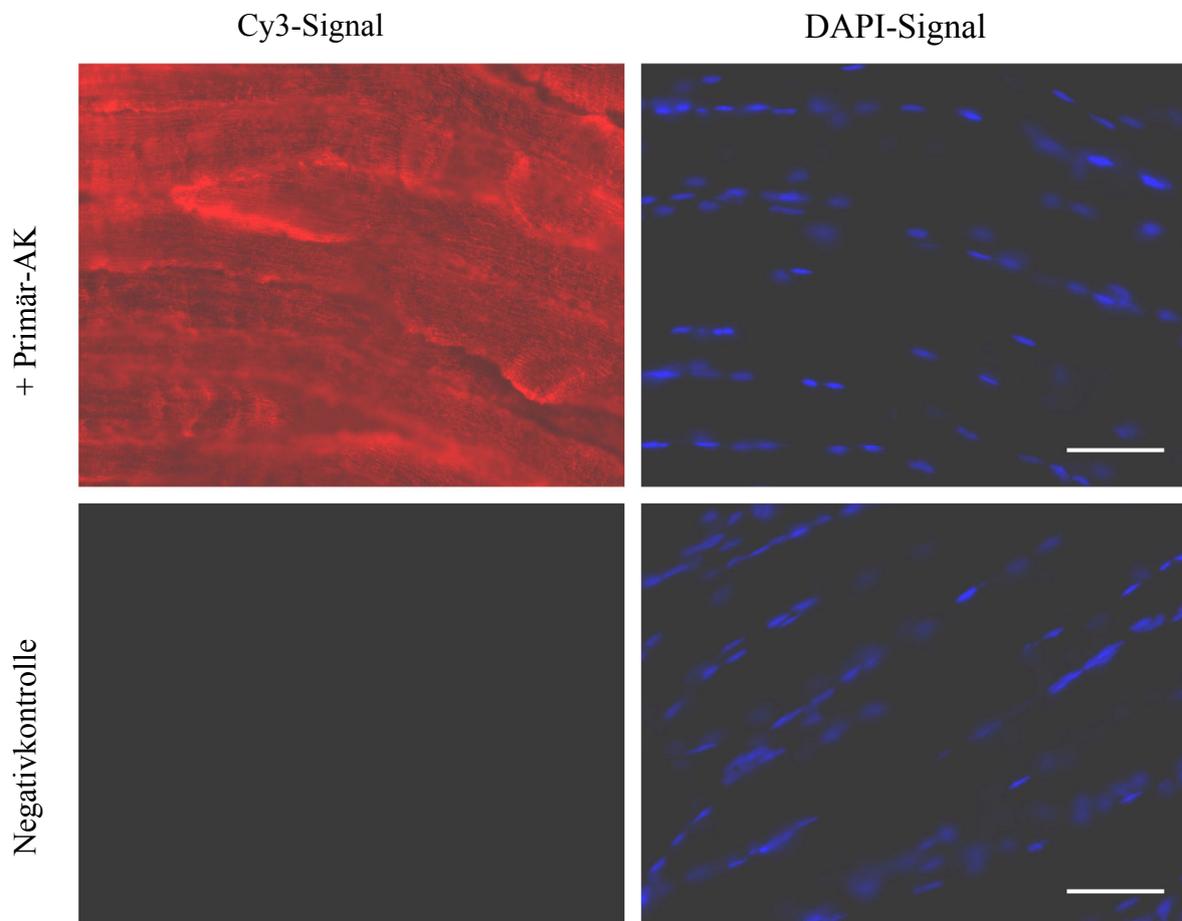


Abbildung III.3.: Verteilung der Ryanodinrezeptoren im Skelettmuskelgewebe

Die Abbildung zeigt die Lokalisation des RyR-1 im Skelettmuskelgewebe. Auf dem ersten Bild der ersten Zeile stellt sich der RyR-1 rot dar, da die Kopplung mit einem Cy3- goat anti-mouse IgG stattgefunden hat. Die letzte Zeile zeigt das Ergebnis der Negativkontrolle. In der rechten Spalte sind die Zellkerne durch eine DAPI-Färbung blau. Eichbalken jeweils 100 μm . N = > 5, n = > 5. N = Anzahl der Mukosa-Submukosa-Präparationen; n = Anzahl der Färbungen.

2.1.1.2. Nachweis mittels Peroxidasereaktion

Um das Ergebnis der Immunfluoreszenz an den Kolonkrypten zu untermauern, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, die unter dem Lichtmikroskop ausgewertet wurden.

Abbildung III.4. bestätigt das Ergebnis der Immunfluoreszenz, indem sie eine gleichmäßige Verteilung des RyR-1 entlang der Kryptenachse zeigt. Das spezifische braune Signal, das durch die Umsetzung von Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP) entsteht, ist in der *Lamina epithelialis mucosae* lokalisiert. Eine Kernfärbung wurde nicht angefertigt.

Die Negativkontrolle zeigt, dass es zu keinem Ausfällen des Farbstoffes gekommen ist. Somit kann von einer spezifischen Bindung des RyR-Antikörpers ausgegangen werden.

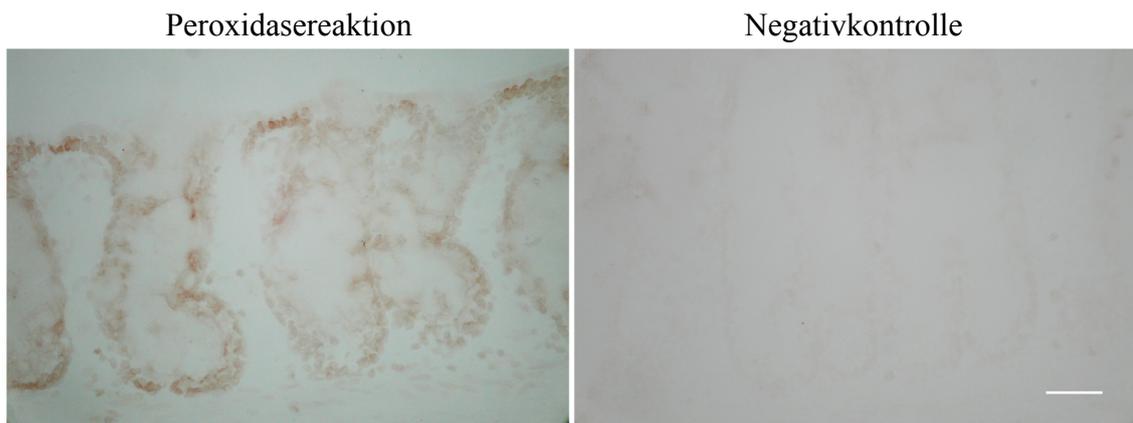


Abbildung III.4.: Verteilung des Ryanodinrezeptors im Kryptenepithel

Die Abbildung zeigt die Verteilung des RyR-1 entlang der Kryptenachse. Auf dem linken Bild stellt sich der RyR-1 braun dar, da durch spezifische Reaktion an den Stellen des Rezeptors ein brauner Niederschlag entsteht. Das rechte Bild zeigt die Negativkontrolle. Unterer Bildbereich: Kryptenfundus; oberer Bildbereich: Darmlumen; Eichbalken: 100 μm . N = > 3, n = > 3. N = Anzahl der Mukosa-Submukosa-Präparationen; n = Anzahl der Färbungen.

2.1.2. Doppelmarkierung RyR-1/IP₃R-3

Neben den Ryanodinrezeptoren gehören die Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptoren (= IP₃R) zu den wichtigsten ligandengesteuerten Kalziumkanälen. Sie sind in der Lage zelluläre Abläufe zu steuern, indem sie Kalzium aus Organellen freisetzen, sobald intrazelluläre Botenstoffe gebunden haben. Drei Subtypen des IP₃-Rezeptors sind bisher identifiziert (IP₃R-1 bis IP₃R-3), wobei Subtyp-3 als einziger im Zytoplasma

des Kolonepithels der Ratte exprimiert wird (Siefjediers et al. 2007). Aus diesem Grund ist es interessant, ob der RyR-1 mit dem IP₃R-3 kolokalisiert ist. Hierfür wurde eine Doppelfärbung durchgeführt, für die der RyR-1-Antikörper als auch der IP₃R-3-Antikörper aus Kapitel II.6.3.1. eingesetzt wurden.

Der in Abbildung III.5. dargestellte Ausschnitt des Kolons zeigt den Oberflächenbereich einer Krypte, weil der IP₃R-3 nur innerhalb dieses Kryptenabschnitts exprimiert wird und die angefertigte Färbung somit ausschließlich in diesem Kryptenbereich aussagekräftig ist. Aus dem rechten oberen Bild geht hervor, dass der RyR-1 kaum mit dem IP₃R-3 kolokalisiert ist, da keine nennenswerten Areale die Mischfarbe gelb aufweisen. Die RyR-Signale erscheinen eher im basalen, die IP₃R-Signale eher im apikalen Teil der Enterozyten. Zu einem gelben Fluoreszenzsignal käme es, wenn sich rote (RyR-1) und grüne (IP₃R-3) Signale überlagern.

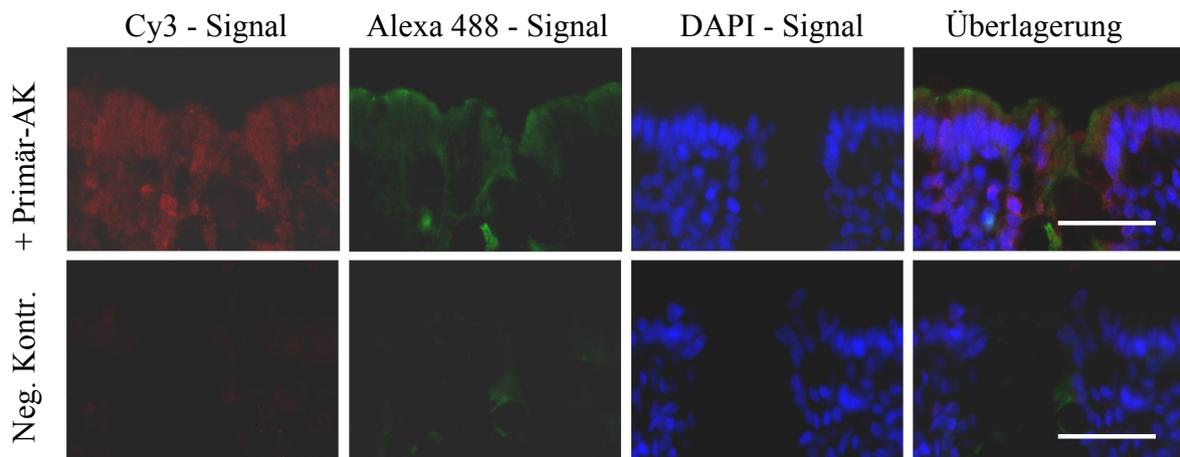


Abbildung III.5.: Lokalisation des RyR-1 und IP₃R-3 im Oberflächenbereich des Kolonepithels der Ratte

Das Bild oben links zeigt das Signal des RyR-1 durch Ankopplung eines Cy3-goat anti-mouse rot. Im Bild rechts daneben stellt sich das IP₃R-3-Signal grün dar, weil der Primäranalyt an ein Alexa Fluor® 488 goat anti-chicken gebunden ist. In der dritten Spalte sind die Zellkerne durch DAPI blau angefärbt. Die Bilder der letzten Spalte kommen durch Überlagerung der jeweils in der Zeile vorangehenden Bilder zustande. Die zweite Zeile zeigt die Negativkontrolle. Im Bild rechts oben wird deutlich, dass keine nennenswerten Kolokalisationen des RyR-1- und des IP₃R-3-Signals vorliegt, da die Mischfarbe gelb nur zu sehr kleinen Teilen sichtbar wird. Unterer Bildabschnitt: Mitte der Krypte; oberer Bildabschnitt: Darmlumen; Eichbalken: 50 µm. N = > 5, n = > 5. N = Anzahl der Mukosa-Submukosa-Präparationen; n = Anzahl der Färbungen.

Da bei dieser Färbemethode beide verwendeten Primärantikörper (RyR/IP₃R-3) aus der Maus stammten, war es wichtig zu zeigen, dass der zweite Sekundärantikörper – nämlich das Alexa Fluor 488[®] – tatsächlich spezifisch an den den IP₃R-3-Antikörper bindet. Hierfür wurden Färbungen angefertigt, in denen der RyR mit Cy3 angefärbt wurde, kein IP₃R-3-Antikörper eingesetzt wurde aber Alexa Fluor 488[®] trotzdem Verwendung fand (Kap. II.6.5.6.2.; Tab. II.16.).

Auch der in Abbildung III.6. dargestellte Ausschnitt des Kolons zeigt den Oberflächenbereich einer Krypte, weil der IP₃R-3 nur innerhalb dieses Kryptenabschnitts exprimiert wird und die angefertigte Färbung somit ausschließlich in diesem Kryptenbereich aussagekräftig ist. Das erste Bild von links in der oberen Reihe zeigt das rote RyR-Signal. Aus dem zweiten Bild von links in der oberen Reihe geht hervor, dass kaum ein grünes IP₃R-3-Signal vorhanden ist. Das bedeutet, dass das Alexa Fluor 488[®] spezifisch an den IP₃R-3-Antikörper bindet.

Die zweite Zeile in Abbildung III.6. zeigt die Negativkontrolle, die keine Rot- und kaum Grünfärbungen aufweist und somit unspezifische Signale ausgeschlossen werden können.

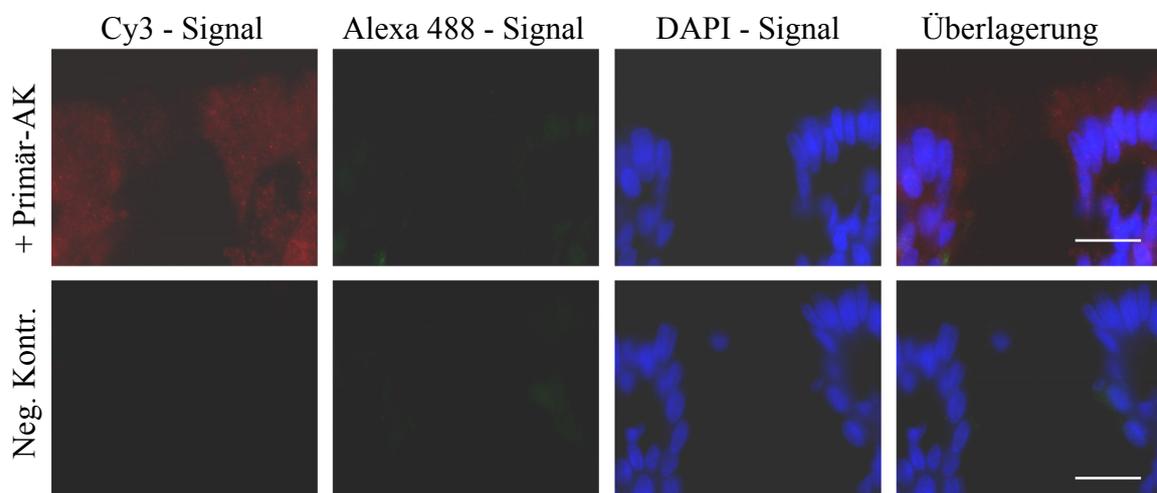


Abbildung III.6.: Spezifische Bindung des Alexa Fluor 488[®] an den IP₃R-3-Antikörper
Das Bild oben links zeigt das Signal des RyR-1 durch Ankopplung eines Cy3-goat anti-mouse rot. Im Bild rechts daneben ist kein IP₃R-3-Signal sichtbar, weil kein IP₃R-3-Primärantikörper eingesetzt worden ist. In der dritten Spalte sind die Zellkerne durch DAPI blau angefärbt. Die Bilder der letzten Spalte kommen durch Überlagerung der jeweils in der Zeile vorangehenden Bilder zustande. Die zweite Zeile zeigt die Negativkontrolle. Unterer Bildabschnitt: Mitte der Krypte; oberer Bildabschnitt: Darmlumen; Eichbalken: 50 µm. N = > 5, n = > 5. N = Anzahl der Mukosa-Submukosa-Präparationen; n = Anzahl der Färbungen.

2.2. Einfachmarkierung der CD38/ADP-Ribosyl Zyklase in den Epithelzellen des Kolons

Das Enzym CD38/ADP-Ribose Zyklase ist in verschiedensten Geweben von Säugetieren verantwortlich für die Synthese von cADP-Ribose (Lee & Aarhus 1991). Die cADP-Ribose ist ein wichtiger endogener Mediator der Ca^{2+} -Freisetzung über Ryanodinrezeptoren (Clementi et al. 1996; Bai et al. 2005).

Das in Abbildung III.7. dargestellte Kolongewebe ist so orientiert, dass der Kryptenfundus sich im unteren Bildabschnitt befindet und das Darmlumen im oberen. Die blaue DAPI-Kernfärbung (Kap. II.6.5.5.) lässt die Kryptenform deutlich werden. Das CD38-Molekül konnte durch Anfärbung mit seinem Antikörper (Kap. II.6.3.2.) in der *Lamina epithelialis mucosae* des Kolons nachgewiesen werden. Das Signal kommt aus dem zytoplasmatischen Teil der Zellen und ist gleichmäßig über die gesamte Kryptenachse verteilt. Es scheint zu keiner Überlagerung des CD38-Signals mit der DAPI-Färbung zu kommen, was darauf schließen lässt, dass CD38 nicht in der Kernregion exprimiert wird.

Die Negativkontrolle zeigt kein rotes Signal, bis auf vier kleinere Punkte, die auf unspezifische Bindungsreaktionen hinweisen. Der eingesetzte Antikörper hat in dieser Versuchsreihe zu größten Teilen spezifisch an sein Zielmolekül gebunden.

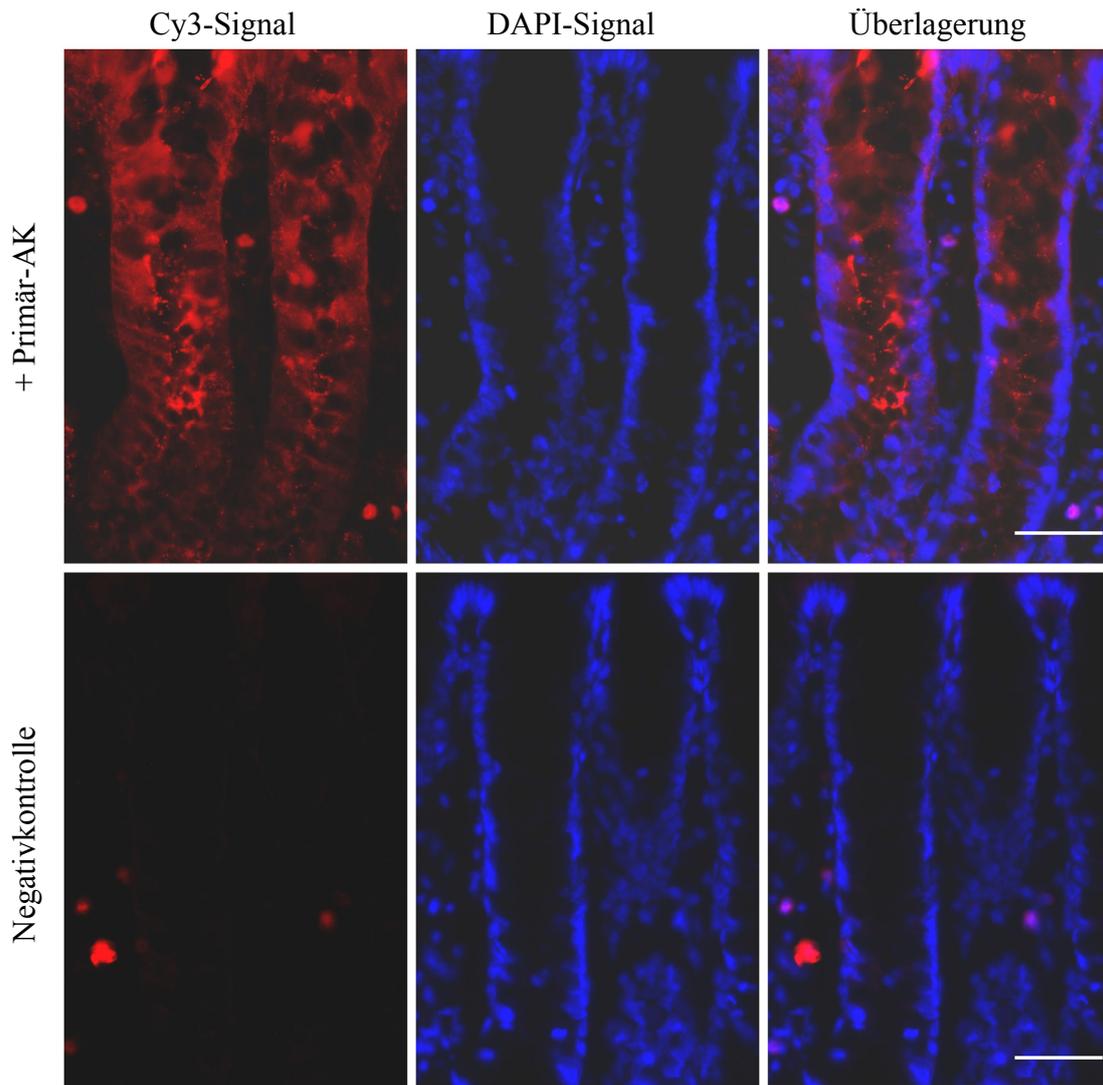


Abbildung III.7.: Die Abbildung zeigt die Verteilung des Enzyms CD38 in der Kolonwand

Das Bild der ersten Reihe in der ersten Spalte zeigt die CD38/ADP-Ribosyl Zyklase in rot, da sie mit einem Cy3-goat anti-mouse IgG gekoppelt ist. Die Bilder der letzten Zeile stellen die Negativkontrollen dar. In der mittleren Spalte sind die Zellkerne durch eine DAPI-Färbung blau dargestellt. Die Bilder der letzten Spalte ergeben sich jeweils aus den Überlagerungen der Bilder der vorhergehenden Spalten. Unterer Bildbereich: Kryptenfundus; oberer Bildbereich: Darmlumen; Eichbalken: 50 μm . N = 2, n = 2. N = Anzahl der Mukosa-Submukosa-Präparationen; n = Anzahl der Färbungen.

3. Western Blot

3.1. Nachweis des Ryanodinrezeptors Subtyp-1 im Kolonepithel

Die Identifizierung des Ryanodinrezeptors im Western Blot wurde durchgeführt, um die Spezifität des in der Immunhistochemie eingesetzten Antikörpers zu bestätigen.

In diesem Experiment diente Skelettmuskelgewebe wiederum als Referenzgewebe. Durch Immunopräzipitation (Kap. II.7.4.) wurde das Protein des Ryanodinrezeptors in den Krypten angereichert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Nachweisgrenze für diese Methodik erreicht wurde. Eine Leiter (Kap. II.7.2.) ermöglichte die Orientierung auf dem Gel, wobei ihre oberste Bande ein Gewicht von 200 kDa markierte. Abbildung III.8. zeigt, dass auf beiden Gelen (A: Skelettmuskel; B: Kolonkrypten) auf der Höhe von ca. 500 kDa Banden entstanden sind. Da die Untereinheiten des RyR-1 ein Gewicht von 565 kDa aufweisen (Ludtke et al. 2005), lässt dies darauf schließen, dass dieser Rezeptortyp in beiden Geweben exprimiert wird.

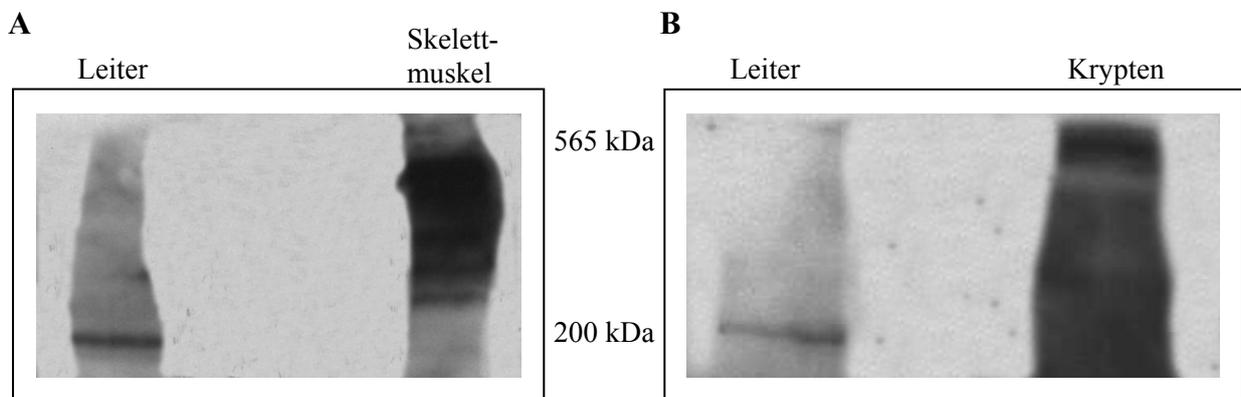


Abbildung III.8.: Immunologischer Nachweis des RyR-1. A: im Skelettmuskel, B: in kopräzipitierter Form in den Kolonkrypten

In beiden Bildern stellt sich auf der Höhe von ca. 500 kDa eine deutliche Bande dar, was darauf schließen lässt, dass in beiden untersuchten Geweben die Untereinheiten des RyR-1 vorhanden sind. **A:** Die Proteine der aus der Skelettmuskulatur isolierten Mikrosomenfraktion wurden über ein Polyacrylamidgel getrennt und die Untereinheiten des RyR-1 mit Hilfe des RyR-1-Antikörpers im Western Blot nachgewiesen. Der Skelettmuskel diente als Kontrollgewebe. **B:** Die mit Hilfe der Sepharose-G kopräzipitierten Proteine aus der Mikrosomenfraktion der Krypten wurden ebenfalls über ein Polyacrylamidgel getrennt und die Untereinheiten des RyR-1 mit Hilfe des RyR-1-Antikörpers im Western Blot nachgewiesen. Die angewandte Technik ist in Kapitel II.7. beschrieben. Für A gilt N und $n = 2$, für B gilt N und $n = 1$; N = Anzahl der Kryptenpräparationen und n = Anzahl der Filme.

4. Funktionelle Auswirkungen der gleichmäßigen Verteilung des RyR-1 entlang der Kryptenachse

4.1. Wirkung des Ryanodinrezeptor-Agonisten Monochloramin auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel

In den durchgeführten Ca^{2+} -Imaging-Experimenten wurde untersucht, ob die durch die immunhistochemischen Untersuchungen herausgefundene gleichmäßige Verteilung des Ryanodinrezeptors entlang der Kryptenachse (Oberfläche, Mitte, Fundus), funktionelle Auswirkungen hat. Als Agonist des RyRs wurde Monochloramin eingesetzt. Der Ryanodinrezeptor beinhaltet in seiner zytoplasmatischen Seite reaktive Sulfhydrylgruppen, die dem Molekül eine Redoxsensitivität verleihen. Durch Oxidation dieser Thiolgruppen wird der Rezeptor aktiviert, während deren Reduktion den Kanal inhibiert (Zima et al. 2004). Der Redoxstatus dieser entscheidenden Sulfhydryle des RyR-1 kann sowohl die Leitfähigkeit als auch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals modulieren (Oba et al. 2002).

Diese Versuchsreihe wurde mit Ca^{2+} -freiem Puffer durchgeführt, um einen Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellularruum auszuschließen; Fura-2-AM wurde als Farbstoff eingesetzt. Die Monochloraminkonzentration betrug $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ und induzierte in allen drei Kryptenregionen einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wie der Originalkurvenverlauf in Abbildung III.9. zeigt.

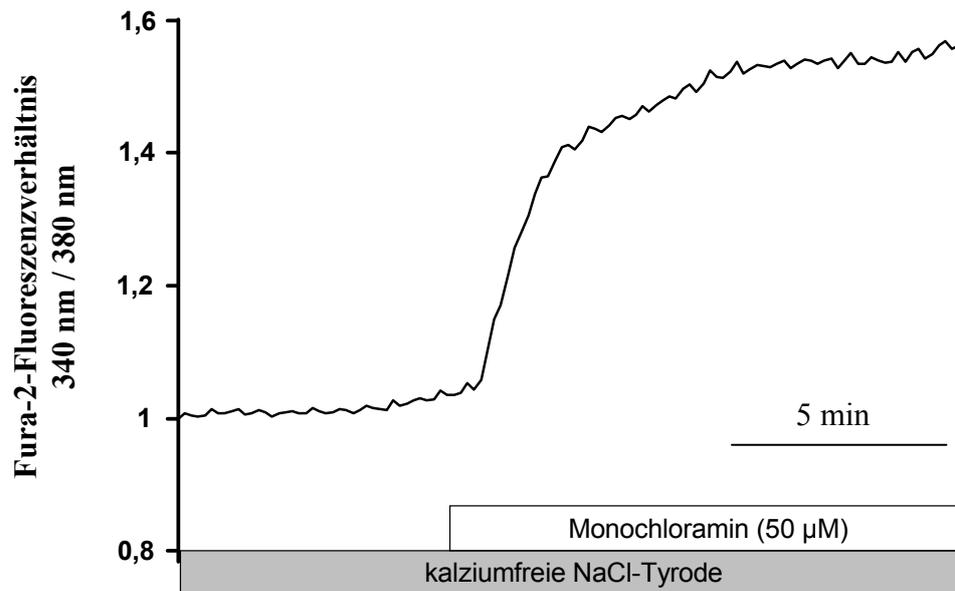


Abbildung III.9.: Stimulation der Kolonkrypten mit Monochloramin

Der Originalkurvenverlauf zeigt, dass es nach Applikation von Monochloramin ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) zu einer Ca^{2+} -Speicher-Entleerung und damit zu einem ansteigendem Kurvenverlauf kommt. $N = 2$, $n = 50-61$. $N =$ Anzahl der Kryptenpräparationen, $n =$ Anzahl der gemessenen Zellen. Statistik siehe Text.

Vergleicht man die Reaktionsstärke der unterschiedlichen Kryptenregionen miteinander, zeigt die Fundusregion mit einem mittleren Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses von $35,2 \cdot 10^{-2} \pm 3,93 \cdot 10^{-2}$ ($n = 61$) eine tendenziell stärkere Antwort auf den Monochloraminstimulus als die Oberflächenregion mit einem Anstieg von $29,5 \cdot 10^{-2} \pm 2,79 \cdot 10^{-2}$ ($n = 50$) und die mittlere Region mit $24,5 \cdot 10^{-2} \pm 3,28 \cdot 10^{-2}$ ($n = 54$). Diese Tendenz erreicht nach dem Scheffé-Test keine Signifikanz (Abb. III.10.).

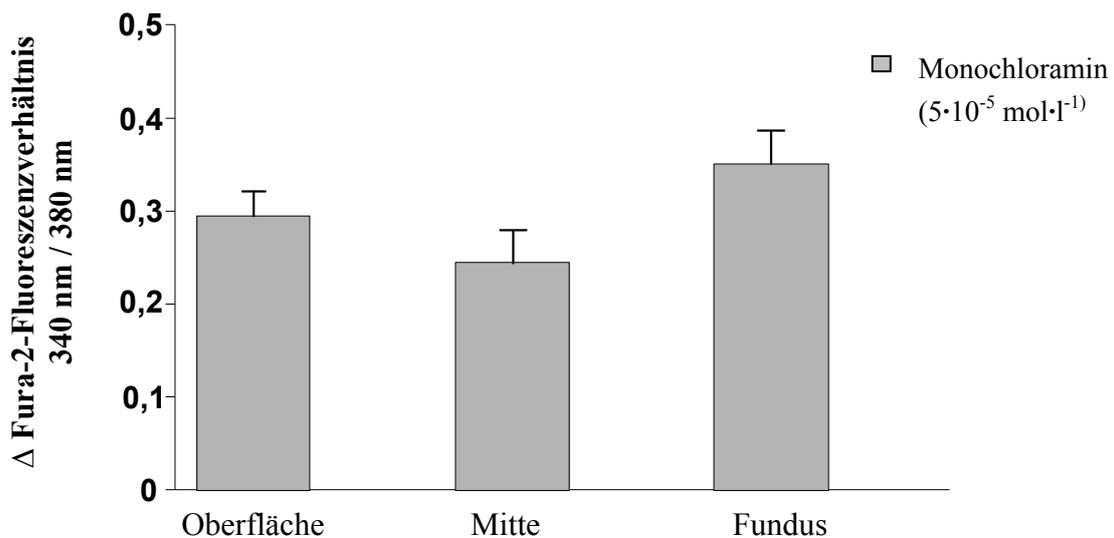


Abbildung III.10.: Anstieg des Fura-2 Fluoreszenzsignals nach Applikation von Monochloramin in den drei Kryptenregionen

Der Anstieg des Quotienten des Fluoreszenzsignals bedeutet die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Aus dem Vergleich der drei Kryptenregionen Oberfläche, Mitte und Fundus geht hervor, dass zwar geringe Unterschiede in der Höhe der Ca^{2+} -Freisetzung bestehen, diese aber nicht signifikant sind ($P > 0,05$). $N = 2$; n -Oberfläche = 50, n -Mitte = 54, n -Fundus = 61. N = Anzahl der Kryptenpräparationen, n = Anzahl der gemessenen Zellen. Statistik siehe Text; Δ = Delta.

4.2. Auswirkungen auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel durch Blockade des Ryanodinrezeptors mit Ruthenium Rot

Um den Angriffsort des Monochloramins am Ryanodinrezeptor zu bestätigen, wurde in dieser Versuchsreihe Ruthenium Rot als Blocker des Ryanodinrezeptors eingesetzt. Ruthenium Rot bindet an den Ryanodinrezeptor und hemmt damit die spezifische Ca^{2+} -Freisetzung. Es handelt sich um eine nichtkompetitive Hemmung (Xu et al. 1999).

Nachdem sich die Baseline stabilisiert hatte, wurde der Superfusionslösung Ruthenium Rot in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zugefügt. Nach mehreren Minuten wurde die Lösung in der Kammer durch eine $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Monochloramin-Lösung ersetzt. Die Applikation des Ruthenium Rots erzeugte einen minimalen Anstieg der Fura-2-Ratio. Dies erklärte sich durch die Eigenfluoreszenz des Stoffes. Abbildung III.11. zeigt, dass die Zugabe des Monochloramins in allen drei Kryptenregionen (Oberfläche, Mitte, Fundus) kaum eine Erhöhung der intrazellulären

Ca²⁺-Konzentration auslöste – Ruthenium Rot blockierte die Wirkung von Monochloramin nahezu vollständig.

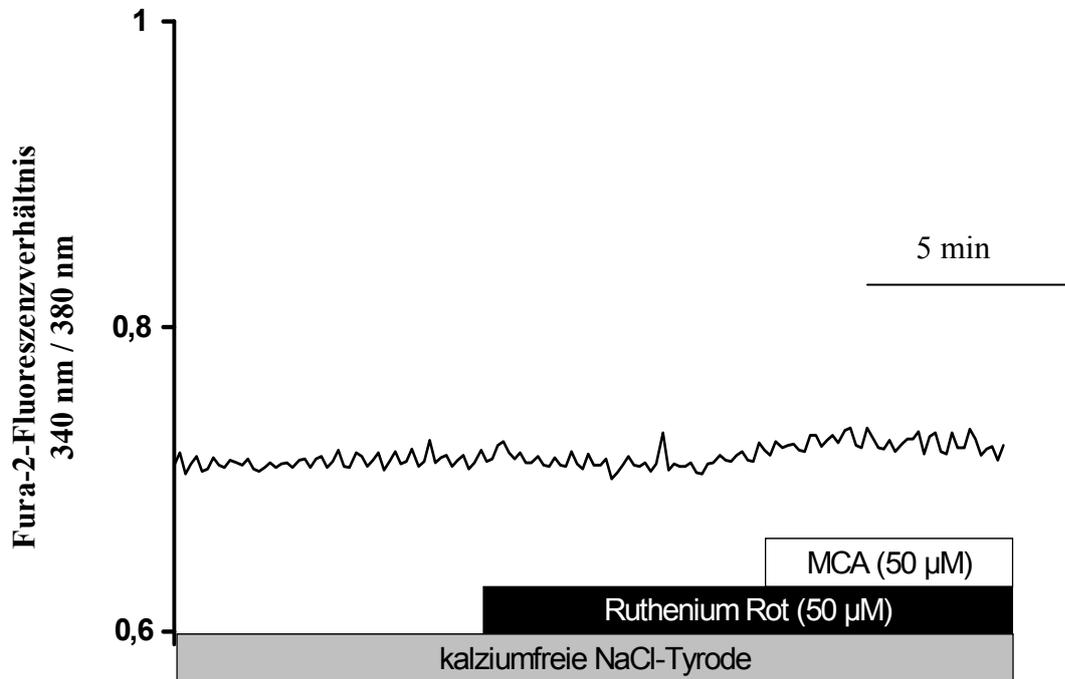


Abbildung III.11.: Blockade der Monochloraminantwort nach vorheriger Gabe von Ruthenium Rot

Nachdem Ruthenium Rot appliziert wurde, konnte Monochloramin (MCA) kaum eine Ca²⁺-Speicherentleerung mehr initiieren, wie der Originalkurvenverlauf widerspiegelt. Ruthenium Rot unterdrückt somit nahezu vollständig die Wirkung von Monochloramin. Dies bedeutet, dass fast keine Ca²⁺-Fluxe stattfinden. N = 2; n = 45-65. N = Anzahl der Kryptenpräparationen, n = Anzahl der gemessenen Zellen.

4.3. Wirkung von Arachidonsäure auf den intrazellulären Kalziumspiegel

Es wurde gezeigt, dass Arachidonsäure am Kolonepithel der Ratte die Sekretion von Chlorid auslöst. Dies ist möglicherweise auf eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und damit auf eine Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels zurückzuführen (Döring et al. 1990). Da Arachidonsäure ein physiologischer Agonist der Ryanodinrezeptoren ist (Woolcott et al. 2006), liegt es nahe, dass es über die RyR-gesteuerten Ca^{2+} -Kanäle zur Ca^{2+} -Freisetzung kommt.

Mit dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob es durch Arachidonsäure zu einer Speicherentleerung in den Kryptenzellen kommt, die direkt mit Fura-2 gemessen werden kann. Hierfür wurde nach Stabilisierung der Baseline der Superfusionslösung Arachidonsäure in einer Konzentration von $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zugegeben. Dies bewirkte keine Veränderung des Originalkurvenverlaufs (Abb. III.12.), der für $N = 2$ und $n = 58-72$ repräsentativ ist, wobei N für die Zahl der Kryptenpräparationen und n für die Zahl der gemessenen Zellen steht. Arachidonsäure konnte in der eingesetzten Konzentration keine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher hervorrufen.

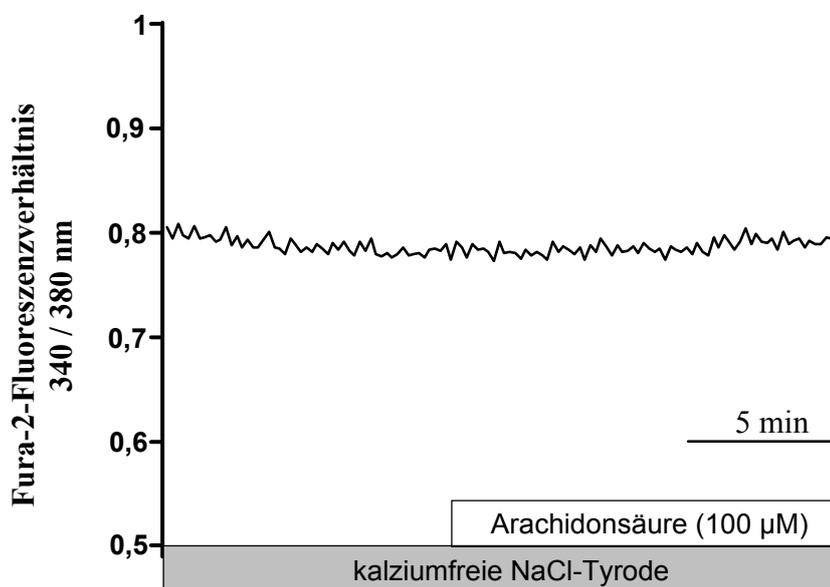


Abbildung III.12.: Stimulation der Kryptenzellen mit Arachidonsäure ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Nachdem Arachidonsäure appliziert wurde, kam es zu keiner Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Diese Substanz bewirkt an den Epithelzellen des Kolons keine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. N und n siehe Text.

4.4. Kolokalisation des Ryanodinrezeptors mit den IP₃-Rezeptoren?

Da die Ca²⁺-Signalwege des Ryanodinrezeptors und der IP₃-Rezeptoren sehr eng miteinander verknüpft sind und beide Rezeptortypen in den Epithelzellen des Rattenkolons vorhanden sind, ist von besonderem Interesse, ob sie auf den selben intrazellulären Ca²⁺-Speichern lokalisiert sind.

Um dies herauszufinden wurden in dieser Versuchsserie die Krypten mit zwei Agonisten stimuliert: Zum einen mit ATP ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), das die Bildung von IP₃ auslöst (Fredholm et al. 1994) und somit über IP₃-Rezeptoren Kalzium aus intrazellulären Speichern freisetzt; zum anderen mit Monochloramin (MCA, $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), das sowohl den Ryanodinrezeptor als auch IP₃-Rezeptoren stimuliert (Schultheiss et al. 2005). Um die Stimulation des Monochloramins ausschließlich auf den Ryanodinrezeptor zu beschränken, wurde dieser Agonist immer im Beisein von 2-APB ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) – einem reversiblen Blocker der IP₃-Rezeptoren – verabreicht (Maruyama et al. 1997). Da bei Stimulation mit diesen Agonisten mit Speicherentleerungen zu rechnen war, musste verhindert werden, dass die freigesetzten Ca²⁺-Ionen über SERCAs direkt wieder zurückgepumpt wurden. Aus diesem Grund wurden die SERCAs mit Cyclopiazonsäure ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), einem reversiblen Blocker dieser Ca²⁺-ATPasen (Plenge-Tellechea et al. 1997), gehemmt.

Als Farbstoff diente das Mag-Fura-2, das sich in den Zellorganellen anreichert. Es wurden zwei Versuchsanordnungen durchgeführt: Im ersten Teil wurde Monochloramin als erster Agonist eingesetzt, ATP als zweiter (Abb. III.13.). Im zweiten Teil wurden die Agonisten vertauscht. Das bedeutet, dass ATP ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) als erster Agonist diente, Monochloramin als zweiter (Abb. III.14.).

Aus den Originalkurvenverläufen in Abbildung III.13. und III.14. geht hervor, dass beide Agonisten unabhängig voneinander einen Kurvenabfall und damit eine Entleerung von verschiedenen intrazellulären Ca²⁺-Speichern hervorrufen. Des weiteren ist eindeutig, dass die IP₃R-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung größer ist als die RyR-vermittelte.

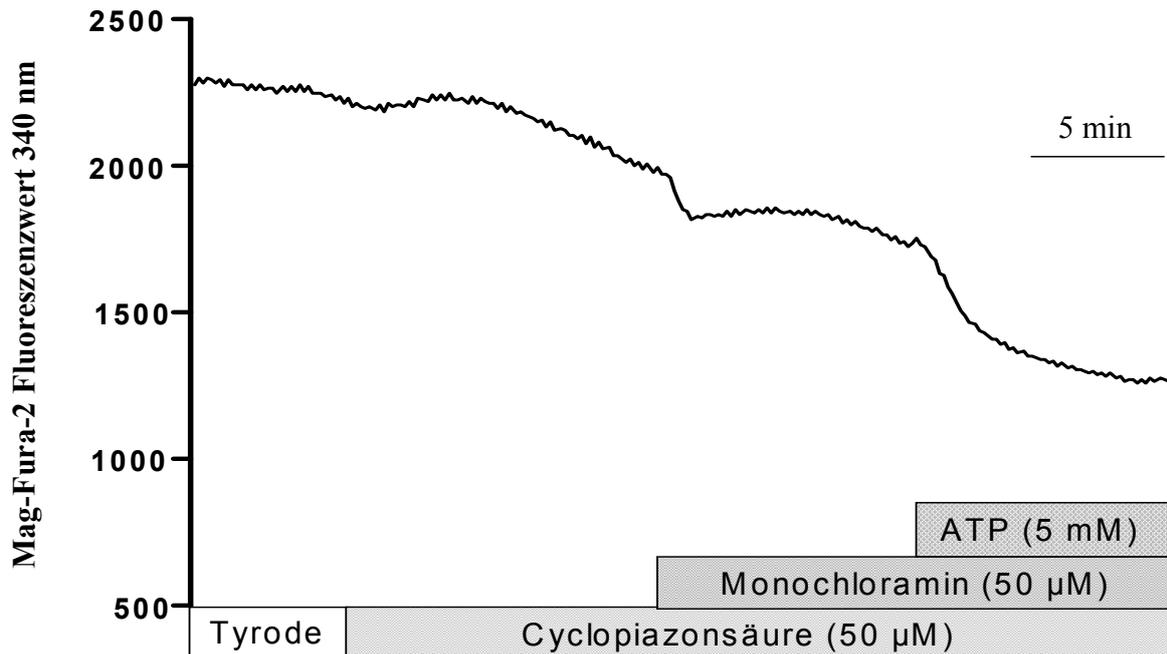


Abbildung III.13.: Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch Monochloramin und Adenosintriphosphat (ATP) an den Krypten des Kolons unter Verwendung von Cyclopiazonsäure

Dargestellt ist der Originalkurvenverlauf, der repräsentativ für $N = 3-4$ und $n = 40-46$ ist. Aufgetragen sind die Fluoreszenzwert bei 340 nm, die dem gebundenen Farbstoff entsprechen. Cyclopiazonsäure ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bewirkte eine leichte Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, was sich in einem Abfall des Mag-Fura-2 Signals widerspiegelt. Monochloramin ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) als erster Agonist des RyR, bewirkte eine Ca^{2+} -Freisetzung aus den Organellen der Krypten. Der zweite Agonist, das ATP ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), bewirkt ebenfalls ein Absinken des Mag-Fura-2 Signals. N = Anzahl der Kryptenpräparationen, n = Anzahl der gemessenen Zellen. Statistik siehe Tab. III.1..

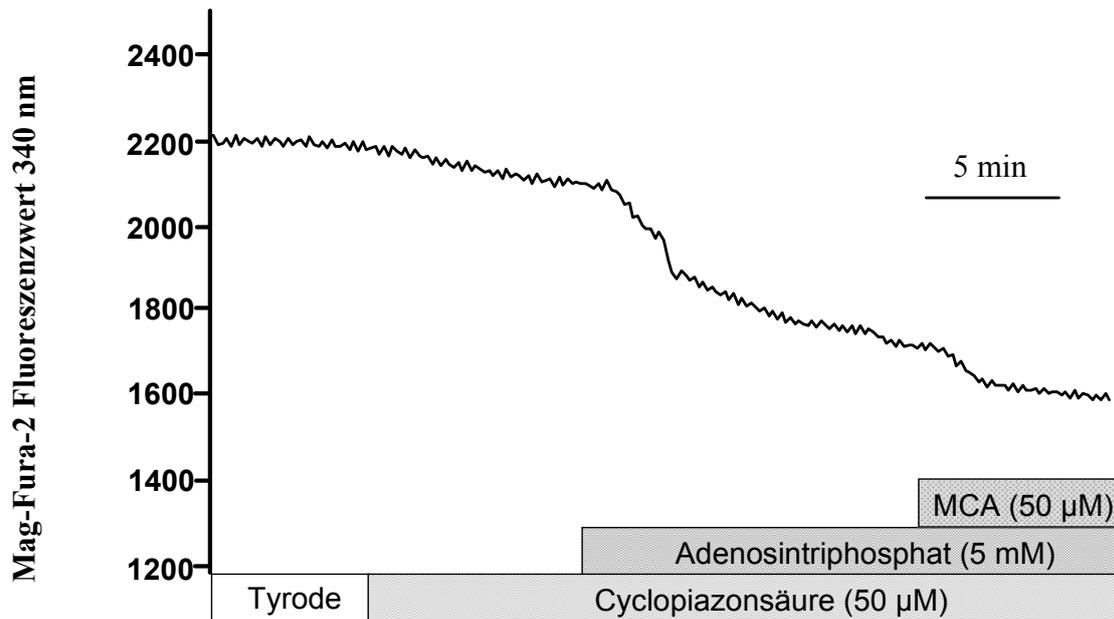


Abbildung III.14.: Intrazelluläre Ca^{2+} -Speicherentleerung der intrazellulären durch Applikation von Adenosintri-phosphat und Monochloramin (MCA) an den Krypten des Kolons unter Verwendung von Cyclopiazonsäure

Der Originalkurvenverlauf zeigt die Fluoreszenzwerte bei 340 nm, die dem gebundenen Farbstoff entsprechen. Er ist repräsentativ für $N = 4$ und $n = 32-56$. Cyclopiazonsäure ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bewirkte in diesem Versuchsansatz eine leichte Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, was sich in einem Abfall des Mag-Fura-2 Signals zeigte. ATP ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) als erster Agonist bewirkte ebenfalls eine Ca^{2+} -Speicherentleerung. Nach anschließender Gabe von Monochloramin (MCA, $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) kommt es zu einer weiteren Ca^{2+} -Freisetzung aus den Ca^{2+} -Speichern. N = Anzahl der Kryptenpräparationen, n = Anzahl der gemessenen Zellen. Statistik siehe Tab. III.1..

Vergleicht man die Mittelwerte der ATP- und Monochloraminantworten aus Tab. III.1. miteinander, wird deutlich, dass es in keinem Fall zu einer signifikanten Verstärkung oder Absenkung der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern kommt. Dieses Ergebnis bestätigt das der immunhistochemischen Doppelfärbung, dass der Ryanodinrezeptor und der IP_3R kaum kolokalisiert sind.

Mag-Fura-2-Signal im Oberflächenbereich der Krypten			
Agonist	Wirkung als 1. Agonist	Wirkung als 2. Agonist	N/n
ATP	- 158 ± 23	- 310 ± 56	N=3-4/ n=32-40
Monochloramin	- 86 ± 13	- 113 ± 13	
Mag-Fura-2-Signal im mittleren Kryptenbereich			
Agonist	Wirkung als 1. Agonist	Wirkung als 2. Agonist	N/n
ATP	- 153 ± 19	- 146 ± 20	N=3-4/ n=46-56
Monochloramin	- 79 ± 10	- 102 ± 8	
Mag-Fura-2-Signal im Fundus der Krypten			
Agonist	Wirkung als 1. Agonist	Wirkung als 2. Agonist	N/n
ATP	- 252 ± 28	- 229 ± 32	N=3-4/ n=43-55
Monochloramin	- 116 ± 20	- 157 ± 17	

Tabelle III.1.: Wirkungen des ATPs am IP_3R und des Monochloramins am RyR unter Verwendung von CPA bei aneinandergereicher Applikation im direkten Vergleich
 Monochloramin wurde in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt, ATP in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM.

5. Untersuchung der Sarkoplasmatisch-Endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) im Kolonepithel der Ratte

5.1. Molekularbiologischer Nachweis mittels PCR

Die Nukleotidsäuresequenzen, die für die Detektion der Existenz der SERCAs des Subtyps-1/-2 und des Subtyps-1a/-1b im Kolonepithel eingesetzt wurden, stammen aus der Veröffentlichung von Gayan-Ramirez (Gayan-Ramirez et al. 2000). Die Sequenzen der Primer zum molekularen Nachweis von SERCA-2b/-3 stammen aus der Veröffentlichung von Wuytack (Wuytack et al. 1994). Als Referenzgewebe diente im Falle SERCA-1a/-1b Skelettmuskelgewebe und für SERCA-1/-2 und SERCA-2b/-3 Herzmuskelgewebe. Um die spezifische Bindung der jeweiligen Primer zu bestätigen, wurde pro Primer eine Negativ(H_2O)-Kontrolle angefertigt. Um die PCR-Produkte unter Fluoreszenzlicht beurteilen zu können, wurden sie auf ein 2 %iges (Gew/Vol) Agarosegel aufgetragen.

Abbildung III.15. zeigt, dass in den Epithelzellen des Rattenkolons die mRNA der SERCA Subtyp-2b oder -3 exprimiert wird, da die PCR-Produkte an entsprechender Stelle (206 bp für SERCA-2b; 209 bp für SERCA-3 (Mountian et al. 1999)) Banden bilden. Das Referenzgewebe – die Herzmuskelzellen – weist ebenfalls bei ca. 200 bp eine deutliche Bande auf.

Abbildung III.15. zeigt ebenfalls, dass die Subtypen-1 und -2a der SERCA in den Krypten nicht exprimiert werden, da an zu erwartender Stelle (248 bp für SERCA-1a/-1b und 196 bp für SERCA-1/-2 (Gayan-Ramirez et al. 2000)) keine Bande sichtbar ist. Die Negativkontrollen zeigen keine Banden, d.h., es sind keine unspezifischen Reaktionen abgelaufen sind.

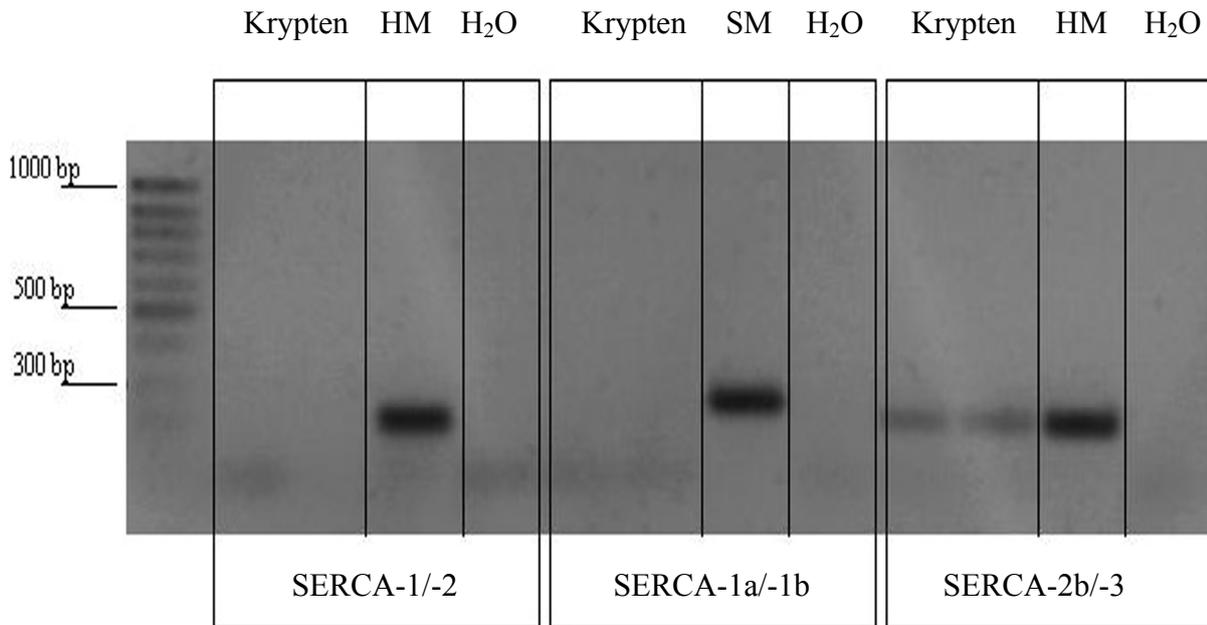


Abbildung III.15.: Agarose-Gel mit DNA-Banden

Die Primerpaare für die SERCA-Subtypen amplifizieren innerhalb einer PCR-Reaktion DNA-Sequenzen bestimmter Länge. In der cDNA der Kolonkrypten werden die Subtypen-2b und -3 exprimiert; Herzmuskelzellen (= HM) dienen als Referenzgewebe. Die Subtypen-1 und -2a konnten in der cDNA dieser Epithelzellen nicht nachgewiesen werden; als Referenzgewebe für Subtyp-1 und -2 wurden Herzmuskelzellen eingesetzt, für Subtyp-1 Skelettmuskelzellen (= SM). Typisches Ergebnis für $N = 2$ und $n = 3$. N = Anzahl der Kryptenpräparationen; n = Anzahl der angefertigten Gele.

5.2. Immunhistochemische Färbemethode zur Darstellung ihrer Lokalisation im Kolonepithel

5.2.1. SERCA-2b

Auch in diesen Studien wurden die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung (Kap. II.6.5.5.) markiert, um eine bessere Orientierung in den Präparaten zu ermöglichen. So ergibt sich, dass sich in Abbildung III.16. der Kryptenfundus jeweils am unteren Bildrand befindet und das Darmlumen nach oben weist.

Die Anfärbung der SERCA-2b zeigt ein deutliches Signal in der *Lamina epithelialis mucosae* und der *Lamina propria mucosae* der Kolonkrypten (Abb. III.16.). Im Gegensatz zur Verteilung des RyR-1 (Abb. III.2. und III.4.), scheint das Cy3-Signal der SERCA-2b im Oberflächenepithel der Krypten stärker zu sein als im Kryptenfundus. Die Überlagerung mit der DAPI-Kernfärbung im Bild oben rechts

ergibt eine Kolo-kalisation von SERCA-2b-Signalen mit den Epithelzellkernsignalen – es entsteht eine violette Mischfarbe. Im Zytoplasma der Epithelzellen ist ebenfalls ein deutliches Fluoreszenzsignal sichtbar.

Die in Abbildung III.16. dargestellte Negativkontrolle ist annähernd schwarz, was die spezifische Bindung des Primärantikörpers an die SERCA-2b zeigt.

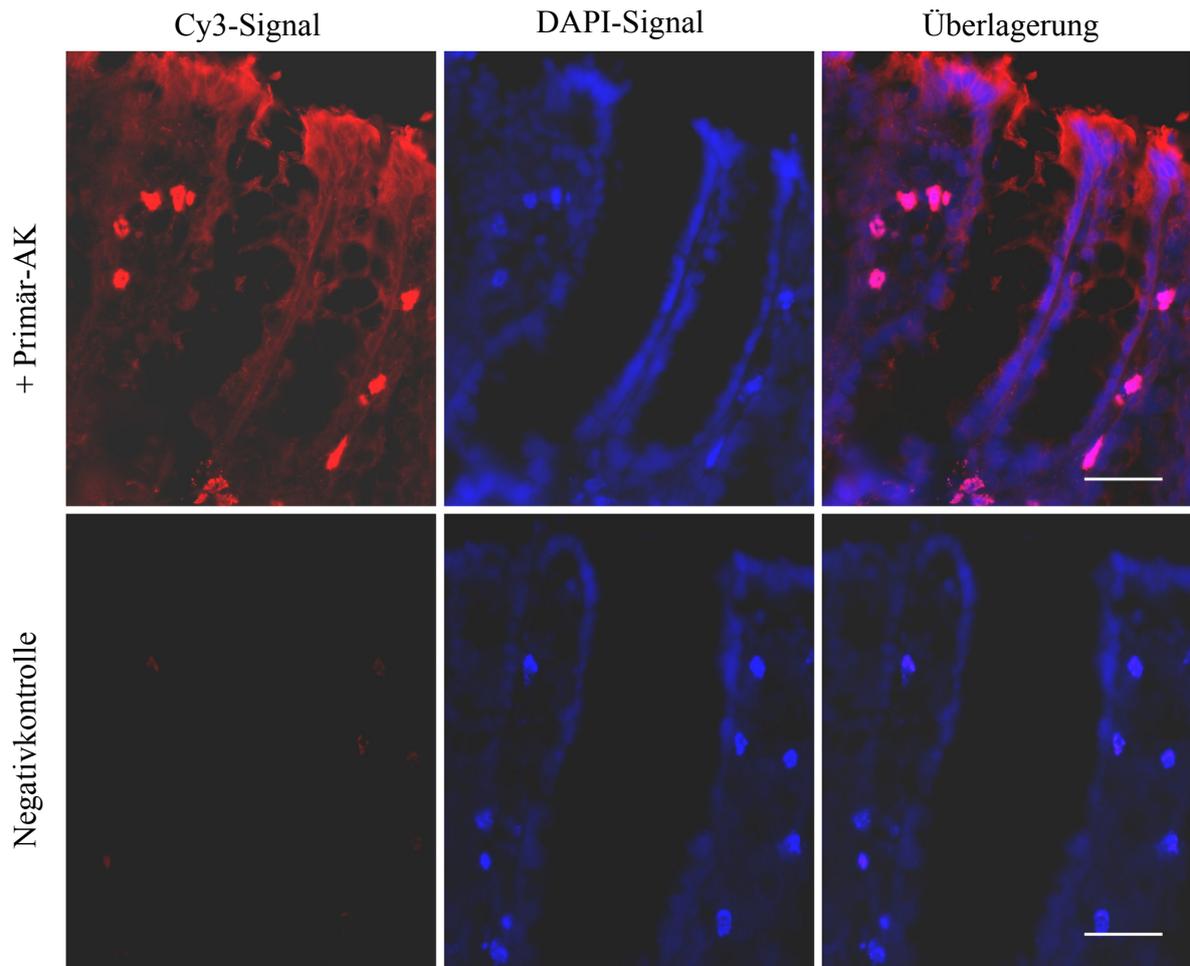


Abbildung III.16.: Verteilung der SERCA-2b in den Epithelzellen des Kolons

Das Bild oben links zeigt die SERCA-2b durch die Färbung mit Cy3-donkey anti-rabbit IgG rot. Auf den Bildern der mittleren Spalte sind die Zellkerne durch eine DAPI-Färbung blau dargestellt. Im Bild unten links ist die Negativkontrolle der SERCA-2b-Färbung dargestellt. Durch Überlagerung der Bilder der jeweiligen Zeilen ergibt sich die letzte Spalte. Das Bild oben rechts zeigt deutlich, dass das rote SERCA-2b-Signal und das blaue DAPI-Signal kolo-kalisiert sind. Unterer Bildabschnitt: Kryptenfundus; oberer Bildabschnitt: Darmlumen; Eichbalken: 50 μm . N = > 3, n = > 3. N = Anzahl der Mukosa-Submukosa-Präparationen; n = Anzahl der Färbungen.

5.2.2. SERCA-3

Die Markierung der SERCA-3 mit dem SERCA-3-Antikörper bewies das Vorhandensein dieses Proteins in den Epithelzellen des Kolons. Das Bild oben links in Abbildung III.17. zeigt das rote SERCA-3-Signal, welches eine relativ gleichmäßige Verteilung entlang der Kryptenachse des Kolons aufweist. Es ist in der *Lamina epithelialis mucosae* und der *Lamina propria mucosae* lokalisiert und erscheint im oberflächlichen Bereich der Krypte etwas stärker als im Fundus. Die violette Mischfarbe im Bild oben rechts zeigt, dass sich das rote Cy3-Signal der SERCA-3 mit dem blauen DAPI-Signal der Zellkerne überlagert. Das SERCA-3-Protein ist sowohl im Nukleus wie auch im Zytoplasma dieser Epithelzellen lokalisiert.

Die Negativkontrolle, dargestellt unten links in Abbildung III.17., weist keine Rotfärbung auf. Dies bedeutet, dass der verwendete Primärantikörper spezifisch an das SERCA-3-Molekül gebunden hat.

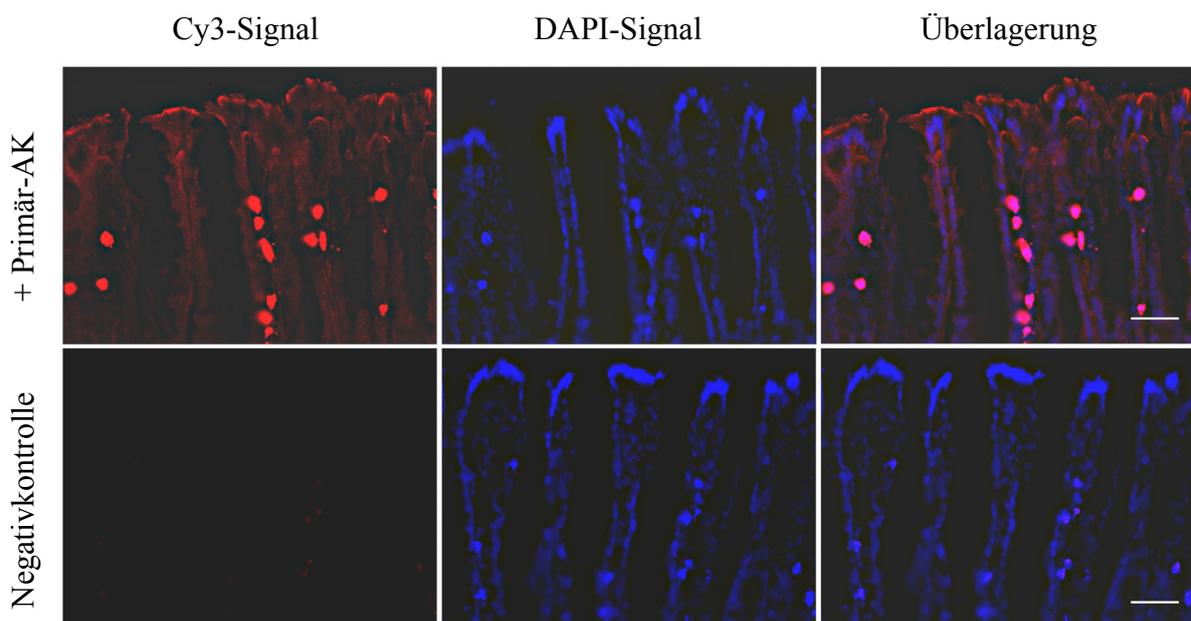


Abbildung III.17.: Lokalisation der SERCA-3 im Kolonepithel

Das Bild oben links zeigt das SERCA-3-Signal durch Kopplung mit einem Cy3-donkey anti-rabbit IgG rot. Die Zellkerne der Enterozyten sind in der mittleren Spalte blau dargestellt, weil eine DAPI-Färbung durchgeführt wurde. Im Bild unten links ist die Negativkontrolle der SERCA-3-Färbung zu erkennen. Die Bilder der rechten Spalte ergeben sich jeweils aus der Überlagerung der Bilder der vorhergehenden Spalten. Die Kolokalisation des SERCA-3-Signals mit dem Epithelzellkernsignal wird im Bild oben rechts durch die violette Mischfarbe sichtbar. Unterer Bildabschnitt: Kryptenfundus; oberer Bildabschnitt: Darmlumen; Eichbalken: 50 µm. N = > 3, n = > 3. N = Anzahl der Mukosa-Submukosa-Präparationen; n = Anzahl der Färbungen.

IV. Diskussion

Kalzium ist ein wichtiger, nahezu universeller Botenstoff, der zelluläre Prozesse weitreichend kontrolliert. So spielt es auch in den Enterozyten des Kolons eine bedeutende Rolle, weil eine Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung die Sekretion von Chlorid induziert (Böhme et al. 1991). Die Cl^- -Sekretion erfolgt zum einen indirekt, indem zuerst Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle in der basolateralen Epithelzellmembran aktiviert werden (Bleich et al. 1996). Der Kaliumausstrom bewirkt eine Hyperpolarisation der Membran, was als Triebkraft für den Ausstrom von Cl^- -Ionen über den apikal lokalisierten CFTR dient (Schultheiss & Diener 1998; Greger 2000). Zum anderen erfolgt der Cl^- -Ausstrom direkt über die transiente Öffnung von Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanälen in der apikalen Epithelzellmembran (Schultheiss et al. 2005).

Im Kolonepithel der Ratte sind mehrere Mechanismen zur Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bekannt. Die IP_3 -Signalkaskade wird angestoßen, sobald an einen muskarinergen Rezeptor vom Typ M_3 in der Enterozytenmembran Acetylcholin bindet. Die Aktivierung der Phospholipase C führt daraufhin zur Bildung von IP_3 (Lindqvist et al. 1998), das an den IP_3 -Rezeptor in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums bindet. Es kommt zur intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung und damit zur Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Hanson et al. 2004). IP_3 -Rezeptoren sind im Kolonepithel bereits genau charakterisiert: Subtyp-2 und -3 werden in den Enterozyten exprimiert, wobei der erstgenannte Subtyp gleichmäßig über die Kryptenachse im Nukleus lokalisiert ist. Der letztgenannte Subtyp ist hingegen im zytoplasmatischen Teil der Zellen vorhanden und unterliegt einem starken Gradienten entlang der Kryptenachse (Oberfläche \gg Fundus) (Siefjediers et al. 2007). Neben diesem klassischen IP_3 -Signalweg ist im Kolonepithel der Ratte der RyR-Signalweg beschrieben. Über die Modulation des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch Ryanodinrezeptoren lagen bisher allerdings nur funktionelle Daten vor (Kocks et al. 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, den RyR in den Kolonkrypten zu untersuchen. Meine Arbeit zeigt, dass ausschließlich RyR-1 in den Enterozyten exprimiert wird. Der Rezeptor ist im Zytoplasma der Zellen lokalisiert und zeigt eine gleichmäßige

Verteilung entlang der Kryptenachse. Eine nennenswerte Kollokalisierung mit dem IP₃R-3 scheint nicht vorzuliegen. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die CD38/ADP-Ribosyl Zyklase, die den RyR-Agonisten cADP-Ribose synthetisiert, ebenfalls in den Epithelzellen des Kolons lokalisiert ist. Zur Ergänzung der Daten wurde untersucht, welche SERCA Subtypen in den Krypten exprimiert werden. Es zeigte sich, dass SERCA-2b und -3 sowohl im zytoplasmatischen Teil der Zellen als auch im Nukleus lokalisiert sind und ein leichter Gradient entlang der Kryptenachse besteht (Oberfläche > Fundus).

1. Der Ryanodinrezeptor im Kolonepithel der Ratte

1.1. Molekularbiologischer Nachweis

Primäres Ziel der Untersuchungen war es, den im Kolonepithel bereits funktionell beschriebenen Ryanodinrezeptor genauer zu charakterisieren. Die hier angewandte Technik der PCR eignete sich, um die drei RyR-Subtypen voneinander zu unterscheiden, da deren Sequenzhomologie nur zwischen 66 und 70 % liegt (Meissner 1994). Die Sequenz der Primerpaare, die für die Detektion von RyR-1 bis RyR-3 spezifisch waren, stammten aus der Veröffentlichung von Lee et al. (Lee et al. 2002). Das Primerpaar für RyR-1 führte sowohl in der cDNA, die aus Kryptenzellen gewonnen wurde, als auch in der cDNA des Kontrollgewebes (Skelettmuskel) zu einer Amplifikation von Fragmenten mit einer Länge von ca. 300 bp (Abb. III.1.). Dies stimmt recht gut mit der theoretisch zu erwartenden Fragmentlänge von 287 bp (Lee et al. 2002) überein.

Der RyR-1, dessen Existenz in den Enterozyten des Kolons der Ratte durch meine Arbeit bewiesen worden ist, gilt als dominanter Subtyp in der Skelettmuskulatur (Rossi & Dirksen 2006). In epithelialen Zellen sind hingegen vorwiegend Subtyp-2 und -3 des RyRs dokumentiert, allerdings kaum Subtyp-1. Beispielsweise konnten in T₈₄-Zellen, einer Tumorzelllinie aus dem menschlichen Kolon, der RyR-2 und -3 nachgewiesen werden (Verma et al. 1996). So auch im Lungenepithel und in der epithelialen Leberzelllinie LLC-RK1, wobei im ersteren ausschließlich der Subtyp-3 (Kim et al. 1997) und im letzteren ausschließlich der Subtyp-2 des Ryanodinrezeptors

identifiziert worden ist (Tunwell & Lai 1996). In Speicheldrüsenzellen der Ratte konnte eine neue RyR-Isoform, die der trunkierten Form des RyR-1 ähnelt und im Gehirn von Kaninchen exprimiert wird (Takeshima et al. 1993), nachgewiesen werden (Zhang et al. 1999). Wie die trunkierte Form scheint auch der RyR der Parotidea eine C-terminale (Kanal)-Komponente zu besitzen, es fehlt aber der Koffein-sensible N-terminale Teil. Es wird spekuliert, dass diese RyR-Isoform über einen anderen Mechanismus Kalzium freisetzt als der klassische RyR-1 (Zhang et al. 1999). Auch in Hepatozyten wurde eine trunkierte Form des RyR-1 nachgewiesen, die sich ebenfalls nicht durch Koffein aktivieren ließ (Pierobon et al. 2006). Ozawa et al. konnte hingegen in Speicheldrüsenzellen den dort vorhandenen RyR-1 durch Koffein öffnen (Ozawa & Nishiyama 1997).

1.2. Nachweis des RyR-1 und Vergleich zum IP₃R-3

Um die Lokalisation des RyR-1 zu untersuchen, wurden immunhistochemische Untersuchungen unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers durchgeführt. Die *einfache Fluoreszenzmarkierung* zeigte in den Epithelzellen des Kolons eine gleichmäßige Verteilung des Rezeptors entlang der Kryptenachse. Das RyR-1-Signal stammt aus dem Zytoplasma der Enterozyten. Diese Färbung überlagerte sich nicht mit dem DNA-Fluoreszenzmarker (DAPI), was darauf schließen lässt, dass der RyR-1 nicht im Nukleus lokalisiert ist (Abb. III.2.). Dieses Ergebnis ist schlüssig mit der in meiner Arbeit ebenfalls angefertigten DAB-Färbung. Auch sie zeigt eine gleichmäßige Verteilung des Rezeptors entlang der Kryptenachse (Abb. III.4.).

Bezüglich der zytoplasmatischen Lokalisation des RyRs in nicht-erregbaren Zellen liegen konträre Daten vor. In der Parotidea beschränkt sich das Auftreten des RyR-1 ebenfalls auf das Zytoplasma, wobei die Expression am basalen Pol der Zellen am höchsten ist (Zhang et al. 1999). Auch aus der Leber ist bekannt, dass im Nukleus kein RyR exprimiert wird (Guihard et al. 1997). Zu einem anderen Ergebnis kam Gerasimenko et al. mittels Imaging-Experimenten und konfokaler Mikroskopie. Er hat funktionell aktive IP₃Rs und RyRs in der nukleären Membran von isolierten Leberzellkernen nachgewiesen (Gerasimenko et al. 1995). Für erregbare Gewebe, die beispielsweise durch C2C12-Zellen (Myoblasten-Zelllinie) repräsentiert werden,

liegen Daten vor, die ebenfalls für die Existenz eines nukleären RyR-1 sprechen (Marius et al. 2006).

Dass der RyR-1 im Skelettmuskelgewebe der dominante Subtyp ist, ist hinlänglich bekannt (Sorrentino 1995). Somit konnte dies als Positivkontrolle für die Immunfluoreszenzfärbung der Krypten dienen. Wie erwartet ist das RyR-1-Signal in diesem Gewebe wesentlich stärker als in den Enterozyten und durch diese Färbung lässt sich die Querstreifung der Muskelzellen erahnen (Abb. III.3.). Der eingesetzte Antikörper zeigte in 1B5-Zellen, einer myogenen Zelllinie, die mit der cDNA des RyR-1 transfiziert worden waren, ebenfalls ein deutliches Signal. Es stammt aus der Nähe der Oberflächenmembran der Muskelfasern (Protasi et al. 1998).

Um die Spezifität des in der Immunhistochemie verwendeten RyR-Antikörpers zu untermauern, wurde ein *Western Blot* durchgeführt. Der RyR-Antikörper führte sowohl in der Mikrosomenfraktion, die aus Kryptenzellen gewonnen wurde, als auch in der des Kontrollgewebes (Skelettmuskel) zu einer Bandenbildung auf Höhe von ca. 500 kDa (Abb. III.8.). Dies stimmt recht gut mit der theoretisch zu erwartenden Fragmentlänge von 565 kDa (Ludtke et al. 2005) überein. Dass der im Western Blot eingesetzte RyR-Antikörper das RyR-Protein spezifisch bindet, hat auch Moore et al. gezeigt. In seiner Veröffentlichung sind im Gel seines Western Blots, in den Spalten der Positivkontrolle, deutliche Banden auf Höhe des RyR-Proteins entstanden (Moore et al. 1998).

Da RyRs und IP₃Rs funktionell sehr eng miteinander verknüpft sind, erschien es interessant, ob die beiden Rezeptortypen kolokalisiert sind. Zwei der drei bekannten IP₃-Rezeptoren werden in den Epithelzellen des Kolons exprimiert, wobei der Subtyp-2 eine rein nukleäre Lokalisation, gleichmäßig entlang der Kryptenachse aufweist und der Subtyp-3 sich ausschließlich im Zytoplasma der ausdifferenzierten Enterozyten, die im Oberflächenbereich der Krypten lokalisiert sind, befindet (Siefjediers et al. 2007). Da der RyR-1 im Kolonepithel rein zytoplasmatisch lokalisiert und gleichmäßig entlang der Kryptenachse verteilt ist, wurde unter Durchführung einer immunhistochemischen *Doppelfärbung* untersucht, ob Kolokalisationen zwischen RyR-1 und IP₃R-3 bestehen. Die Färbung ist ausschließlich im Oberflächenbereich der Krypten relevant, da der IP₃R-3 nur in diesem Abschnitt exprimiert wird. Die Detektion des IP₃R-3 wurde mit einem kommerziellen, gegen den N-Terminus

gerichteten Antikörper durchgeführt. Dieser Rezeptortyp wird häufig in nicht-neuronalen Geweben exprimiert, wie z. B. den Inselzellen des Pankreas und dem Dünndarm (Blondel et al. 1993). Auch in der Niere ist der IP₃R-3 in der glatten Muskulatur der Gefäße, in glomerulären Mesangiumzellen und in einigen Zellen des kortikalen Sammelrohrs lokalisiert (Monkawa et al. 1998). Eine detailliertere intrazelluläre Lokalisation dieses Rezeptortyps veröffentlichte Laflamme et al.: Er zeigte in verschiedenen Säugetierzellen, wie z. B. in bovinen Endothelzellen, die Verteilung des IP₃R-3 in der perinukleären Region und dem Endoplasmatischen Retikulum (Laflamme et al. 2002).

In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *Doppelfärbung* stellen sich der RyR-1 rot, der IP₃R-3 grün und die Zellkerne blau dar (Abb. III.5.). Eine gelbe Mischfarbe, die sich aus der Überlagerung von roten (RyR) und grünen (IP₃R) Signalen ergeben würde, ist kaum erkennbar. Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Rezeptortypen keine nennenswerte Koloalitionen besitzen. Der RyR-1 befindet sich eher im perinukleären Bereich der Zellen, der IP₃R-3 eher im apikalen Teil.

Dieses Ergebnis wird durch andere Untersuchungen an nicht-erregbaren Geweben unterstützt: Auch in Speicheldrüsenzellen besteht keine Koloalitionen zwischen dem RyR, der im basalen Zellpol angesiedelt ist, und dem IP₃R, der im apikalen Teil der Zelle lokalisiert ist (Zhang et al. 1999; Lee et al. 2002). Die funktionelle Bedeutung der beiden Ca²⁺-Kanäle in exokrinen Drüsenzellen könnte die sein, dass alle drei Isoformen des IP₃Rs für die apikale Initiation der Ca²⁺-Signale in Anspruch genommen werden. RyRs haben dann die Aufgabe, das Ca²⁺-Signal in den basolateralen Zellteil weiterzuleiten. Im Gegensatz dazu exprimieren nicht-pigmentierte Ziliar-Epithelzellen apikal nur den IP₃R-3, dafür befindet sich allerdings der IP₃R-1 im basolateralen Teil der Zellen. Er ist in diesem Fall auch hauptsächlich für die Verteilung von Ca²⁺-Wellen in die basolaterale Zellregion verantwortlich (Hirata et al. 2002). In den Drüsenzellen des exokrinen Pankreas besteht ebenfalls eine unterschiedliche räumliche Verteilung von RyRs und IP₃Rs: Auch hier ist der zuletzt genannte Rezeptortyp im apikalen Teil der Zelle lokalisiert und die RyRs im basolateralen (Leite et al. 1999; Leite et al. 2002).

Als physiologischer Agonist des RyRs gilt die cADP-Ribose (Perez et al. 1998), die intrazellulär durch Zyklisierung von NAD^+ synthetisiert wird (Sorrentino 1995). Katalysiert wird diese Reaktion von der CD38/ADP-Ribosyl Zyklase, einem Enzym mit ubiquitärem Verteilungsmuster (Khoo et al. 2000).

In der von mir durchgeführten immunhistochemischen Färbung wurde der CD38-Antikörper an einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden und stellt sich somit rot dar. Es wurde ebenfalls ein DNA-Fluoreszenzmarker (DAPI) eingesetzt, wodurch sich die Zellkerne blau färbten. Das Enzym ist im Zytoplasma der Enterozyten lokalisiert und unterliegt einer gleichmäßigen Verteilung entlang der Kryptenachse. Es kommt zu keiner Überlagerung von Cy3- und DAPI-Signalen; das bedeutet, dass eine nukleäre Lokalisation in den Krypten des Kolons ausgeschlossen werden kann (Abb. III.7.). Dies scheint insofern erstaunlich, als dass das Enzym generell nicht nur auf der Zelloberfläche und in intrazellulären Organellen, sondern auch im Nukleus vorkommt (Lee 2001). So auch in MC3T3.E1-Zellen (embryonale, fibroblastenartige Mäusezellen) und Hepatozyten, wo CD38 auf der inneren nukleären Hülle lokalisiert ist (Adebanjo et al. 1999; Khoo et al. 2000). Immunoelektronenmikroskopische Studien an Neuronen haben ergeben, dass dieses Enzym intrazellulär in vielen Organellen, einschließlich des Endoplasmatischen Retikulums, exprimiert wird (Bai et al. 2005).

2. Die SERCA im Kolonepithel der Ratte

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass die Enterozyten im Fundusbereich der Kolonkrypten der Ratte zur Ca^{2+} -Freisetzung aus zytoplasmatischen Speichern ausschließlich den Ryanodinrezeptor exprimieren. Da die funktionelle Rolle dieses Rezeptors noch nicht klar war, sollte zunächst der Ca^{2+} -Aufnahme Mechanismus in diesen Zellen näher charakterisiert werden. Einerseits wurde untersucht, welche SERCA-Subtypen dort vorhanden sind und andererseits interessierte deren Verteilung entlang der Kryptenachse, da die Zellen vom Kryptenfundus bis hin zur Oberfläche altern, sich differenzieren und damit ihre Eigenschaften verändern (Greger et al. 1997). SERCAs zählen zu den Ca^{2+} -ATPasen vom P-Typ und transportieren Kalzium in das Lumen des ERs (Burk et al. 1989).

Für den molekularbiologischen Nachweis wurden mehrere PCRs durchgeführt. Das Primerpaar für Subtyp-2b und -3 führt sowohl in der cDNA der Kryptenzellen als auch in der cDNA des Kontrollgewebes (Herzmuskel) zu einer Amplifikation von Fragmenten mit einer Länge von ca. 200 bp (Abb. III.15.). Da die erwartete Fragmentlänge der SERCA-2b bei 206 bp und der SERCA-3 bei 209 bp (Kap. III.5.) liegt, sollte es sich tatsächlich um ein Amplifikat der SERCA handeln. Mit dieser Methodik konnte noch nicht geklärt werden, ob es die SERCA-2b oder -3 ist, die im Kolonepithel exprimiert wird; dafür wurde die Immunhistochemie herangezogen. Bei den beiden verwendeten Antikörpern handelt es sich um polyklonale Antikörper, wobei der SERCA-2b-Antikörper gegen das C-terminale Ende und der SERCA-3-Antikörper gegen das N-terminale Ende des jeweiligen Proteins gerichtet ist (Kap. II.6.3.3.). Es wurde der DNA-Fluoreszenzmarker DAPI eingesetzt, um durch Färbung der Zellkerne eine bessere Orientierung im Gewebe zu ermöglichen. Die einfache Fluoreszenzfärbung zeigt für beide Subtypen Signale aus dem Zytoplasma und dem Nukleus der Enterozyten. SERCA-2b zeigt dabei einen stärkeren Gradienten entlang der Kryptenachse (Oberfläche >> Fundus) als SERCA-3 (Oberfläche > Fundus) (Abb. III.16. und III.17.).

Im Kolonepithel der Ratte sind erst wenige Untersuchungen bezüglich der SERCA durchgeführt worden. Wu et al. stellte mittels in-situ Hybridisierung eine Expression von SERCA-3 in den Krypten des Rattendarms fest (Wu et al. 1995). Dieses Ergebnis wird durch immunhistochemische Untersuchungen von Gélébart et al. unterstützt, die in Epithelzellen des Kolons ebenfalls den Subtyp-3 der SERCA identifizieren. Diese Färbung zeigt eine Verteilung der Ca^{2+} -ATPase von der Kryptenoberfläche über die Mitte bis hin zum Fundus (Gélébart et al. 2002). Für andere nicht-erregbare Gewebe liegen ebenfalls Daten vor, die eine dortige Expression von SERCA-2b und -3 belegen (Gunteski-Hamblin et al. 1988; Wuytack et al. 1995). Die aus den immunhistochemischen Färbungen meiner Arbeit hervorgehende intrazelluläre Lokalisation der SERCA-Subtypen stimmt mit dem Verteilungsmuster anderer, nicht-erregbarer Zellen überein. Dass sie in der Membran des ER lokalisiert ist, und daher auch ihren Namen trägt, ist hinlänglich bekannt (Berridge 2002). Zusätzlich zur zytoplasmatischen Lokalisation wurde in Hepatozyten eine nukleäre

SERCA identifiziert, die in der äußeren Kernmembran lokalisiert ist (Gerasimenko et al. 1995; Humbert et al. 1996).

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigt sich, dass die Kolon-Enterozyten durch Expression von SERCA-2b und -3 alle Voraussetzungen haben, ihre Ca^{2+} -Speicher wieder zu befüllen. Wie sich hingegen die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER, besonders im Kryptenfundus, wo zytoplasmatisch allein der RyR-1 exprimiert wird, abspielt, war bisher unklar. Um Daten hinsichtlich der Funktion des RyRs im Kolonepithel zu sammeln, wurden im Rahmen dieser Arbeit Ca^{2+} -Imaging-Experimente durchgeführt.

3. Funktionelle Charakterisierung des RyR-1 im Kolonepithel

Nachdem unter Durchführung von immunhistochemischen Färbungen das Expressionsmuster des RyR-1 im Kolonepithel der Ratte geklärt war, wurde nachfolgend die Funktion des Rezeptors untersucht. Da Unterschiede im Differenzierungsgrad und damit in der Funktion der Enterozyten entlang der Kryptenachse bestehen, war entscheidend für diese Fragestellung, ob die Funktion des RyRs zwischen Kryptenoberfläche und -fundus differiert.

Um die Funktion des RyRs zu untersuchen, wurden Krypten aus dem Kolon isoliert (Kap. II.5.2.) und mit Fura-2-AM beladen (Kap. II.8.6.1.). Der durch die intakten Zellen hydrolytisch gespaltene und dadurch aktivierte Farbstoff ließ ein Monitoring der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen zu. Im ersten Versuchsaufbau wurden die Krypten mit Monochloramin stimuliert, einem Stoff, der die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyRs erhöht (Oba et al. 2002; Schultheiss et al. 2005). Es bewirkte in allen drei Kryptenregionen eine Speicherentleerung, was sich in einem Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses zeigte (Abb. III.9.). Auf den ersten Blick scheint es, als ob die Ca^{2+} -Konzentrationsänderung nach Monochloramin-Stimulation im Fundusbereich der Krypte am stärksten und in der Oberflächenregion am geringsten ist (Abb. III.10.). Diese Unterschiede sind allerdings nicht groß genug, um statistisch signifikant zu sein. Die Antwort wurde von Ruthenium Rot, einem Blocker des RyR (Xu et al. 1999), nahezu vollständig unterdrückt (Abb. III.11.). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch gleichmäßige Verteilung des RyR-1

entlang der Kryptenachse auch eine gleichmäßige Ca^{2+} -Speicherentleerung stattfindet. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern über RyRs in bezug auf seine Lokalisation innerhalb der Krypte.

Dass eine Speicherentleerung durch Monochloramin möglich ist, wurde bereits mehrfach gezeigt. Cima et al. veröffentlichte - ebenfalls am Kolonepithel der Ratte mittels Fura-2-Experimenten - eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern nach Applikation von Monochloramin. Dies führte zusätzlich zu einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum ins Zytoplasma der Enterozyten (Cima et al. 2006). Des Weiteren führt die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels z. B. durch Monochloramin in diesem Gewebe zu einer Stimulation der Cl^- -Sekretion (Tamai et al. 1991; Schultheiss et al. 2005).

Das eingesetzte Monochloramin gilt als oxidatives Molekül, das bei entzündlichen Prozessen des Kolons aus Hypochlorsäure (HOCl) und Ammoniak (NH_3) gebildet wird (Ballester et al. 2005; Cima et al. 2006). Vermutlich ist es dort in der Lage Metaboliten der Arachidonsäure freizusetzen (Tamai et al. 1991). Die Arachidonsäure ist eine biologisch aktive, ungesättigte Fettsäure, aus der durch Metabolisierung eine Fülle von weiteren biologisch aktiven Molekülen entstehen kann (Jones et al. 2004). Da bereits gezeigt wurde, dass die Arachidonsäure in intakten β -Pankreaszellen Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum über RyRs freisetzen konnte (Woolcott et al. 2006), drängte sich die Frage auf, ob dies im Kolonepithel der Ratte ebenso möglich ist. Diese zweite Fragestellung bezüglich der Funktionalität des RyR-1 wurde ebenfalls mit Hilfe der Fura-2-Imagingtechnik, unter Ca^{2+} -freien Bedingungen, untersucht. Aus dem Originalkurvenverlauf des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses geht hervor, dass es nach Stabilisierung der Grundlinie und Applikation von Arachidonsäure zu keiner Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern kommt (Abb. III.12.). Dieses Ergebnis ist ebenfalls unabhängig von der Enterozytenlokalisierung innerhalb der Krypte.

Dass Arachidonsäure keine Ca^{2+} -Speicherentleerung im Kolonepithel der Ratte hervorruft, ist konträr zu veröffentlichten Daten in anderen nicht-erregbaren Geweben, wo Arachidonsäure eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern auslöst. Beispielsweise in Astrozyten hat diese Substanz den Effekt, den zytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegel über die Entleerung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern zu erhöhen.

Gleichzeitig werden dadurch die SOCCs dieser Zellen gehemmt, was zu einer Reduzierung der Amplitude der Ca^{2+} -Antworten führt, da Kalzium ebenfalls aus dem Extrazellularraum einströmt (Sergeeva et al. 2005). Auch in Zellen der Hypophyse mobilisiert die Arachidonsäure Kalzium aus intrazellulären Speichern, und in höheren Konzentrationen ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) rekrutiert es ebenfalls extrazelluläres Kalzium. Diese Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels führt in diesen Zellen zu einer Hormonsekretion (Knepel et al. 1988). Am Kolonepithel der Ratte zeigen Ussing-Kammer-Untersuchungen ebenfalls eine Arachidonsäure-induzierte, Ca^{2+} -abhängige Sekretion (Döring et al. 1990). Ob dieses Kalzium aus intrazellulären Speichern oder aus dem extrazellulären Raum mobilisiert wird, war bisher noch nicht geklärt. Die Ergebnisse meiner Arbeit legen nun nahe, dass im Kolonepithel das Kalzium, das eine solche Sekretion auslöst, nicht aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird, sondern unter physiologischen Bedingungen aus dem Extrazellularraum einströmt. Um genau solche indirekten Wirkungen auf den Ca^{2+} -Spiegel durch Einstrom von extrazellulärem Kalzium auszuschließen, wurden die Ca^{2+} -Imaging-Experimente meiner Arbeit unter Ca^{2+} -freien Bedingungen durchgeführt. Dass der Originalkurvenverlauf keinen Anstieg zeigt, bedeutet, dass die Arachidonsäure keine intrazelluläre Ca^{2+} -Speicherentleerung verursacht (Abb. III.12.).

4. Physiologische Bedeutung von RyRs und IP₃Rs in den Enterozyten des Kolons der Ratte

Da Ryanodinrezeptoren und IP₃-Rezeptoren in engem funktionellem Zusammenhang stehen, ist es von Bedeutung, inwieweit deren Ca^{2+} -Signalwege dieselben intrazellulären Ca^{2+} -Speicher entleeren. Hierfür wurden ebenfalls Ca^{2+} -Imaging-Experimente, in diesem Fall unter Verwendung von Mag-Fura-2, durchgeführt. Dieser Farbstoff reichert sich in den intrazellulären Speichern der Zellen an (Hofer & Machen 1993), was zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals führt, sobald Kalzium aus ihnen freigesetzt wird. In diesem Versuchsaufbau wurden RyRs und IP₃Rs direkt aufeinanderfolgend stimuliert. Im ersten Experiment wurde zuerst der RyR-1 und danach die IP₃Rs stimuliert, im zweiten kam der Primärstimulus für die IP₃Rs zuerst, dann folgte der für den RyR-1. Aus den Messergebnissen geht deutlich

hervor, dass sich die Ca^{2+} -Freisetzungen über RyRs und IP_3Rs gegenseitig nicht beeinflussen (Abb. III.13 und III.14.). Durch dieses Ergebnis wird dasjenige aus der immunhistochemischen Doppelfärbung bestätigt. Diese wies ebenfalls darauf hin, dass im Oberflächenbereich der Krypten keine nennenswerten Kollokalisierungen zwischen RyRs und IP_3Rs bestehen. Außerdem ist die Ca^{2+} -Freisetzung durch IP_3Rs – unabhängig davon, ob bereits eine Speicherentleerung über RyRs stattgefunden hat oder nicht – immer größer als die über die RyRs vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung (Abb. III.13 und III.14.).

Trägt man die Informationen zusammen, die über IP_3Rs und RyRs im Kolonepithel der Ratte bekannt sind, ergibt sich eine spezifische Verteilung dieser Rezeptortypen entlang der Kryptenachse. Im Fundus und der mittleren Region der Krypte wird in den Nuklei der Enterozyten der $\text{IP}_3\text{R-2}$ exprimiert, in deren Zytoplasma der RyR-1. Im Oberflächenbereich der Krypten wird in den Nuklei der Epithelzellen ebenfalls der $\text{IP}_3\text{R-2}$ exprimiert, wohingegen im Zytoplasma der $\text{IP}_3\text{R-3}$ und der RyR-1 vorkommen (Siefjediers et al. 2007).

Das Expressionsmuster der in dieser Arbeit untersuchten intrazellulären Ca^{2+} -Kanäle lässt darauf schließen, dass beide Signalwege funktionell miteinander verknüpft sind. Im Fundus und der mittleren Kryptenregion kommt es nach Stimulation des M_3 -Rezeptors auf der Plasmamembran zur Bildung von IP_3 (Lindqvist et al. 1998). Dieses bindet wiederum an seinen Rezeptor, den $\text{IP}_3\text{R-2}$, der im Nukleoplasma der Enterozyten lokalisiert ist (Siefjediers et al. 2007). Letzterer setzt daraufhin Kalzium frei, welches aus der Kernregion in das umliegende Zytoplasma diffundiert. Erreicht dieses das Endoplasmatische Retikulum, in dessen Membran der RyR-1 lokalisiert ist, kann es dort binden und zur Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung führen. Durch den erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel werden in der basolateralen Enterozytenmembran K^+ -Kanäle aktiviert (Bleich et al. 1996; Warth et al. 1999) und in der apikalen Plasmamembran Cl^- -Kanäle (Schultheiss & Diener 1998; Schultheiss et al. 2005) (Abb. IV.1.).

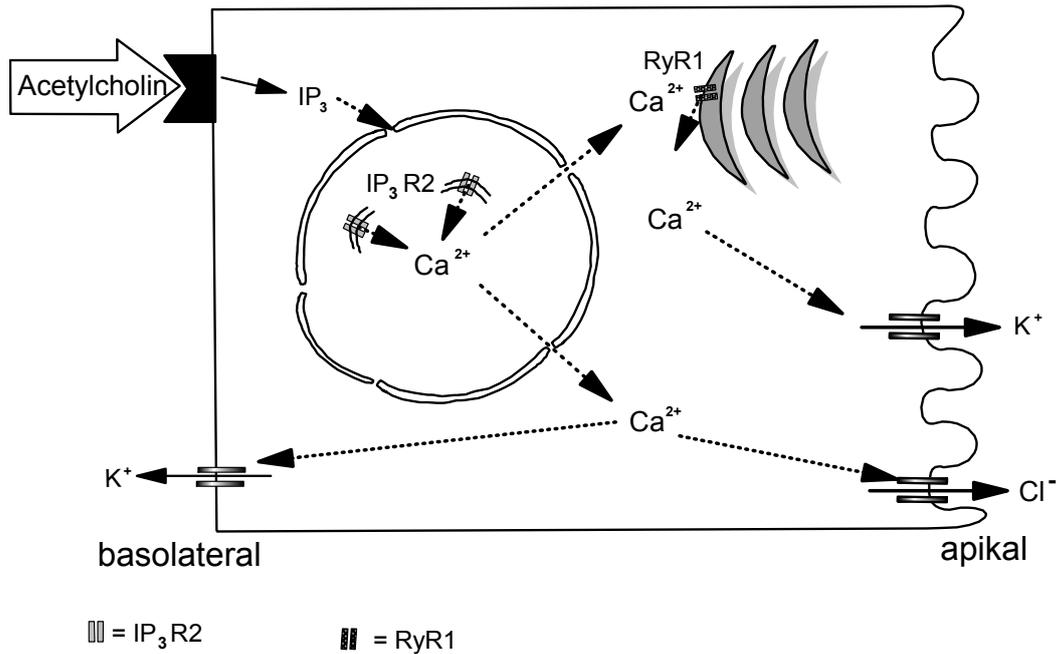


Abbildung IV.1.: Enterozyt im Kryptenfundus bzw. der mittleren Kryptenregion

IP₃ aktiviert im Zellkern IP₃-Rezeptoren des Subtyp-2, die im Nukleoplasma Kalzium freisetzen. Dieses kann entweder Prozesse im Kern regulieren oder ins Zytoplasma diffundieren, um dort über den RyR-1 Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum freizusetzen, was als Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung bezeichnet wird. Das Kalzium kann wiederum apikale und basolaterale Ionenkanäle aktivieren.

In der Oberflächenregion der Krypte ist das Zusammenspiel der intrazellulären Ca²⁺-Kanäle etwas komplexer, da sich im Zytoplasma der Enterozyten nicht nur der RyR-1 befindet, sondern auch der Subtyp-3 des IP₃-Rezeptors. Bindet in dieser Kryptenregion das Acetylcholin an den M₃-Rezeptor in der Plasmamembran der Epithelzelle, kommt es wiederum zur Bildung von IP₃ (Lindqvist et al. 1998). Dieses hat nun zwei Bindungsmöglichkeiten: 1. an den nukleären IP₃R-2 oder 2. an den zytoplasmatisch lokalisierten IP₃R-3. Das daraufhin freigesetzte Kalzium, das entweder aus dem Zellkern oder dem Endoplasmatischen Retikulum stammt, kann wiederum über den RyR-1 eine Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung auslösen. Es folgt eine Öffnung von Ionenkanälen in der Plasmamembran der Zelle (s.o.) (Abb. IV.2.).

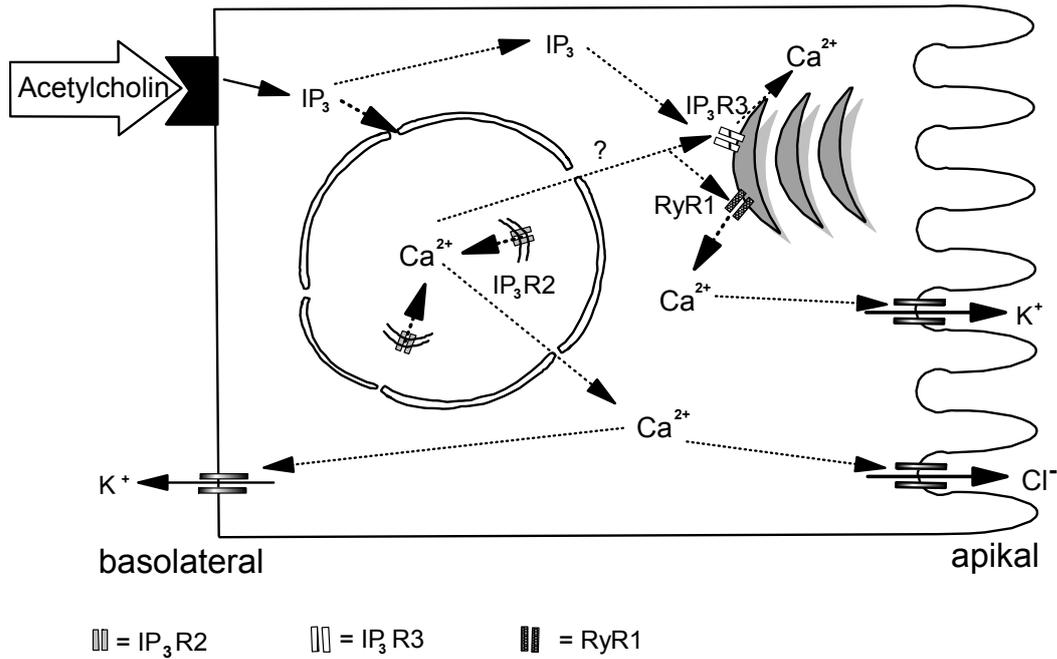


Abbildung IV.2.: Enterozyt aus der Kryptenoberfläche

IP₃ aktiviert zum einen den nukleären IP₃R-2, zum anderen den zytoplasmatischen IP₃R-3. Das freigesetzte Kalzium kann nukleäre Prozesse steuern, über Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung den RyR-1 oder auch den IP₃R-3 öffnen oder Ionenkanäle in der apikalen und basolateralen Plasmamembran aktivieren.

Eine mögliche Erklärung für die Verteilung der Rezeptorsubtypen entlang der Kryptenachse ist der unterschiedliche Differenzierungsgrad und damit auch die unterschiedliche Funktion der Enterozyten. Im Kryptenfundus sitzen die jungen Enterozyten, die eher sezernierende Eigenschaften haben (Köckerling & Fromm 1993) (Kap. I.1.). Je weiter diese Zellen in Richtung Kryptenoberfläche wandern, desto weiter schreitet ihre Differenzierung und Reifung fort – damit verschiebt sich ihre Transportleistung hin zur Resorption (Barrett & Keely 2000). Die Epithelzellen sind jedoch jederzeit in der Lage, zwischen Resorption und Sekretion umzuschalten (Greger et al. 1997). Mit der Differenzierung und Reifung nimmt auch das Alter der Zellen vom Kryptenfundus bis hin zum Oberflächenepithel zu, wo sie aufgrund apoptotischer Prozesse ins Darmlumen abschilfern (Potten et al. 1997). Die Apoptose ist zum einen ein physiologischer Prozess, wie hier im Kolon, kann zum anderen allerdings auch aufgrund pathologischer Bedingungen einsetzen. Sie wird ebenfalls als programmierter Zelltod bezeichnet, da die Zellen unter kontrollierten, von spezifischen Stimuli gelenkten Bedingungen, einem intrinsischen Programm folgend, sterben.

Apoptotische Zellen verlieren den Kontakt zu benachbarten Zellen, und ihr Chromatin unterliegt der Kondensation und der Fragmentierung (Fawthrop et al. 1991). Kalzium spielt bei der Einleitung dieser Prozesse eine wichtige Rolle. Steigt der Ca^{2+} -Spiegel der Mitochondrienmatrix stark an, können diese anschwellen und rupturieren, oder deren Permeabilität kann sich ändern. Dadurch werden verschiedene pro-apoptotische Faktoren in das Zytoplasma freigesetzt, wie z. B. das Cytochrom C, der second mitochondrial activator of caspases (SMAC) oder der Apoptosis-Inducing Factor (AIF). Dies führt zur Bildung des sog. Apoptosoms (Hanson et al. 2004). Es wird vermutet, dass die durch IP_3Rs und RyRs streng regulierten Ca^{2+} -Signale wichtig für die Aktivierung des Zelltodes sind. Allerdings muss der genaue Zusammenhang zwischen der Apoptose und den IP_3Rs -/ RyRs -vermittelten Ca^{2+} -Signalen noch durch weitere Experimente geklärt werden (Hajnoczky et al. 2000).

Die biologische Rolle des Ryanodinrezeptors im Kolonepithel ist somit noch nicht gänzlich bekannt und bietet Raum, um weitere Untersuchungen durchzuführen.

V. Zusammenfassung

Der Ryanodinrezeptor ist ein wichtiger Regulator der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase. Im Kolonepithel ist dieser Ca^{2+} -Kanal zwar funktionell bereits untersucht worden, es lagen bisher allerdings keine weiteren Daten vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf molekularbiologischer Ebene mittels PCR nachgewiesen, dass im Kolonepithel der Ratte der Subtyp-1 des RyRs exprimiert wird. Über immunhistochemische Untersuchungen zeigte sich seine gleichmäßige Verteilung entlang der Kryptenachse und seine zytoplasmatische Lokalisation. Da neben dem RyR-Signalweg der IP_3 -Signalweg als wichtigster Modulator der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung gilt, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen durchgeführt, die ergaben, dass diese beiden Ca^{2+} -Kanäle nicht nennenswert kolokalisiert sind. Die Spezifität des in der Immunhistochemie eingesetzten RyR-Antikörpers wurde mit einem Western Blot bestätigt. Die CD38/ADP-Ribosyl Zyklase, die die Synthese der cADP-Ribose, einem physiologischen Agonisten des RyR, katalysiert, konnte ebenfalls in Immunfluoreszenzfärbungen im Kolonepithel der Ratte nachgewiesen werden. Dieses Enzym zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation in den Enterozyten, mit gleichmäßiger Verteilung entlang der Kryptenachse.

Neben der intrazellulären Ca^{2+} -Speicherentleerung in diesen Zellen wurde auch der Mechanismus der Wiederbefüllung untersucht. Mittels PCR wurde die Expression der SERCA Subtypen-2b oder -3 im Kolonepithel nachgewiesen. Um eine Differenzierung zwischen diesen beiden Isoformen vornehmen zu können, wurde wiederum die Immunfluoreszenz herangezogen. Sowohl SERCA-2b als auch SERCA-3 haben in diesem Gewebe zytoplasmatische und nukleäre Lokalisationen und zeigen einen leichten Gradienten von der Oberfläche der Krypten bis hin zu deren Fundus, wo sie weniger stark exprimiert werden.

Monochloramin, ein Stoff, der die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyRs erhöht, zeigte in Fura-2-Experimenten eine intrazelluläre Ca^{2+} -Speicherentleerung, die sich durch Ruthenium Rot blockieren ließ. Arachidonsäure konnte hingegen, unter gleichen Versuchsbedingungen, keine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern auslösen. Um die beiden wichtigsten intrazellulären Ca^{2+} -Signalwege – über RyRs und IP_3 Rs –

in direktem funktionellen Zusammenhang zu untersuchen, wurden Mag-Fura-2-Experimente durchgeführt. Sie ergaben, dass RyRs aus anderen Ca^{2+} -Speichern Kalzium freisetzen als die IP_3 Rs, wobei über IP_3 Rs mehr Kalzium freigesetzt wurde als über den RyR-1.

Im Kolonepithel der Ratte wird demnach neben dem IP_3 -Rezeptor Subtyp-2 und -3 auch der Ryanodinrezeptor Subtyp-1 exprimiert, der ebenfalls eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung in nicht-erregbaren Geweben spielt.

VI. Summary

The ryanodine receptor (RyR) is an important regulator of the intracellular Ca^{2+} -homoeostasis. This Ca^{2+} -channel has only been functionally described at the colonic epithelium. Therefore, PCR experiments were performed at crypts isolated from rat colon. They demonstrated the expression of subtype-1 of the RyR in this tissue. Immunohistochemical experiments revealed an even distribution of this Ca^{2+} -channel along the crypt axis with a cytoplasmic localisation. As the IP_3 -signalling pathway, along with the RyR one, is postulated to be responsible for intracellular Ca^{2+} -release from intracellular stores, immunohistochemical doublestaining were performed. These experiments did not reveal a relevant colocalisation of both Ca^{2+} -channels. The specificity of the RyR-antibody used in immunohistochemistry was confirmed by a Western Blot. Immunofluorescent stainings revealed the existence of CD38/ADP-ribosyl cyclase in the colon epithelium of the rat; this enzyme catalyses the synthesis of cADP-ribose, a physiological agonist of RyR. As is the case with RyR-1, this peptide is localized cytoplasmatically in the enterocytes, evenly distributed along the crypt axis.

Both the intracellular Ca^{2+} -storage release in these cells and the mechanism of refilling were analysed. By way of PCR, the expression of SERCA subtypes-2b or -3 in the colon epithelium was proven. In order to differentiate between those two isoforms, again immunofluorescence was used. Both SERCA-2b and SERCA-3 have cytoplasmatic and nuclear localisations in this tissue and show a slight gradient from the surface of the crypts in direction of their fundus where they are expressed with a lower intensity.

Monochloramine, a substance that increases the opening probability of RyR, caused a release of intracellularly stored Ca^{2+} at fura-2-loaded crypts, which was blocked by ruthenium red. In contrast, under the same experimental conditions, arachidonic acid did not cause Ca^{2+} -release from intracellular reservoirs. In order to investigate the two most important Ca^{2+} -signalling pathways – by way of RyRs and IP_3 Rs – in direct functional comparison, mag-fura-2 experiments were performed.

Their results proved both mechanisms to be independent from each other; however, IP₃R-mediated release was always stronger than RyR-mediated release.

Consequently, at rat colonic epithelium there is an expression of RyR-1 beside IP₃R-2 and IP₃R-3. These channel types play a dominant role for the release of intracellular calcium in non-excitabile cells.

VII. Literaturverzeichnis

- Abdel-Latif, A. A.** (1986). Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol Rev*, 38(3), 227-272.
- Adebanjo, O. A., Anandatheerthavarada, H. K., et al.** (1999). A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca²⁺ homeostasis. *Nat Cell Biol*, 1(7), 409-414.
- Ashby, M. C., & Tepikin, A. V.** (2001). ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Semin Cell Dev Biol*, 12(1), 11-17.
- Bai, N., Lee, H. C., et al.** (2005). Emerging role of cyclic ADP-ribose (cADPR) in smooth muscle. *Pharmacol Ther*, 105(2), 189-207.
- Ballester, I., Gonzalez, R., et al.** (2005). Monochloramine induces acute and protracted colitis in the rat: response to pharmacological treatment. *Life Sci*, 76(25), 2965-2980.
- Barrett, K. E., & Keely, S. J.** (2000). Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol*, 62, 535-572.
- Baylor, S. M., & Hollingworth, S.** (2000). Measurement and Interpretation of Cytoplasmic Ca^{2+} . *News Physiol Sci*, 15, 19-26.
- Bennett, D. L., Cheek, T. R., et al.** (1996). Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *J Biol Chem*, 271(11), 6356-6362.
- Berridge, M. J.** (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32(5-6), 235-249.
- Berridge, M. J.** (2004). Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1742(1-3), 3-7.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., et al.** (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature*, 395(6703), 645-648.
- Berridge, M. J., Lipp, P., et al.** (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 11-21.
- Bezprozvanny, I.** (2005). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*, 38(3-4), 261-272.
- Binder, H., & Sandle, G.** (1994). Electrolyte transport in the mammalian colon. In L. Johnson (Ed.), *Physiology in gastrointestinal tract* (Vol. 2, pp. 2133-2171). New York: Raven Press.
- Binder, H., Sandle, G., et al.** (1991). Colonic fluid and electrolyte transport in health and disease. In R. Shorter (Ed.), *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease* (pp. 141-168). New York: Raven Press.
- Blaustein, M. P., & Lederer, W. J.** (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*, 79(3), 763-854.
- Bleich, M., Riedemann, N., et al.** (1996). Ca²⁺ regulated K⁺ and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells. *Pflugers Arch*, 432(6), 1011-1022.
- Bleisiegel, U.** (1986). Protein blotting. *Electrophoresis*, 7, 1-18.

- Blondel, O., Takeda, J., et al.** (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(15), 11356-11363.
- Böhme, M., Diener, M., et al.** (1991). Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. *Pflugers Arch*, 419(2), 144-151.
- Bootman, M. D., Berridge, M. J., et al.** (2002). Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol*, 12(16), R563-565.
- Bootman, M. D., Collins, T. J., et al.** (2001). Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol*, 12(1), 3-10.
- Bootman, M. D., Lipp, P., et al.** (2001). The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *J Cell Sci*, 114(Pt 12), 2213-2222.
- Brini, M., & Carafoli, E.** (2000). Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci*, 57(3), 354-370.
- Burk, S. E., Lytton, J., et al.** (1989). cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump. *J Biol Chem*, 264(31), 18561-18568.
- Burnette, W. N.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112(2), 195-203.
- Cima, R. R., Dubach, J. M., et al.** (2006). Intracellular Ca(2+) and Zn(2+) signals during monochloramine-induced oxidative stress in isolated rat colon crypts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(2), G250-261.
- Clementi, E., Riccio, M., et al.** (1996). The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of the nitric oxide/cGMP pathway. *J Biol Chem*, 271(30), 17739-17745.
- Coons, A.** (1958). Fluorescent antibody methods. In J. Daniel (Ed.), *General cytochemical methods* (pp. 399-422). New York: Academic Press.
- Denk, H.** (1989). *Immunhistochemische Färbemethoden* (Vol. 17. Auflage). München: Urban & Schwarzenberg.
- Denk, H.** (1989). Immunhistochemische Färbemethoden. In P. Böck (Ed.), *Mikroskopische Technik* (Vol. 17. Auflage, pp. 251 - 261). München: Urban & Schwarzenberg.
- Dharmasathaphorn, K., & Pandol, S. J.** (1986). Mechanism of chloride secretion induced by carbachol in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest*, 77(2), 348-354.
- Dode, L., De Greef, C., et al.** (1998). Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA. *J Biol Chem*, 273(22), 13982-13994.
- Dode, L., Wuytack, F., et al.** (1996). cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3 gene. *Biochem J*, 318 (Pt 2), 689-699.
- Doring, A., Diener, M., et al.** (1990). Arachidonic acid-induced secretion in the rat colon. Indomethacin-resistant neuronal and epithelial actions. *Eicosanoids*, 3(3), 149-155.

- Döring, A., Diener, M., et al.** (1990). Arachidonic acid-induced secretion in the rat colon. Indomethacin-resistant neuronal and epithelial actions. *Eicosanoids*, 3(3), 149-155.
- East, J. M.** (2000). Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps: recent advances in our understanding of structure/function and biology (review). *Mol Membr Biol*, 17(4), 189-200.
- Fawthrop, D. J., Boobis, A. R., et al.** (1991). Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol*, 65(6), 437-444.
- Field, M., & Semrad, C. E.** (1993). Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. *Annu Rev Physiol*, 55, 631-655.
- Fill, M., & Copello, J. A.** (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev*, 82(4), 893-922.
- Fleischer, S., Ogunbunmi, E. M., et al.** (1985). Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(21), 7256-7259.
- Franzini-Armstrong, C., & Protasi, F.** (1997). Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev*, 77(3), 699-729.
- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., et al.** (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev*, 46(2), 143-156.
- Frings, M., Schultheiss, G., et al.** (1999). Electrogenic Ca²⁺ entry in the rat colonic epithelium. *Pflugers Arch*, 439(1-2), 39-48.
- Gayán-Ramírez, G., Vanzeir, L., et al.** (2000). Corticosteroids decrease mRNA levels of SERCA pumps, whereas they increase sarcolipin mRNA in the rat diaphragm. *J Physiol*, 524 Pt 2, 387-397.
- Gélébart, P., Kovacs, T., et al.** (2002). Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem*, 277(29), 26310-26320.
- Genazzani, A. A., & Galione, A.** (1997). A Ca²⁺ release mechanism gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP. *Trends Pharmacol Sci*, 18(4), 108-110.
- Gerasimenko, O. V., Gerasimenko, J. V., et al.** (1995). ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell*, 80(3), 439-444.
- Giannini, G., Conti, A., et al.** (1995). The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol*, 128(5), 893-904.
- Greger, R.** (2000). Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol*, 62, 467-491.
- Greger, R., Bleich, M., et al.** (1997). Regulation of Ion Transport in Colonic Crypts. *News Physiol Sci*, 12, 62-66.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., et al.** (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6), 3440-3450.
- Guihard, G., Proteau, S., et al.** (1997). Does the nuclear envelope contain two types of ligand-gated Ca²⁺ release channels? *FEBS Lett*, 414(1), 89-94.

- Gunteski-Hamblin, A. M., Greeb, J., et al.** (1988). A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca²⁺ and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site. *J Biol Chem*, 263(29), 15032-15040.
- Hajnoczky, G., Csordas, G., et al.** (2000). Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell Calcium*, 28(5-6), 349-363.
- Hamilton, S. L.** (2005). Ryanodine receptors. *Cell Calcium*, 38(3-4), 253-260.
- Hanson, C. J., Bootman, M. D., et al.** (2004). Cell signalling: IP3 receptors channel calcium into cell death. *Curr Biol*, 14(21), R933-935.
- Harlow, E., & Lane, D.** (1988). *Antibodies - A laboratory manual*. New York: Cold spring Harbour Laboratory.
- Hirata, K., Dufour, J. F., et al.** (2002). Regulation of Ca(2+) signaling in rat bile duct epithelia by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. *Hepatology*, 36(2), 284-296.
- Hofer, A. M., & Machen, T. E.** (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(7), 2598-2602.
- Hofer, A. M., & Schulz, I.** (1996). Quantification of intraluminal free [Ca] in the agonist-sensitive internal calcium store using compartmentalized fluorescent indicators: some considerations. *Cell Calcium*, 20(3), 235-242.
- Humbert, J. P., Matter, N., et al.** (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(1), 478-485.
- Hussain, A., & Inesi, G.** (1999). Involvement of Sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+) ATPases in cell function and the cellular consequences of their inhibition. *J Membr Biol*, 172(2), 91-99.
- Hycr, K. L., Bownik, J. M., et al.** (2000). Ionic selectivity of low-affinity ratiometric calcium indicators: mag-Fura-2, Fura-2FF and BTC. *Cell Calcium*, 27(2), 75-86.
- Imagawa, T., Smith, J. S., et al.** (1987). Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca²⁺-permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem*, 262(34), 16636-16643.
- Inui, M., Saito, A., et al.** (1987). Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J Biol Chem*, 262(4), 1740-1747.
- Jones, P. M., Burns, C. J., et al.** (2004). The role of cytosolic phospholipase A(2) in insulin secretion. *Diabetes*, 53 Suppl 1, S172-178.
- Karon, B. S., Mahaney, J. E., et al.** (1994). Halothane and cyclopiazonic acid modulate Ca-ATPase oligomeric state and function in sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 33(46), 13928-13937.
- Khoo, K. M., Han, M. K., et al.** (2000). Localization of the cyclic ADP-ribose-dependent calcium signaling pathway in hepatocyte nucleus. *J Biol Chem*, 275(32), 24807-24817.

- Kim, Y. K., Cho, H. J., et al.** (1997). Caffeine- and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced 45Ca^{2+} releases in the microsomes of tracheal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 230(2), 247-250.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., et al.** (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972), 360-364.
- Knepel, W., Schofl, C., et al.** (1988). Arachidonic acid elevates cytosolic free calcium concentration in rat anterior pituitary cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 338(3), 303-309.
- Köckerling, A., & Fromm, M.** (1993). Origin of cAMP-dependent Cl^- secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. *Am J Physiol*, 264(5 Pt 1), C1294-1301.
- Kocks, S., Schultheiss, G., et al.** (2002). Ryanodine receptors and the mediation of Ca^{2+} -dependent anion secretion across rat colon. *Pflugers Arch*, 445(3), 390-397.
- Kubista, M., Akerman, B., et al.** (1987). Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*, 26(14), 4545-4553.
- Kunzelmann, K., & Mall, M.** (2002). Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*, 82(1), 245-289.
- Laflamme, K., Domingue, O., et al.** (2002). Immunohistochemical localization of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to the nucleus of different mammalian cells. *J Cell Biochem*, 85(1), 219-228.
- Lai, F. A., Misra, M., et al.** (1989). The ryanodine receptor- Ca^{2+} release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for a cooperatively coupled, negatively charged homotetramer. *J Biol Chem*, 264(28), 16776-16785.
- Laver, D. R.** (2006). Regulation of ryanodine receptors from skeletal and cardiac muscle during rest and excitation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33(11), 1107-1113.
- Ledbetter, M. W., Preiner, J. K., et al.** (1994). Tissue distribution of ryanodine receptor isoforms and alleles determined by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Biol Chem*, 269(50), 31544-31551.
- Lee, B. S., Sessanna, S., et al.** (2002). Expression and cellular localization of a modified type 1 ryanodine receptor and L-type channel proteins in non-muscle cells. *J Membr Biol*, 189(3), 181-190.
- Lee, H. C.** (2001). Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 317-345.
- Lee, H. C., & Aarhus, R.** (1991). ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD^+ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul*, 2(3), 203-209.
- Leite, M. F., Burgstahler, A. D., et al.** (2002). Ca^{2+} waves require sequential activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors in pancreatic acini. *Gastroenterology*, 122(2), 415-427.
- Leite, M. F., Dranoff, J. A., et al.** (1999). Expression and subcellular localization of the ryanodine receptor in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J*, 337 (Pt 2), 305-309.
- Lindqvist, S. M., Sharp, P., et al.** (1998). Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis. *Gastroenterology*, 115(5), 1131-1143.

- Lindstrom, C. G., Rosengren, J. E., et al.** (1979). Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*, 20(3), 523-536.
- Lipkin, M.** (1985). Growth and development of gastrointestinal cells. *Annu Rev Physiol*, 47, 175-197.
- Liu, X., & Ambudkar, I. S.** (2001). Characteristics of a store-operated calcium-permeable channel: sarcoendoplasmic reticulum calcium pump function controls channel gating. *J Biol Chem*, 276(32), 29891-29898.
- Lottspeich, F., & Zorbach, H.** (1998). *Bioanalytik*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Ludtke, S. J., Serysheva, II, et al.** (2005). The pore structure of the closed RyR1 channel. *Structure (Camb)*, 13(8), 1203-1211.
- Lytton, J., Westlin, M., et al.** (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 267(20), 14483-14489.
- Lytton, J., Westlin, M., et al.** (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 266(26), 17067-17071.
- MacLennan, D. H., Rice, W. J., et al.** (1997). The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem*, 272(46), 28815-28818.
- Maeda, N., Kawasaki, T., et al.** (1991). Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *J Biol Chem*, 266(2), 1109-1116.
- Marius, P., Guerra, M. T., et al.** (2006). Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 39(1), 65-73.
- Martonosi, A. N.** (1995). The structure and interactions of Ca(2+)-ATPase. *Biosci Rep*, 15(5), 263-281.
- Maruyama, T., Kanaji, T., et al.** (1997). 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem (Tokyo)*, 122(3), 498-505.
- McPherson, P. S., & Campbell, K. P.** (1993). The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem*, 268(19), 13765-13768.
- Meissner, G.** (1994). Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol*, 56, 485-508.
- Missiaen, L., Raeymaekers, L., et al.** (2004). SPCA1 pumps and Hailey-Hailey disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 322(4), 1204-1213.
- Monkawa, T., Hayashi, M., et al.** (1998). Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the rat kidney. *Kidney Int*, 53(2), 296-301.
- Moore, R. A., Nguyen, H., et al.** (1998). A transgenic myogenic cell line lacking ryanodine receptor protein for homologous expression studies: reconstitution of Ry1R protein and function. *J Cell Biol*, 140(4), 843-851.
- Morton-Jones, R. T., Cannell, M. B., et al.** (2006). Differential expression of ryanodine receptors in the rat cochlea. *Neuroscience*, 137(1), 275-286.
- Mountian, I., Manolopoulos, V. G., et al.** (1999). Expression patterns of sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in vascular endothelial cells. *Cell Calcium*, 25(5), 371-380.

- Mullis, K.** (1990). Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion, *Spektrum der Wissenschaft* (Vol. 6, pp. 60-67).
- Oba, T., Murayama, T., et al.** (2002). Redox states of type 1 ryanodine receptor alter Ca²⁺ release channel response to modulators. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(4), C684-692.
- O'Connell, P. J., Klyachko, V. A., et al.** (2002). Identification of functional type 1 ryanodine receptors in mouse dendritic cells. *FEBS Lett*, 512(1-3), 67-70.
- Ogawa, H., Stokes, D. L., et al.** (1998). Structure of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum: a view along the lipid bilayer at 9-Å resolution. *Biophys J*, 75(1), 41-52.
- Ozawa, T.** (2001). Ryanodine-sensitive Ca²⁺ release mechanism in non-excitabile cells (Review). *Int J Mol Med*, 7(1), 21-25.
- Ozawa, T., & Nishiyama, A.** (1997). Characterization of ryanodine-sensitive Ca²⁺ release from microsomal vesicles of rat parotid acinar cells: regulation by cyclic ADP-ribose. *J Membr Biol*, 156(3), 231-239.
- Parekh, A. B.** (2003). Store-operated Ca²⁺ entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol*, 547(Pt 2), 333-348.
- Parsons, D. S., & Paterson, C. R.** (1965). Fluid and Solute Transport across Fat Colonic Mucosa. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 50, 220-231.
- Patterson, R. L., Boehning, D., et al.** (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem*, 73, 437-465.
- Perez, C. F., Marengo, J. J., et al.** (1998). Cyclic ADP-ribose activates caffeine-sensitive calcium channels from sea urchin egg microsomes. *Am J Physiol*, 274(2 Pt 1), C430-439.
- Pessah, I. N., Waterhouse, A. L., et al.** (1985). The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 128(1), 449-456.
- Petersen, O. H., Petersen, C. C., et al.** (1994). Calcium and hormone action. *Annu Rev Physiol*, 56, 297-319.
- Pierobon, N., Renard-Rooney, D. C., et al.** (2006). Ryanodine receptors in liver. *J Biol Chem*, 281(45), 34086-34095.
- Plenge-Tellechea, F., Soler, F., et al.** (1997). On the inhibition mechanism of sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases by cyclopiazonic acid. *J Biol Chem*, 272(5), 2794-2800.
- Potten, C. S., Booth, C., et al.** (1997). The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol*, 78(4), 219-243.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., et al.** (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev*, 74(3), 595-636.
- Protasi, F., Franzini-Armstrong, C., et al.** (1998). Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J Cell Biol*, 140(4), 831-842.
- Renart, J., Reiser, J., et al.** (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7), 3116-3120.

- Ringer, S.** (1883). A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol*, 4(1), 29-42 23.
- Rossi, A. E., & Dirksen, R. T.** (2006). Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve*, 33(6), 715-731.
- Sachs, L.** (1992). Beurteilung linearer Kontraste nach Scheffé, *Angewandte Statistik* (pp. 626-631). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Schagger, H., & von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2), 368-379.
- Schneider, M. F.** (1994). Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol*, 56, 463-484.
- Schultheiss, G., & Diener, M.** (1998). K⁺ and Cl⁻ conductances in the distal colon of the rat. *Gen Pharmacol*, 31(3), 337-342.
- Schultheiss, G., Lan Kocks, S., et al.** (2002). Methods for the study of ionic currents and Ca²⁺-signals in isolated colonic crypts. *Biol Proced Online*, 3, 70-78.
- Schultheiss, G., Lan Kocks, S., et al.** (2005). Stimulation of colonic anion secretion by monochloramine: action sites. *Pflugers Arch*, 449(6), 553-563.
- Seidler, N. W., Jona, I., et al.** (1989). Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 264(30), 17816-17823.
- Sergeeva, M., Strokin, M., et al.** (2005). Regulation of intracellular calcium levels by polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, in astrocytes: possible involvement of phospholipase A2. *Reprod Nutr Dev*, 45(5), 633-646.
- Serysheva, II, Bare, D. J., et al.** (2003). Structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor revealed by electron cryomicroscopy. *J Biol Chem*, 278(24), 21319-21322.
- Shull, G. E.** (2000). Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases. *Eur J Biochem*, 267(17), 5284-5290.
- Siefjediers, A., Hardt, M., et al.** (2007). Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP(3)) receptor subtypes at rat colonic epithelium. *Cell Calcium*, 41(4), 303-315.
- Singh, S. K., Binder, H. J., et al.** (1995). Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. *J Clin Invest*, 96(5), 2373-2379.
- Sobotta, J., & Becher, H.** (1972). Verdauungsapparat. In J. Staubesand (Ed.), *Atlas der Anatomie des Menschen* (Vol. 2, pp. 61-143). München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg.
- Soler, F., Plenge-Tellechea, F., et al.** (1998). Cyclopiazonic acid effect on Ca²⁺-dependent conformational states of the sarcoplasmic reticulum ATPase. Implication for the enzyme turnover. *Biochemistry*, 37(12), 4266-4274.
- Sorrentino, V.** (1995). The ryanodine receptor family of intracellular calcium release channels. *Adv Pharmacol*, 33, 67-90.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98(3), 503-517.
- Spassova, M. A., Soboloff, J., et al.** (2004). Calcium entry mediated by SOCs and TRP channels: variations and enigma. *Biochim Biophys Acta*, 1742(1-3), 9-20.

- Specht, W.** (1977). Morphology of intestinal wall. In F. Lauterbach (Ed.), *Intestinal permeation* (pp. 4-40). Amsterdam, Oxford: Excerpta Medica.
- Strabel, D., & Diener, M.** (1995). Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol*, 274(1-3), 181-191.
- Takeshima, H., Nishimura, S., et al.** (1993). A brain-specific transcript from the 3'-terminal region of the skeletal muscle ryanodine receptor gene. *FEBS Lett*, 322(2), 105-110.
- Tamai, H., Kachur, J. F., et al.** (1991). Monochloramine, a neutrophil-derived oxidant, stimulates rat colonic secretion. *J Pharmacol Exp Ther*, 257(2), 887-894.
- Taylor, C. W.** (2006). Store-operated Ca²⁺ entry: A STIMulating stOrai. *Trends Biochem Sci*, 31(11), 597-601.
- Taylor, C. W., & Laude, A. J.** (2002). IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium*, 32(5-6), 321-334.
- Thastrup, O.** (1990). Role of Ca²⁺(+)-ATPases in regulation of cellular Ca²⁺ signalling, as studied with the selective microsomal Ca²⁺(+)-ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions*, 29(1-2), 8-15.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., et al.** (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(7), 2466-2470.
- Towbin, H., Staehelin, T., et al.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354.
- Tsien, R.** (1986). Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling. *TIBS*, 11, 450-455.
- Tsien, R. W., & Tsien, R. Y.** (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 715-760.
- Tsien, R. Y.** (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19(11), 2396-2404.
- Tunwell, R. E., & Lai, F. A.** (1996). Ryanodine receptor expression in the kidney and a non-excitabile kidney epithelial cell. *J Biol Chem*, 271(47), 29583-29588.
- Verma, V., Carter, C., et al.** (1996). Identification and function of type-2 and type-3 ryanodine receptors in gut epithelial cells. *Biochem J*, 319 (Pt 2), 449-454.
- Warth, R., Hamm, K., et al.** (1999). Molecular and functional characterization of the small Ca²⁺-regulated K⁺ channel (rSK4) of colonic crypts. *Pflugers Arch*, 438(4), 437-444.
- Welsh, M. J., Smith, P. L., et al.** (1982). Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science*, 218(4578), 1219-1221.
- Woolcott, O. O., Gustafsson, A. J., et al.** (2006). Arachidonic acid is a physiological activator of the ryanodine receptor in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium*, 39(6), 529-537.
- Wu, K. D., Lee, W. S., et al.** (1995). Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol*, 269(3 Pt 1), C775-784.

- Wuytack, F., Dode, L., et al.** (1995). The SERCA3-type of organellar Ca²⁺ pumps. *Biosci Rep*, 15(5), 299-306.
- Wuytack, F., Eggermont, J. A., et al.** (1989). Antibodies against the non-muscle isoform of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-transport ATPase. *Biochem J*, 264(3), 765-769.
- Wuytack, F., Papp, B., et al.** (1994). A sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3-type Ca²⁺ pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J Biol Chem*, 269(2), 1410-1416.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., et al.** (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, 32(5-6), 279-305.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., et al.** (2003). PMR1/SPCA Ca²⁺ pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca²⁺ store. *Pflugers Arch*, 446(2), 148-153.
- Xu, L., Tripathy, A., et al.** (1999). Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. *J Biol Chem*, 274(46), 32680-32691.
- Zhang, X., Wen, J., et al.** (1999). Ryanodine and inositol trisphosphate receptors are differentially distributed and expressed in rat parotid gland. *Biochem J*, 340 (Pt 2), 519-527.
- Zima, A. V., Copello, J. A., et al.** (2004). Effects of cytosolic NADH/NAD(+) levels on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in permeabilized rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 555(Pt 3), 727-741.
- Zucchi, R., & Ronca-Testoni, S.** (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev*, 49(1), 1-51.

Danksagung

Für ihre Hilfsbereitschaft, für ihr Wissen und die Unterstützung, die sie mir gewährt haben, bin ich vielen Menschen zu Dank verpflichtet.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Martin Diener danken, der durch seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, Geduld und vor allem Zeit zum wesentlichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Durch sein umfangreiches Wissen bewahrte er mich vor so mancher Tücke.

Gedankt sei auch dem Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“, das mir durch seine finanzielle Unterstützung den nötigen Freiraum zur Durchführung dieser Arbeit schuf.

Danke an Frank Wuytack für die Bereitstellung der SERCA-Antikörper.

Danke an Anne Siefjediers, die mich in die Grundlagen der Immunhistochemie einwies und auch Dank an Britta Hennig, die mich mit der Imaging-Technik vertraut machte und die für das Korrekturlesen meiner Arbeit immer Zeit fand.

Bei Bärbel Schmidt, Eva-Maria Haas und Alice Metternich möchte ich mich für die Einführung in die Laborarbeit bedanken und bei Brigitta Brück für die Unterstützung bei der Durchführung der PCR-Technik.

Die für die Durchführung des Western Blots nötige Hilfe, für die ich mich hier bedanken möchte, erhielt ich von Prof. Dr. rer. nat. Georgios Scheiner-Bobis und Frau Ulrike Kirch.

Daniela Hild sei besonders für ihre arbeitsgruppenübergreifende Hilfe gedankt. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite, vielen Dank dafür.

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

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Physiologie möchte ich mich für das gute Arbeitsklima, das dort herrscht, bedanken.

Schlussendlich sage ich danke zu meiner Familie und meinem Freund, die mich alle während meiner Promotion unterstützt haben, wo sie nur konnten. Danke.

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
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5195-5



9 783835 1951952