

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

**Der nicht-selektive Kationenkanal
am Kolon der Ratte
– Charakterisierung, Regulation und
Interaktion mit dem Na⁺/Ca²⁺-Austauscher**

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

Eingereicht von
Gisela Seip

Gießen 2002

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

**Der nicht-selektive Kationenkanal
am Kolon der Ratte
– Charakterisierung, Regulation und
Interaktion mit dem Na⁺/Ca²⁺-Austauscher**

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

Eingereicht von
Gisela Seip
Tierärztin aus
Limburg a. d. Lahn

Gießen 2002

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Diener

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frieder Lutz

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2002

Für meine Eltern

Abkürzungen	
I Einleitung	1
I.1 Das Kolon – Aufbau und Funktion	1
<i>I.1.1 Funktion des Kolons im Gastrointestinaltrakt</i>	3
I.2 Mechanismen des Elektrolyttransports	4
<i>I.2.1 Transportsysteme in der Plasmamembran</i>	4
<i>I.2.2 Resorption und Sekretion am Kolonepithel</i>	5
<i>I.2.3 Second messenger als intrazelluläre Transformatoren extrazellulärer Signale</i>	8
I.3 Ca^{2+} als Vermittler in der zellulären Kommunikation	10
<i>I.3.1 Rezeptoren der intrazellulären Speicher</i>	10
<i>I.3.2 Ca^{2+}-Rekrutierung an erregbaren Strukturen</i>	13
I.4 Der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom	15
<i>I.4.1 Ca^{2+}-Rekrutierung an nichterregbaren Strukturen</i>	15
<i>I.4.1.1 Eigenschaften differierender Speicher-gesteuerter Kanäle</i>	17
<i>I.4.2 Mögliche Kopplungsmechanismen zwischen intrazellulärem Speicher und dem von ihm gesteuerten kapazitativen Ca^{2+}-Einstrom</i>	18
I.5 Eigene Fragestellung	21
II Material und Methoden	23
II.1 Versuchstiere	23
II.2 Elektrolytlösungen	23
<i>II.2.1 Lösungen für die Präparation</i>	23
<i>II.2.2 Lösungen bei Patch-Clamp-Messungen</i>	24
<i>II.2.2.1 Perfusionslösungen</i>	24
<i>II.2.2.2 Pipettenlösungen</i>	25
<i>II.2.3 Lösungen für die Imaging-Messungen</i>	27
<i>II.2.4 Lösungen für die Ussingkammer-Messungen</i>	28

Inhaltsverzeichnis

II.3 Gewebepräparation	28
II.3.1 Präparation der Darmschleimhaut	28
II.3.2 Präparation isolierter Krypten	29
II.4 Patch-Clamp-Technik	31
II.4.1 Patch-Clamp-Konfigurationen	32
II.4.1.1 Vorzeichenkonventionen	34
II.4.2 Der Patch-Clamp-Messstand	35
II.4.2.1 Mikroskop	35
II.4.2.2 Messkammer und Perfusionssystem	36
II.4.2.3 Messtisch und mechanische Komponenten	37
II.4.2.4 Elektronische Komponenten	38
II.4.2.5 Elektroden und Patchpipette	39
II.4.2.6 Datenerfassung	41
II.4.3 Praktische Durchführung eines Patch-Clamp-Experimentes	42
II.4.3.1 Strom-Spannungskurven	46
II.4.4 Berechnungen	47
II.4.4.1 Delta-Strom-Kurven	47
II.4.4.2 Gleichgewichtspotential und Nernst-Gleichung	47
II.5 Imaging-Technik	49
II.5.1 Grundlagen der intrazellulären Ca^{2+} -Messung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fura-2	49
II.5.1.1 Exzitationsspektren und Bindungsverhalten von Fura-2	49
II.5.1.2 Kalibrierung des Systems und Berechnung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration	54
II.5.2 Der Imaging-Messstand	56
II.5.2.1 Mikroskop und elektronische Komponenten	56
II.5.2.2 Messkammern	58
II.5.3 Versuchsdurchführung	58
II.5.4 Datenerfassung	60

Inhaltsverzeichnis

II.6 Ussingkammer-Technik	61
II.6.1 Die Messkammer	61
II.6.2 Elektrische Messungen	63
II.6.3 Datenerfassung	67
II.7 Chemikalien	67
II.8 Statistik	68
III Resultate	69
III.1 Charakterisierung des nicht-selektiven Kationenkanals	69
III.1.1 Selektivität gegenüber monovalenten Kationen	69
III.1.2 Hemmwirkung divalenter Kationen auf den nicht-selektiven Kationenkanal	73
III.2 Interaktion zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und nicht-selektivem Kationenkanal	77
III.2.1 Wirkung von cAMP auf den nicht-selektiven Kationenkanal	77
III.2.2 Effekt einer Zellvolumenänderung auf den nicht-selektiven Kationenkanal	80
III.2.3 Wirkung von NO auf den nicht-selektiven Kationenkanal	84
III.2.3.1 Effekte von NO auf das intakte Kolonepithel	84
III.2.3.2 Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch NO	87
Rekrutierung des Calciums aus dem Extrazellulärraum	89
III.2.3.3 Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals durch NO	91
III.2.3.4 Bedeutung von NO in der Kommunikation zwischen Ca^{2+} -Speicher und nicht-selektivem Kationenkanal	94
III.3 Interaktion zwischen nicht-selektivem Kationenkanal und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher	95
III.3.1 Nachweis eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers am Kolonepithel	96

III.3.2 Funktion des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers unter basalen Bedingungen	102
III.3.3 Transportmodus des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers während der Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals	105
IV Diskussion	107
IV.1 Passage-Eigenschaften des nicht-selektiven Kationenkanals	107
IV.1.1 – für monovalente Kationen	108
IV.1.2 – für divalente Kationen	110
IV.2 Mechanismen zur Aktivierung/Inaktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals	111
IV.2.1 Die direkte Kopplung Ca^{2+} -Speicher – Speicher-gesteuerter Kanal in der Plasmamembran	112
IV.2.1.1 Regulation des nicht-selektiven Kationenkanals über eine Änderung des Zellvolumens	114
IV.2.2 Die indirekte Kopplung Ca^{2+} -Speicher – Speicher-gesteuerter Kanal in der Plasmamembran	117
IV.2.2.1 Nicht-selektiver Kationenkanal und intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration unter cAMP-Wirkung	118
IV.2.2.2 Stickstoffmonoxid (NO) – ein Molekül in der Regulation des nicht-selektiven Kationenkanals	121
NO – Wirkung auf den Wasser- und Elektrolyttransport am Darm	123
NO - Wirkung am Kolonepithel – Induktion einer Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Sekretion	123
NO - Wirkung am Kolonepithel – Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals ohne die vorherige Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher	128
IV.3 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher – seine Funktion in der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase	131

Inhaltsverzeichnis

IV.3.1	<i>Der $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$-Austauscher</i>	131
IV.3.2	<i>Der $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$-Austauscher - funktioneller Nachweis seiner Expression am Kolonepithel</i>	133
IV.3.3	<i>Der $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$-Austauscher – Ausschleusung von Ca^{2+} unter basal niedriger Cl^--Sekretion</i>	135
IV.3.4	<i>Der $\text{Na}^+ / \text{Ca}^+$-Austauscher - die physiologische Bedeutung des dominierenden Na^+-Einstroms</i>	136
V	Zusammenfassung	138
VI	Summary	140
VII	Literaturverzeichnis	142
VIII	Danksagung	159

Abkürzungen

Abkürzungen

AM	Acetoxymethylester
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(aminophenoxy)ethan- tetraessigsäure
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'- monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'- monophosphat
CIF	Ca ²⁺ Influx Faktor
DAG	Diacylglycerol
DCB	Dichlorobenzamil
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol- bis(2-aminoethyl)- tetraessigsäure
ENS	Enterales Nervensystem
Fura-2	Ca ²⁺ -sensitiver Fluoreszenz- Farbstoff
GEA 3162	lipophiler NO-Donor 1,2,3,4-Oxatriazolium, 5-amino-3-(3,4-dichlorophenyl)- chlorid
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein

Abkürzungen

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- N'-(2-ethanolsulfonsäure)
I_{in} / I_{out}	Einwärtsstrom /Auswärtsstrom in pA
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
I _{sc}	Kurzschlussstrom
I/V-Kurve	Strom-Spannungskurve
K _D	Dissoziationskonstante
K _{gluc}	Kaliumgluconat
μEq	Mikro-Equivalent (1 μEq·h ⁻¹ ·cm ⁻² = 26,9 μA·cm ⁻²)
NaGluc	Natriumgluconat
NMDG ⁺	N-Methyl-D-Glucamin
NO	Stickstoffmonoxid
NSKK	nicht-selektiver Kationenkanal
PD	Potentialdifferenz
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5- biphosphat
PLC	Phospholipase C
RVD	Regulatory volume decrease
RVI	Regulatory volume increase
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwerts (standard error of the mean)

Abkürzungen

SERCA	Sarkoplasmtische/ Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase
SNP	Natrium-Nitroprussid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration

I Einleitung

I.1 Das Kolon – Aufbau und Funktion

Die Aufnahme von Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen ist für einen Organismus lebensnotwendig, eine konstante Versorgung hiermit gewährt der Gastrointestinaltrakt. Die aufgenommene Nahrung wird dort in ihre Bestandteile zerlegt und resorbiert, gleichzeitig werden Sekretionsvorgänge initiiert. Nach mechanischer und enzymatischer Behandlung des Chymus und der Nährstoffresorption gelangt der Inhalt des Dünndarms über die Ileozäkalklappe in den Dickdarm. An diesem lassen sich anatomisch verschiedene Abschnitte, das Zäkum, das Kolon und das Rektum, unterscheiden.

Das Kolon, an dem meine Untersuchungen vorgenommen wurden, stellt den Hauptanteil des Dickdarms dar. Seine Mukosa besitzt im Gegensatz zur Dünndarmmukosa keine Zotten. Die Epitheloberfläche wird von in die Tiefe reichenden Krypten (*Glandulae intestinales*) unterbrochen (s. Abb. I.1 und I.2) Diese weisen verschiedene Zelltypen auf. *Enterozyten*, die dominierende Zellform, resorbieren und sezernieren Elektrolyte und Wasser, *Becherzellen* produzieren Muzin und *enteroendokrine Zellen*, eine heterogene Zellpopulation, beinhalten Somatostatin, Serotonin, Glukagon u. a. (Übersicht bei Christensen, 1991). Undifferenzierte Zellen (*Stammzellen*), die im Fundus der Krypten liegen, teilen und differenzieren sich in die o.g. Zelltypen. Sie bewegen sich entlang der Kryptenachse in Richtung Oberfläche und reifen auf diesem Weg (Lipkin, 1985).



Abb. I.1

Darmwand des menschlichen Kolons (Hämatoxylin/Eosin Färbung;
Quelle: Klinische Physiologie, Freie Universität Berlin)

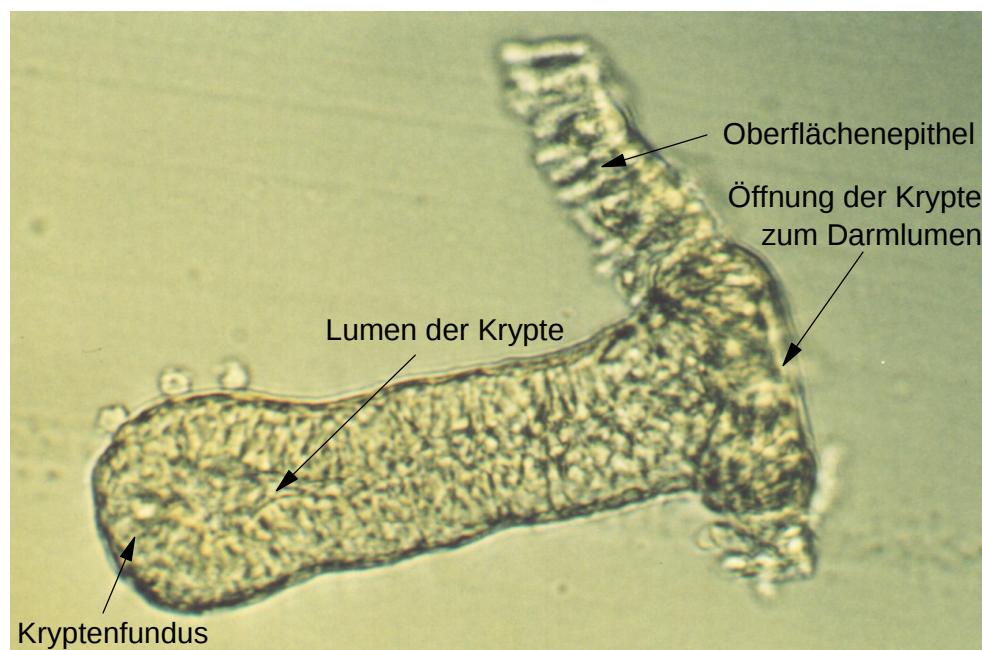


Abb. I.2 Kryptenfundus

Einzelne Krypte mit unterschiedlichen Abschnitten (Kolon der Ratte)

I.1.1 Funktion des Kolons im Gastrointestinaltrakt

Hauptaufgabe des Kolons ist die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes im Organismus. Ca. 90% der Flüssigkeit, die aus dem Dünndarm in das Kolon gelangt, wird hier resorbiert (Ganong, 1995). Die Abgabe von Flüssigkeit in das Darmlumen ist deutlich geringer, sezerniert wird eine plasmaisotone, Mucin-, HCO_3^- - und K^+ -reiche, alkalische Flüssigkeit.

Lokalisiert ist der Vorgang der Resorption und Sekretion sowohl am Oberflächenepithel als auch in den Kolonkrypten. Das ehemals existierende Modell des Wasser- und Elektrolyttransports am Kolon beinhaltete eine räumliche Trennung von resorptiven und sekretorischen Prozessen. Eine Sekretion fand demnach ausschließlich in den Kryptenzellen, die Resorption nur in den Oberflächenzellen statt (Welsh et al., 1982). An isolierten, mikroperfundierten Krypten wurde jedoch, neben der reversiblen Induktion einer Chloridsekretion durch Sekretagoga, eine Natrium-abhängige basale Flüssigkeitsresorption nachgewiesen (Singh et al., 1995; Binder et al., 1997), so dass eine strikte Trennung in Resorption-Oberfläche und Sekretion-Krypte nicht weiter aufrecht zu erhalten ist.

Im Rahmen der Epithelzellentwicklung verändern sich die Sekretions- und Resorptionsfähigkeiten. Eine undifferenzierte Zelle im Fundusbereich zeigt vor allem eine NaCl -Sekretion. Im Laufe ihrer Entwicklung wandelt sie sich zu einer Zelle, die sowohl sezerniert als auch resorbiert und weist nach weiterer Differenzierung und Wanderung in Richtung Oberfläche vorwiegend eine Resorption von Elektrolyten auf (Greger et al., 1997).

Der Mechanismus dieser Transportumkehr unterliegt der Kontrolle verschiedener Second messenger.

I.2 Mechanismen des Elektrolyttransports

Das Darmepithel stellt eine wichtige Barriere zwischen Kompartimenten mit unterschiedlichen Konzentrationen an gelösten Substanzen dar, dem Darmlumen auf der einen, den Blutgefäßen auf der anderen Seite. Dies erfordert gerichtete Transportprozesse durch den Zellverband mit Hilfe von Transport- und Kanalproteinen.

I.2.1 Transportsysteme in der Plasmamembran

Die Möglichkeit der Diffusion durch die Zellmembran besteht in größerem Umfang alleine für lipidlösliche oder kleine, ungeladene Moleküle wie z.B. Harnstoff, H_2O , CO_2 und O_2 . Für Elektrolyte kommt dieser Permeationsweg normalerweise nicht in Frage. Ionenkanäle, Carrierproteine und ATP-getriebene Pumpen transportieren Moleküle, die kaum in der Lage sind zu diffundieren. In die Membran eingelagert, fungieren diese Proteine als „Schleuse“ zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten.

Ionenkanäle, d.h. Kanalproteine, die eine wassergefüllte Pore besitzen, erlauben selektiv den Durchtritt einzelner Ionenarten. Ihre Selektivität beruht auf integrierten Festladungen und spezifischen Bindungsstellen, die als „Wächter“ fungieren und nur für bestimmte Moleküle die Passage ermöglichen (Dudel, 1995). Die Richtung des Ionenflusses wird durch den elektrochemischen Gradienten des permeierenden Ions bestimmt. Das Öffnen des Kanals führt zu einer kontrollierten, passiven Passage der Ionen entlang dem Gefälle eines Gradienten (Alberts et al, 1995). Die Regulation des Offenzustandes kann über die Bindung eines Agonisten an einen Rezeptor, z.B.

Acetylcholin, über Potentialänderungen der Membran und über die Änderung des Phosphorylierungszustandes des Kanalproteins erfolgen.

Transportproteine binden im Gegensatz zu Ionenkanälen spezifisch zu transportierende Moleküle, ändern ihre Konformation und geben das Substrat jenseits der Membran wieder ab. Auch hier dient der elektrochemische Gradient als Antrieb für den Transport. Eine Vielzahl von Carrierproteinen arbeiten derart, dass sie den Na^+ -Gradienten nutzen, um ein anderes Substrat mit in die Zelle oder aus der Zelle zu schleusen (sekundär aktiver Transport). Ein gleichgerichteter Transport wird als Symport oder Cotransport, ein Austausch von Substraten als Antiport bezeichnet. Ionenpumpen oder ATPasen arbeiten unter direktem Verbrauch von ATP, sie transportieren aktiv gelöste Teilchen gegen ihren Konzentrations- bzw. Potentialgradienten (= „bergauf“) über die Zellmembran. Unter Energieverbrauch entsteht ein transmembranärer Ionenkonzentrationsgradient. Durch Trennung der elektrisch unterschiedlich geladenen Teilchen, die, von der für sie nicht permeablen, isolierenden Zellmembran, an einem Ausgleich gehindert werden, ist die Zelle in der Lage Energie zu konservieren, Energie, die bei Bedarf für weitere Transportprozesse herangezogen werden kann.

1.2.2 Resorption und Sekretion am Kolonepithel

Im distalen Kolon findet mit Hilfe der in die Plasmamembran integrierten Proteine sowohl eine aktive Resorption von Na^+ , K^+ und Cl^- , als auch eine aktive Sekretion von K^+ und Cl^- statt (Übersicht bei Binder & Sandle, 1994). Die Mechanismen, die diesen

Transportprozessen zugrunde liegen, sind relativ gut untersucht. Im Mittelpunkt des Ionentransports steht die, in der basolateralen (den Blutgefäßen zugewendet) Plasmamembran verankerte, Na^+/K^+ -ATPase. Sie ist der Motor, der unter Energieverbrauch weitere Transportvorgänge antreibt. Unter ATP-Spaltung schleust sie 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle und 2 K^+ -Ionen in das Zytoplasma (Alberts et al., 1995), so dass die intrazelluläre Na^+ -Konzentration konstant auf niedrigem Niveau, die intrazelluläre K^+ -Konzentration auf hohem Niveau gehalten wird. Dieser elektrogene Vorgang trägt so zu einem negativen Membranpotential bei und energetisiert, aufgrund des aufgebauten elektrochemischen Gradienten, weitere Transportprozesse an der Kolonmukosa.

Der ebenfalls an der basolateralen Membran vorhandene $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter ist für die physiologische Cl^- -Aufnahme und damit auch für eine Cl^- -Sekretion der Zelle bedeutend. Er nutzt die Triebkraft für Na^+ und transportiert Cl^- und K^+ sekundär aktiv gegen ihre elektrischen bzw. chemischen Gradienten in die Zelle. Cl^- verlässt das Zytoplasma über apikale, d.h. dem Darmlumen zugewandte, Chloridkanäle (Frizzell et al., 1979), unterstützt durch die Hyperpolarisation der Zelle, die durch den Ausstrom von K^+ -Ionen via basolateraler K^+ -Kanäle hervorgerufen wird. Durch das sich entwickelnde lumennegative, transepitheliale Potential entsteht ein parazellulärer Natriumfluss parallel der Cl^- -Sekretion. Wasser strömt entlang des osmotischen Gradienten, der durch die Ionenverschiebung entsteht (s. Abb. I.3), in das Darmlumen.

An Enterozyten nachgewiesen sind weiterhin: die elektroneutrale Resorption von Na^+ und Cl^- über die parallele Schaltung des Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons$

$\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$; Frizzell et al., 1976), die Resorption von Na^+ über epitheliale Na^+ -Kanäle (ENaC; Barbry et al., 1997; Greger et al., 1997), die Resorption von K^+ via der H^+/K^+ -ATPase an der luminalen Membran (Cougnon et al., 1996), die Resorption von kurzkettigen Fettsäuren parallel zur Abgabe von Anionen (Binder & Sandle, 1994) und die Sekretion von K^+ -Ionen über luminalen K^+ -Kanäle (Kerstan et al., 1998).

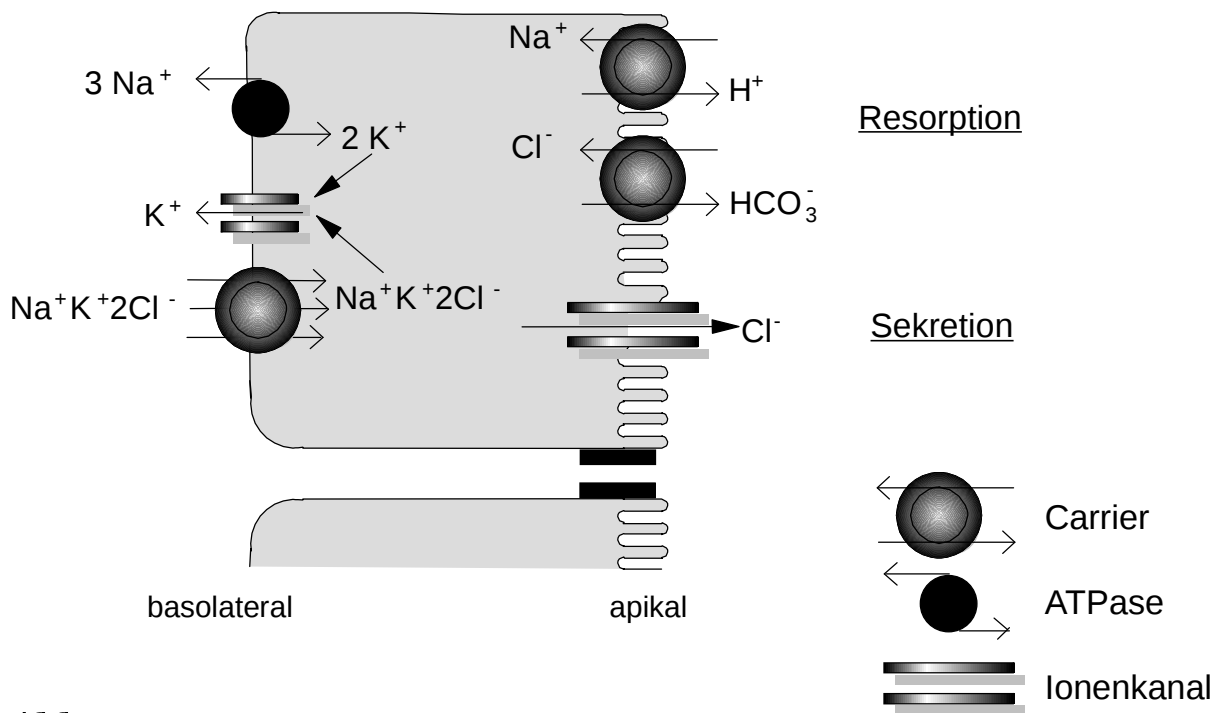


Abb. I.3

Die wichtigsten Transportproteine (weitere Transportsysteme s. Text) für Sekretions- und Resorptionsprozesse.

Die Resorption von Elektrolyten am distalen Kolon findet vorwiegend über parallel geschaltete Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher statt. Für den Aufbau des Na^+ -Gradienten transportiert die Na^+/K^+ -ATPase unter Energieverbrauch Na^+ aus dem Zytoplasma.

Für die Ionensekretion schleust der basolateral befindliche $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter Cl^- in die Zelle, welches hier akkumuliert und über apikal gelegene Cl^- -Kanäle sezerniert wird.

1.2.3 Second messenger als intrazelluläre Transformatoren extrazellulärer Signale

Eine Stimulation des Kolons mit Neurotransmittern, z.B. Acetylcholin (Lindqvist et al., 1998) und VIP (vasoaktives intestinales Peptid), lokal freigesetzte Autakoide (Prostaglandine, Guanylin) oder pathophysiologische Faktoren, z.B. bakterielle Toxine wie das hitzestabile Escherichia coli-Toxin und das Choleratoxin, führen zu einer Sekretion von NaCl und Wasser, der Resorptionsprozess wird gleichzeitig gehemmt (Übersicht bei Barrett & Keely, 2000).

Das Umschalten von physiologisch überwiegend stattfindender Resorption zu einer Sekretion wird durch verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege gesteuert. Über unterschiedliche Second messenger werden intrazelluläre Botenstoffkaskaden eingeleitet, die zu einer erheblichen Verstärkung des initialen Signals führen. Die bisher am besten untersuchten Second messenger sind zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und Ca^{2+} .

cAMP wird aus ATP durch die membranständige Adenylatzyklase gebildet und steuert u.a. über Proteinkinasen des Typs A Phosphorylierungsprozesse. An Enterozyten hat cAMP stimulierende Effekte auf Cl^- -Kanäle (Typ CFTR) in der luminalen Membran und auf basolaterale K^+ -Kanäle, vermutlich des Typs $\text{K}_{\text{v}}\text{LQT}_1$ (Übersicht bei Greger, 2000) mit einer Leitfähigkeit von < 3 pS (Bleich & Warth, 2000). Hemmende Effekte des Second messengers zielen luminal auf den Na^+/H^+ -Austauscher (Binder & Sandle, 1994) und indirekt, über die Aktivierung des CFTR-Kanals, auf den epithelialen Na^+ -Kanal ENaC (Ecke et al., 1996a; Mall et al., 1999).

Der Botenstoff cGMP führt ebenfalls zur Sezernierung von Chlorid in das Darmlumen (Nobles et al., 1991; Markert et al., 1999). Zum einen wird eine direkte Stimulation des luminalen Cl⁻-Kanals via cGMP regulierter Proteinkinase G II proklamiert (Vaandrager et al., 2000), zum anderen kann der Second messenger eine Phosphodiesterase (Typ V) hemmen, welches indirekt zu einer intrazellulären cAMP-Konzentrationserhöhung führt (Nobles et al., 1991).

Die Konzentration von Ca²⁺-Ionen im Zytoplasma ist normalerweise sehr gering (10^{-7} mol·l⁻¹). Ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt am Kolonepithel primär zur Aktivierung von Kaliumleitfähigkeiten. Basolateral ist ein „small conductance“ 16 pS K⁺-Kanal (Bleich et al., 1996; Nielsen et al., 1998; Warth et al., 1999) betroffen, apikal zeigt sich ein noch unidentifizierter K⁺-Kanal durch Ca²⁺ aktivierbar (Greger, 2000). Die daraus resultierende Hyperpolarisation der Zelle hat wiederum eine Cl⁻-Sekretion in das Darmlumen zur Folge (s. Abb. I.6).

Die Präsenz eines Cl⁻(Ca²⁺)-Kanals, der über eine direkte Aktivierung durch Ca²⁺ öffnet, wurde bisher nur am *humanen Kolonepithel* (hCLCA1) dargestellt (Fuller & Benos, 2000; Kidd & Thorn, 2000), jedoch ist diese Leitfähigkeit an weiteren Epithelien, z.B dem bovinen Trachealepithel (bCLCA1) ebenfalls vorhanden (Fuller & Benos, 2000).

I.3 Ca^{2+} als Vermittler in der zellulären Kommunikation

Ca^{2+} als kommunikatives Instrument der Zelle stand im Mittelpunkt meiner Untersuchungen. Als *universeller* Botenstoff des Organismus kontrolliert dieses Kation ein breites Spektrum zellulärer Prozesse. Jede Bewegung, jeder Herzschlag, Informationsverarbeitung und Erinnerung, Fertilisation und Apoptose werden durch Ca^{2+} vermittelt. Als Second messenger transformiert es extrazelluläre Signale und setzt diese in intrazelluläre Regulationsmechanismen um. Um diese Ergebnisse zu erzielen, müssen die von Ca^{2+} ausgehenden Signale sehr variabel und präzise regulierbar sein.

I.3.1 Rezeptoren der intrazellulären Speicher

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wird in ruhenden Zellen aktiv zwischen 20-100 nmol·l⁻¹ gehalten. Hierfür zuständig sind Transportproteine. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher koppeln den transmembranären Na^+ -Gradienten an den Ca^{2+} -Export. Ca^{2+} -Pumpen nutzen die Energie aus der Hydrolyse von ATP zur Einschleusung des Ions in intrazelluläre Speicher und zur Ca^{2+} -Ausschleusung über die Zellmembran in das Interstitium. Extrazellulär liegt die physiologische Ca^{2+} -Konzentration bei Säugetieren mit ~ 2,5 mmol·l⁻¹ um den Faktor 10⁴-10⁵ deutlich höher als intrazellulär. Dieser Ca^{2+} -Konzentrationsgradient führt bei entsprechender Reizung der Zelle und Öffnung einer Vielzahl von unterschiedlich gesteuerten Kanälen zu einem passiven Influx des Kations. Für die intrazelluläre Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels stehen jedoch weitere Ressourcen zur Verfügung, denn sowohl das Endoplasmatische Retikulum als auch Mitochondrien und Zellkernmembran sind in der Lage Ca^{2+} zu speichern. Die im

Endoplasmatischen Retikulum herrschende Ca^{2+} -Konzentration ist ebenfalls weit höher als die des Zytoplasmas (heterogene Ca^{2+} -Konzentrationen bis in den mM-Bereich; Montero et al., 1997). Zwei verschiedene Arten intrazellulärer Kanäle sind in der Membran dieses Organells bekannt, die Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3)-Rezeptoren und Ca^{2+} -sensitive Ca^{2+} -Kanäle, die der Ryanodin-Rezeptor-Familie (RyRs) zuzurechnen sind (Berridge, 1997). Die IP_3 -Rezeptoren werden durch den Botenstoff IP_3 aktiviert und für Ca^{2+} sensibilisiert. Ca^{2+} strömt entlang seines Konzentrationsgradienten in das Zytoplasma und wirkt retrograd stimulierend auf den Kanal. Dieses Signal kann in vielen Zelltypen zusätzlich durch eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung über RyRs potenziert werden (s. Abb. I.4).

Kapazitiver Calciueinstrom:
selektive Calcium-und
nicht-selektive Kationenkanäle

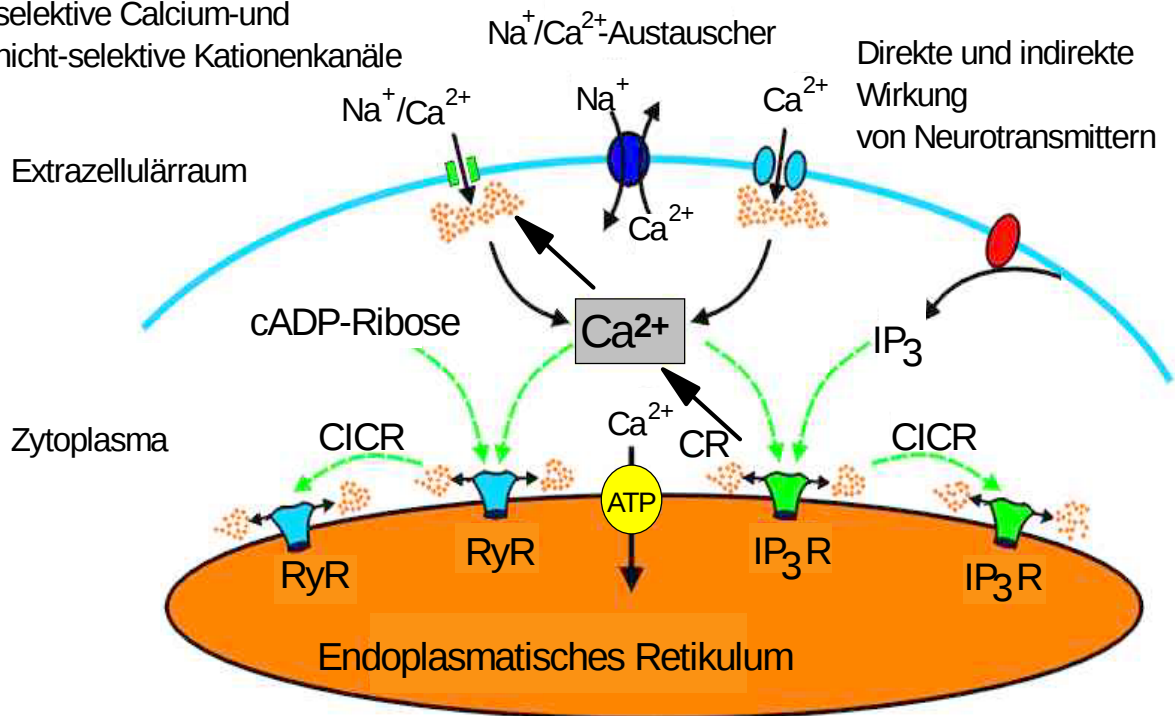


Abb. I.4

Schematische Darstellung der Ca²⁺-Freisetzung an intrazellulären Ca²⁺-Speichern (Quelle: Institut für Biologische Informationsverarbeitung, FZ Jülich; modifiziert n. S.Frings).

Zum einen findet eine Ca²⁺-Abgabe aus dem Endoplasmatischen Retikulum statt, zum anderen wird, gesteuert durch die Speicherentleerung und über ein positives Feedback durch das Kation selbst, die [Ca²⁺]_i über einen Influx von Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum erhöht = *kapazitiver Ca²⁺-Einstrom*. Der massive Konzentrationsgradient zwischen Zytoplasma und Interstitium bietet die Basis für die Nutzung von Ca²⁺ als Signal.

RyR = Ryanodin-Rezeptor; IP₃R = IP₃-Rezeptor; CICR = Ca²⁺-induced Ca²⁺-release; CR = Ca²⁺-release

Ca^{2+} zeigt einen biphasischen Effekt auf beide Kanaltypen. Konzentrationsabhängig fördert es seine eigene Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum bis zu einem gewissen Grad, um dann in einer negativen Rückkopplung seine Ausschleusung aus den Speichern zu hemmen (Bezprozvanny & Ehrlich, 1995). Neben Ca^{2+} führt auch die zyklische ADP-Ribose (cADPR) zu einer Freisetzung von Ca^{2+} über diese intrazellulären Kanäle, wahrscheinlich über die Erhöhung der Rezeptor-Sensitivität für Ca^{2+} . Auch Nicotinsäure-Adenindinucleotidphosphat (NAADP) aktiviert den Ryanodin-Rezeptor, dessen Rolle vor allem an erregbaren Strukturen gut untersucht ist (Übersicht bei Sorrentino, 1996), der aber ebenfalls an nichterregbaren Zellen des Pankreas, der Parotidia, der Leber, der Niere u.a. (Übersicht bei Ozawa, 2001) exprimiert wird.

Trotz vieler Gemeinsamkeiten erregbarer und nichterregbarer Zellen zeigen sie Unterschiede im Zusammenspiel der intrazellulären Speicher mit den in der Zellmembran integrierten Ca^{2+} -Kanälen, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

1.3.2 Ca^{2+} -Rekrutierung an erregbaren Strukturen

Erregbare Zellen, wie Nerven und Muskeln, exprimieren spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Sie differieren u.a. in der Größe und im Zeitverhalten ihrer Ströme, sowie in ihren pharmakologischen Eigenschaften, ihr Aufbau ist jedoch weitgehend identisch (Hille, 2001).

Der L-Typ Ca^{2+} -Kanal („L“ für „large conductance“ und „long lasting current“), isoliert aus der Skelettmuskulatur, ist aus einer $\alpha 1$ -, $\alpha 2\delta$ -, β - und γ -Untereinheit zusammengesetzt (Suh-Kim et al., 1996). Die $\alpha 1$ -Einheit dient alleine als Ca^{2+} -Pore und als

Spannungssensor (Dihydropyridin-Rezeptor = DHPR; s. Abb. I.5). Depolarisiert die Zellmembran, reagiert der DHPR mit einer Konformationsänderung, welche sich auf den benachbarten RyR auswirkt (Sorrentino, 1996; Berridge, 1997; Ogawa et al., 2000). So aktiviert, entlässt der in der Speichermembran vorhandene Kanal Ca^{2+} -Ionen in das Zytoplasma.

Durch diese direkte Kopplung führt das auf die Muskelzelle treffende Aktionspotential zu einer fast simultanen Rekrutierung der vorhandenen Ryanodin-Rezeptoren und bewirkt so die explosionsartige Freisetzung von Ca^{2+} aus den Speichern.

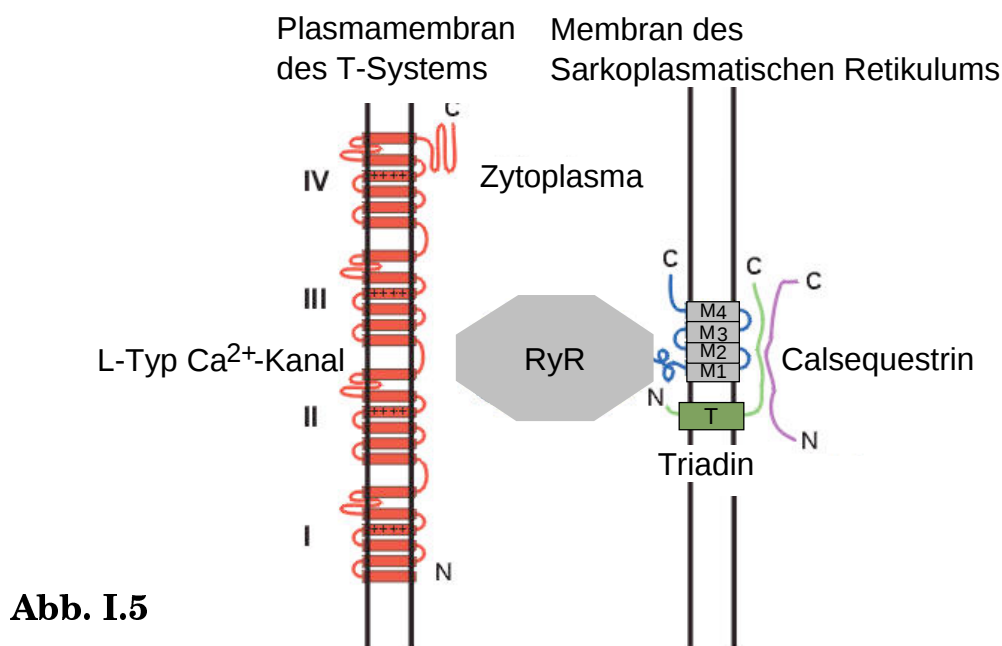


Abb. I.5
Modell des Dihydropyridin-Rezeptors und des Ryanodin-Rezeptors in der Skelettmuskulatur.

Eine Interaktion zwischen beiden Rezeptoren findet vermutlich über die in die Zelle hineinragende Proteinschleife zwischen Repeats II und III statt.

Die Proteine Triadin und Calsequestrin sind mit dem Ryanodin-Rezeptor assoziiert, ihre Rolle bei der Freisetzung von Ca^{2+} aus den Speichern ist noch unbekannt (Quelle: Institut für Biologische Informationsverarbeitung, FZ Jülich; modifiziert n. S.Frings).

I.4 Der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom

I.4.1 Ca^{2+} -Rekrutierung an nichterregbaren Strukturen

An nichterregbaren Strukturen, wie dem Kolonepithel, wurde ein spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal noch nicht nachgewiesen. Zellen der Parathyreoidea exprimieren zwar L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Untereinheiten, diese sind jedoch nicht in der Lage die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu modulieren (Chang et al., 2001). Statt dessen stehen nichterregbaren Zellen für die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sogenannte „store operated channels“ (SOCs), Speicher-gesteuerte Kanäle in der Plasmamembran zur Verfügung. Ca^{2+} strömt über diese Leitfähigkeiten aus dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma. Dieser sogenannte „kapazitative Ca^{2+} -Einstrom“ ist die Reaktion der Zelle auf eine Entleerung der intrazellulären Speicher (Putney, 1997) und wurde auch an der Kolonkarzinomzelllinie HT29 (Leipziger et al., 1994) und an nativen Kolonepithelzellen der Ratte nachgewiesen (Frings et al., 1999).

Die klassische Vorstellung des rezeptorvermittelten Ca^{2+} -Signalwegs beginnt mit der Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins des Typs G_q , welches bei Rezeptorbindung z.B. durch den Neurotransmitter Acetylcholin über einen muskarinergen Rezeptor zur Stimulation einer Phospholipase C (PLC) führt (s. Abb. I.6).

Diese spaltet das in der Zellmembran vorhandene Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren z.B. des Endoplasmatischen Retikulums und bewirkt so eine Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern (Lindqvist et al., 1998). Diese Speicherentleerung löst den

kapazitativen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus (Übersicht bei Parekh & Penner, 1997).

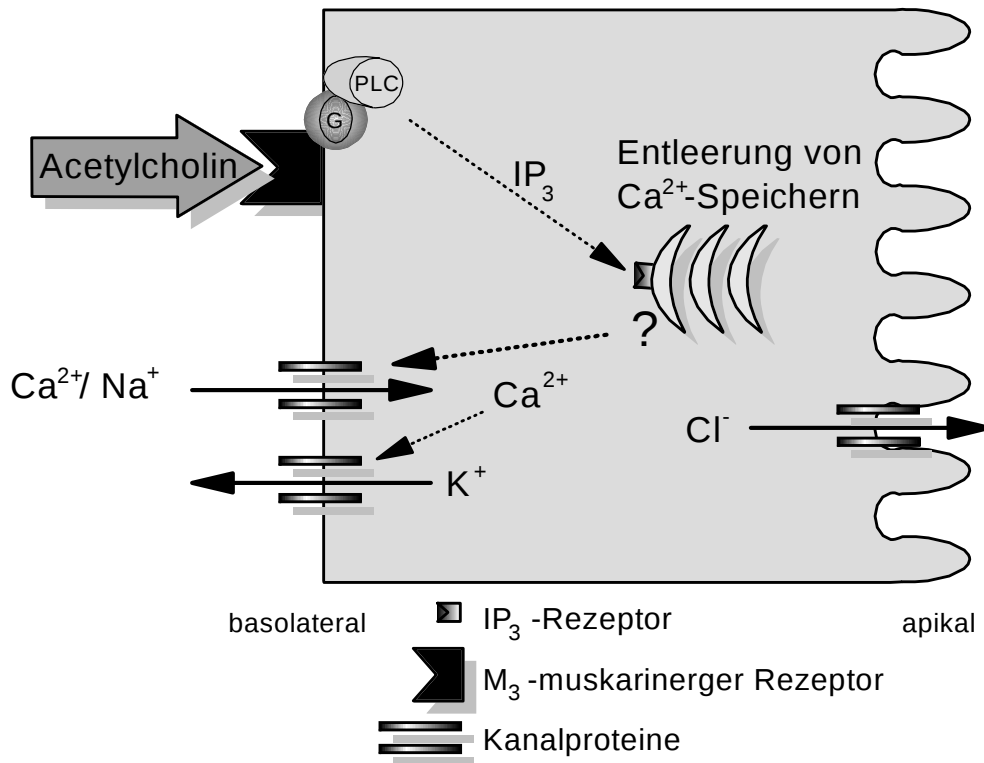


Abb. I.6

Klassisches Modell des kapazitativen Calciumeinstroms und direkte bzw. indirekte Auswirkung des erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf K^+ - und Cl^- -Leitfähigkeiten. PLC = Phospholipase C; G = G-Protein.

Eine weitere Möglichkeit die intrazellulären Speicher zu leeren besteht im Einsatz sogenannter SERCA (Sarkoplasmatische/Endoplasmatische Retikulum-ATPase)-Blocker wie z.B Thapsigargin. Diese verhindern die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in die Speicher, imitieren somit eine Entleerung und initiieren einen kapazitativen Ca^{2+} -Influx aus dem Interstitium in das Zytoplasma. Eine Speicherentleerung kann auch durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Pufferkapazität induziert werden. Ca^{2+} -

Chelatbildner wie EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure) und BAPTA (1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-tetraessigsäure) in hoher intrazellulärer Konzentration, binden im Zytoplasma frei vorliegendes Ca^{2+} , senken somit den Ca^{2+} -Spiegel in der Zelle und führen zu einer langsamen Entleerung der Speicher mit einer nach wenigen Minuten stattfindenden Aktivierung eines Kationeneinstroms (Kerst et al., 1995). Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit zur Aktivierung der durch den Speicher beeinflussten Leitfähigkeit eingesetzt.

1.4.1.1 Eigenschaften differierender Speicher-gesteuerter Kanäle

Für meine Untersuchungen spielte der Speicher-gesteuerte Kanal eine vorherrschende Rolle, der bisher an verschiedenen Zelltypen untersucht wurde.

Der in Mastzellen von Hoth und Penner (Hoth & Penner, 1992, Hoth & Penner, 1993) beschriebene und charakterisierte Ca^{2+} -Strom, der sogenannte „ Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current“ (I_{crac}), zeichnet sich durch spezifische Charakteristika aus. Er besitzt u.a. eine hohe Calcium-Selektivität, ist nicht spannungsabhängig, sein Umkehrpotential ist größer als +50 mV und er weist eine Einwärtsrektifizierung auf.

Die Speicher-gesteuerte Leitfähigkeit am Epithel des Rattenkolons, welches in dieser Arbeit als Untersuchungsmaterial dient, zeigt einige Abweichungen von den o.g. Eigenschaften. Der Anteil von Natrium am Einwärtsstrom ist deutlich höher als der des Calciums (Kanalpermeabilität $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+} = 6:1$) und das Umkehrpotential befindet sich nahe 0 mV (Frings et al., 1999), welches charakteristisch für einen nicht-selektiven Kationenkanal

ist. Beiden Kanaltypen gemeinsam ist die Hemmung durch hohe extrazelluläre Konzentrationen von Ca^{2+} .

Die molekulare Struktur des SOC ist bisher noch nicht identifiziert, jedoch lässt sich die Zugehörigkeit zur TRP (transient receptor potential)-Familie vermuten (Philipp et al., 1998; Bouley et al., 1999; Hofmann et al., 2000). Säugetier-Homologien, zu denen bei *Drosophila melanogaster* identifizierte Fotorezeptor-zellspezifische Proteine, sind vermutlich strukturelle Komponenten der für den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom verantwortlichen Kanäle.

I.4.2 Mögliche Kopplungsmechanismen zwischen intrazellulärem Speicher und dem von ihm gesteuerten kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom

Trotz vieler Fragen, die in den letzten Jahren bzgl. des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms beantwortet wurden, ist die Interaktion zwischen intrazellulären Speichern und Ca^{2+} -permeablen Kanälen in der Plasmamembran auch heute noch unklar - direkte und indirekte Kopplung werden diskutiert.

Ein Mechanismus, der die Kommunikation zwischen Speicher und kapazitivem Calcium-Einstrom darstellen könnte, ist eine Konformationsänderung von Rezeptor- und Kanalprotein. Die direkte Protein-Protein-Verbindung des IP_3 -Rezeptors mit dem Kanal (Boulay et al., 1999), analog dem Kontakt Ryanodin-Rezeptor - spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanal in der Skelettmuskulatur (s. I.3.2), setzt die Lokalisation der Speicher nahe der Plasmamembran voraus (Parekh & Penner, 1997). Die Konformationsänderung des IP_3 -Rezeptors aufgrund der Speicherentleerung teilt diese Information direkt dem in der Membran eingelassenen Kanalprotein mit (s. Abb. I.7C) und führt zum Öffnen der Pore.

Eine weiterer Mechanismus, der diskutiert wird, ist die Insertion von in intrazellulären Vesikeln vorhandenen Kanalproteinen (Somasundaram et al., 1995, Yao et al., 1999) in die Plasmamembran. Ähnlich dem Insertionsprozess des, auf Insulin ansprechenden, Glucose-Transporters, soll die Speicher-gesteuerte Leitfähigkeit nach entsprechendem Signal über Exozytose in die Membran integriert werden (s. Abb. I.7B).

Befunde, die auf die Existenz eines löslichen, kleinmolekularen Botenstoffs, des sogenannten „Ca²⁺ influx factor“ weisen (z.B. Trepakova et al., 2000), präsentieren einen möglichen dritten Mechanismus im Zusammenspiel von intrazellulären Speichern und Ca²⁺-Influx über die Plasmamembran (s. Abb. I.7A). Der Botenstoff wird bei Entleerung der Speicher freigesetzt und führt zu einem kapazitativen Ca²⁺-Einstrom in die Zelle. Aus T-Lymphozyten isoliert, wurde er bei seiner Entdeckung als phosphorylierte Substanz mit einem Molekulargewicht < 500 Dalton beschrieben (Randriamampita & Tsien, 1993). Aber auch eine Vielzahl anderer Signalstoffe stehen zur Diskussion, einen Ca²⁺-Einstrom bei Speicherentleerung zu induzieren, unter diesen NO (Bischof et al., 1995). Patch-Clamp-Untersuchungen an Zellmembranen von *Xenopus laevis*-Oozyten zeigten den Verlust des zuvor nachgewiesenen Ca²⁺-Stroms bei „Herausreißen“ des analysierten Membranflecks. Wurde dieses Membranstück der Zelle wieder eingesetzt, war erneut eine Ionenbewegung messbar (Parekh et al., 1993), so dass auch an diesem Zellmodell eine indirekte Kopplung, möglicherweise über einen Botenstoff der sich im Zytoplasma befindet, zu vermuten ist.

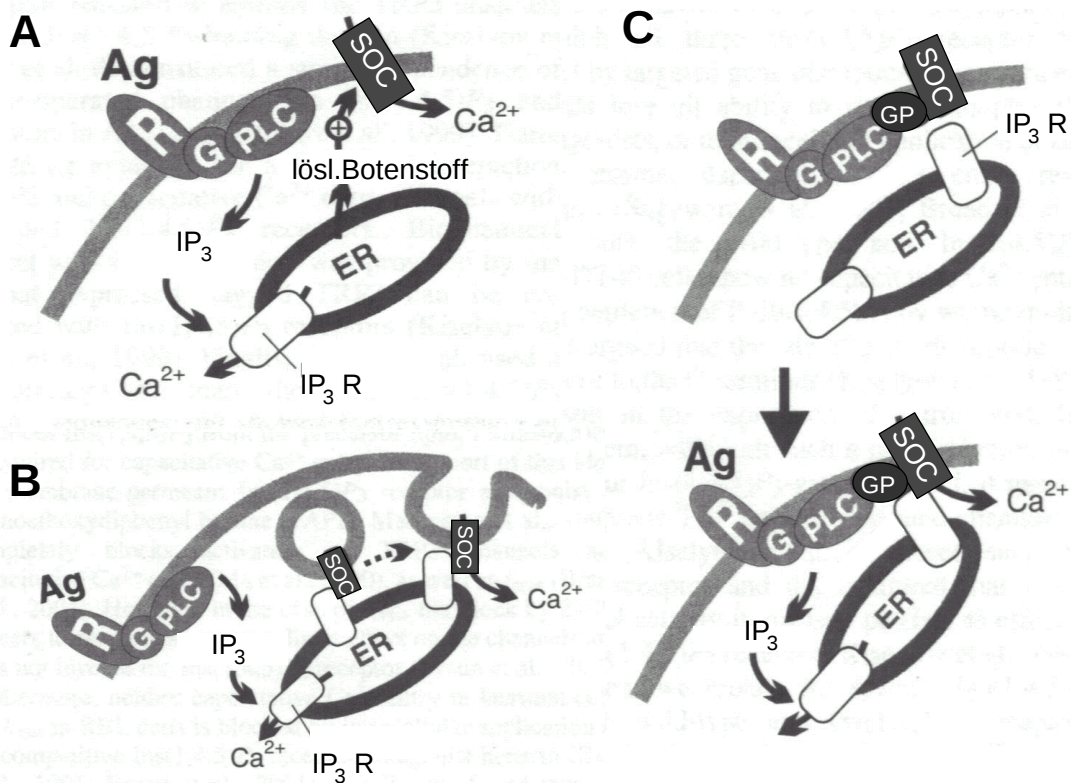


Abb. I.7

Mechanismen zur Aktivierung des kapazitiven Calciumeinstroms (modifiziert nach J.W. Putney, 2001).

In allen Vorschlägen führt die Kopplung eines Agonisten an den Rezeptor zu einer Produktion von IP₃, gefolgt von einer Freisetzung von Ca²⁺ aus den intrazellulären Speichern.

A: indirekte Interaktion Ca²⁺-Speicher – „store-operated channel“ (SOC) durch eine lösliche Substanz.

B: Exozytose - Mechanismus

C: direkte Protein zu Protein-Kopplung durch Konformationsänderung von IP₃-Rezeptor und Kanalprotein.

R = Rezeptor; Ag = Agonist; G = G-Protein; PLC = Phospholipase C; SOC = store-operated channel; ER = Endoplasmatisches Retikulum; IP₃ = Inositol-(1,4,5)trisphosphat; IP₃R = IP₃-Rezeptor; GP = Gerüstprotein.

Untersuchungen an unterschiedlichsten Zelltypen zeigen ein Für und Wider für die o.g. Mechanismen, jedoch ist keine dieser Hypothesen bis heute verifiziert. Möglicherweise existieren, abhängig vom Zelltyp, verschiedene Vorgehensweisen der Zelle zur Auslösung des kapazitativen Ca^{2+} -Einstroms via entsprechender Kanäle in das Zytoplasma.

I.5 Eigene Fragestellung

Am Kolon wirkende Ca^{2+} -abhängige Sekretagoga, wie Acetylcholin, induzieren eine massive Cl^- -Sekretion, infolge einer Aktivierung Ca^{2+} -sensitiver, basolateraler K^+ -Kanäle (Böhme et al., 1991; Bleich et al., 1996; s. I.2 u. I.4.1). Die aus dem K^+ -Efflux resultierende Hyperpolarisation unterstützt den Ausstrom von Cl^- über apikale Cl^- -Kanäle (Böhme et al., 1991; Strabel & Diener, 1995). Acetylcholin erhöht, mit biphasischem Zeitverlauf (Diener et al., 1991), die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Initial erfolgt ein Peak durch die Entleerung intrazellulärer IP_3 -sensitiver Speicher, gefolgt von einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Interstitium (Lindqvist et al., 1998; s. Abb. I.6). Am Kolonepithel der Ratte wurde dieser Influx von Ca^{2+} vor kurzem als *kapazitativer* Ca^{2+} -Einstrom verifiziert. Untersuchungen von Frings et al. (1999) zeigten eine Speicher-gesteuerte, basolaterale Leitfähigkeit, die sowohl für Ca^{2+} als auch für Na^+ durchlässig ist, wobei der Na^+ -Influx über diese Leitfähigkeit deutlich dominiert. Welche Charakteristika dieser Kanal gegenüber anderen Kationen aufweist, wurde noch nicht überprüft.

Zudem ist die Interaktion zwischen intrazellulären Speichern und dieser Leitfähigkeit auch an diesem Gewebe noch völlig unklar.

Tendenziell wird hier aufgrund der zeitlich relativ großen Spanne zwischen intrazellulärer Speicherentleerung und Aktivierung des Speicher-gesteuerten Kanals die Anwesenheit eines löslichen Botenstoffs angenommen, der als aktivierendes Signal den kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom auslöst.

Weiterhin scheint der massive Einstrom der Na^{+} -Ionen über die nicht-selektive Leitfähigkeit nicht von Vorteil für die Induktion einer Chloridsekretion, die, wie erwähnt, die physiologische Reaktion des Enterozyten auf eine intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung ist. Zum einen reduziert die durch Na^{+} hervorgerufene Depolarisation der Zelle die Triebkraft für die Ausschleusung von Anionen, zum anderen mindert sich durch die erhöhte intrazelluläre Na^{+} -Konzentration die Aktivität des $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}/2\text{Cl}^{-}$ -Kotransporters.

Daher ergeben sich die folgenden Fragen für meine Untersuchungen:

- Welche Passage-Eigenschaften zeigt der nicht-selektive Kationenkanal gegenüber Kationen?
- Wie wird diese Leitfähigkeit reguliert - führen eine Zellvolumenänderung bzw. bestimmte zelluläre Signalstoffe zu einer Inaktivierung/Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals?
- Warum ist diese Leitfähigkeit nicht-selektiv – worin liegt die physiologische Bedeutung des dominierenden Na^{+} -Einstroms über diese Leitfähigkeit?

II Material und Methoden

II.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen eingesetzt. Die Tiere waren für die Messungen mittels der Patch-Clamp-Technik vier bis neun Wochen alt. Für die Untersuchungen mittels Ussingkammer-Technik wurden Wistar-Ratten mit einer Körpermasse zwischen 150 – 380 g verwendet. Futter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Haltung erfolgte in klimatisierten Räumen in zwölf-Stunden-hell/zwölf-Stunden-dunkel Zyklen.

II.2 Elektrolytlösungen

II.2.1 Lösungen für die Präparation

Die Isolierung der Kolonschleimhaut wurde in einer Bicarbonat-gepufferten Parsons-Lösung (Parson & Paterson, 1965) durchgeführt. Diese enthielt (in mmol·l⁻¹): NaCl 107; KCl 4,5; NaHCO₃ 25; Na₂HPO₄ 1,8; NaH₂PO₄ 0,2; CaCl₂ 1,25; MgSO₄ 1 und Glucose 12. Die Lösung wurde mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast und die pH-Einstellung mit NaHCO₃/HCl auf 7,4 vorgenommen.

Die Isolationslösung für die Krypten enthielt (in mmol·l⁻¹): NaCl 107; KCl 4,5; NaHCO₃ 25; Na₂HPO₄ 1,8; NaH₂PO₄ 0,2; Glucose 12; mit 1 g·l⁻¹ bovinem Serumalbumin (BSA) und 10 mmol·l⁻¹ Ethylendiamin-N,N,N',N',-tetra-essigsäure (EDTA), einen Calcium-chelatbildner. Der pH-Wert wurde mit Tris(hydroxymethyl)-

aminomethan (TRIS) und HCl unter Carbogenbegasung auf 7,4 eingestellt und die Lösung auf eine Temperatur von 37° C erwärmt.

Die isolierten Krypten wurden in einer kaliumreichen, chloridarmen Tyrode-Lösung aufgefangen (Böhme et al., 1991; Diener et al., 1991). Diese enthielt (in mmol·l⁻¹): Kaliumgluconat (KGluc) 100; KCl 30; N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure) (HEPES) 10; NaCl 20; MgCl₂ 1; CaCl₂ 1,25; Glucose 12; Natriumpyruvat 5; und zudem 0,1% BSA. Der pH-Wert dieser Tyrode wurde mit KOH/HCl auf 7,4 titriert.

II.2.2 Lösungen bei Patch-Clamp-Messungen

II.2.2.1 Perfusionslösungen

Als Standardlösung kam eine 140 mmol·l⁻¹ NaCl/Tyrode-Lösung zum Einsatz. Sie enthielt (in mmol·l⁻¹): NaCl 140; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 12,2; CaCl₂ 1,25; MgCl₂ 1. Der pH-Wert wurde mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt. Die Ca²⁺-Konzentration dieser Elektrolytlösung wurde zur Erreichung eines optimalen Seals (Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran) vorübergehend auf 10 mmol·l⁻¹ erhöht.

Bei den Versuchen, die die Permeabilität des nicht-selektiven Kationenkanals für monovalente Kationen klären sollten, wurde bei der Standardlösung NaCl äquimolar durch CsCl, KCl, LiCl und NMDG (N-Methyl-D-Glucamin)-Cl ersetzt. Zur Messung des Einflusses divalenter Kationen auf die Kationenleitfähigkeit wurde die Ca²⁺-Konzentration der Standardtyrode auf 10 mmol·l⁻¹ erhöht und in weiteren Lösungen CaCl₂ durch BaCl₂, MgCl₂ oder SrCl₂ substituiert; für die Aufrechterhaltung des Seals wurden 0,5 mmol·l⁻¹ CaCl₂ zu jeder dieser Lösungen zugesetzt.

Um eine Beteiligung von Cl^- -Ionen an den gemessenen Strömen auszuschließen, wurde bei Versuchen zur Volumen- und cAMP-Regulation des nicht-selektiven Kationenkanals Cl^- durch das impermeable Gluconat (Gluc) ersetzt. Die Lösungen zur Volumenregulation enthielten in der isotonen Form (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaGluc 110; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 12,2; Calciumgluconat (CaGluc) 1; MgCl_2 1; Mannitol 50. Der hypotonen Lösung wurde kein Mannitol zugesetzt.

II.2.2.2 Pipettenlösungen

Die Vorgabe der intrazellulär vorhandenen Ionen erfolgt über die Pipettenlösung. Wird wie bei Patch-Clamp-Ableitungen im Whole-Cell-Modus ein Zugang zum Zellinneren geschaffen, findet ein rascher Austausch zwischen Zytosol und Pipettenlösung statt.

Die Standardpipettenlösung für die Patch-Clamp-Experimente enthielt in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$: KGluc 100; KCl 30; NaCl 10; TRIS 10; ATP 5; MgCl_2 2; EGTA 0,1. Sie wurde mit TRIS/HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

Zur Pufferung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, somit indirekt zur Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, wurde in einigen Versuchen die EGTA-Konzentration auf $11\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ erhöht und $1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CaCl_2 zugefügt. So wurde eine konstante freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von ca. $10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ gewährleistet. Zum Ausschluss einer Beteiligung von Chlorid- und Kaliumströmen wurde Kalium durch das impermeable NMDG⁺ und Chlorid durch Gluconat ersetzt ($140\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG-Gluc).

Für bestimmte Regulationsmechanismen der Zelle sind im Zytosol gelöste Substanzen notwendig. Diese werden jedoch bei

Ganzzellableitungen mittels der Whole-Cell-Methode ausgewaschen. Mit dem Perforated-Patch wird durch das Ionophor Nystatin die Membran unter der Pipette siebartig durchlöchert, größere Moleküle können jedoch nicht aus der Zelle heraus diffundieren (s. Abb. II.1 und II.2). Zur Durchführung dieses Patches wurde Nystatin in Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgelöst. Die Stammlösung enthielt 50 mg·ml⁻¹ Nystatin. Sie wurde zu jedem Versuchstag frisch angesetzt und unter Lichtschutz aufbewahrt. Von der Stammlösung wurden 6 µl in 1 ml Pipettenlösung verwendet.

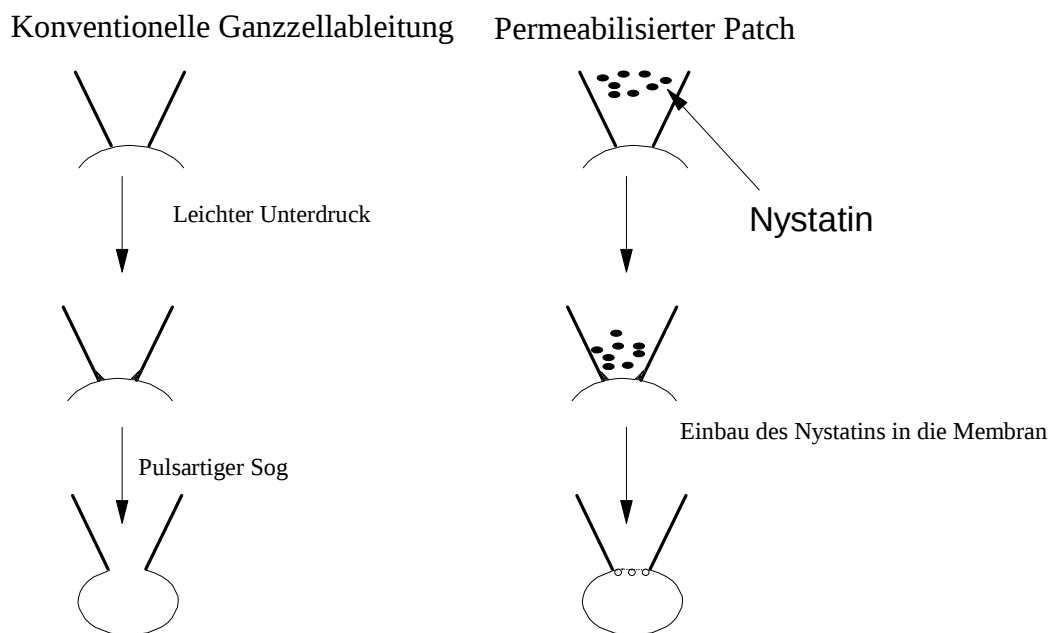


Abb. II.1

Vergleich der angewandten Patch-Clamp-Konfigurationen (s. auch Abb. II.2).

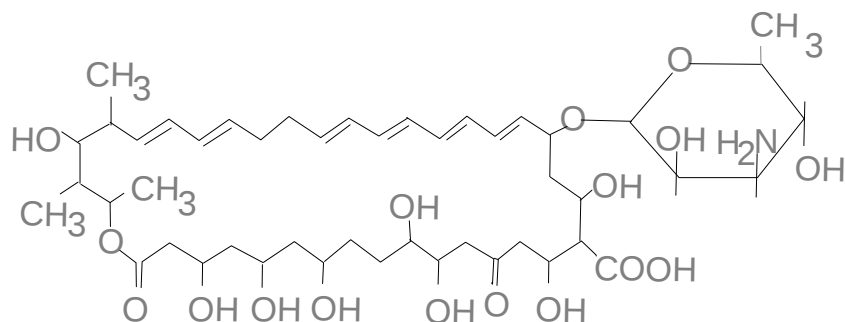


Abb. II.2

Nystatin: ein Ionophor, welches, in die Zellmembran eingebaut, Poren bildet und einen elektrischen Zugang zur Zelle schafft.

II.2.3 Lösungen für die Imaging-Messungen

Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2AM, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurde als $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Stammlösung in DMSO (max. Endkonzentration $2,5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$) angesetzt. Pluronic[®] F-127 (BASF, Weyandotte, USA), ein Detergenz zur Unterstützung der Löslichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2, wurde als 20 %-ige Lösung in DMSO (max. Endkonzentration $2,5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$) gelöst.

Die isolierten Krypten wurden mit $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Fura-2 und 0,05% Pluronic[®] für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Eine Spülung des Präparates mit der Hochkalium-Tyrode erfolgte anschließend, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die so behandelten Krypten bis zur Messung unter Lichtschutz aufbewahrt.

Die Standard-Perfusionslösung war die o.g. 140 mmol·l⁻¹ NaCl/Tyrode-Lösung, in Natrium-freier Perfusionslösung wurde NaCl äquimolar durch NMDG (N-Methyl-D-Glucamin)-Cl ersetzt und mit Tris/HCl auf einen pH-Wert von 7.4 titriert.

II.2.4 Lösungen für die Ussingkammer-Messungen

Standardbadlösung für Versuche mit der Ussingkammer war die, bei den Präparationslösungen beschriebene, Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung (Parson & Paterson, 1965).

II.3 Gewebepräparation

II.3.1 Präparation der Darmschleimhaut

Die Ratten wurden mittels Schlag auf den Kopf betäubt und durch anschließende Entblutung getötet (Genehmigung der Tötung der Tiere zur Organentnahme durch das Regierungspräsidium Gießen). Das Abdomen wurde entlang der Linea alba eröffnet. Das Kolon wurde an seinem distalen Ende, ca. 5 mm anal des Lymphknotens, der die Grenze zum Rektum markiert (Lindström et al., 1979), abgesetzt, stumpf vom Mesenterium gelöst und entnommen. Zur Säuberung des Darmlumens wurde der Darmschlauch mit eisgekühlter Parsons-Lösung (4 °C) gespült und danach auf einen dünnen Plastikstab gezogen. Am distalen Darmende erfolgte nun eine stumpfe Präparation von Tunica serosa und Tunica muscularis in proximale Richtung, um ein Mukosa-Submukosa-Präparat zu erhalten. Hier liegen nur noch, von serosal nach mukosal, drei Zelllagen vor: die Lamina muscularis mucosae, die Lamina propria mucosae und die Lamina epithelialis (s. Abb. II.3).

Um das so erhaltene Schleimhautpräparat in die Ussingkammer einzuspannen, wurde es im distalen und proximalen Kolon in jeweils zwei Abschnitte unterteilt und im Bereich des Mesenterialansatzes in Längsrichtung aufgeschnitten. Eine Unterscheidung dieser beiden Kolonsegmente ist durch eine palmblätterartige Schrägstreifung möglich, die nur im proximalen Kolon zu finden ist (Lindström et al., 1979).

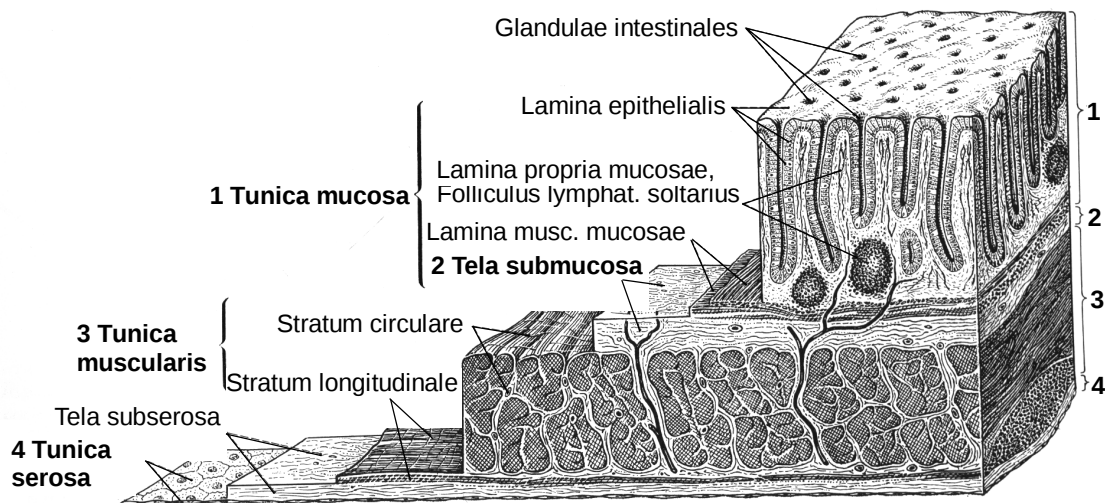


Abb. II.3

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

II.3.2 Präparation isolierter Krypten

Für die Isolation der Krypten wurde nur der distale Teil des Kolons verwandt. Die unter II.3.1 beschriebene Präparation wurde in gleicher Weise durchgeführt. Das Mukosa-Submukosa-Präparat wurde zur Isolierung der Krypten mit Hilfe eines Cyanacrylatklebers auf Plexiglashalter geklebt.

Die so fixierte Tunica mucosa wurde je nach Alter, Geschlecht und Gewicht der Tiere für 7 - 11 Minuten in einer Ca^{2+} -freien, EDTA-haltigen Isolationslösung bei 37°C unter Carbogenbegasung inkubiert. Anschließend wurden die Halter in einen Vibromischer (Chemap, Volketswil, Schweiz) gespannt und in Hochkalium-Tyrode geschüttelt, so dass sich die intakten Krypten lösten (s. Abb. II.4). Die kryptenhaltige Suspension konnte nun bis zu 6 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden. Mittels Pipettierhilfe wurden vor jeder Messung ca. $10\text{ }\mu\text{l}$ der Kryptensuspension unter optischer Kontrolle auf runde, mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen gebracht und in die Messkammer gegeben.

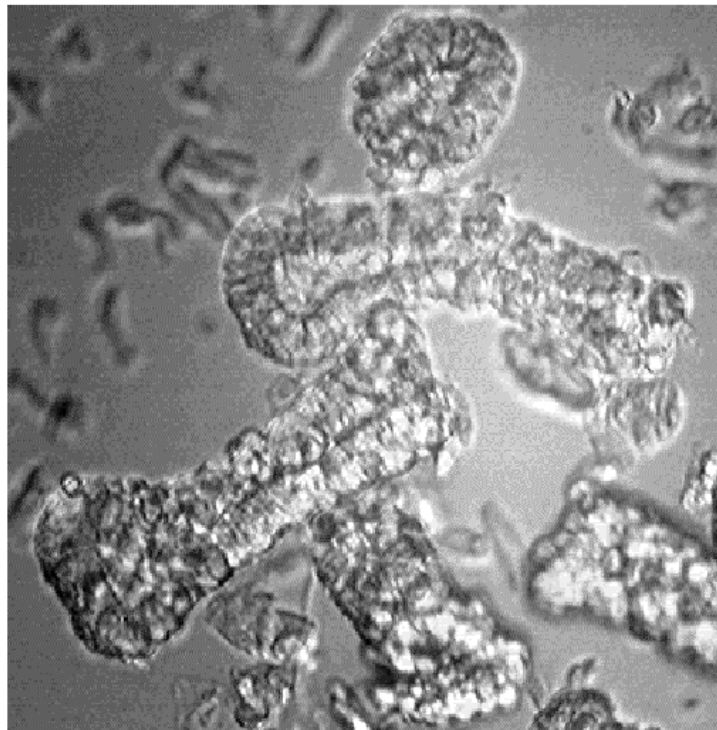


Abb. II.4

Isolierte Krypten.

II.4 Patch-Clamp-Technik

Zur Messung der Membranpotentiale und Ganzzellströme an Zellen von isolierten Krypten wurde die Patch-Clamp-Methode angewandt. Diese Technik wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt, um Ströme, die durch einzelne Ionenkanäle in biologischen Membranen fließen, zu messen (Hamill et al., 1981). Für ihre Arbeiten („Funktion einzelner zellulärer Ionenkanäle“) erhielten sie 1991 den Nobel-Preis für Medizin und Physiologie. Die vielzähligen Anwendungsmöglichkeiten dieser Technik führten zu einer weiten Verbreitung der Methode und machten die Untersuchung einer Reihe wichtiger Ionenkanäle möglich. Ionenströme haben nicht nur bei elektrisch erregbaren Zellen eine Funktion, sie sind für alle Gewebe, inklusive dem Darmepithel, wichtige Regulationsmechanismen. Für die Messung der Einzelkanalströme, die im pA-Bereich (10^{-12} A) liegen, ist das Filtern dieser Ströme aus dem deutlich größeren Hintergrundrauschen essentiell.

Eine mit Elektrolytlösung gefüllte Glaspipette wird auf die Zelloberfläche der zu messenden Zelle gesetzt und isoliert unter ihrer Öffnung (Durchmesser ca. 1 μm) einen kleinen Abschnitt der Membran, einen Flecken oder *Patch*, elektrisch von seinem Umfeld. Eine glatte, saubere Oberfläche auf Seiten der Zellmembran und der Pipette ist eine wichtige Voraussetzung zur Abdichtung des Kontakts. Um diesen Vorgang zu begünstigen, wird das Membranstück zusätzlich vorsichtig an die Pipettenöffnung gesaugt (Hamill et al., 1981).

Diese Faktoren bewirken einen Anstieg des elektrischen Widerstands zwischen Pipette und Membran in den Gigaohmbereich.

Der hohe Abdichtwiderstand, auch als „Gigaseal“ bezeichnet, führt zu einem deutlich verminderten Hintergrundrauschen und kleinen Leckströmen, Messungen an Einzelkanälen sind dadurch möglich.

II.4.1 Patch-Clamp-Konfigurationen

Kommt ein „Gigaseal“ nach Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran zustande, befindet sich das Präparat in der Cell-attached-Konfiguration: die Zelle ist intakt, alle intrazellulären Bestandteile bleiben erhalten. Nur unterhalb der Pipettenöffnung wird der Stromfluss und das extrazelluläre Potential kontrolliert.

Um das Membranpotential (V) sowie den Stromfluss (I) über der gesamten Zellmembran bestimmen zu können, wurde in den meisten Versuchen dieser Arbeit die Whole-Cell-Konfiguration genutzt. Hier können bei Anlegen einer vorgegebenen Spannung (Voltage-Clamp) oder durch Applikation eines definierten Stroms (Current-Clamp) die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran variiert und die daraus resultierenden Ströme bzw. Potentiale gemessen werden. Eine exakt definierte Zusammensetzung des Zellinneren ist durch den Zugang der Pipette zum Zellinneren vorhanden, jedoch werden lösliche Faktoren, z.B. Enzyme und Second messenger aus dem Zytoplasma mit der Pipettenlösung ausgetauscht, die natürliche Zusammensetzung des Zellinneren geht somit verloren. Der Verlust dieser niedermolekularen Bestandteile kann eine Veränderung der Regulationsprozesse an bestimmten Ionenkanälen zur Folge haben. Um dies zu vermeiden, besteht die Möglichkeit einen Perforated-Patch zu verwenden.

Hierbei gibt man das Ionophor Nystatin (s. Abb. II.2), ein Polyen-Antibiotikum, in die Pipettenlösung. Im Cell-attached-Modus

wird durch diese Substanz der Membranfleck unter der Pipette siebartig durchlöchert (Porendurchmesser $\sim 0,8$ nm). Es entsteht ein elektrischer Zugang zum Zellinneren. Moleküle >180 D (Horn und Marty, 1988) können jedoch die Membran nicht passieren und bleiben der Zelle für Regulationsvorgänge erhalten (s. Abb. II.1).

Andere Messanordnungen der Patch-Clamp-Technik, die hier jedoch nicht zur Anwendung kamen, sind die Inside-out- und die Outside-out-Konfiguration. Der Inside-Out-Modus wird durch ein Zurückziehen der Pipette nach einem Cell-attached-Seal erreicht. Die zytoplasmatische Oberfläche ist der Badlösung zugewandt. Bei der Outside-out-Konfiguration ist erst einmal die Ganzzellableitung erforderlich, durch langsames Abziehen der Pipette löst sich auch hier ein Membranstück von der Zelle und bildet über der Pipettenöffnung eine geschlossene Oberfläche, die ihre extrazelluläre Seite zur Badlösung hin exponiert (s. Abb. II.5).

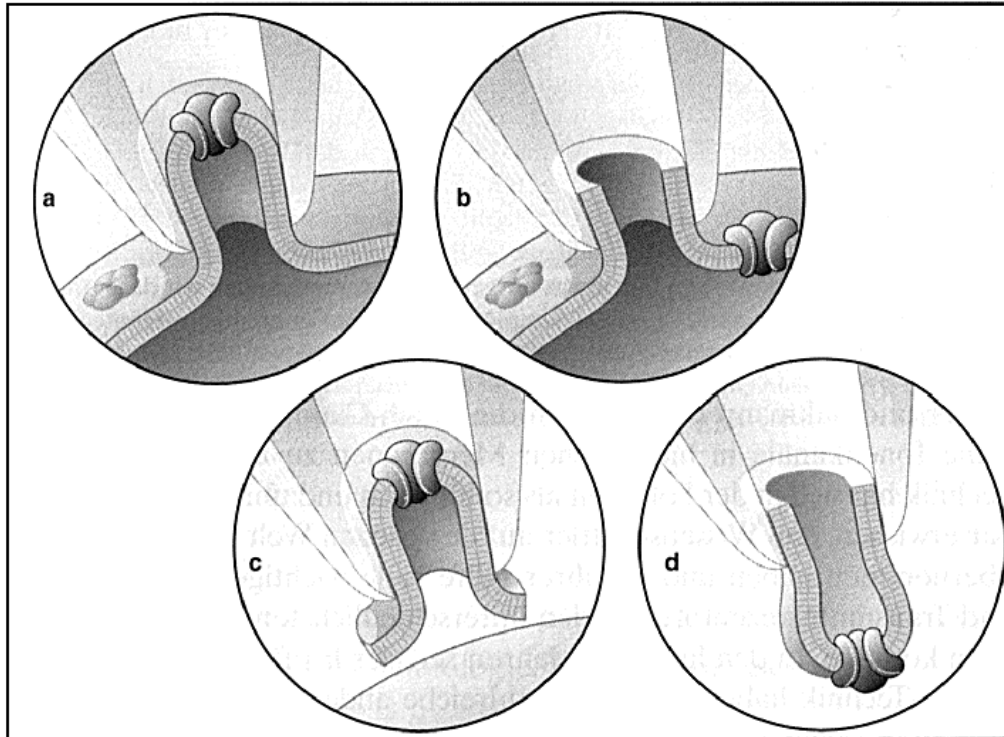


Abb. II.5

Patch-Konfigurationen: a) Cell-attached, b) Whole-Cell, c) Inside-out, d) Outside-out.

II.4.1.1 Vorzeichenkonventionen

Generell wird die Richtung des Stroms aus der Sicht der Zelle dargestellt. Ein Stromfluss positiv geladener Ionen in die Zelle hinein, ein Einwärtsstrom, wird definitionsgemäß als negativer Strom gesehen. Der Auswärtsstrom, ein Fluss positiv geladener Ionen aus der Zelle, wird als positiver Strom betrachtet. Die Flüsse negativ geladener Ionen erhalten invertierte Vorzeichen.

II.4.2 Der Patch-Clamp-Messstand

II.4.2.1 Mikroskop

Die Manipulation an den Präparaten während der Versuche war nur unter Sichtkontrolle möglich. Verwendet wurde hierfür ein inverses Mikroskop (IX 70 Olympus, Tokyo, Japan). Ein ausreichender Abstand von Lichtquelle und Kondensor zur Messkammer ermöglichte ein Platzieren von Messpipette, Perfusion, Elektroden und anderen Aufbauten.

Das Mikroskop verfügte über 10 x Weitwinkel-Okulare und Objektive mit 4-, 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung.

Bei einem Patch-Clamp-Experiment ist eine exakte Oberflächendarstellung für das Aufsetzen der Pipette auf die Zelle wichtig. Um eine dreidimensionale Darstellung der Krypten zu erhalten, wurde ein kontrastverstärkendes Verfahren, die sogenannte Normarski-Optik, eingesetzt. Bei dieser Technik, einem Verfahren mit differentiellm Interferenzkontrast (Übersicht bei Gerlach, 1985), wird optisch ein dünner Schnitt durch das Untersuchungsobjekt gelegt, so dass Strukturen über und unter der Betrachtungsebene weniger stören. Durch abwechselndes Fokussieren von Pipettenspitze und Zelle kann man sich daher gut orientieren und die Pipette langsam an die Zelloberfläche führen.

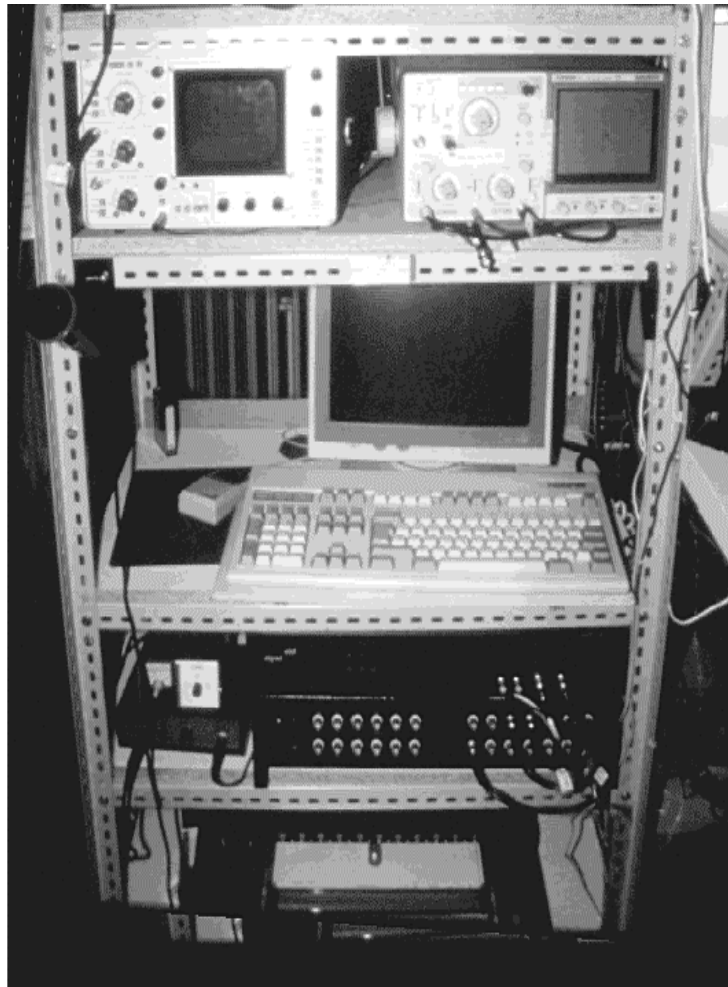


Abb. II.6

Patch-Clamp-Stand; von oben nach unten: 1.Oszilloskop, 2.Computer mit Tastatur, 3.Hauptverstärker, 4.Schreiber.

II.4.2.2 Messkammer und Perfusionssystem

Speziell angefertigte Messkammern wurden auf einem entsprechend modifizierten Objektisch des Mikroskops befestigt, der in X- und Y-Richtung bewegt werden konnte. Die Messkammern aus 10 mm starken Plexiglas, ähnlich einem Objektträger, zeigten in ihrer Mitte eine runde Vertiefung (Durchmesser 15 mm) mit einem

Fassungsvermögen von 0,5 ml. Hier wurden Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen (Durchmesser 13 mm, Stärke 0,16 - 0,19 mm, W. Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland), auf denen die isolierten Krypten hafteten, eingebracht und perfundiert. Die Perfusionslösungen befanden sich etwa 60 cm über dem zu perfundierenden Präparat und waren mittels Infusionsbestecken (LDKS Oversan Industria Biomedica S.p.A. Mailand, Italien) mit der Messkammer verbunden. Der Zulauf erfolgte kontinuierlich mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 1 ml pro Minute. Gegenüber der Perfusion wurde, um ein gleichbleibendes Volumen in der Kammer zu halten, eine Absaugvorrichtung positioniert. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

II.4.2.3 Messtisch und mechanische Komponenten

Die sehr empfindliche Verbindung zwischen Pipette und Präparat, sowie die Überlagerung der Messung durch elektrische Störquellen, setzten das Arbeiten in einem schwingungsgedämpften und elektrisch abgeschirmten Umfeld voraus. Eine die Erschütterungen reduzierende schwere Metallplatte, von einem Faradaykäfig umgeben, erfüllte diese Anforderungen. Das Mikroskop, die Messkammer, der Mikromanipulator mit Pipettenhalter und Vorverstärker waren auf der Metallplatte montiert.

Der hydraulische Mikromanipulator (MHW-103, Narishige International, London, England) ermöglichte durch Bewegungen in alle Richtungen das präzise Aufsetzen der Pipette auf die Zelloberfläche. Die Glaspipetten wurden in einen Pipettenhalter (s. Abb. II.8) eingesetzt, welcher direkt am Vorverstärker befestigt war.

Über eine Schlauchverbindung konnte hier ein Unter- oder Überdruck angelegt werden.

II.4.2.4 Elektronische Komponenten

Für die Erfassung der Membranströme und -potentiale wurde ein Patch-Clamp-Verstärker (RK 400, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) verwandt. Mit diesem verbunden war der Vorverstärker (HK 409), auch *Headstage oder probe* genannt, der zusammen mit dem Pipettenhalter auf dem Mikromanipulator montiert wurde. Er registrierte den Strom, der durch die Zellmembran unter der Pipette floss und wandelte ihn in eine Spannung um.

Das verstärkte Signal wurde auf den nachgeschalteten Patch-Clamp-Verstärker übertragen und hier nochmals verstärkt und gefiltert (s. Abb. II.7). Um das hochfrequente Rauschen der gemessenen Signale zu reduzieren, besaß der Verstärker einen Tiefpassfilter (AF-180, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) von 3 kHz.

Die Steuerung fand über eine spezielle Software (CED Patch and Voltage Clamp Software, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, England) statt. Durch diese konnte eine Kommandospannung in Form eines Haltepotentials oder einer Potentialpulsfolge festgelegt und, nach Umwandlung des digitalen in ein analoges Signal, in den Eingang des Verstärkers eingespeist werden. Auch die Möglichkeit, bei konstanter Stromapplikation (*Current-Clamp*) die Messung des Membranpotentials durchzuführen, war vorhanden. Die Vermittlung zwischen dem analog „kommunizierenden“ Verstärker und dem digital arbeitenden

Computer übernahm ein DA/AD-Wandler (CED 1401, Cambridge Electronic Design LTD., Cambridge, England).

Eine weitere optische Kontrollmöglichkeit der elektrischen Vorgänge, z.B. bei der Sealbildung und dem Übergang in den Whole-Cell-Modus, bot sich in Form eines Oszilloskops (HM-205-3 HAMEG Instruments, Frankfurt, BRD), welches mit dem Verstärker gekoppelt war (s. Abb. II.6).

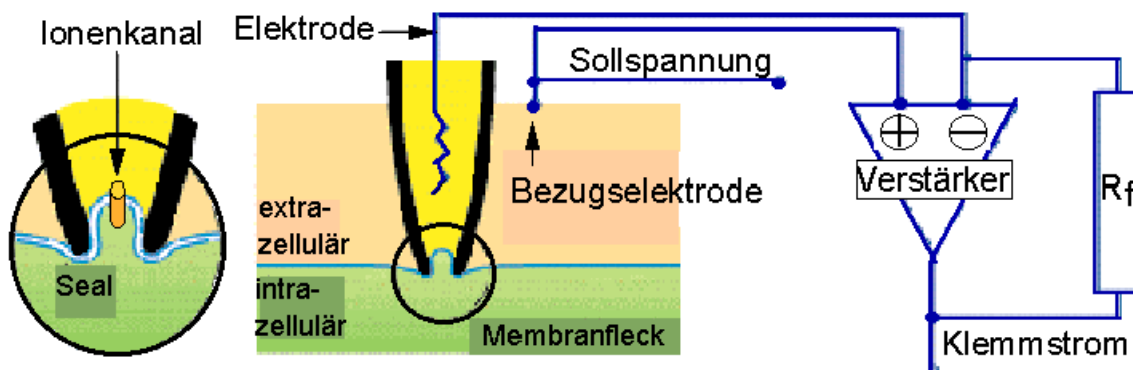


Abb. II.7

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

II.4.2.5 Elektroden und Patchpipette

Die metallischen Leiter zwischen Pipettenlösung und Vorverstärker sowie zwischen Erdung und Badlösung werden als Elektroden bezeichnet. Beide bestanden aus einem Silber/Silberchlorid-Draht. Die Badreferenzelektrode tauchte über eine

Agarbrücke ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl in 3 % Agar) in die Badlösung. Die Messelektrode befand sich in der Pipette, die zuvor mit der entsprechenden Pipettenlösung gefüllt worden war und wurde über den Pipettenhalter mit dem Vorverstärker verbunden. Vor Einsetzen der Pipetten in den Pipettenhalter wurde das hintere Ende der Glaskapillaren mit einem Bunsenbrenner rundgeschmolzen, um eine Beschädigung der Elektrode und des Dichtungsgummis (wichtig für die Applikation von Über- und Unterdruck) des Pipettenhalters zu vermeiden.

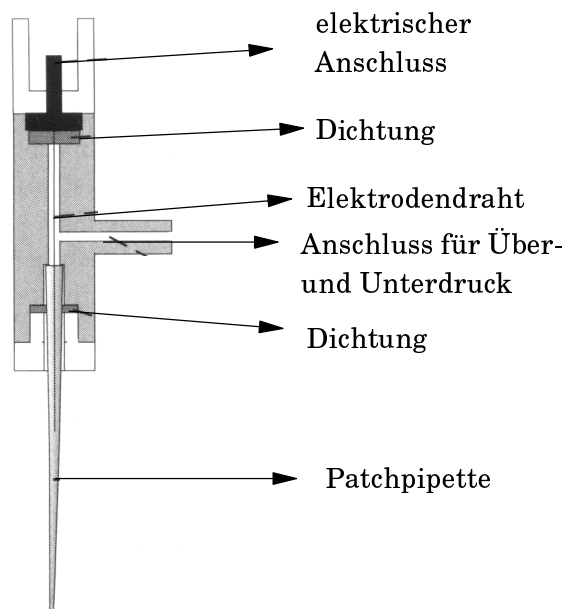


Abb. II.8

Patchpipettenhalter im Längsschnitt.

Die Glaskapillaren aus Borosilikatglas (Jencons Scientific, Bedfordshire, England), die zur Herstellung der Patchpipetten verwendet wurden, hatten einen Innendurchmesser von 1,15 mm und einem Außendurchmesser von 1,8 mm. Mittels eines Vertikalpullers

(Typ PC 95, Hans Ochotzki, Feinmechanik, Homburg/Saar, Deutschland) wurden sie in zwei Arbeitsgängen zu gleichgeformten Pipetten ausgezogen. Das Ausziehen erfolgte nach dem Einspannen der Glasrohlinge in eine Heizspirale. Im ersten Schritt wurde die Kapillare um etwa 0,7 bis 1 cm vorgezogen. Nach Rezentrierung des durch die Wärmeeinwirkung verdünnten Glasabschnitts riss, erneut durch Erhitzung, die Glaskapillare an der dünnsten Stelle und man erhielt zwei Pipetten. Vorgaben am Puller, wie Hitzeeinwirkung, Zugkraft und –geschwindigkeit, waren Faktoren, die die Pipettenform bestimmten. Ziel war eine Pipettenspitze mit einer Öffnung von ca. 1 μm Durchmesser und einem Pipettenwiderstand von 5-10 MegaOhm ($M\Omega$).

II.4.2.6 Datenerfassung

Für die Aufnahme, Analyse und Darstellung der gemessenen Daten wurden mehrere Geräte verwendet, die dem Verstärker angeschlossen waren (s. Abb. II.9).

Der DA/AD-Wandler (CED 1401, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, England) transformierte analoge Signale in digitale Daten, die auf der Festplatte des Computers sowie auf einem DAT-Rekorder (DTR 1204, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) aufgezeichnet wurden. Ein Papierschreiber (L 250 E, Phywe Systeme GmbH, Düsseldorf, Deutschland) erfasste zudem während des Versuchablaufs entweder Membranpotential oder –strom.

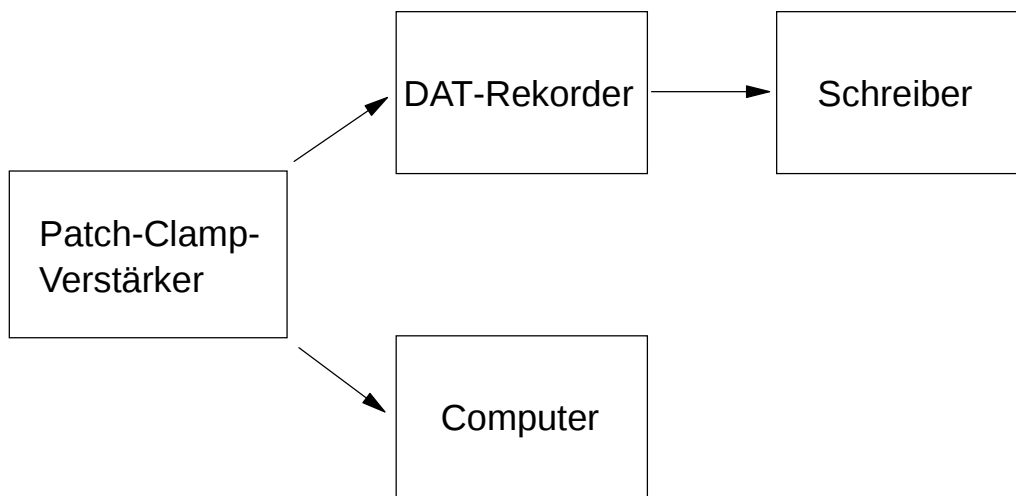


Abb. II.9

Anordnung der Geräte zur Datenerfassung.

II.4.3 Praktische Durchführung eines Patch-Clamp-Experimentes

Eine intakte Krypte wurde unter dem Mikroskop für die Messung ausgewählt. Voraussetzung war eine feste Verbindung des Präparats mit dem Untergrund, um Störungen der Messung durch Verlust des Seals zu vermeiden. Eine am Versuchstag gezogene Pipette wurde mit der entsprechenden Pipettenlösung luftblasenfrei gefüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Über einen am Pipettenhalter zugeführten Schlauch applizierte man einen Überdruck im Pipetteninneren. Hierdurch sollte ein Verschluss der Pipettenöffnung durch Schmutzpartikel in der Badlösung verhindert werden. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Pipettenspitze unter optischer Kontrolle der Kryptenoberfläche angenähert (s. Abb. II.10).

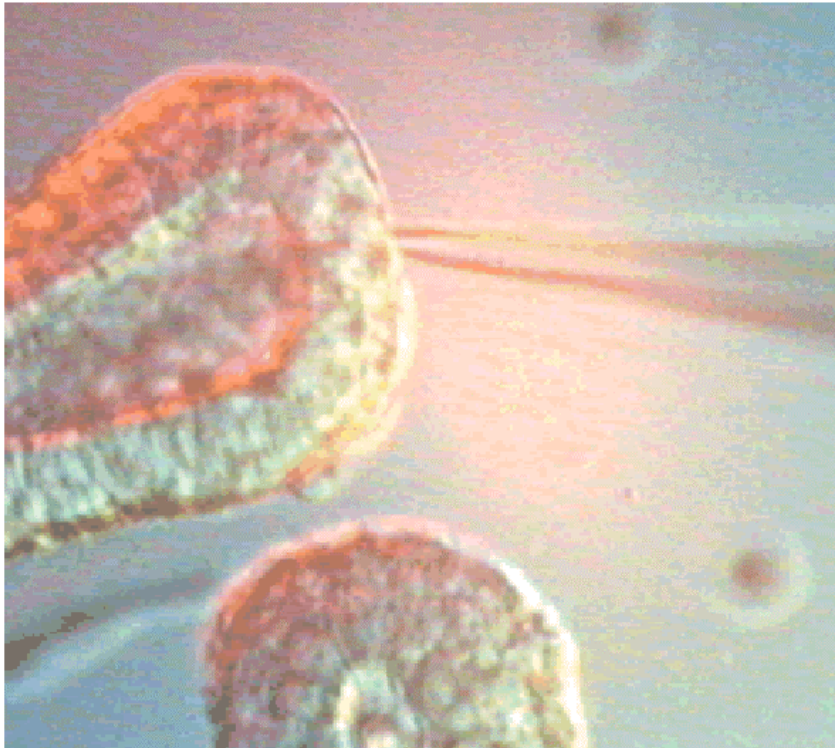


Abb. II.10

Pipette an der Oberfläche einer Krypte.

Originalfotographie: Darstellung des Präparates mit der sogenannten Normarski-Optik.

Bei Überschreiten der Luft-Flüssigkeits-Grenze entsteht in der Messkette Silberdraht - Pipettenlösung- Perfusionslösung - Bezugselektrode ein Messartefakt, als „*Liquid Junction Potential*“ oder *Offsetpotential* bezeichnet. Es ist nicht auf das Präparat oder die Kommandospannung zurückzuführen. Die Korrektur der Spannung, eine Einstellung des Membranpotentials auf „Null“, erfolgte am Verstärker. Somit lag das eingestellte Kommandopotential während der Messung auch wirklich an. Nun wurde zur Berechnung des Pipettenwiderstandes eine definierte Spannung in Form eines 50 mV-Rechteckimpulses appliziert. Aus dem daraus resultierenden Strom

liess sich nach dem Ohmschen Gesetz ($R = U/I$) der Widerstand berechnen. Entsprechend der Pipettenwiderstand Werten von 5-10 MegaOhm, wurde die Pipette an die Zelloberfläche geführt, der Überdruck abgelassen und vorsichtig aufgesetzt (s. Abb. II.11.1+2). Selten entstand ein sofortiger, spontaner Seal, häufig musste vorsichtiges Saugen diese innige Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran herbeiführen. Durch den sich in den GigaOhm-Bereich erhöhenden Widerstand, fiel nun die Stromantwort auf den Kommandospannungspuls am Oszilloskop nur noch minimal aus. Der Membranfleck unter der Pipettenöffnung war fast vollständig isoliert. Die angezeigten Ströme stellen eine fast durchgehend flache Linie dar mit zwei kapazitiven Artefakten am Anfang und Ende des Spannungspulses (s. Abb. II.11.3). Diese entstehen durch Umladeprozesse an Pipette und Zellmembran und wurden vor Beginn der Messung kompensiert.

Dann wurde die Zellmembran auf ein Haltepotential ca. – 60 mV geklemmt. Durch ruckartiges Saugen am Pipettenschlauch versuchte man die Membran zu durchbrechen, um einen elektrischen Zugang (Whole-Cell-Modus) unter der Pipettenöffnung herzustellen. Die Ganzzelleableitung erfasst den Stromfluss über der gesamten Membran. Das Durchbrechen der Zelle hatte eine deutliche Änderung des Stromflusses, sichtbar am Oszilloskop, zur Folge. Die kapazitiven Ströme nahmen durch die Vergrößerung der Messfläche zu, gleichzeitig verringerte sich der Widerstand unterhalb der Pipette und die Stromantwort auf den Testpuls wurde größer (s. Abb. II.11.4). Nach Kompensation der Kapazität wurde die Zelle im Current-Clamp-Modus auf einen Membranstrom von Null geklemmt und das Membranpotential der Zelle abgelesen.

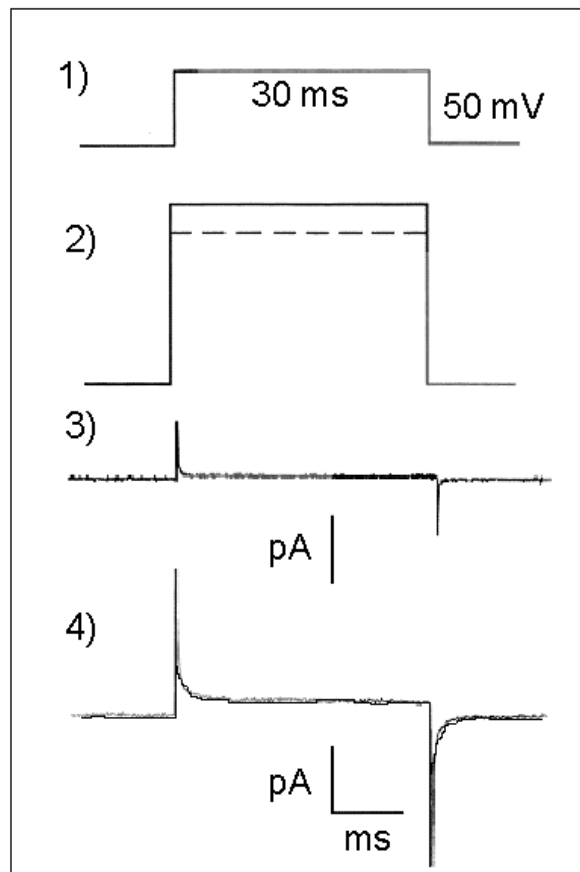


Abb. II.11

Arbeitsschritte zur Herstellung einer Whole-Cell-Konfiguration:

- 1) Anlegen eines Kommandospannungspulses.
- 2) Stromantwort der Pipette bei Eintauchen in die Badlösung (gestrichelte Linie: verkleinerte Stromantwort in unmittelbarer Nähe der Zellmembran, durch geringgradige Widerstandserhöhung).
- 3) Seal = fast durchgehende Linie = Reduktion der Stromantwort bis auf wenige pA; rechts und links kapazitative Artefakte. Nach Kompensation der Kapazität wird durch kurzen Unterdruck die Zellmembran unter der Pipettenöffnung perforiert und man registriert eine
- 4) Zunahme des Stromsignals in der Whole-Cell-Konfiguration, durch die Zunahme der Kapazität und die Reduktion des Zugangswiderstandes.

II.4.3.1 Strom-Spannungskurven

Klemmt man die Zellen auf ein definiertes Membranpotential (*Voltage-Clamp-Modus*), kann man den entsprechenden Membranstrom, der durch die Zellen fließt, kontinuierlich aufzeichnen. Werden die Haltepotentiale variiert, ändert sich auch der Strom. Trägt man nun die einzelnen Stromwerte in Abhängigkeit vom Potential auf, erhält man eine Strom-Spannungs-Kurve (I-V-Kurve). Der Schnittpunkt dieser Kurve mit der Spannungsachse (Abszisse) ergibt das sogenannte Umkehrpotential, die Spannung, bei der kein Strom mehr fließt. Abhängig ist das Umkehrpotential von der Ionenzusammensetzung auf beiden Seiten der Membran und den aktivierten Leitfähigkeiten in der Zellmembran. Es ermöglicht daher eine Aussage über die Art des beteiligten Kanals. Berechnen lässt sich das Gleichgewichtspotential für jedes einzelne Ion über die Nernst-Gleichung (s. Abb. II.12), wenn die Ionenkonzentrationen sowohl intrazellulär als auch extrazellulär bekannt sind.

Zur Charakterisierung des nicht-selektiven Kationenkanals am Darmepithel wurde ein Pulsprotokoll angewandt, welches ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV in $+10\text{ mV}$ -Schritten bis auf eine positive Spannung von $+60\text{ mV}$ sprang. Diese Spannungspulse von -70 mV , -60 mV , ... bis $+60\text{ mV}$ dauerten jeweils 30 ms . Zwischen den einzelnen Spannungssprüngen wurde jedesmal für eine Sekunde wieder auf das Haltepotential geklemmt.

Für die statistische Auswertung von Veränderungen im Membranstrom wurde der Einwärtsstrom bei einem Haltepotential von -80 mV gemessen und der Auswärtstrom am Ende eines Spannungspulses, der die Zelle auf $+60\text{ mV}$ depolarisierte. Zur Kontrolle des Membranpotentials und für die Entlastung der Zelle

wurde zwischen den einzelnen Strom-Spannungs-Kurven in den Current-Clamp-Modus gewechselt.

II.4.4 Berechnungen

II.4.4.1 Delta-Strom-Kurven

Delta-Strom(ΔI)-Kurven zeigen die Änderung des Stromflusses im Verlauf des Pulsprotokolls in Abhängigkeit von der perfundierten Badlösung. Sie sind das Ergebnis der Subtraktion von Stromwerten, ermittelt unter Kontrollbedingungen und den entsprechenden Strömen aus Versuchsmessungen. Die berechneten Werte wurden als Δ Strom-Spannungskurve in ein Diagramm aufgetragen und das Umkehrpotential dieser Kurve war dann ein Hinweis auf den im Versuch beeinflussten Kanaltyp.

II.4.4.2 Gleichgewichtspotential und Nernst-Gleichung

An der Zellmembran liegt ein elektrochemischer Gradient für jedes vorhandene Ion an. Der Strom des entsprechenden Ions kommt zum Stillstand, wenn sich elektrischer und chemischer Gradient im Gleichgewicht befinden. In diesem Gleichgewichtszustand ist der Nettostrom des jeweiligen Ions durch die Membran = „0“ Ampere. Dieses Gleichgewichtspotential lässt sich für jedes Ion mit Hilfe der Nernst-Gleichung (s. Abb. II.12) berechnen, wenn die Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran bekannt sind.

$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[Ion]_a}{[Ion]_i}$$

Abb. II.12

Nernst-Gleichung:

- E = Gleichgewichtspotential (V)
- R = Gaskonstante (8,3143 J·K⁻¹·mol⁻¹)
- T = absolute Temperatur (K)
- z = Ladung des betreffenden Ions
- F = Faraday-Konstante (96478 C·mol⁻¹)
- []_a / []_i = Konzentration des Ions auf der Außen- bzw. Innenseite der Membran (mol·l⁻¹)
- ln = natürlicher Logarithmus

II.5 Imaging-Technik

II.5.1 Grundlagen der intrazellulären Ca^{2+} -Messung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fura-2

II.5.1.1 Exzitationsspektren und Bindungsverhalten von Fura-2

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kann mittels des Fluoreszenz-Indikator-Farbstoffs Fura-2 (s. Abb. II.13) gemessen werden. Er bildet mit Calcium einen Chelat-Komplex, wobei das Ca^{2+} -Ion vom Chelat-Molekül „klauenartig“ umschlossen wird (griechisch: chele = Klaue). Dieses mehrfach geladene, große Molekül ist nicht in der Lage, die intakte Zellmembran zu passieren. Für die „Aufladung“ der Zelle wird die ungeladene, lipophile Form, der Fura-2 Acetoxymethyl(AM)-Ester, verwandt.

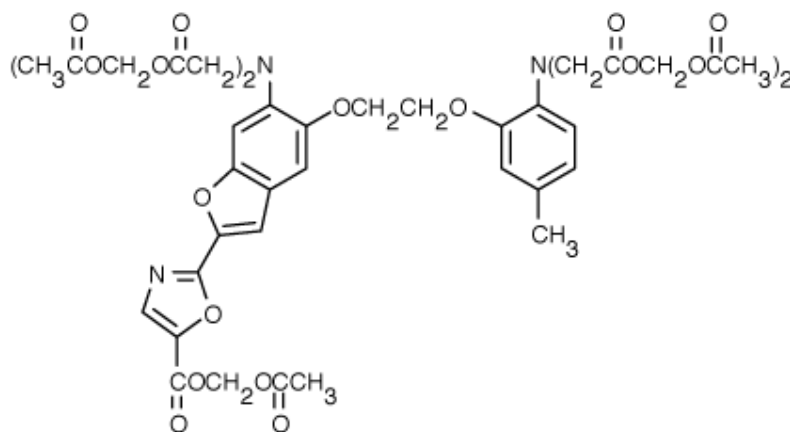


Abb. II.13

Fura-2 Acetoxymethyl(AM)- Ester

Fura-2 AM diffundiert in die Zelle, ist jedoch nicht aktiv und kann das Zielion nicht binden. Enzyme aus dem Zytosol, unspezifische Esterasen, spalten die Ester-Bindungen. Als freie Säure ist der Farbstoff aktiviert und zur Ionenbindung fähig. Der Vorteil dieser „intrazellulären Konvertierung“ vom inaktiven zum aktiven Zustand besteht in der Speicherung des aktiven Farbstoffs in der Zelle. Aufgrund seiner Ladung ist es ihm nicht möglich aus dem Zytoplasma zu entweichen. Ein Auswaschen des intrazellulär vorhandenen Farbstoffs, durch Perfusion des Präparats während des Versuchs, ist somit nicht zu befürchten.

Man unterscheidet bei den Ionen-Fluoreszenzfarbstoffen zwei Kategorien, die „Wavelength stable dyes“ und die „Wavelength shifting dyes“. Fura- 2 gehört zu den „Wavelength shifting dyes“, die mit Bindung an das Zielion Calcium ihre Exzitationswellenlängen ändern, so dass eine Differenzierung von freiem und gebundenem Farbstoff während der Messung vorgenommen werden kann. Für das ungebundene Fura-2 liegt das Anregungsmaximum bei 360 nm Wellenlänge, für den Ca^{2+} /Fura-2-Komplex bei 340 nm. Der freie Farbstoff wird jedoch nicht auf seinem Emissionsmaximum, sondern bei 380 nm angeregt. Dort nimmt die Emission aufgrund der Ca^{2+} -Bindung ab, so dass das Verhältnis („Ratio“) des Fluoreszenzsignals von der Anregung bei 340 nm-Wellenlänge zur vergleichbaren Anregung bei 380 nm (ungebundenen Fura-2) durch Bildung des Ca^{2+} /Fura-2-Komplexes, d.h. durch Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, zunimmt. Der Schnittpunkt beider Anregungsspektren bei 360 nm wird als isoemissiver Punkt bezeichnet (s. Abb. II.14).

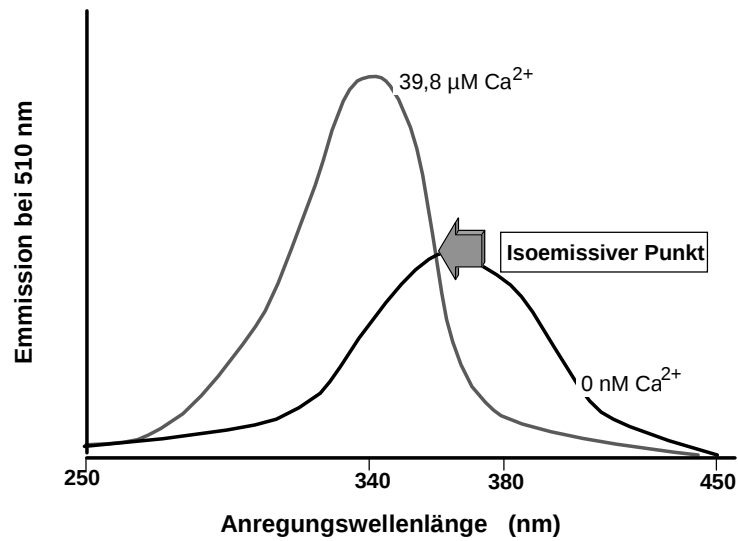


Abb. II.14

Fura-2-Exzitationsspektren bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen

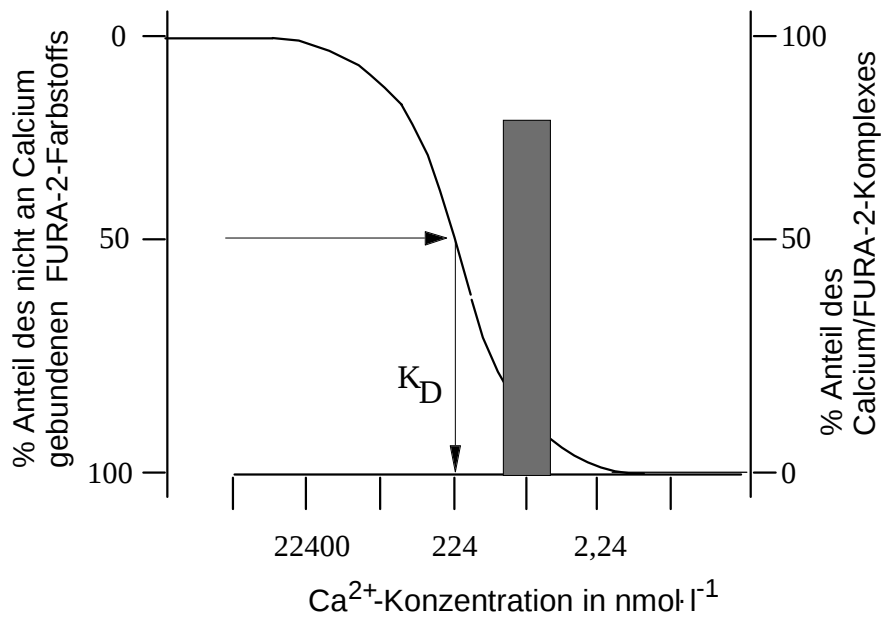


Abb. II.15

Bindung von Fura-2 an Calcium in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration.

In einer Bindungskurve kann man darstellen, wie sich der Anteil des mit Fura-2 gebundenen Calciums zur freien Ca^{2+} -Konzentration verändert (s. Abb. II.15). Ihr Verlauf ist sigmoidal.

Die Dissoziationskonstante (K_D) ist der Wert, bei dem 50 % des Indikatorfarbstoffes an das Zielion, hier Calcium, gebunden sind. Je kleiner der K_D -Wert, desto größer ist die Affinität des Farbstoffes für das Zielion. Für Fura-2 liegt der K_D -Wert bei einer Ca^{2+} -Konzentration von $224 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration unter Ruhebedingungen bei etwa $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, in der Grafik durch die graue Säule gekennzeichnet. Aufgrund des sigmoidalen Bindungskurvenverlaufs zeigt der Farbstoff eine ausreichende Kapazität für die Erfassung einer intrazellulären Calcium- Konzentrationserhöhung.

Die Eigenschaft der maximalen Anregung bei unterschiedlicher Wellenlänge macht man sich durch die sogenannten Verhältnismessungen (Ratio measurements) zu nutze. Eine Anregung bei 340 nm und 380 nm findet getrennt, mit einem zeitlichen Abstand von wenigen ms, statt. Aus den so erfassten Daten wird der Quotient der Emission bei beiden Wellenlängen (340 nm/ 380 nm) gebildet.

Diese Methode zeigt einige Vorteile:

- ❖ Die Ca^{2+} -Konzentrationsmessung ist unabhängig von der absoluten intrazellulären Farbstoff-Konzentration.
- ❖ Die Zell-Morphologie ist unbedeutend.
- ❖ Fehlermöglichkeiten durch Farbverlust oder Ausbleichvorgänge, während eines zeitlich länger gefassten Versuchs, werden minimiert.

Diese Faktoren zeigen sowohl bei 340 nm als auch bei 380 nm die gleichen Auswirkungen, fallen daher mit Bildung der Ratio nicht ins Gewicht.

Allerdings muss bedacht werden, dass mittels dieser Messung nur eine Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels registriert wird und keine exakte Ermittlung der Ca^{2+} -Konzentration. Um von der Ratio auf die Ionenkonzentration zu schließen, muss eine Kalibrierung vorausgehen.

II.5.1.2 Kalibrierung des Systems und Berechnung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Mittels mehrerer Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von freiem Calcium (von $0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $39,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; s. Abb. II.16) wurde eine Eichkurve erstellt. Diese zeigt die Fluoreszenzintensität bei der Sättigungskonzentration von Fura-2 bis zu einer Ionenkonzentration von „Null“.

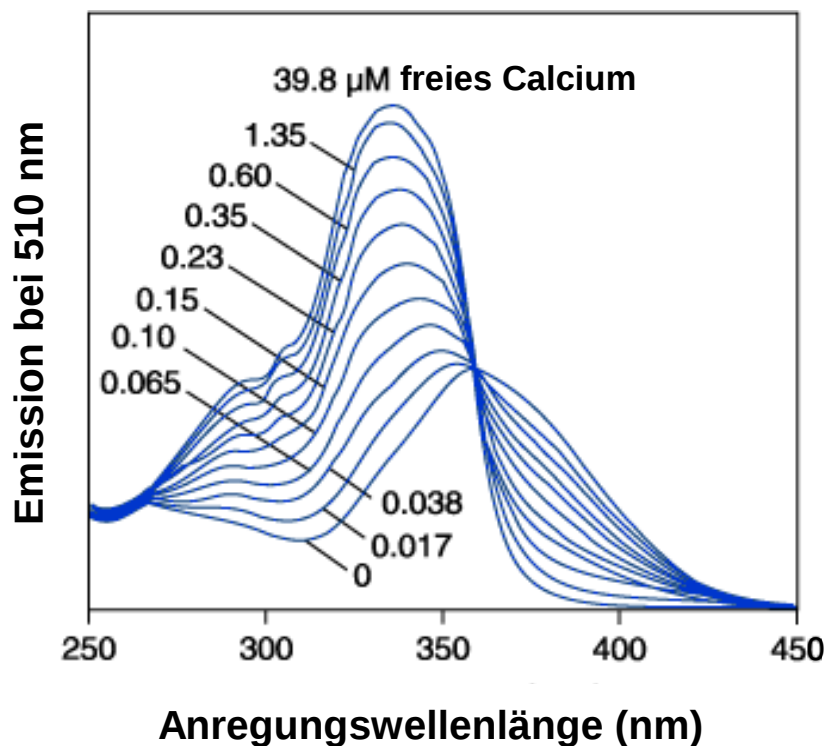


Abb. II.16

Fluoreszenzintensität differierender Ca^{2+} -Konzentrationen.

Die ermittelten Werte der Fluoreszenzintensität von gesättigter Konzentration ($R_{\max}$) und Fura-2-Eichlösung ohne Calcium ($R_{\min}$) wurden mit Hilfe der Grynkiewicz-Gleichung (Grynkiewicz et al., 1985) zur Berechnung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration herangezogen.

Die Grynkiewicz-Gleichung lautet:

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

- $[\text{Ca}]_i$ = intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration
- K_D = Dissoziationskonstante = $224 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$
- β = Fluoreszenzsignal bei 340 nm bei $0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Calcium dividiert durch das Fluoreszenzsignal bei 380 nm bei $39,8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Calcium
- R = Ratio
- $R_{\min}$ = Ratio bei $0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Calcium
- $R_{\max}$ = Ratio bei $39,8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Calcium

Die Übertragung der ermittelten Eichkurve auf intrazelluläre Messungen ist jedoch mit möglichen Fehlerquellen behaftet. Die Eichmessung erfolgt in der Regel extrazellulär. Zytoplasmatische Faktoren, die zu einer Beeinflussung der Messung führen, werden nicht berücksichtigt. Derartige Faktoren, die die Eigenschaften des Fura-2-Moleküls beeinträchtigen könnten, sind zum einen der pH-Wert, aber auch intrazelluläre Proteine, die den Farbstoff abfangen.

Durch das intrazelluläre Milieu ist eine direkte Umrechnung der gemessenen Ratio in eine Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe der Eichkurve nicht möglich, allerdings kann sie für eine Aussage über die Größenordnung der Konzentrationsänderung des Ions herangezogen werden.

II.5.2 Der Imaging-Messstand

II.5.2.1 Mikroskop und elektronische Komponenten

Wie für die Patch-Clamp-Experimente wurde auch für diese Messungen ein inverses Lichtmikroskop (Olympus IX-50, Olympus optical, Japan) verwandt, ausgestattet mit einem Epifluoreszenz-Setup und einer Imageanalyse-Software (Till Photonics, Martinsried, Deutschland).

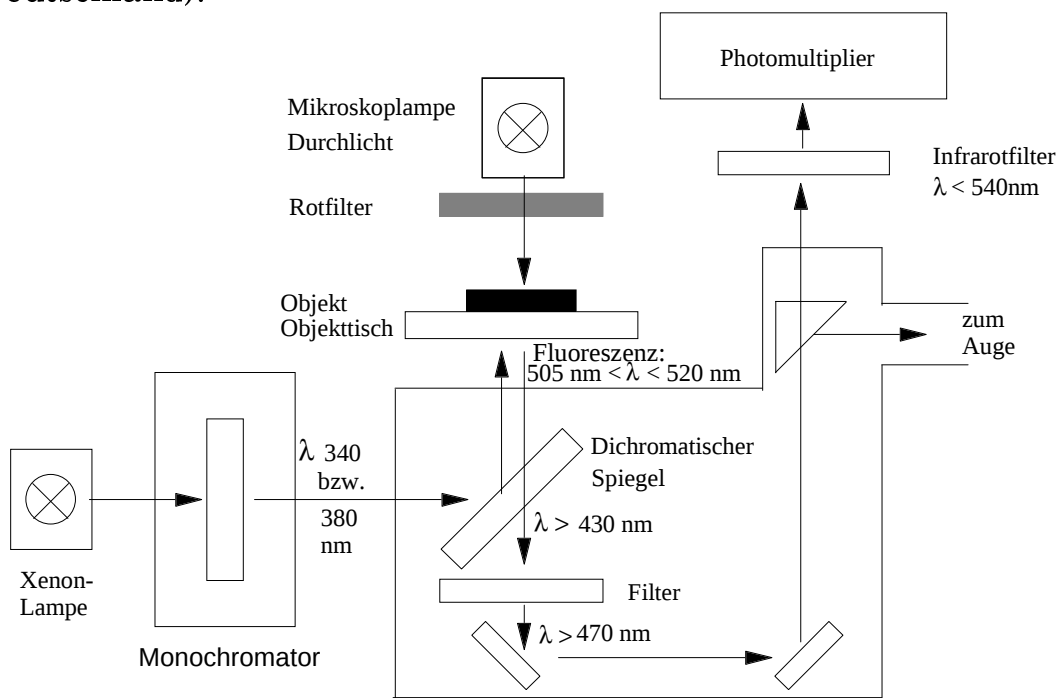


Abb. II.17

Das optische System der Fluoreszenzmessung.

Die Monochromator-Einheit ist das Herz des Messsystems. Über eine integrierte Xenon-Lichtquelle werden aus dem Lichtstrahl mit Hilfe verschiedener Linsen-, Filter- und Spiegelsysteme die entsprechenden Wellenlängen selektiert (s. Abb. II.17). Gekoppelt ist der Monochromator mit einem Epifluoreszenz-Kondensor, der die gebündelten Lichtstrahlen der Optik des Mikroskops zuführt. Ein mit der erwähnten Hardware gekoppelter Imaging-Systemcontroller gewährt die präzise Steuerung des Experiments. Zusätzlich ist eine Kamera vorhanden, die in Verbindung mit der Software „live-displays“ der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen aufzeichnet (s. Abb. II.18).

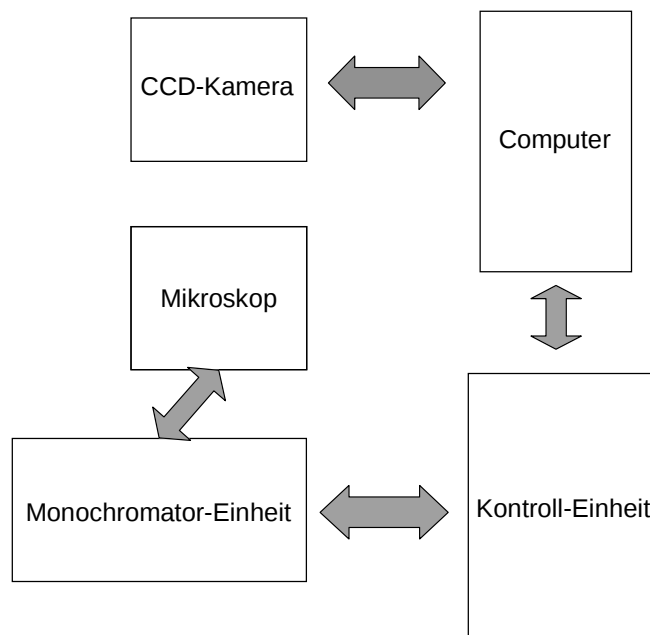


Abb. II.18

Hardware-Schematik des Imaging-Systems.

II.5.2.2 Messkammern

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

Die isolierten Krypten wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen gebracht und in Vorinkubationsschalen (Nunc Brand Products, Roskilde, Dänemark) eine Stunde mit $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fura-2 und $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Pluronic[®] inkubiert. Anschließend wurden die mit Krypten behafteten Deckgläschen mit Hochkalium-Tyrode gespült und mit Hilfe von Silikonpaste (Baysilone, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) unter die gebohrten Öffnungen der Zellkulturschalen geklebt. Diese Schalen wurden in eine Halterung auf dem Objektisch des Mikroskops eingesetzt und hydrostatisch perfundiert.

II.5.3 Versuchsdurchführung

Eine intakte Krypte wurde im Sichtfeld des Mikroskops justiert. Perfusionsschlauch und Absaugung waren mittels Magneten am Objektisch des Mikroskops befestigt. Der Aufbau des Perfusionssystems wurde vom Patch-Clamp-Messstand übernommen. Die Perfusionsrate belief sich auf $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ und führte zu einem konstanten Flüssigkeitsvolumen von 3 ml in der Messkammer.

Nach Start der Imaging-Software stellte sich die Krypte auf dem Monitor des Computers dar. An dem zu untersuchenden Präparat wurden mehrere Messregionen im Bereich des Fundus markiert (regions of interest = ROI; s. Abb. II.19) und hier die Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen im Verlauf des Experiments ermittelt.

Eine Messung der Grundlinie (Baseline), d.h. der Calcium-Konzentration unter Kontrollbedingungen, fand, bis zu ihrer Stabilisierung über mehrere Minuten statt, dann erst wurde ein Lösungswechsel bzw. eine Substanzapplikation durchgeführt.

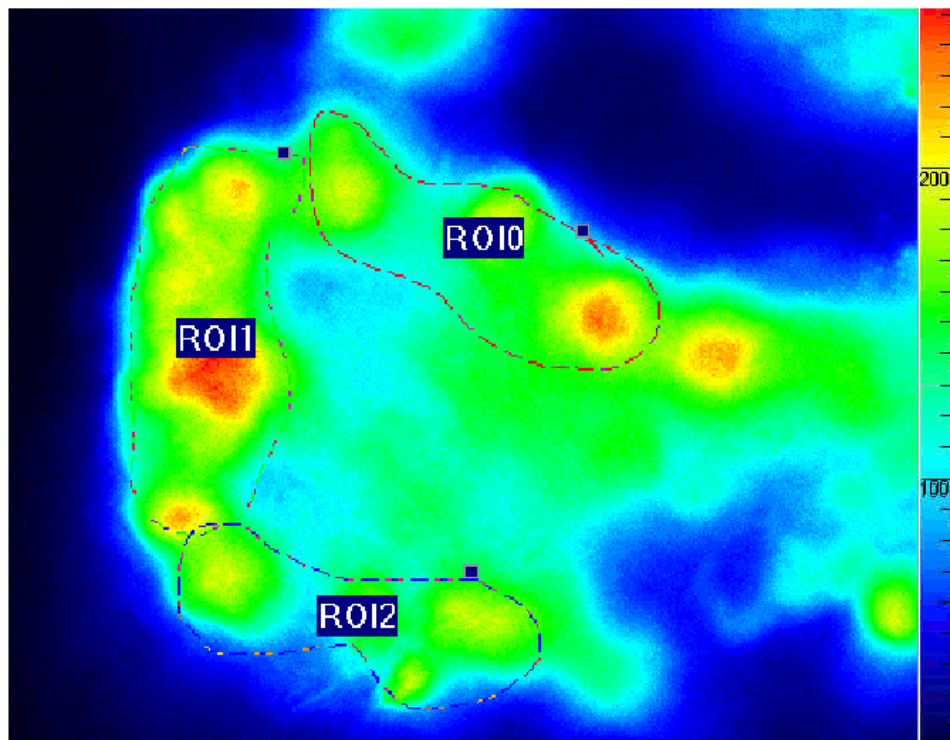


Abb. II.19

Mit Fura-2 aufgeladene Krypte zu Versuchsbeginn. In der Fundusregion sind drei Messbereiche, „regions of interest“ (ROI), definiert. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration liegt unter Ruhebedingungen bei etwa $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ein Anstieg des Calcium-Spiegels im Zytosol wird, neben den numerischen Werten, durch eine Änderung der Falschfarben (blau, grün, gelb bis rot; s. Farbskala re.) angezeigt, wobei die Farbe „Rot“ die relativ höchste intrazelluläre Ionenlokalisation darstellt.

II.5.4 Datenerfassung

Gemessen wurde die Fluoreszenz von Fura-2 bei zwei Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm). Die Sammelrate lag bei 0,2 Hz. Eine Emission über 470 nm wurde über einen Filter, der nur Wellenlängen unter 540 nm passieren ließ, zu einer CCD-Kamera geführt und in digitale Bilder umgesetzt. Die Kamera war mit dem Computer verbunden, der mit Hilfe der Imageanalyse-Software „TILLvisION“ (Till Photonics, Martinsried, Deutschland), die Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen, entsprechend der gemessenen Emissionen, auf dem Monitor in Form einer Grafik oder als Zahlenwerte (Ratio) darstellte. Gleichzeitig wurden die ermittelten Daten für die Auswertung des Versuchs auf der Festplatte gespeichert.

II.6 Ussingkammer-Technik

II.6.1 Die Messkammer

Die Kurzschlussstrom- oder Ussingkammer-Technik ist eine Methode zur Quantifizierung des elektrogenen Ionentransports an Epithelien. Sie wurde Anfang der fünfziger Jahre von Hans H. Ussing entwickelt (Ussing & Zerahn, 1951) und im Laufe der Zeit modifiziert.

Die hier eingesetzte Ussingkammer (s. Abb. II.20+21) bestand aus zwei Plexiglaskammerhälften, die mittels Schrauben miteinander verbunden wurden. Zur Befestigung des Gewebes waren in der Innenfläche der einen Hälfte Metallstifte eingelassen. Das Darmepithel trennte nach dem Einspannen die beiden Kammerhälften und wirkte als Grenzfläche zweier mit Pufferlösungen gefüllter Kompartimente. Durch einen temperierten, zirkulierenden Wasserkreislauf wurden Gewebe und Lösungen konstant auf 37°C gehalten. An der Oberseite einer jeden Kammerhälfte befand sich ein Zugang, über den Lösungen ausgetauscht und Chemikalien zugeführt werden konnten. Eine Begasung über zwei am Boden befindliche Gasfritten führte zu einer ausreichenden Sauerstoffversorgung des Darmepithels und einem konstanten pH-Wert der Pufferlösungen von 7,4, so dass eine Aufrechterhaltung der epithelialen Funktionen bis zu sechs Stunden nach Organentnahme möglich war. Elektronenmikroskopische Kontrollen des Gewebes wiesen in diesem Zeitraum keine morphologischen Veränderungen auf (Diener et al., 1989).

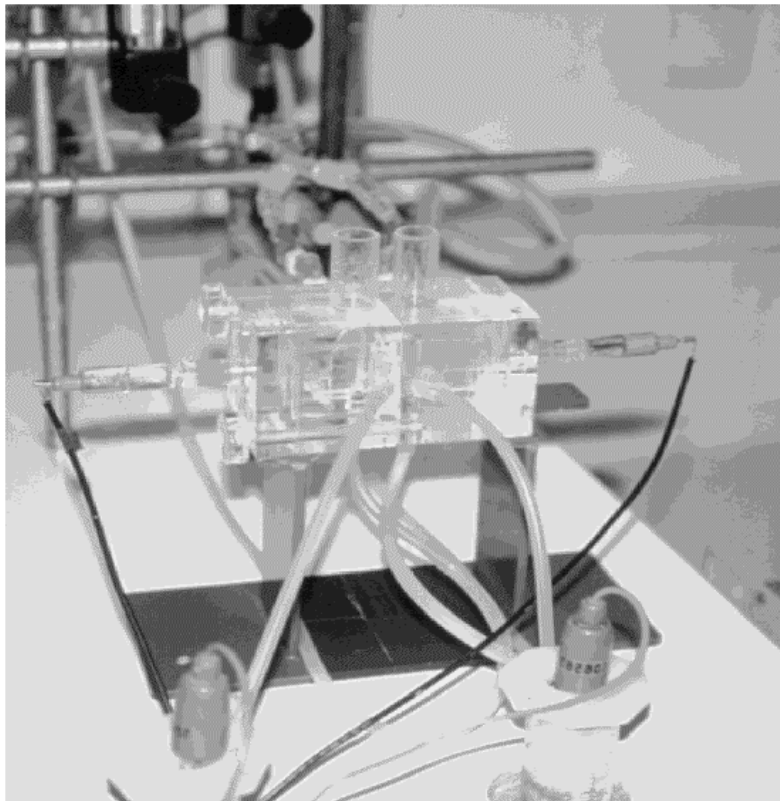


Abb. II.20

Ussingkammer im Original.

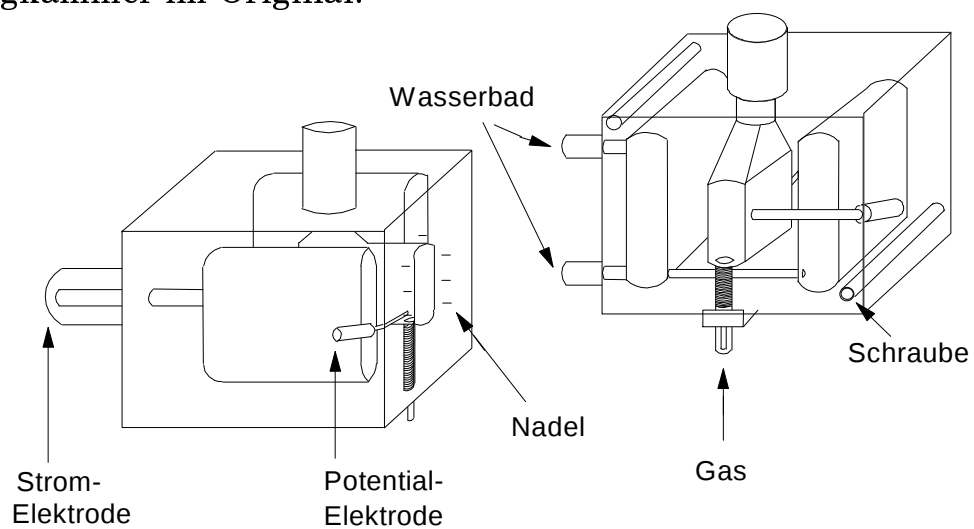


Abb. II.21

Schema der modifizierten Ussingkammer.

II.6.2 Elektrische Messungen

Um den Fluss bestimmter Ladungsträger über das Epithel bestimmen zu können, wurde von Ussing und Zerahn ein elektrisches Ersatzschaltkreismodell entwickelt (s. Abb. II.22).

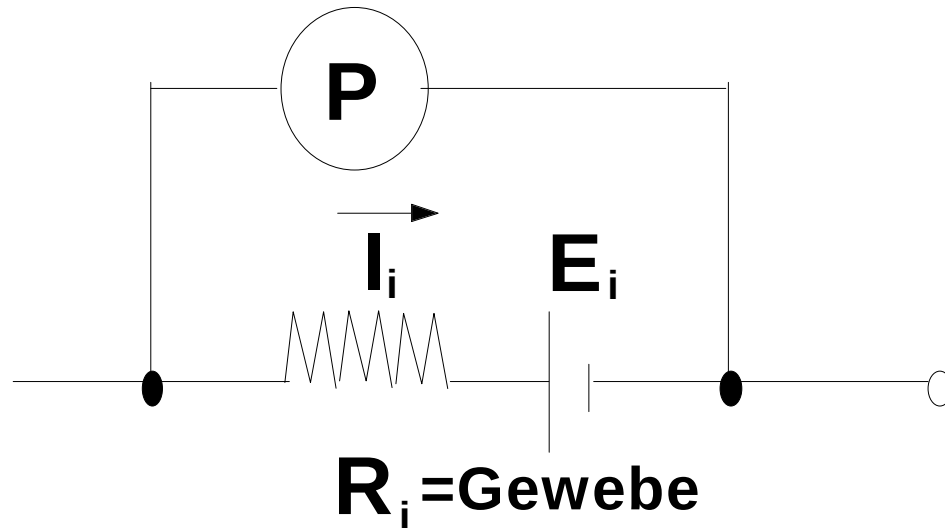


Abb. II.22

Prinzip der Erfassung von elektrogenen Verschiebungen einer Ionenspezies anhand eines elektrischen Schaltkreismodells.

P = Potentialdifferenz, E_i = elektromotorische Kraft, I_i = Ionenfluss, R_i = Widerstand

Heute findet eine Steuerung der Messanlage nicht mehr über Batterie und Potentiometer, sondern über die Software (Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland) eines Computers statt. Elektrische Parameter wie Kurzschlussstrom, Gewebeleitfähigkeit oder Gewebepotentialdifferenz können so kontinuierlich bestimmt werden.

Die verwendeten Ussingkammern besaßen zwei differierende Elektroden-Anschlüsse. Ein Elektrodenpaar wurde etwa einen

Millimeter vom Gewebe entfernt platziert, das andere hatte eine größerer Distanz zum eingespannten Epithel. Beide Paare waren über Agarbrücken (5% Agar in Parsons-Lösung) mit der Messkammer verbunden. Die gewebe-nahen Silber/Silberchlorid-Elektroden dienten zur Messung der Potentialdifferenz (PD) zwischen der mukosalen (= apikalen = luminalen) und serosalen (= basolateralen) Seite des Epithels. Aufgrund des geringen Abstandes zwischen Messstelle und Gewebe waren Messartefakte durch den Lösungswiderstand minimiert. Über die andere Ag/AgCl-Elektrode wurde Strom appliziert (s. Abb. II.23). Der größere Abstand zum Epithel bewirkte eine gleichmäßig auftreffende Stromdichte.

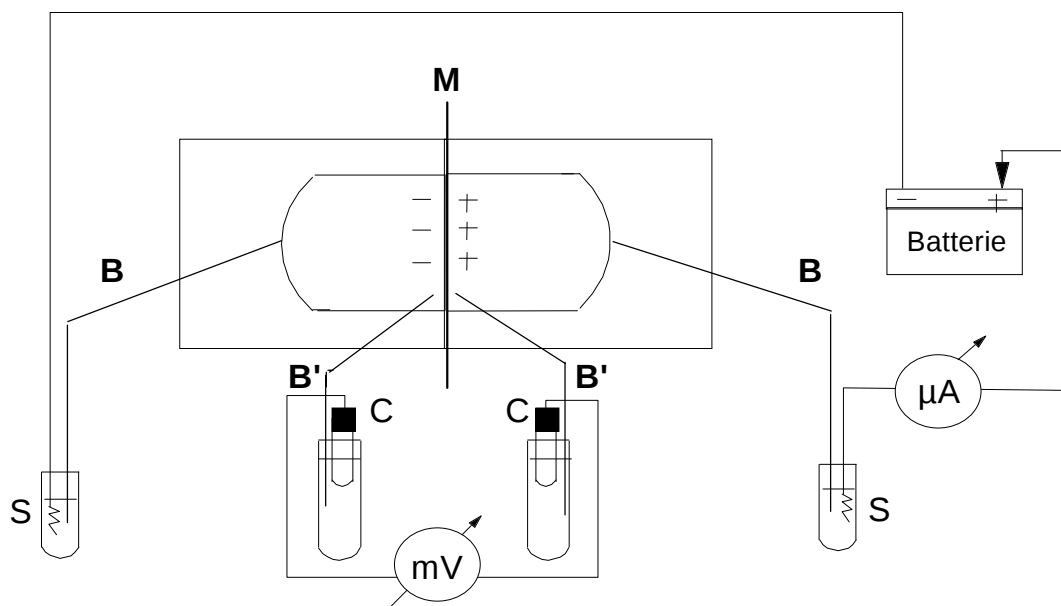


Abb. II.23

Kurzschlussstrom-Bestimmung nach Ussing und Zehran (1951); **C** = Ag/AgCl-Elektroden (PD-Messung), **S** = Ag/AgCl-Elektroden (Strom-Applikation), **B** und **B'** = Agarbrücken, **M** = Gewebe.

Initial wurde vor dem Einspannen des Gewebes die Eigenpotentialdifferenz des Elektrodenpaares (Offset) und der Widerstand, der für das Experiment verwandten Lösungen, ermittelt und vom Computer automatisch von den später erfassten Messdaten subtrahiert.

Nach Fixierung des Epithels zwischen beiden Kammerkompartimenten entstand eine transepitheliale Potentialdifferenz, begründet in einer spontanen Anionensekretion (Strabel & Diener, 1995) von serosal nach mukosal (Messung im „Open-Circuit-Modus“; s. Abb. II.24). Die serosale Seite wies gegenüber der mukosalen Seite ein, um einige mV positiveres Potential auf. Diese Potentialdifferenz wurde im Voltage-Clamp-Modus mit einem kompensatorischen Strom, dem *Kurzschlussstrom* (I_{sc} =short-circuit) ausgeglichen, d.h. auf Null geklemmt. Der elektrische Gradient für eine passive Verschiebung von Ionen über das Epithel entfiel.

Zeigte sich nun eine Zunahme des Kurzschlussstroms unter „Short-Circuit“-Bedingungen, resultierte diese aus aktiven Transportvorgängen.

Per definitionem entspricht ein positiver I_{sc} einer aktiven Kationenverschiebung von der mukosalen zur serosalen Epithelseite bzw. einem Anionentransport in die entgegengesetzte Richtung.

Neben den schon aufgeführten Parametern „Kurzschlussstrom“ und „Potentialdifferenz“ beinhaltet eine vollständige Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften eines Gewebes zusätzlich die Messgröße des Widerstandes (R_t ; mit „t“ für tissue) bzw. der Leitfähigkeit (G_t ; mit „t“ für tissue). Die Leitfähigkeit des eingespannten Epithels stellt die Summe aller Einzelleitfähigkeiten

dar (Scheffler, 1984). Ihre Messung erfolgte in der Form, dass alle 60 s ein bipolarer Strompuls von $\pm 50 \mu\text{A}$ Amplitude über eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe einwirkte. Aus der resultierenden Potentialänderung ließ sich mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes ($U=R \cdot I$) die Leitfähigkeit (G) errechnen. Die Leitfähigkeit entspricht dem Kehrwert des Widerstandes $R = U / I$; so ergibt sich für sie $G = I / U$ angegeben in Siemens (S).

- R = Widerstand in Ohm
- U = Spannung in Volt
- I = Strom in Ampere
- G = Leitfähigkeit in Siemens

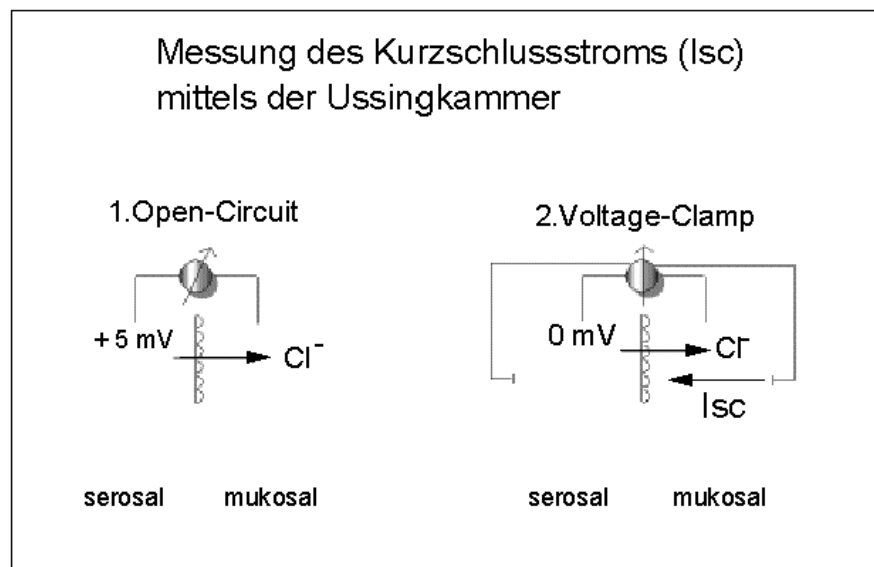


Abb. II.24

Durch spontane Chloridsekretion entwickelt sich eine Potentialdifferenz zwischen serosaler und mukosaler Geweboberfläche. Dieser Gradient wirkt als treibende Kraft für weitere Ionenbewegungen. Durch Einspeisung eines entgegenwirkenden Stroms, des Kurzschlussstroms (I_{sc}), wird diese Potentialdifferenz aufgehoben.

Für einen direkten Vergleich der Ionentransferleistungen, wurde der Kurzschlussstrom als Ladungsverschiebung pro Zeit und freier Gewebefläche ($\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ mit $1\ \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^2$) angegeben.

II.6.3 Datenerfassung

Die Versuche begannen nach einer Äquilibrierungszeit von 60 Minuten, in der sich der Isc stabilisierte. Die Messwerte von PD, Isc und Gt wurden von dem Computer erfasst, gespeichert und am Ende des Versuchs minutenweise ausgedruckt.

Als *Baseline* (Kurzschlussstrom unter basalen Bedingungen) wurde der Mittelwert der letzten drei Isc-Minutenwerte vor Substanzzugabe genommen, als *Peak* bezeichnete man den höchsten Wert nach Substanzzugabe.

II.7 Chemikalien

Die eingesetzten Substanzen wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland bezogen. Die verwendeten Lösungsmittel zeigten in Kontrollversuchen keine Effekte. 2',4'-Dichlorobenzamil(DCB)Hydrochlorid (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO; max. Endkonzentration $2,8\ \text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$) gelöst. Forskolin wurde mit Ethanol (max. Endkonzentration 0,29 %, v/v) als Stammlösung angesetzt. GEA 3162 (1,2,3,4-Oxatriazolium, 5-amino-3-(3,4-dichlorophenyl)-chlorid; Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz) und Carbachol wurden in destilliertem Wasser gelöst.

Das für die Haftung der Krypten auf den Deckgläschen verwandte Poly-L-Lysin (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) wurde in einer 0,01%-igen Lösung aufgetragen.

II.8 Statistik

Die Messwerte wurden als Originalwerte oder als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM = standard error of the mean) dargestellt. Vergleiche zwischen mehreren Gruppen wurden mittels Varianzanalyse, gefolgt von einem Tukey's Test statistisch ausgewertet, der Vergleich von zwei Gruppen wurde mit gepaartem bzw. ungepaartem Student's T-Test oder Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Ein F-Test entschied, welche Testmethode verwandt wurde. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für die Berechnungen kamen die Software-Programme Excel[®] (Microsoft, Redmond, USA), Origin[®] (Microcal, Northampton, USA) und Stat Most[™] (Dataxiom, LosAngeles, USA) zum Einsatz.

III Resultate

III.1 Charakterisierung des nicht-selektiven Kationenkanals

Der am Kolonepithel nachgewiesene nicht-selektive Kationenkanal kann über eine hohe Konzentration eines Chelatbildners (EGTA) in der Patchpipette aktiviert werden (Frings et al., 1999). Diese Leitfähigkeit ist sowohl für Natrium als auch für Calcium permeabel, wobei für Natrium eine sechs mal höhere Durchlässigkeit nachgewiesen wurde. Dies wirft die Frage auf: „Wie permeabel ist der Kanal für andere monovalente Kationen?“

III.1.1 Selektivität gegenüber monovalenten Kationen

Mit Hilfe der Whole-Cell Patch-Clamp-Technik wurden an isolierten Krypten die Einwärtsströme verschiedener monovalenter Kationen gemessen. Hierzu wurde an die zu messende Zelle ein Membranpotential von -80 mV angelegt. Zur Aktivierung der zu untersuchenden Leitfähigkeit befanden sich $11 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA in der Pipettenlösung. Kontaminationen durch Chlorid-Ströme, die unter Standardbedingungen eine dominierende Rolle spielen (Schultheiss & Diener, 1998), wurden durch die Verwendung von NMDG-Gluconat in der Pipettenlösung vermieden. In der Perfusion befand sich zu Beginn NMDG^+ ($140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG-Cl-Tyrode), ein Kation, das aufgrund seiner Größe die Membran über den Speicher-gesteuerten Kanal nicht passieren kann. Danach wurde NMDG-Cl äquimolar durch die Chloridsalze von Natrium, Kalium, Lithium und Caesium ersetzt. Ihre Reihenfolge wurde beliebig gewählt. Nach jeder Perfusion mit einem permeierenden Kation wurde wieder zur NMDG-Cl-Tyrode gewechselt.

Jedes dieser Alkalimetall-Ionen bewirkte eine Zunahme des Einwärtsstroms (I_{in} ; s. Abb. III.1), war somit in der Lage den nicht-selektiven Kationenkanal zu passieren, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Setzte man den in Anwesenheit von Natrium gemessenen Strom von -458 ± 220 pA als Bezug fest (= 100 %), so betrug der Lithium-getragene I_{in} nur 59 ± 6 %, während er für Caesium signifikant größer war (180 ± 35 %; $n = 7$). Die für Kalium vorhandene Leitfähigkeit wurde quantitativ nicht ausgewertet, da keine Kaliumkanalblocker eingesetzt wurden und der Einwärtsstrom deshalb nicht ausschließlich durch den nicht-selektiven Kationenkanal stattfand. Hieraus ergab sich die Permeabilitäts-Sequenz: $Cs^{+(b)} > Na^{+(a)} \geq Li^{+(a)}$ (s. Legende zu Abb. III.2).

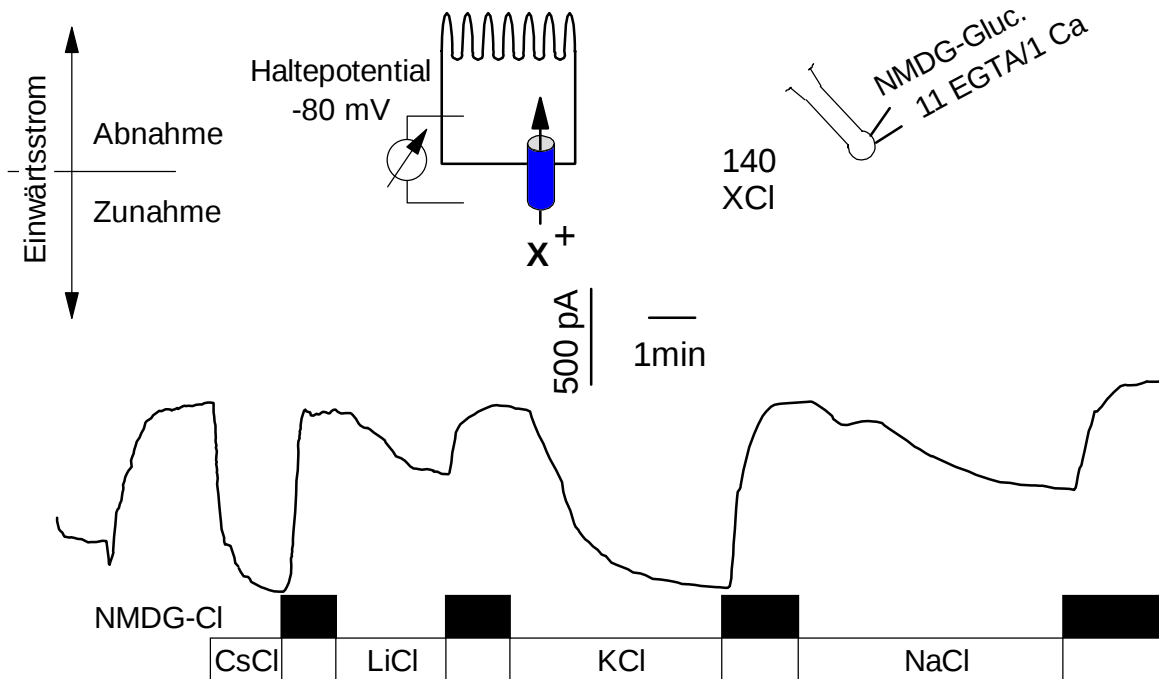


Abb. III.1

Originalaufnahme des Einwärtsstroms einer Zelle der isolierten Krypte während der Perfusion mit $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NMDG-Cl-Tyrode (schwarze Balken) und CsCl, LiCl, KCl oder NaCl (weiße Balken). Die Pufferlösungen mit den o.g. monovalenten Kationen wurden in allen Versuchen dieser Serie in zufälliger Reihenfolge gewechselt.

Die Patch-Pipette enthielt NMDG-Gluconat mit einer hohen EGTA-Konzentration (s. Schema rechts, oben); die Zelle wurde auf ein Membranpotential von -80 mV geklemmt (oben, Mitte), um die Triebkraft für den Einwärtsstrom zu erhöhen.

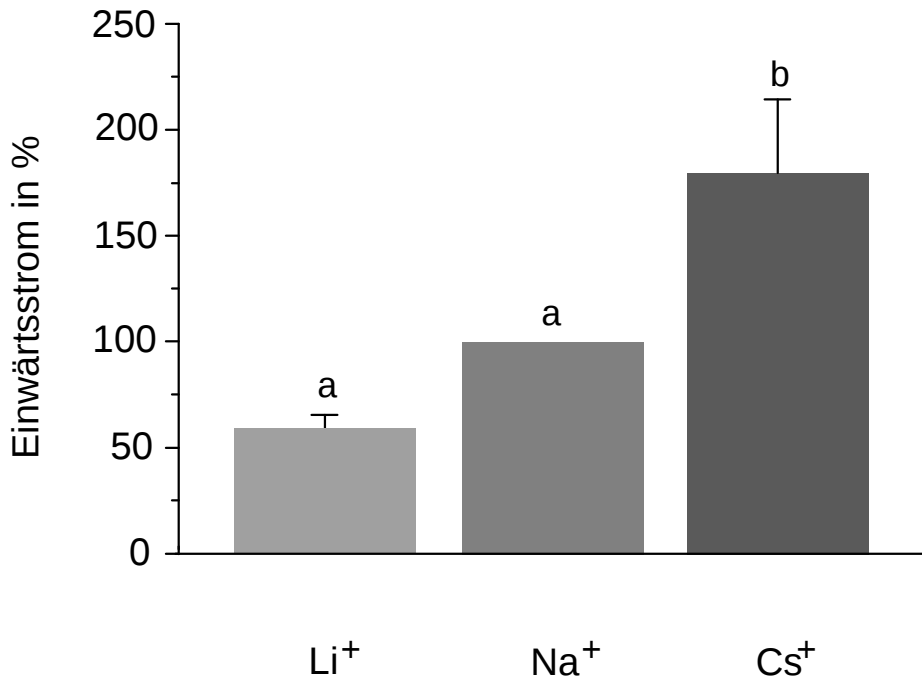


Abb. III.2

Der Einwärtsstrom, getragen durch monovalente Kationen, in Relation zu dem Natrium-Einwärtsstrom, der für jede Zelle auf 100 % gesetzt wurde. Der mittlere Einwärtsstrom in Anwesenheit von Natrium belief sich auf 458 ± 220 pA ($n = 7$). Unterschiedliche Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Gruppen hin (Varianzanalyse gefolgt von Tukey's Test).

III.1.2 Hemmwirkung divalenter Kationen auf den nicht-selektiven Kationenkanal

Auch das divalente Kation Calcium passiert den nicht-selektiven Kationenkanal. Im Gegensatz zu Natrium hemmt es jedoch bei Konzentrationen über $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ seinen eigenen Einstrom in die Zelle (Frings et al., 1999). In der folgenden Versuchsserie sollte geklärt werden, ob andere divalente Kationen ebenfalls diese hemmenden Eigenschaften aufweisen. Unter Verwendung der in der ersten Versuchsserie angewandten NMDG-Gluconat/ $11 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EGTA-Pipettenlösung wurden die Zellen mit einer $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl/ $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca^{2+} -Tyrode perfundiert. Bei einem Klemmpotential von -80 mV wurde nun der unter diesen Bedingungen hauptsächlich von Na^{+} -Ionen getragene Einwärtsstrom über der Zellmembran gemessen (s. Abb. III.3). Im zufälligen Wechsel wurden jeweils $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BaCl_2 , SrCl_2 , MgCl_2 und CaCl_2 , gelöst in der o.g. NaCl/ Ca^{2+} -Tyrode, zugegeben. Vor jedem Puffertausch mit einer hohen Konzentration divalenter Kationen wurde die Lösung gegen die initial verwandte $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl/ $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca^{2+} -Tyrode gewechselt, so dass für jedes divalente Kation ein eigener basaler I_{in} gemessen wurde. Durch Bildung der Differenz $I_{\text{in ohne}}$ zu $I_{\text{in mit}}$ divalentem Kation wurde dann das ΔI_{in} gebildet.

Der Na^{+} -getragene Einwärtsstrom wurde von allen divalenten Kationen gehemmt. Ihre Hemmwirkung war jedoch unterschiedlich ausgeprägt: $\text{Ca}^{2+} \geq \text{Mg}^{2+} \geq \text{Ba}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+}$ (s. Abb. III.4). Der Absolutwert der Stromhemmung durch Calcium lag bei $166 \pm 63 \text{ pA}$ ($n = 7$), wobei die Abnahme des Na^{+} -Einwärtsstroms bei der $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca^{2+} -Konzentration für jede gemessene Zelle als Bezug ($=100 \%$) verwendet wurde. Magnesium verringerte den

Einwärtsstrom im Verhältnis zu Calcium um $79 \pm 16 \%$, Strontium um $56 \pm 8 \%$ und Barium um $71 \pm 11 \%$. Signifikante Unterschiede ergaben sich beim Vergleich zwischen Ca^{2+} und $\text{Ba}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$, ebenso zwischen Mg^{2+} und Sr^{2+} . Mg^{2+} und Ca^{2+} , die physiologisch eine Rolle spielen, zeigten einen ähnlich hemmenden Effekt.

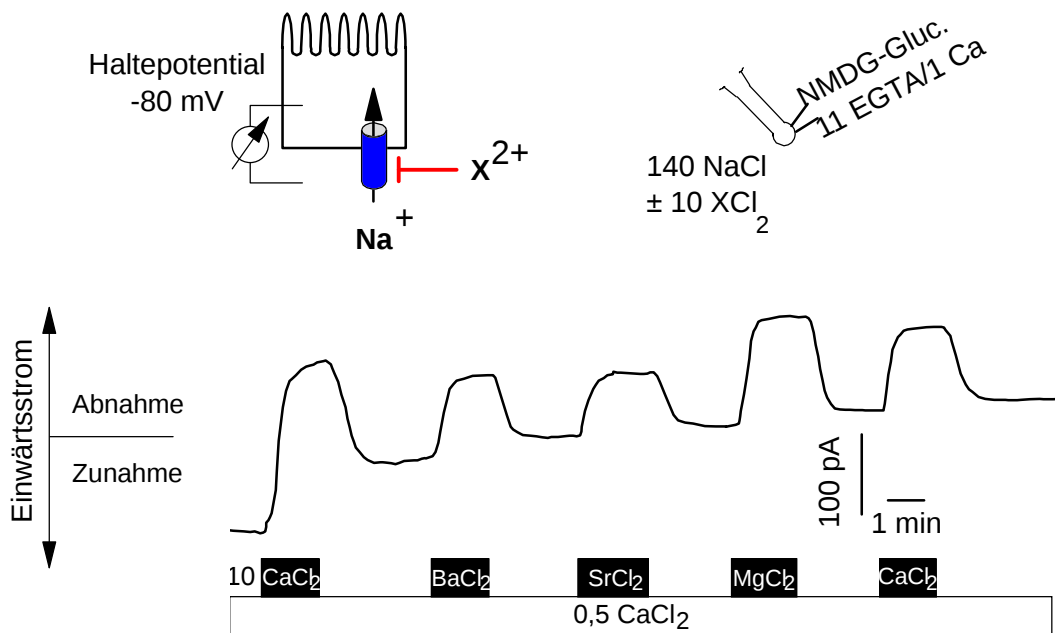


Abb. III.3

Originalaufzeichnung der Hemmung des Na^+ -getragenen I_{IN} durch den nicht-selektiven Kationenkanal, infolge Zugabe divalenter Kationen (schwarze Balken) an einer Kryptenzelle. Die Zellen wurden auf ein Membranpotential von -80 mV geklemmt, um die Triebkraft für den Einwärtsstrom zu erhöhen. Die Reihenfolge der Ionen war zufällig gewählt. Bei Messung der Hemmung wurde Bezug auf den basalen I_{IN} während Perfusion mit der $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl/ $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CaCl_2 -Tyrode direkt vor Zugabe des entsprechenden divalenten Kations genommen.

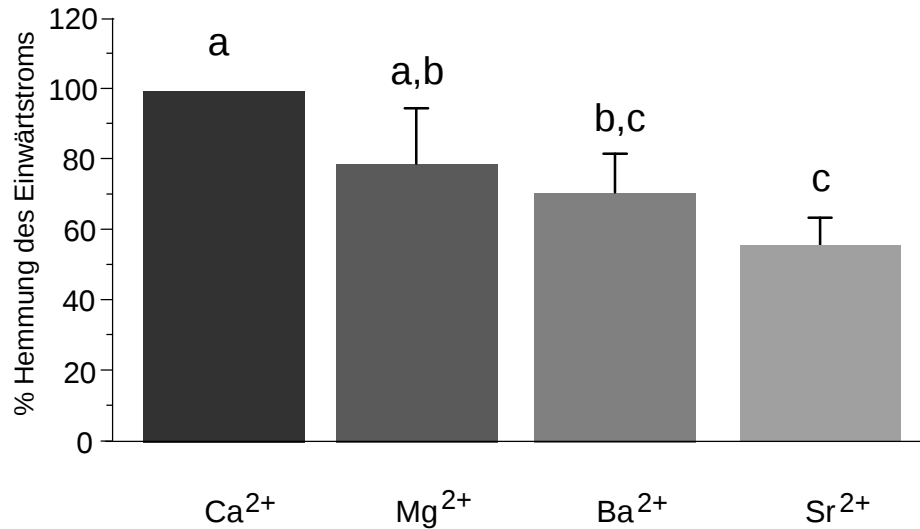


Abb. III.4

Hemmung des Na⁺-getragenen Einwärtsstroms durch divalente Kationen in einer Konzentration von 10 mmol·l⁻¹. Die Stärke der Hemmung wurde in Bezug zur I_{in}-Hemmung durch 10 mM Ca²⁺ gesetzt. Die mittlere Reduzierung des Einwärtsstroms durch Calcium betrug 166 ± 63 pA (n = 7). Unterschiedliche Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den einzelnen Gruppen hin (Varianzanalyse gefolgt von Tukey's Test).

III.2 Interaktion zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und nicht-selektivem Kationenkanal

An verschiedenen, nicht neuronalen Geweben wurden Ca^{2+} -permeable Kanäle beschrieben, die sich über eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aktivieren lassen (Parekh & Penner, 1997). Im Kolon der Ratte führt eine Speicherentleerung ebenfalls zu einem Ca^{2+} -Influx über den nicht-selektiven Kationenkanal in die Zelle (Frings et al., 1999). Über welchen Mechanismus die Interaktion zwischen Speicher und Ionenkanal in der Zellmembran stattfindet, ist jedoch weitgehend unbekannt.

III.2.1 Wirkung von cAMP auf den nicht-selektiven Kationenkanal

Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat ist ein wichtiger Second messenger der Zelle. Aus der Literatur (Bleich et al., 1996) ist bekannt, dass eine Erhöhung der cAMP-Konzentration zu einer Reduzierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Denkbar wäre eine durch cAMP-vermittelte Hemmung des nicht-selektiven Kationenkanals. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik wurde diese Annahme überprüft.

Die Aktivierung des Kanals erfolgte über die auch in den ersten Versuchsserien eingesetzte Pipettenlösung. Als Perfusionslösung fungierte eine $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaGluconat-Tyrode. Cl^- wurde durch Gluconat ersetzt, da bekannt war, dass cAMP einen apikalen Chlorid-Kanal aktiviert. Zusätzlich wurde die Zelle auf ein Potential von -80 mV geklemmt, ein Wert, der nahe dem K^+ -Gleichgewichtspotential liegt. Nach einer 10 - 15 Minuten dauernden Kontrollperiode kam es zu einer Depolarisation infolge der Speicherentleerung durch die EGTA-Pipettenlösung. Die Zugabe von Forskolin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$),

einem Aktivator der Adenylatzyklase, erhöhte die intrazelluläre cAMP-Konzentration, eine Änderung des Membranpotentials (s. Abb. III.5) und eine signifikante Beeinflussung von I_{in} und I_{out} durch cAMP (s. Abb. III.6) wurden jedoch nicht beobachtet. Unter der Perfusionslösung ergab sich ein Einwärtsstrom von 73 ± 19 pA, der Auswärtsstrom lag bei 107 ± 29 pA. Nach Forskolin-Zugabe erhöhte sich der I_{in} nicht signifikant auf 102 ± 37 pA, der I_{out} auf 112 ± 25 pA ($n = 8$). Somit ist eine Hemmung des nicht-selektiven Kationenkanals durch cAMP nicht anzunehmen.

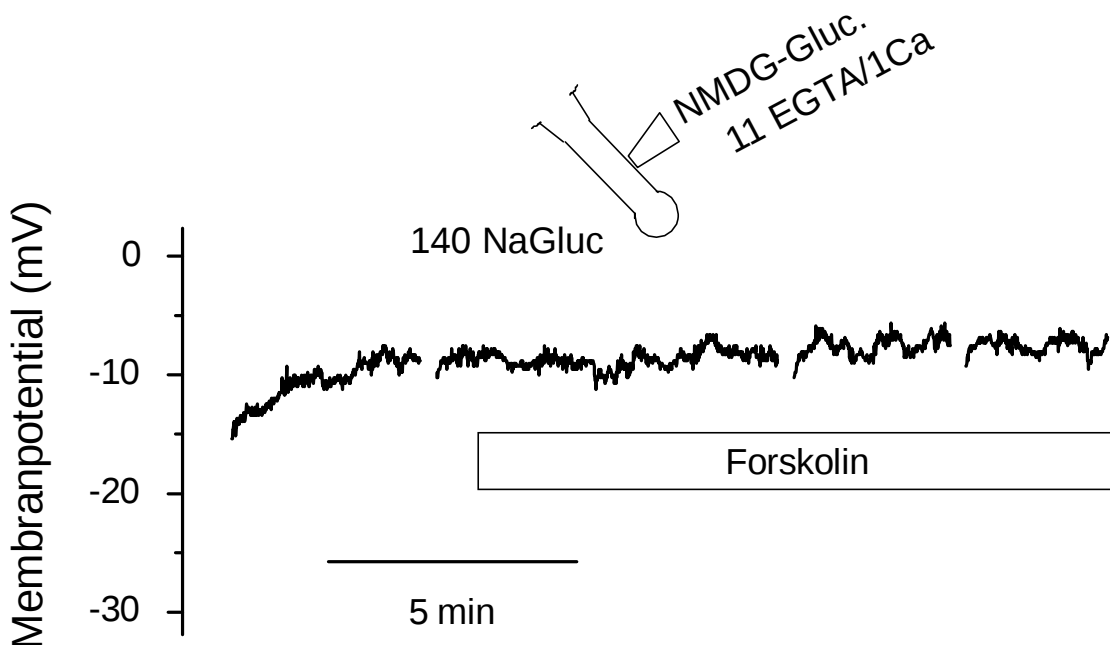


Abb. III.5

Keine Veränderung des Membranpotentials einer Kryptenzelle durch den Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) nach Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals durch die EGTA-Pipettenlösung; als Kontrolllösung diente eine NaGluconat-Tyrode.

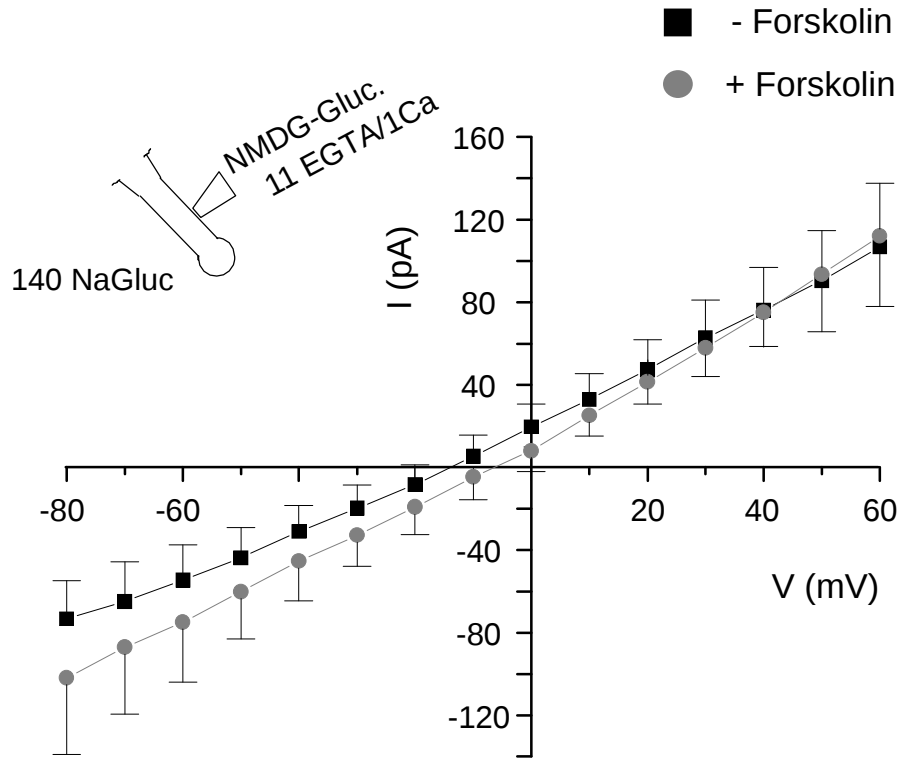


Abb. III.6

Membranströme ohne (schwarze Quadrate) und mit $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ Forskolin (graue Kreise) in der Perfusionslösung. Unter der Applikation von Forskolin traten keine signifikanten Änderungen in Ein- und Auswärtsströmen auf. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte und die entsprechenden SEM-Daten ($n = 8$).

III.2.2 Effekt einer Zellvolumenänderung auf den nicht-selektiven Kationenkanal

Zellen besitzen die Fähigkeit unter anisoosmolaren Bedingungen ihr erhöhtes Volumen zu reduzieren (regulatorische Volumenabnahme) bzw. einer Zellschrumpfung mit einer kompensatorischen Anhebung des Volumens entgegen zu wirken (regulatorische Volumenzunahme). Unterschiedlichste Transportsysteme werden aktiviert, um Osmolyte aus dem Zytosol zu entfernen oder darin zu akkumulieren. In einigen Zelltypen führt eine Zellschwellung zur Aktivierung von nicht-selektiven Kationenkanälen und infolgedessen zu einer intrazellulären Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (Lang et al., 1998). Der Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktiviert Ca^{2+} -sensitive K^+ -Kanäle und unterstützt die regulatorische Volumenabnahme (Kawahara et al., 1991). Das Interesse dieser Versuchsserie, bei der die Patch-Clamp-Technik eingesetzt wurde, bezog sich auf die Involvierung des nicht-selektiven Kationenkanals in diesen Regulationsablauf, denn solch eine Ca^{2+} -abhängige K^+ -Leitfähigkeit ist auch am Kolon der Ratte beschrieben (Böhme et al., 1991).

Wurde der Kanal mit einer Ca^{2+} -puffernden EGTA-Pipettenlösung aktiviert und die isolierte Krypte einem Wechsel von isotoner zu hypotoner Perfusionslösung ausgesetzt ($110 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaGluconat} + \text{Mannitol} \rightarrow 110 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaGluconat}$), schien dies eine Inaktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals zu provozieren. Es zeigte sich eine Hyperpolarisation von $-12 \pm 5 \text{ mV}$ zu $-19 \pm 7 \text{ mV}$ ($n = 6$; $p < 0,05$; s. Abb. III.7). Der Einwärtsstrom reduzierte sich im Gegensatz zum Auswärtsstrom signifikant (s. Abb. III.8a; isotone Badlösung: $I_{in} 69 \pm 22 \text{ pA}$; $I_{out} 73 \pm 25 \text{ pA} \rightarrow$ hypotone Badlösung: I_{in}

48 ± 18 pA; I_{out} 64 ± 19 pA; Vergleich Kontrolle versus Versuch $I_{in} = p < 0,05$; $I_{out} = p > 0,05$).

Das Umkehrpotential des durch die hypotone Perfusionslösung gehemmten Stroms war nicht verschieden von 0 mV ($p < 0,05$), was auf eine Hemmung der nicht-selektiven Kationenleitfähigkeit hinweist (s. Abb. III.8b).

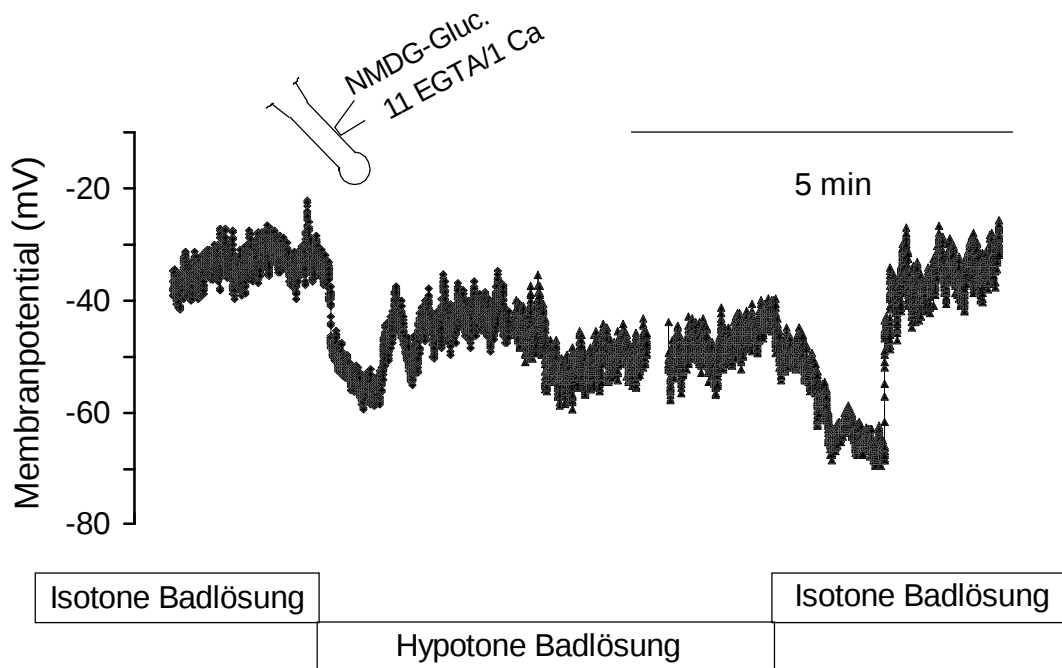


Abb. III.7

Originalaufzeichnung des Membranpotentials einer Zelle, die unter der hypotonen $110 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaGluconat-Lösung hyperpolarisierte. Bei einer erneuten Perfusion mit isotoner Tyrode war die Hyperpolarisation in 4 Versuchen reversibel.

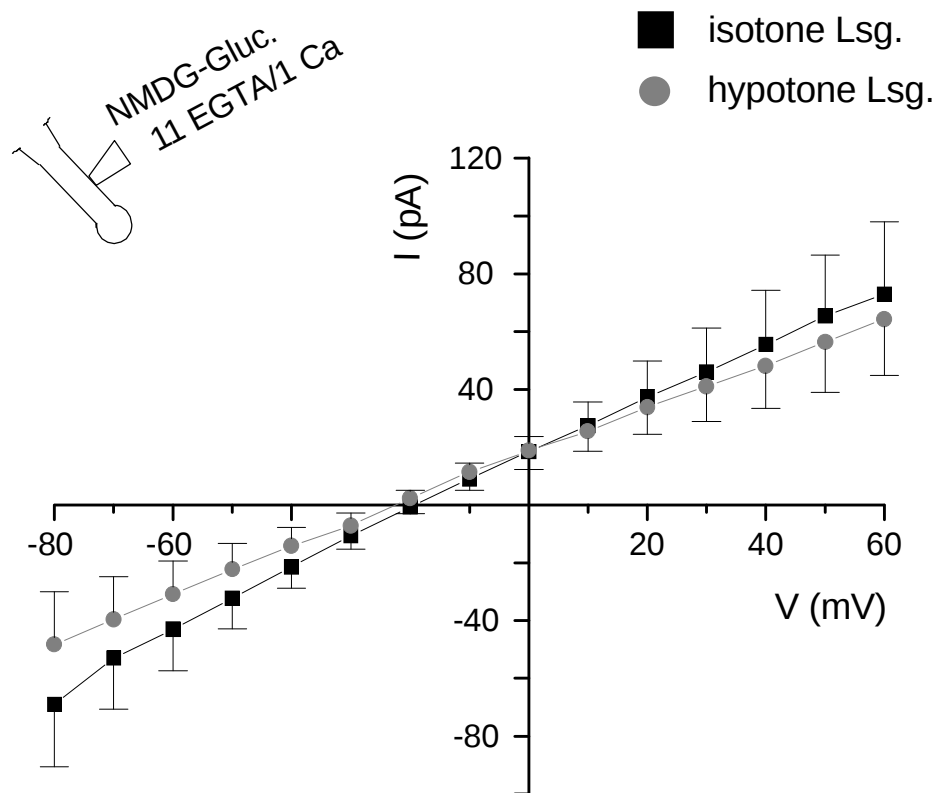


Abb. III.8a

Membranströme unter einer isotonen 110 mmol·l⁻¹ NaGluconat/ 50 mmol·l⁻¹ Mannitol-Lösung (schwarze Quadrate) und unter der hypotonen 110 mmol·l⁻¹ NaGluconat-Lösung (graue Kreise). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Sowohl Ein- als auch Auswärtsstrom, zusammengefasst von 6 Zellen, nehmen unter der hypotonen Badlösung ab, wobei nur I_{IN} signifikant beeinflusst wird.

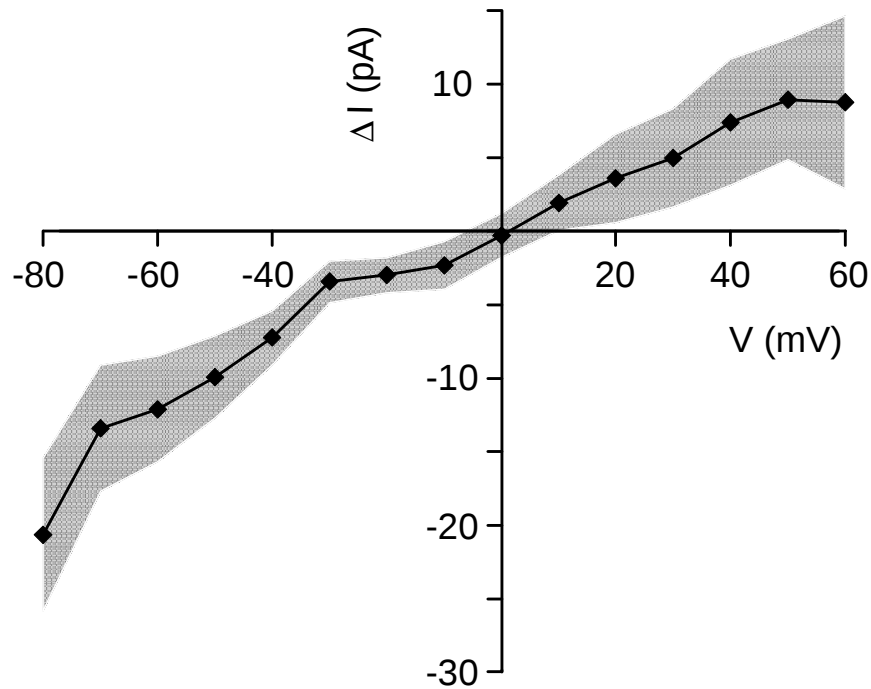


Abb. III.8b

Aus diesen Membranströmen berechnet sich die Strom-Spannungsbeziehung des durch die hypotone NaGluconat-Lösung gehemmten Ganzzellstroms, deren Umkehrpotential nicht signifikant von 0 mV abweicht. Schwarze Quadrate stellen die Mittelwerte, graue Flächen die SEM-Daten dar.

III.2.3 Wirkung von NO auf den nicht-selektiven Kationenkanal

Stickstoffmonoxid ist ein Signalmolekül, welches an HT29/B6-Zellen nach Ca^{2+} -Speicherentleerung eine Potenzierung des Ca^{2+} -Einstroms bewirkt (Bischof et al., 1995). Dies warf die Frage auf, ob Stickstoffmonoxid am Kolonepithel der Ratte eine Funktion als Signal für die Steuerung des nicht-selektiven Kationenkanals hat.

III.2.3.1 Effekte von NO auf das intakte Kolonepithel

Am intakten Epithel bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Aktivierung Ca^{2+} -sensitiver, basolateraler K^{+} -Kanäle, die indirekt über eine Triebkraftänderung die Anionensekretion über die apikale Membran fördern (Strabel & Diener, 1995).

In der Literatur ist beschrieben, dass eine NO-freisetzende Substanz (Natrium-Nitroprussid = SNP) eine Anionensekretion am Rattendarm auslöst (Wilson et al., 1993), über die beteiligten Mechanismen ist jedoch nichts bekannt. Dieses Ergebnis von Wilson konnte reproduziert werden. Am intakten Epithel in der Ussingkammer induzierten 100 μM SNP einen Anstieg des Kurzschlussstroms. Noch besser wirkte jedoch ein anderer NO-Donor – GEA 3162 (Holm et al.; 1998, Kankaanranta et al.; 1996).

Die Applikation dieses lipophilen NO-Donors ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, serosal) führte an den Mukosa-Submukosa-Präparaten des Rattenkolons zu einer Zunahme des Kurzschlussstroms (I_{sc}) um $3,0 \pm 0,4 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 6$; $p < 0,05$). Dieser Anstieg des I_{sc} war in einer nominal Ca^{2+} -freien Lösung auf der serosalen Seite nicht mehr vorhanden (s. Abb. III.9b). Eine Blockade des $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}/2\text{Cl}^{-}$ -Kotransporters durch das Schleifendiuretikum Bumetanid (10^{-6}

$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) hemmte die durch GEA 3162 induzierte Chloridsekretion vollständig (s. Abb. III.9a).

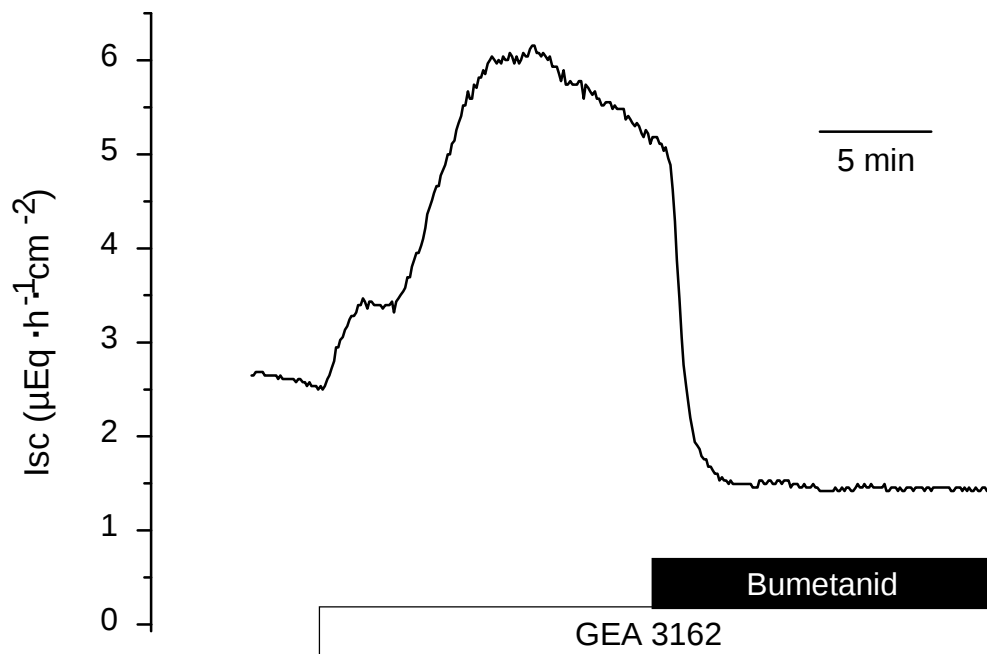


Abb. III.9a

Originaldarstellung des GEA 3162-Effekts auf die Chloridsekretion an der intakten Mukosa. Nach Applikation des NO-Donors ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) stieg der Kurzschlussstrom im distalen Kolon signifikant um $3,0 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) an, die Zugabe von Bumetanid ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal), einem Schleifendiuretikum und Blocker des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters, führte zum vollständigen Zusammenbruch des Isc.

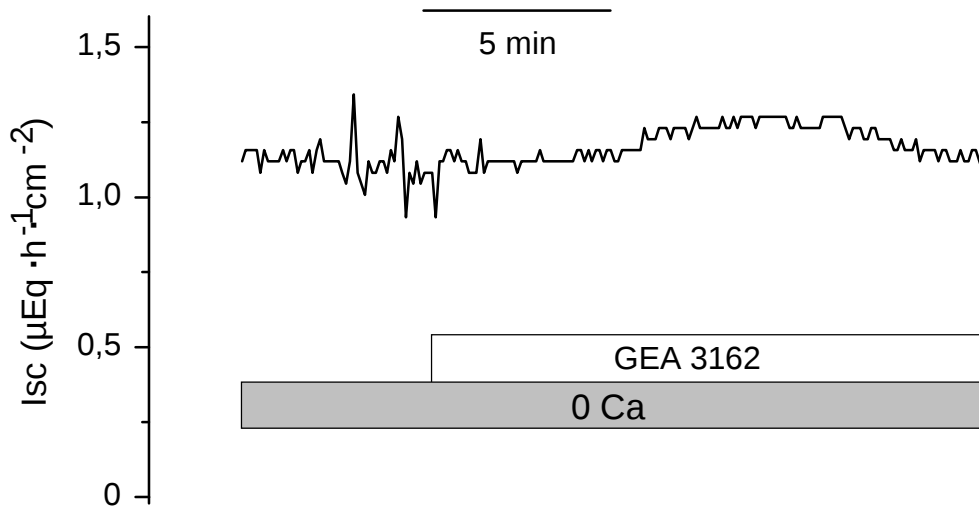


Abb. III.9b

Unter serosal Ca^{2+} -freien Bedingungen zeigte GEA ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, serosal) keine Wirkung am distalen Kolonabschnitt.

Eine der vielen Wirkungen von NO besteht in der Freisetzung von Neurotransmittern. Da in den von mir verwandten Mukosa-Submukosa-Präparaten noch neuronale Strukturen vorhanden sind, stellte sich die Frage, ob die GEA-Wirkung am Gewebe eventuell nerval vermittelt wird.

Das Nervengift des Kugel-Fisches, Tetrodotoxin (TTX), wirkt als selektiver Na^{+} -Kanalblocker und verhindert somit die Weiterleitung der Erregung am Nerv. TTX zeigte eine signifikante basale Wirkung auf den Isc. $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ TTX serosal verursachte einen Abfall des Isc um $-0,9 \pm 0,2 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. GEA 3162, in Anwesenheit des

Nervengifts, konnte aber immer noch eine signifikante Erhöhung des Kurzschlussstroms um $1,6 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 10$) induzieren. Die NO-Wirkung hat dennoch eine nervale Komponente, denn im Vergleich zu einer nicht-TTX-behandelten Kontrolle war der Isc-Anstieg signifikant geringer.

III.2.3.2 Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch NO

Mit Hilfe der Imaging-Technik wurde die Änderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels unter Kontrollbedingungen und während der NO-Donor-Zugabe an isolierten Krypten verfolgt. Hierbei wurde nur die relative Modifikation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration anhand der Änderung im Fluoreszenzverhältnis von Fura-2 gemessen (s. Material & Methoden). Perfundiert wurde das Präparat mit der $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl-Tyrode als Kontrolllösung. GEA 3162 ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) induzierte im gesamten Kryptenfundus einen Anstieg des Fura-2-Signals, gleichbedeutend mit einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (s. Abb. III.10). 10 Minuten nach Zugabe von GEA 3162 stieg das Fluoreszenzverhältnis um $0,4 \pm 0,1$ ($n = 6$; $p < 0,05$) an, welches bei Verwendung der extrazellulären Eichkurve einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von $98 \pm 15 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ entspricht (s. Abb. III.11).

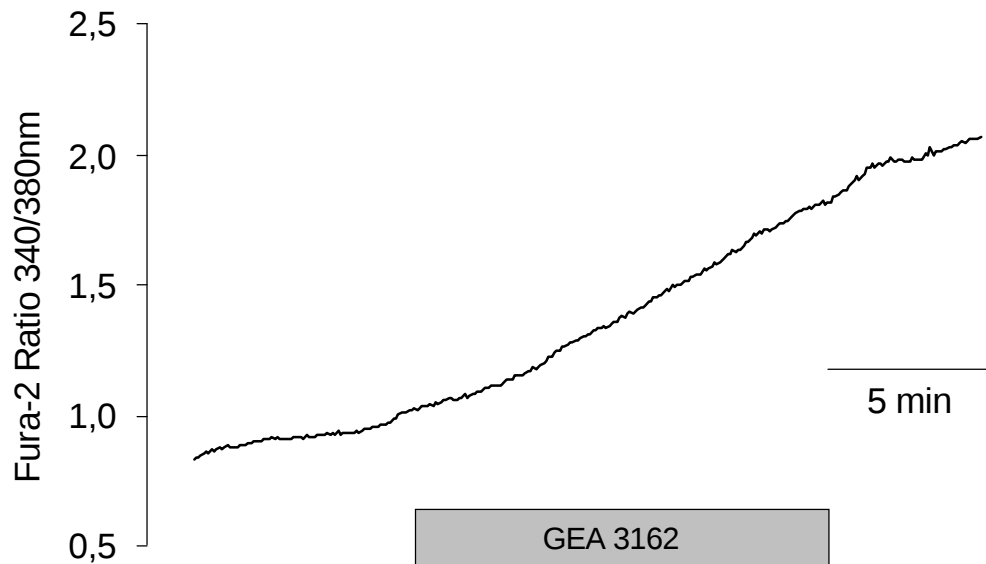


Abb. III.10

Erhöhung des Fluoreszenzsignals von Fura-2 infolge der Zugabe von GEA 3162 ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Dargestellt ist die Originalaufnahme einer Messung aus dem Fundusbereich einer isolierten Krypte.

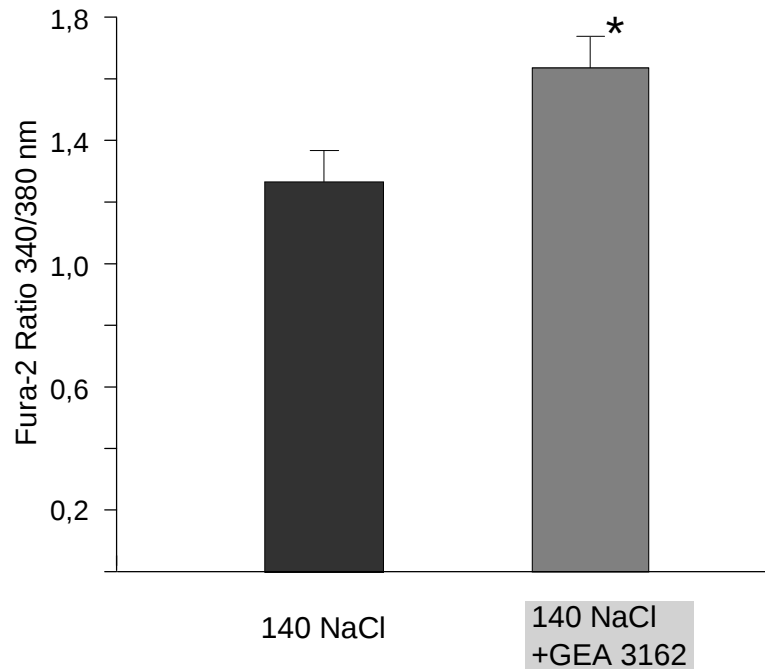


Abb. III.11

Zusammenfassung der Versuchsserie. Der NO-Donor ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bewirkte eine Erhöhung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von ca. $98 \pm 15 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (* = $p < 0,05$ versus Kontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von Fundusbereichen 6 verschiedener isolierter Krypten.

Rekrutierung des Calciums aus dem Extrazellulärraum

Aus diesen Messungen resultierte die nächste Frage - ist der Anstieg des intrazellulär freien Calciums direkt auf eine Entleerung der Speicher oder aber auf einen Influx aus dem Extrazellulärraum zurückzuführen? Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration war nicht mehr vorhanden, wenn die Badlösung nominal Ca^{2+} -frei war ($140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl-Tyrode; $0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Calcium; s. Abb. III.12). Der Austausch der Ca^{2+} -haltigen Standardtyrode mit der Ca^{2+} -freien Lösung bewirkte eine Abnahme der Ratio um $0,2 \pm 0,04$. Dies

entspricht nach der Grynkiewicz-Gleichung einer Reduzierung des intrazellulär freien Calciums um $42 \pm 10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. 10 Minuten nach Zugabe von GEA 3162 ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) war keine Erhöhung des Fluoreszenzsignals messbar ($n = 6$; $p < 0,05$; paariger T-Test).

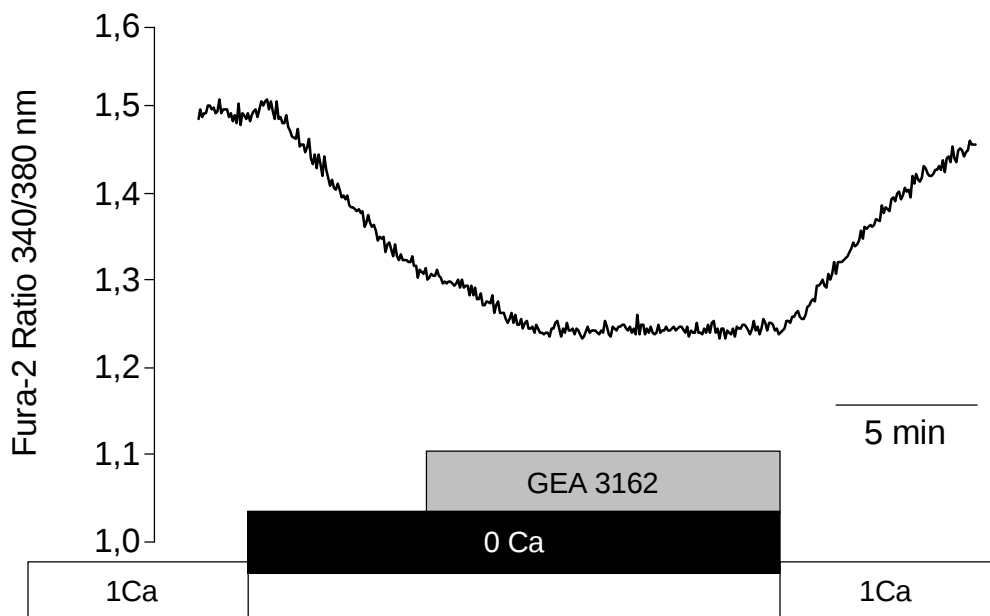


Abb. III.12

Originalaufzeichnung des Fura-2-Signalverhältnisses. Das Fluoreszenzsignal zeigte eine deutliche Abnahme während der Zufuhr einer Ca^{2+} -freien Lösung. Ein Anstieg durch den NO-Donor war nicht zu beobachten (vergl. Abb. III.10). Die erneute Perfusion der Krypte mit einer Ca^{2+} -haltigen Lösung führte zu einer sofortigen Anhebung der Fura-2-Ratio. Der Versuch ist repräsentativ für 6 Messungen an isolierten Krypten mit gleichen Ergebnissen.

III.2.3.3 Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals durch NO

Die vorherigen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass GEA (somit NO) einen nicht-selektiven Kationenkanal aktiviert, welches zur Stimulation einer Chloridsekretion führt. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik wurde die Aktivierung dieser Leitfähigkeit durch GEA 3162 an isolierten Krypten untersucht. Ist ein löslicher Botenstoff an der Regulation der nicht-selektiven Leitfähigkeit beteiligt, muss ein Auswaschen dieser Substanz vermieden werden. Mit Nystatin in der Standardpipettenlösung (EGTA $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurde der „Perforated-Patch“ eingesetzt (s. Material & Methoden). Die Zugabe von GEA ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) induzierte bei 6 von 10 Zellen eine sofortige Depolarisation um $6 \pm 1 \text{ mV}$ ($p < 0,05$; s. Abb. III.13), bei gleichzeitiger signifikanter Zunahme des Ein- (von $12 \pm 3 \text{ pA}$ auf $18 \pm 4 \text{ pA}$) und des Auswärtsstroms ($43 \pm 4 \text{ pA} \rightarrow 49 \pm 5 \text{ pA}$; $p < 0,05$; s. Abb. III.14). Die Berechnung des GEA-sensitiven Ganzzellstroms ergab ein Umkehrpotential von $-9 \pm 8 \text{ mV}$, nicht signifikant verschieden von 0 mV unter den gegebenen Bedingungen. Die restlichen 4 von 10 Zellen wiesen eine Hyperpolarisation von $15 \pm 4 \text{ mV}$ auf. Weder der Ein- noch der Auswärtsstrom zeigten nach Wechsel in die GEA-haltige Tyrode eine signifikante Veränderung. Die errechneten Delta-IV-Kurven verliefen parallel zur Abszisse, so dass kein Umkehrpotential bestimmt werden konnte (s. Diskussion).

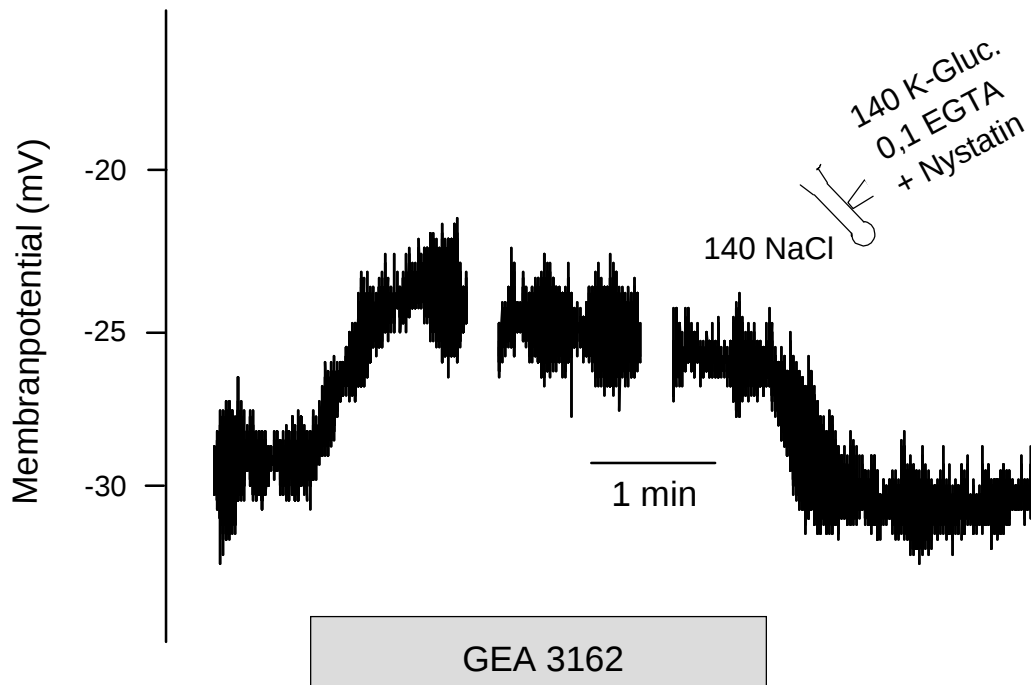


Abb. III.13

Originalaufzeichnung der Membranpotentialänderung einer Kryptenzelle. In 6 von 10 Zellen führte GEA 3162 ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) zu einer signifikanten, reversiblen Depolarisation um $6 \pm 1 \text{ mV}$. Die Unterbrechungen im Verlauf der Kurve resultieren aus den durchgeführten Strom-Spannungs-Protokollen unter Voltage-Clamp-Bedingungen.

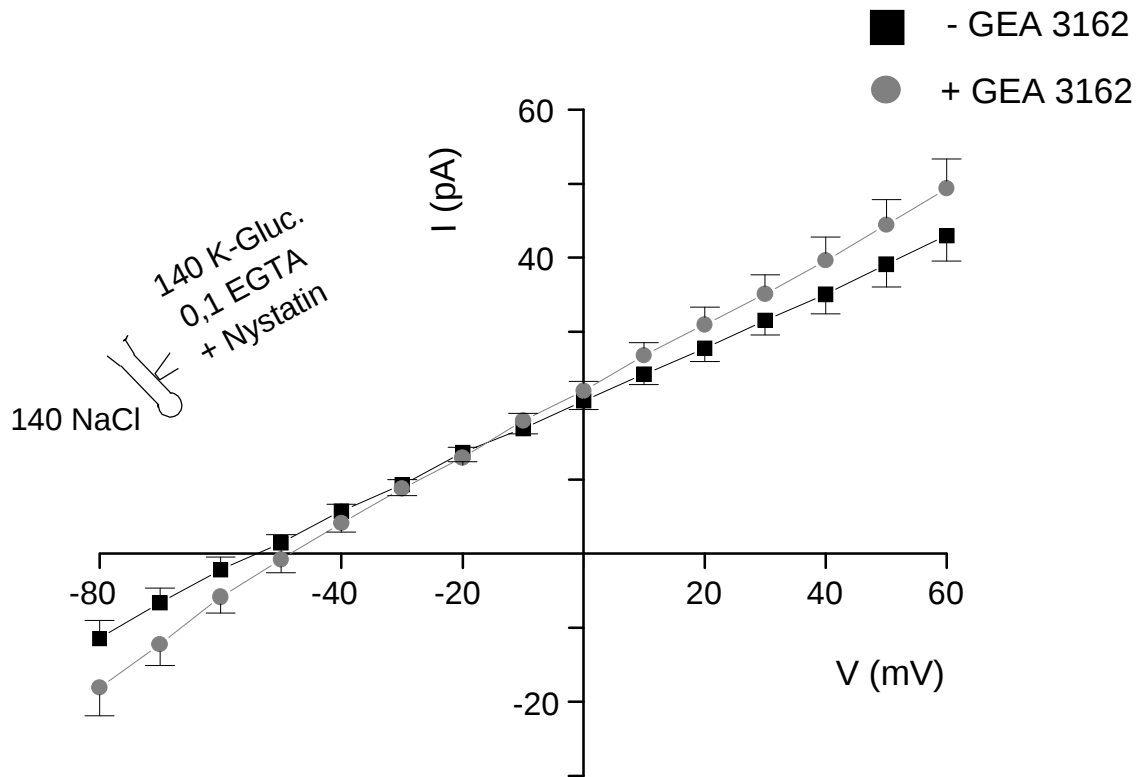


Abb. III.14

IV-Protokoll (s. Material & Methoden) ohne (schwarze Quadrate) und mit (graue Kreise) $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ GEA 3162 von 6 Kryptenzellen, die durch den NO-Donor depolarisierten. Mittelwerte sind als Quadrate und Kreise, der SEM als Balken dargestellt.

III.2.3.4 Bedeutung von NO in der Kommunikation zwischen Ca²⁺-Speicher und nicht-selektivem Kationenkanal

In den vorausgegangenen Versuchsserien reagierte das Kolonepithel auf NO mit einer Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals, dem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und einer Chloridsekretion. Die Frage, ob NO als Botenstoff in der hypothetischen Signalkette: Ca²⁺-Speicherentleerung → NO-Synthase-Aktivität↑ → NO↑ → Guanylatcyclase↑ → cGMP↑ → Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals agiert, wurde versucht mit der Ussingkammer-Technik zu beantworten.

Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite), ein stabiles Acetylcholinderivat, induziert einen biphasischen Anstieg des Kurzschlussstroms mit einem initialen Peak durch Entleerung IP₃-sensitiver Speicher und einem nachfolgenden langanhaltenden Plateau, infolge eines Ca²⁺-Influxes über die nicht-selektive Kationenleitfähigkeit (Frings et al., 1999).

Für den Nachweis einer epithelialen NO-Synthese wurden Blocker der intrazellulären NO-Synthase (NOS) und der löslichen Guanylatcyclase eingesetzt. NG-nitro-L-argininmethylester (L-NAME; $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ serosal) ein NOS-Inhibitor wurde zur Vorbehandlung des Mukosa-Submukosa-Präparates verwendet. Die Zugabe von Carbachol in Anwesenheit der Hemmsubstanz führte zu einem Anstieg des Kurzschlussstroms um $9,0 \pm 1,1 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ und zeigte, wie die Plateauphase 10 Minuten nach Carbachol-Applikation, keinen signifikanten Unterschied zu den Geweben, die nicht mit L-NAME vorbehandelt wurden ($n = 6$). Ein weiterer Blocker der intrazellulären Botenstoff-Kaskade, 6-Anilino-5,8-quinolinquinon (LY 83583, $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ mukosal und serosal) fungiert als Inhibitor der

löslichen Guanylatzyklase (Mülsch et al.; 1989). Nach einer Einwirkzeit des Blockers von 15 Minuten wurde erneut das Acetylcholinderivat Carbachol zugegeben. Auch hier kam es zu einer signifikanten Erhöhung des Kurzschlussstroms mit Ausbildung einer Plateauphase. Der Chloridstrom wies jedoch geringere Isc-Werte im Vergleich zu denen der Kontrollversuche auf.

Zusammenfassend bleibt trotz der Hemmung der NO-Synthase mit L-NAME oder einer Blockade des Signalwegs „Guanylatzyklase→cGMP“ durch LY 83583 die Kommunikation zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und nicht-selektivem Kationenkanal bestehen.

III.3 Interaktion zwischen nicht-selektivem Kationenkanal und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher

Die Permeabilität des nicht-selektiven Kationenkanals für Na^+ ist, wie bereits erwähnt, deutlich besser als die für Ca^{2+} (Frings et al., 1999). Unter physiologischen Bedingungen wird eine Aktivierung dieser Leitfähigkeit somit einen massiven Einstrom von Na^+ in die Zelle bewirken, welches aufgrund der resultierenden Depolarisation einen hemmenden Einfluss auf den Chloridtransport über die Zellmembran hat. Über den gleichen Weg eintretendes Calcium bewirkt andererseits die Sekretion von Anionen. Dies ist vordergründig ein Widerspruch. Deshalb erhebt sich die Frage, ob Zellregulationsmechanismen der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase wie z.B. ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher am Kolonepithel durch diesen dominierenden Na^+ -Einstrom modifiziert werden.

III.3.1 Nachweis eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers am Kolonepithel

In arteriellen Myozyten der Ratte führt der Na^+ -Influx über Speicher-gesteuerte Kationenkanäle zu einer Änderung der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Aktivität (Arnon et al., 2000). Dieser transportiert unter Ruhebedingungen normalerweise 3 Na^+ in und 1 Ca^{2+} aus der Zelle. Unter stimulierten Bedingungen kann sich die Transportrichtung ändern, wodurch Ca^{2+} in die Zelle befördert wird (Blaustein & Lederer, 1999). Eine Expression dieses Austauschers ist an Enterozyten noch nicht nachgewiesen.

In dieser Versuchsserie wurden isolierte Krypten mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2 aufgeladen und die Änderung der Fluoreszenzintensität nach Umkehr des Na^+ -Gradienten gemessen. Ist hier ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher vorhanden, so müsste unter diesen Konditionen Ca^{2+} in die Zelle transportiert werden und das Fura-2-Signal zunehmen. Die Perfusion wurde von der Standardtyrode ($140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; s. Abb. III.15) zu einer Na^+ -freien Tyrode ($140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG-Cl-Tyrode; s. Abb. III.16) gewechselt, welches nach wenigen Minuten zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führte.

Innerhalb der ersten fünf Minuten nach dem Wechsel zur NMDG-Cl-Tyrode erhöhte sich die Ratio von $1,5 \pm 0,1$ auf $2,1 \pm 0,2$ (Abb. III.17). Dies entspricht einer Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung von $0,26 \pm 0,04 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf $0,43 \pm 0,06 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in der Zelle ($n = 6$; $p < 0,05$).

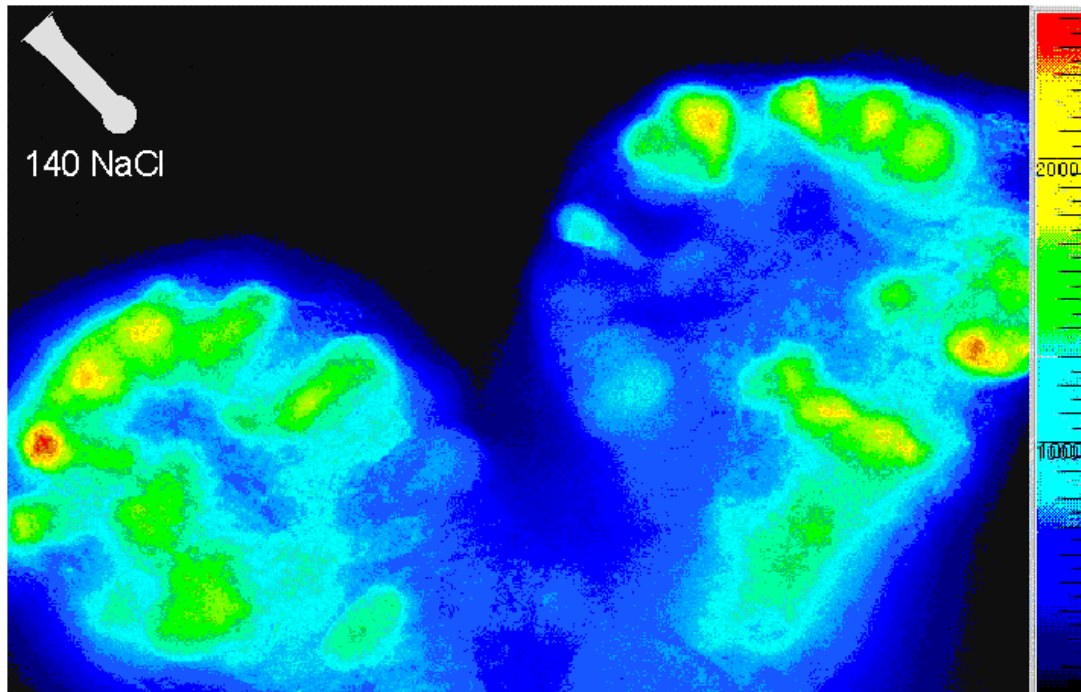


Abb. III.15

Beispiel: Zwei mit Fura-2 aufgeladene Krypten, die hier mit einer 140 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl-Tyrode und anschließend mit einer Na^+ -freien NMDG $^+$ -Lösung (s. Abb. III.16) perfundiert wurden. Im Bereich der Fundi zeigen sich Bereiche mit blauen, grünen, gelben und roten Falschfarben (s. Material & Methoden), die entsprechend dieser Reihenfolge auf eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität hinweisen (s. Farbskala rechter Bildrand). Aus vorgewählten ROI's (regions of interest) wurde die Ratio im Fundusbereich der isolierten Krypten gemessen.

Diese Daten weisen auf die Präsenz eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers am Kolonepithel. Unter basalen Konditionen (140 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl) wird Calcium vermutlich aus der Zelle befördert, in Na^+ -freier Perfusionslösung verläuft der Transport jedoch in die entgegengesetzte Richtung.

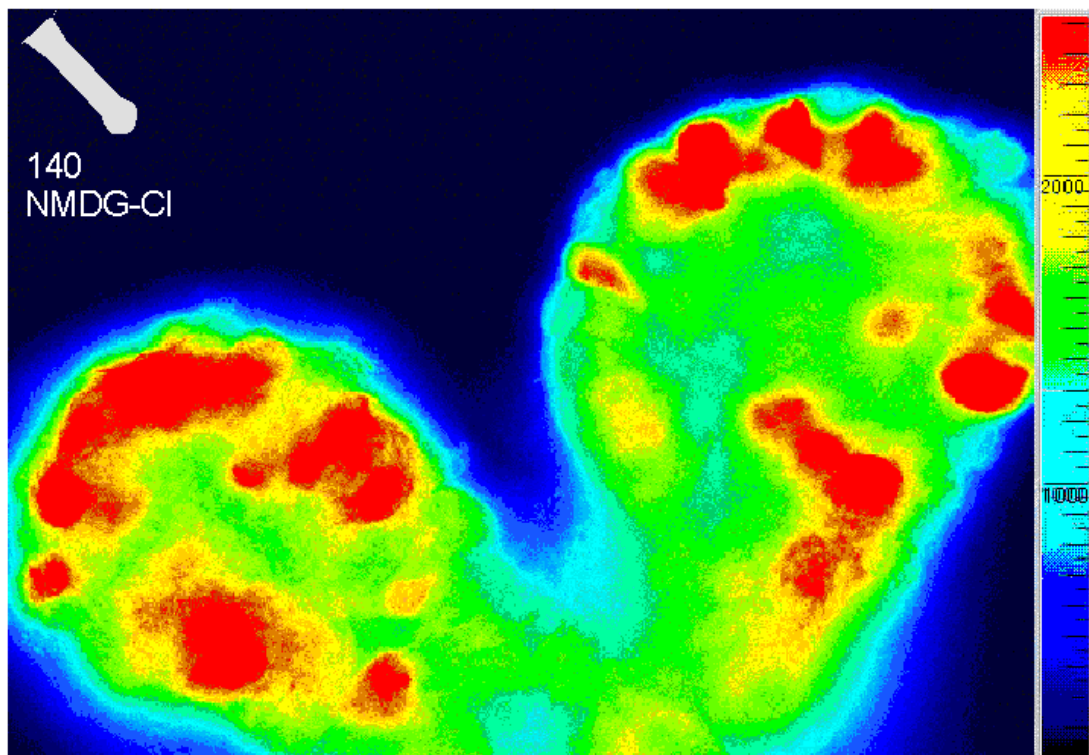


Abb. III.16

Die Krypten aus Abb. III.15 zeigen eine deutliche Zunahme der gelben und roten Falschfarben, einhergehend mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität unter der 140 mmol.l⁻¹ NMDG⁺-Tyrode (typisches Beispiel für n = 6 Krypten).

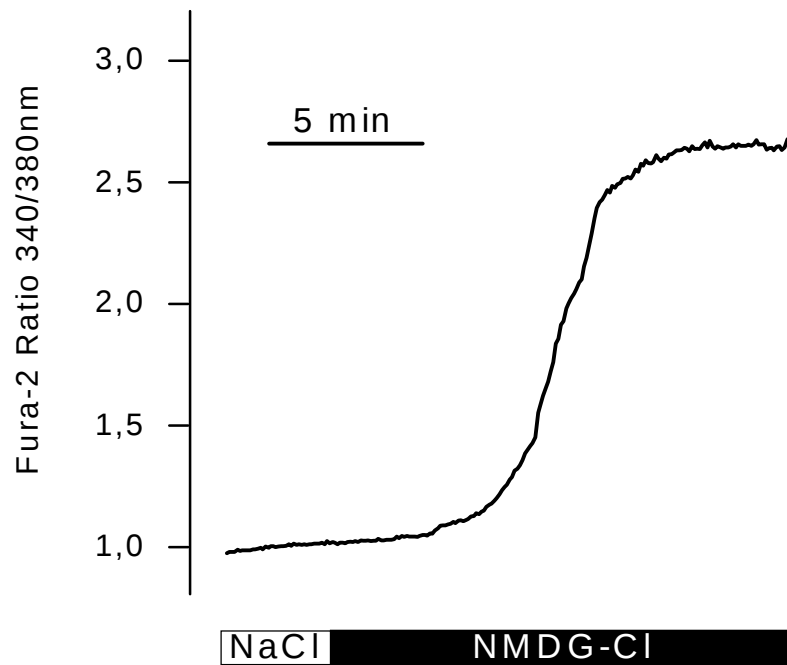


Abb. III.17

Originalaufzeichnung des Fluoreszenzsignal-Anstiegs unter dem umgekehrten Na^+ -Gradienten. Der Kurvenverlauf ist repräsentativ für 6 Krypten. Die unter der $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl-Tyrode stabilisierte Ratio stieg nach dem Wechsel in die Na^+ -freie NMDG $^+$ -Lösung im Mittel um das $1 \frac{1}{2}$ -fache an ($p < 0,05$). Ein Hinweis auf die Existenz eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers am Kolonepithel, der bei fehlendem extrazellulären Natrium seine Arbeitsrichtung umkehrt und Ca^{2+} in die Zelle transportiert.

In Anwesenheit von Dichlorobenzamil (DCB; $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), einem Inhibitor des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (Kaczorowski et al., 1985), wurde die Antwort der Zelle auf die Anwesenheit der Na^+ -freien Perfusionslösung gemessen. Dieses Amilorid-Derivat, mit seinen aromatischen Bestandteilen, führt zu einer Unterdrückung (Quench) der Fluoreszenzintensität des Fura-2 Farbstoffs (Hudson et al.; 1998). Die Zelle wurde mit der Standardtyrode perfundiert und

nach einigen Minuten DCB zugesetzt (s. Abb. III.18). Dies bewirkte einen deutlichen Quench des Fluoreszenzsignals. Der Wechsel zur NMDG⁺-Lösung in Anwesenheit des Blockers verursachte keinen Anstieg der Ratio ($n = 8$; $p < 0,05$; s. Abb. III.19), im Gegensatz zu den Ergebnissen ohne vorherige DCB-Zugabe.

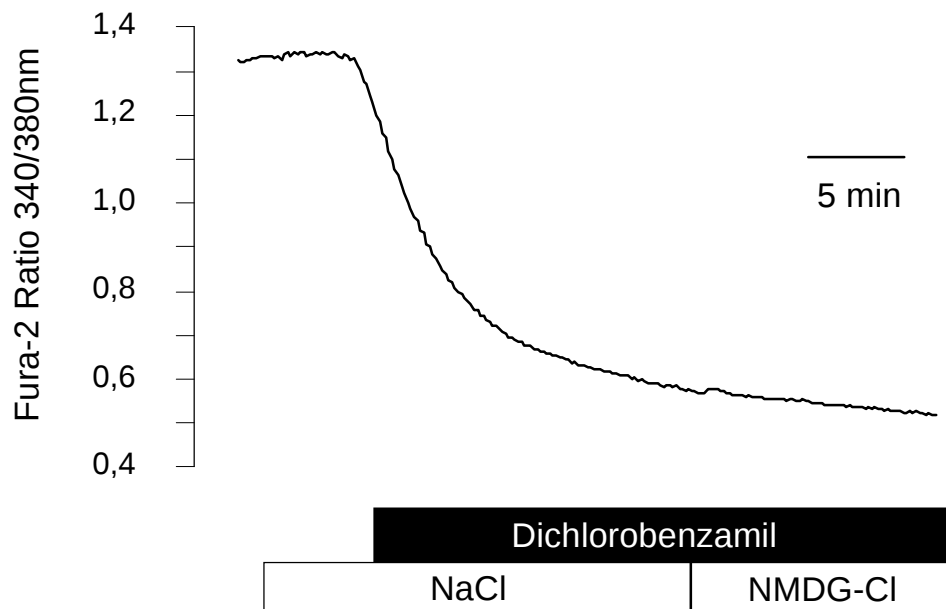


Abb. III.18

Originalaufzeichnung der Fluoreszenzsignal-Änderung einer Krypte (typischer Verlauf für 8 Krypten). In Anwesenheit von Dichlorobenzamil zeigte sich kein Anstieg des Fluoreszenzsignals durch die $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG-Cl-Tyrode. Die Ratio von $1,9 \pm 0,2$ unter der $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl-Tyrode fiel nach der Zugabe von Dichlorobenzamil ($2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aufgrund der Fluoreszenzsignal-Unterdrückung, deutlich ab.

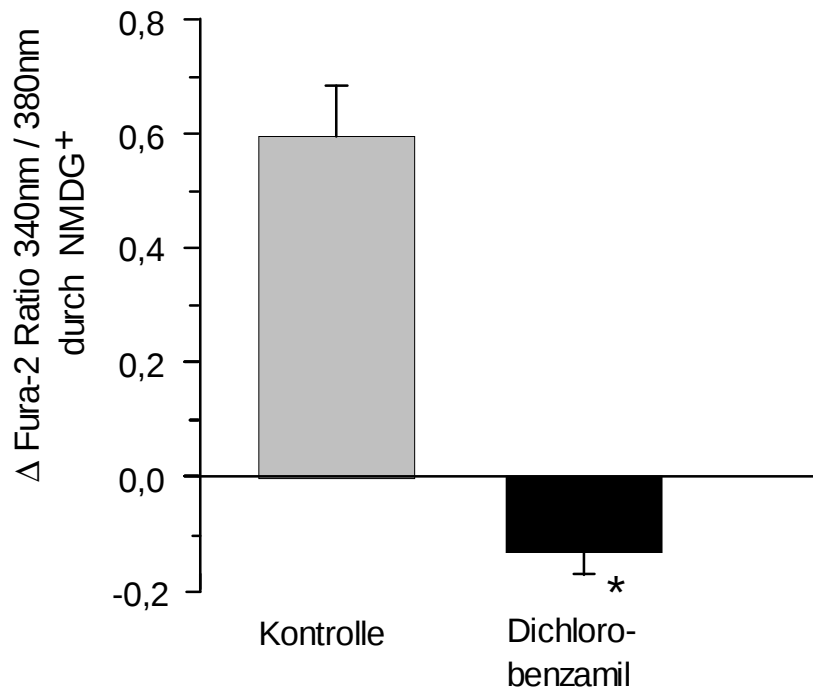


Abb. III.19

Die deutliche Fura-2 Ratio-Zunahme unter der $140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl} / 140 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NMDG} + \text{-Tyrode}$ (Kontrolle) von $0,6 \pm 0,1$, verglichen mit dem fehlenden Anstieg in der Fluoreszenzintensität ($-0,1 \pm 0,04$) durch den Effekt von Dichlorobenzamil ($2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) auf den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Werte sind Mittelwerte $\pm \text{SEM}$; $n = 8$; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

Somit wird durch die Ergebnisse dieser Versuchsserien die Annahme untermauert, dass die Akkumulation des intrazellulär vorhandenen freien Calciums auf die Aktivität eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zurückzuführen ist, der bei einer Umkehr des physiologischen Na^+ -Gradienten Calcium-Ionen in die Zelle transportiert.

III.3.2 Funktion des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers unter basalen Bedingungen

Unter basalen Bedingungen befördert der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher vermutlich Ca^{2+} aus und Na^+ in die Zelle. Bedingt durch die Quench-Eigenschaften des Dichlorobenzamils auf die Fluoreszenzintensität von Fura-2, ließ sich die Auswirkung der Hemmung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers auf die basale Ca^{2+} -Konzentration mittels der Imaging-Methode nicht nachweisen. Deshalb wurde die intakte Mukosa mit Hilfe der Ussingkammer-Technik untersucht. DCB ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; aufgrund der Diffusionsbarriere war es nötig, an der intakten Mukosa eine höhere Konzentration einzusetzen), mukosal und serosal appliziert, führte im distalen Kolon zu einem uneinheitlichen Ergebnis. In 8 von 14 Epithelien zeigte sich eine Isc-Erhöhung von $1,5 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $2,4 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($p < 0,05$; s. Abb. III.20a). Eine Abnahme des Stroms von $2,3 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf $1,5 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ wurde bei 6 von 14 Geweben registriert ($p < 0,05$; s. Abb. III.20b). Hierbei existierte eine Abhängigkeit von der Höhe des basalen Isc, d.h. der basalen sekretorischen Aktivität der jeweiligen Gewebe (s. Abb. III.20c). Bestand eine geringere basale Chloridsekretion, folgte auf DCB ein Anstieg des Isc, ein höherer Ausgangsstrom hatte unter DCB hingegen eine Abnahme des Kurzschlussstroms zur Folge.

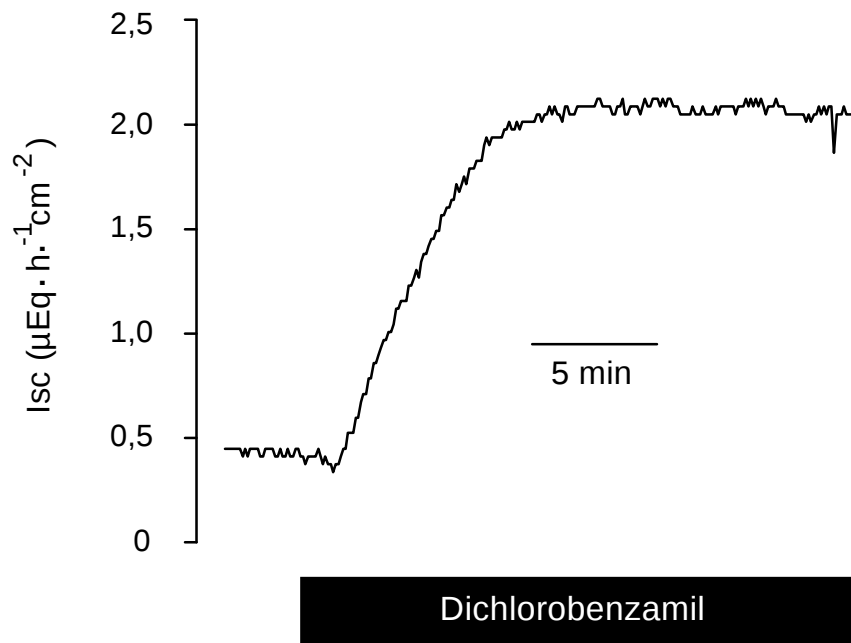


Abb. III.20a

Originalaufzeichnung der Isc-Änderung durch Zugabe von Dichlorobenzamil ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, mukosal und serosal). Im distalen Kolon zeigte sich eine Korrelation zwischen Kurzschlussstrom-Änderung und Anionensekretion vor Zugabe des Blockers. An diesem Gewebe mit initial geringem Isc bewirkte Dichlorobenzamil eine deutliche Zunahme des Kurzschlussstroms (typischer Verlauf mit Isc-Zunahme für 8/14 Geweben).

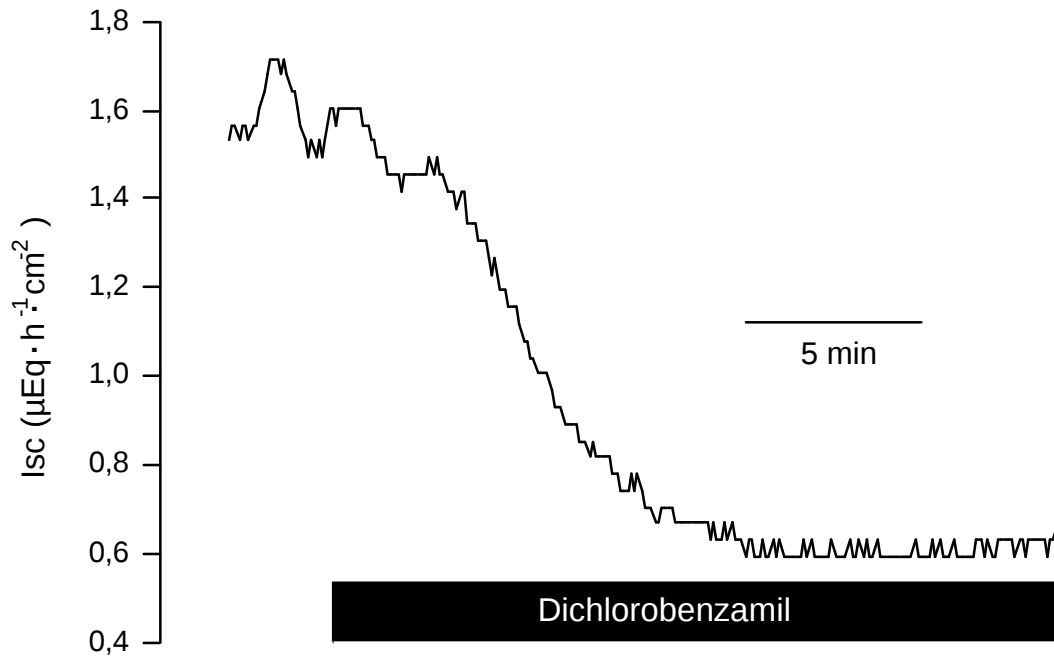


Abb. III.20b

Originalaufzeichnung des Stromverlaufs durch Dichlorobenzamil-Applikation bei einem höheren basalen Isc-Ausgangswert. Die Zugabe von Dichlorobenzamil ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, mukosal und serosal) führte hier zu einer signifikanten Abnahme des Isc (typischer Verlauf bei 6/14 Geweben).

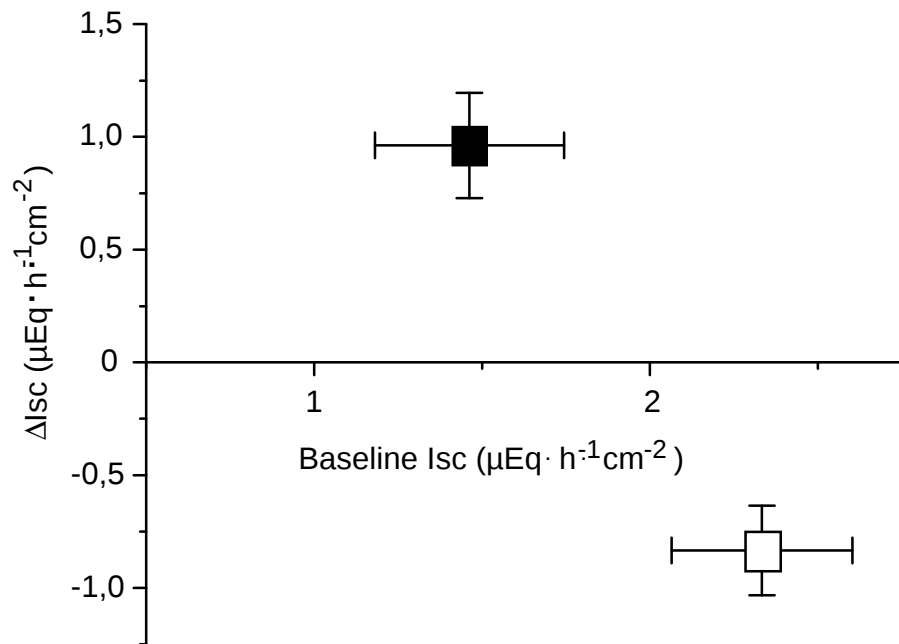


Abb. III.20c

Darstellung der Abhängigkeit der Dichlorobenzamil-Wirkung (Δ Isc) vom initialen Kurzschlussstrom (Baseline-Isc) im distalen Kolon. Bei 8 von 14 Geweben erfolgte eine Erhöhung des Isc von $1,5 \pm 0,3$ auf $2,4 \pm 0,3 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (schwarzes Quadrat; $p < 0,05$), in 6 von 14 Geweben verringerte sich der Isc von $2,3 \pm 0,3$ auf $1,5 \pm 0,3 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (weißes Quadrat; $p < 0,05$). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

III.3.3 Transportmodus des $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauschers während der Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals

In einer letzten Versuchsserie war der Transportmodus des Austauschers während der Aktivierung eines über Ca^{2+} vermittelten Chloridstroms von Interesse. Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite) wurde als muskarinerger Agonist verwandt. Die Zugabe des Carbachols induzierte einen biphasischen Anstieg des Kurzschlussstroms mit initialem Peak und nachfolgendem langsamen Isc-Abfall. Wurde nun in der 2. Phase Dichlorobenzamil gegeben, zeigte sich der Isc-Verlauf insgesamt nicht signifikant

beeinflusst. In einigen Geweben war eine beschleunigte Abnahme des Isc zu beobachten, die jedoch bei Vergleich mit einer zeitabhängigen Kontrolle keine statistische Signifikanz erreichte ($n = 7$; s. Abb. III.21). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals durch Carbachol mit einer Abschaltung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers einhergeht.

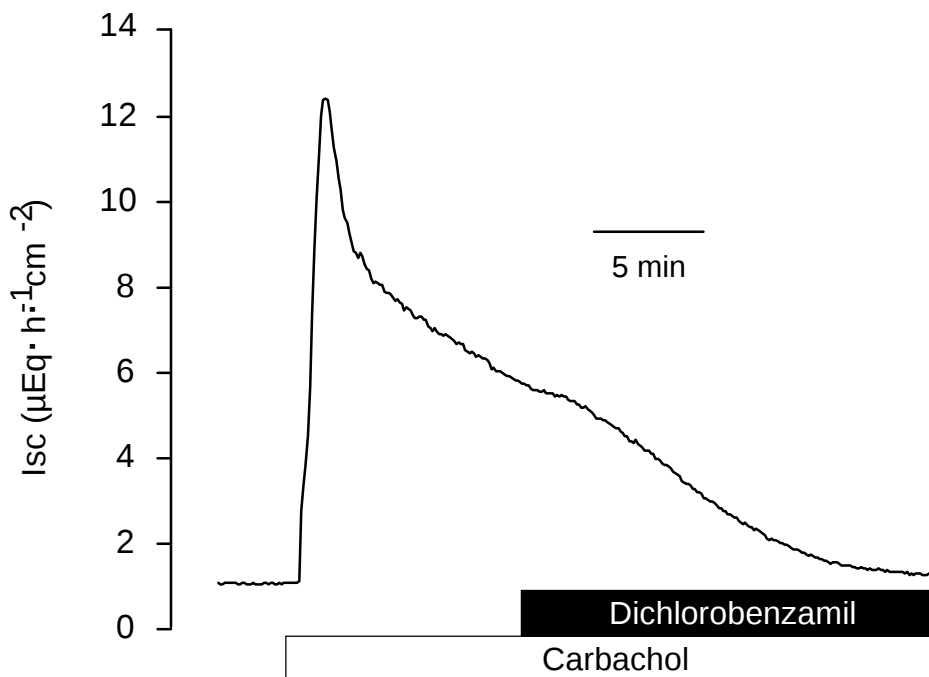


Abb. III.21

Originaldarstellung des Dichlorobenzamil-Effekts ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, beidseits) in Anwesenheit von Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, serosal) auf den Isc. Der muskarinerge Agonist führt über eine Stimulierung der M_3 -Rezeptoren zu einer biphasischen Änderung des Kurzschlussstroms mit einem initialen Peak und einem nachfolgenden langsamen Isc-Abfall. In diesem Präparat verursachte Dichlorobenzamil einen beschleunigten Abfall des Isc während der 2. Phase. Der Vergleich mit einer zeitabhängigen Kontrolle erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (typischer Kurvenverlauf für 7 Gewebe).

IV Diskussion

Enterozyten reagieren auf eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit einer Sekretion von Anionen. Am Kolonepithel der Ratte löst die Stimulierung muskarinerger M_3 -Rezeptoren an der Zellmembran die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aus. Die Ca^{2+} -Freisetzung in das Zytoplasma wird von einem kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom (s. I.4) über eine sowohl für Ca^{2+} - als auch für Na^+ durchlässige Leitfähigkeit begleitet (Frings et al., 1999).

Die hier präsentierten Ergebnisse demonstrieren die Passage-Eigenschaften dieses *tatsächlich* nicht-selektiven Kationenkanals, der u.a durch Stickstoffmonoxid gesteuert wird. Weiterhin zeigen sie am Kolonepithel der Ratte die Existenz eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, der durch den dominierenden Na^+ -Einstrom via nicht-selektiven Kationenkanal in seiner Funktion modifiziert wird.

IV.1 Passage-Eigenschaften des nicht-selektiven Kationenkanals

Ziel meiner Untersuchungen war eine Charakterisierung der Passage-Eigenschaften des, an Enterozyten basolateral lokalisierten, nicht-selektiven, speichergesteuerten Kationenkanals. Dieser ist für alle getesteten monovalente Kationen permeabel, der entstehende Einwärtsstrom variiert mit den angebotenen Ionen. Die Bestimmung charakteristischer monovalenter Kationen-Selektivitätssequenzen (Eisenman-Sequenzen I-XI; Eisenman & Horn, 1983) lässt einen Rückschluss auf die relative elektrostatische Feldstärke der Interaktionsstellen an der untersuchten Leitfähigkeit zu (Wang & Veenstra, 1997; Ding & Sachs, 1999).

IV.1.1 – für monovalente Kationen

Die nach der Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals permeierenden monovalenten Kationen strömen aus der extrazellulären Kationen-Chlorid-Lösung in das Zytoplasma der untersuchten Zelle (s. III.1.1) und erzeugen einen ihrer Passage-Fähigkeit entsprechenden Einwärtsstrom. Die Permeabilitätssequenz, die sich für den untersuchten Kanal ergibt, ist: $\text{Cs}^+ > \text{Na}^+ \geq \text{Li}^+$ und bestätigt somit die Bezeichnung „nicht-selektiver Kationenkanal“. Die Alkalimetall-Ionen sind sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften ähnlich, unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrem Durchmesser. Li^+ weist aus dieser Gruppe den kleinsten Radius mit 0,06 nm auf, besitzt aber den größten hydratisierten Umfang und somit die geringste Mobilität in freier Lösung. Aufgrund des kleinen Durchmessers nähert sich das Ladungszentrum des Kations mit einer hohen Ladungsdichte dem Wassermolekül stärker und führt zu einer festen Anlagerung von Wasser (Übersicht bei Diamond & Wright, 1969). Demzufolge ist die Hydrathülle abhängig von der Ladungsdichte, die wiederum von Kristallradius des Ions abhängt. Cs^+ besitzt den größten Radius mit 0,17 nm und hat die geringste Ladungsdichte, die nur eine schwache Anziehungskraft auf Wassermoleküle zeigt. Deshalb verfügt es in Lösung über die kleinste Hydrathülle. Seine Mobilität in wässriger Lösung ist im Vergleich mit den restlichen Alkalimetallen am größten.

Nach der Theorie von G. Eisenman (Eisenman & Horn, 1983) ist die Selektivität einer Leitfähigkeit das Zusammenspiel elektrostatischer Kräfte, vorwiegend Coulomb'scher Kräfte, zwischen permeierendem Ion und Kanal. Der hier untersuchte nicht-selektive

Kationenkanal, dessen Permeabilitätssequenz sich in den niedrigen Eisenman-Sequenzen I-IV (Diamond & Wright, 1969; Eisenman & Horn, 1983) widerspiegelt, weist auf die Prominenz negativer Festladungen im Inneren der Pore hin z.B. in Form von Carboxylgruppen. Da die Ion:Membran-Interaktion energetisch schwach ist, d.h. der Kanal nur geringgradig aus Ladungsträgern aufgebaut ist, überwiegt die Interaktion Ion:Wasser. Cs^+ , welches die geringste Hydrationsenergie besitzt, wird bei der Passage des Kanals infolgedessen bevorzugt, denn der Energieaufwand für die Dehydrierung des Ions ist im Vergleich zu den anderen Alkalimetallen minimal. Kationen, wie Na^+ (Radius: 0,095 nm) und Li^+ , die eine größere Dehydrationsenergie benötigen (Hille, 2001), um die Leitfähigkeit zu passieren, permeieren in diesen Untersuchungen weniger gut, d.h. sie erzeugen einen geringeren Einwärtsstrom. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die monovalenten Kationen, bevor sie den nicht-selektiven Kationenkanal passieren, vermutlich erst dehydriert werden müssen, um in das Zytoplasma zu gelangen.

Der in Anwesenheit der extrazellulären KCl-Lösung entstehende Einwärtsstrom zeigt im Allgemeinen (s. Abb. III.1) eine ähnliche Amplitude wie der durch CsCl induzierte Strom. Eine Auswertung der K^+ -Passage über den nicht-selektiven Kationenkanal fand indessen nicht statt, da ein Ionenfluss über zusätzliche zelluläre K^+ -Leitfähigkeiten nicht ausgeschlossen werden konnte.

IV.1.2 – für divalente Kationen

Das divalente Kation Ca^{2+} zeigt eine wesentlich komplexere Interaktion mit dem nicht-selektiven Kationenkanal als z.B. Na^+ . Die Leitfähigkeit ist permeabel für Ca^{2+} , zusätzlich hemmt Ca^{2+} in Konzentrationen über $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ seinen eigenen Einstrom (negatives Feedback) in die Zelle (Frings et al., 1999). Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass alle getesteten divalenten Kationen in einer Konzentration von $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ einen Hemmeffekt aufweisen (s. Abb. III.3). Die maximale Reduzierung des Na^+ -getragenen Einwärtsstroms findet durch Calcium ($166 \pm 63 \text{ pA} = 100\%$) statt und variiert mit den verschiedenen divalenten Kationen in der Reihenfolge: $\text{Ca}^{2+} \geq \text{Mg}^{2+} \geq \text{Ba}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+}$ (s. Abb. III.4).

Der Blockademechanismus der divalenten Kationen wird durch die vorliegenden Ergebnisse nicht offensichtlich. Die vorhandenen Daten demonstrieren jedoch deutlich, dass die Bindungsregionen an der Leitfähigkeit keine markante Differenzierung innerhalb dieser Kationen-Gruppe vornehmen.

Spekulativ wäre die Vermutung einer direkten, elektrostatischen Wirkung von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} und Sr^{2+} an der Leitfähigkeit. Ihre Hemmeigenschaften könnten durch eine Bindung am extrazellulären Vestibulum des Kanals oder nach Einstrom in die Zelle auf der zytoplasmatischen Seite der Kanalöffnung, möglicherweise über ein Regulatorprotein hervorgerufen werden. Vielleicht hemmen sie den Influx von Na^+ auch über eine Interaktionsregion in der wassergefüllten Pore (Putney, 1997). Eine Inaktivierung der nicht-selektiven Leitfähigkeit unter Mitwirkung eines – bisher noch anonymen - löslichen Kofaktors wie z.B. bei Ding & Sachs an P2X_2 -Kanälen (Ding & Sachs, 1999; Ding & Sachs, 2000)

beschrieben oder mittels eines unbekannten Zwischenschritts, der durch den Einstrom der Kationen über den Speicher-gesteuerten Kanal in der Zelle ausgelöst wird (Putney, 1997), erscheint eher unwahrscheinlich.

Kurz zusammengefasst führt der Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum, infolge Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals, zu einer negativen Rückkopplung auf den eigenen Influx. Das Kation limitiert mit diesem Mechanismus seine intrazelluläre Konzentration - ein Mechanismus, der vielleicht als Schutz vor zellschädigenden Effekten und Apoptose durch eine zu hohe Konzentration von Ca^{2+} fungiert.

IV.2 Mechanismen zur Aktivierung/Inaktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals

Zwei Quellen für die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration stehen dem Enterozyten zur Verfügung: die intrazellulären Speicher und der Einstrom aus dem Extrazellulärraum über den zuvor charakterisierten nicht-selektiven Kationenkanal. Ein Zusammenspiel dieser beiden Ca^{2+} -Ressourcen ist mehrfach nachgewiesen (Übersicht bei Parekh & Penner, 1997), auch am nativen Kolonepithel wurde es dargestellt (Frings et al., 1999). Dessen ungeachtet ist der Kopplungsmechanismus zwischen Speicher und extrazellulärem Ca^{2+} -Influx, der bei Entleerung der Speicher in Gang gesetzt wird, noch nicht bekannt. Diskutiert wird eine *direkte* Kopplung durch das Zytoskelett oder durch die Konformationsänderungen beteiligter Strukturen und eine *indirekte* Kopplung mittels freigesetzter Signalstoffe.

IV.2.1 Die direkte Kopplung Ca^{2+} -Speicher – Speicher-gesteuerter Kanal in der Plasmamembran

Ergebnisse, die eine direkte mechanische Interaktion zwischen Speichern und der Zellmembran evtl. über eine Vermittlung des Zytoskeletts (Yao et al., 1999) oder durch eine direkte Kopplung des IP_3 -Rezeptors mit dem Speicher-gesteuerten Kanal (Ma et al., 2000; Ma et al., 2001) beschreiben, sind publiziert. Erstmals wurde diese Idee von Robin Irvine geäußert (Irvine, 1990), der wissend, dass IP_3 -Rezeptor und Ryanodin-Rezeptor ähnliche Strukturen besitzen, einen Vergleich mit der Interaktion des Ryanodin-Rezeptors und des Dihydropyridin-Rezeptors in der T-Tubulus-Membran der Skelettmuskulatur zog (Franzini-Amstrong & Jorgensen, 1994; s. I.3.2). Die Lokalisation von Ca^{2+} -Speichern in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran (Irvine & Moor, 1986; Petersen & Berridge, 1996; Muallem & Lee, 1997) führt vermutlich über eine Konformationsänderung des IP_3 -Rezeptors als Antwort auf die Entleerung der Speicher zu einer Interaktion mit Speicher-gesteuerten Kanälen, wodurch diese öffnen und Ca^{2+} in die Zelle strömt.

Dafür, dass der IP_3 -Rezeptor Initiator dieses Prozesses ist, spricht die Größe seiner aminoterminalen Region. Sie ist in der Lage den ca. 10 nm breiten Spalt zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Plasmamembran zu überbrücken und Proteinstrukturen des Kanals zu kontaktieren (Berridge et al., 2000). Diese strukturellen Komponenten sind vermutlich Proteine aus der TRP-Familie (transient receptor potential; Philipp et al., 1998; Bouley et al., 1999; Hofmann et al., 2000), vergleichbar dem Dihydropyridin-Rezeptor (s. I.4.1.1). Die „Brückenbildung“ zwischen intrazellulärem Speicher und

Speicher-gesteuertem Kanal konnte in Form von Koimmunopräzipitaten, bestehend aus hTRP-Proteinen und IP₃-Rezeptoren, dargestellt werden (Boulay et al., 1999). Zur Zeit sind sieben TRP-Isoformen bekannt, die sich jedoch auffällig in ihren Leitfähigkeiten und in der Form ihrer Aktivierungsmechanismen unterscheiden (Berridge et al., 2000). Das in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) vorhandene hTRP3-Protein z.B. bildet einen Speicher-gesteuerten Kanal (Zhu et al., 1996; Hurst et al., 1998; Zhu et al., 1998), dessen Aktivierung nicht allein durch die Entleerung der Speicher hervorgerufen wird. Der Vorgang erfordert zusätzlich eine direkte Verbindung des hTRP3-Kanals zu IP₃-Rezeptoren auf der Membran des Ca²⁺-speichernden Organells (Kiselyov et al., 1998; Ma et al., 2000). Kiselyov et al. (1998) zeigte an exzidierten Membranstücken mit integrierten hTRP-Kanälen eine Aktivierung der Leitfähigkeiten nach Zugabe von IP₃/IP₃-Rezeptor-Komplexen.

Neben der direkten Interaktion des Kanals mit IP₃-Rezeptoren ist eine Kommunikation mit dem Zytoskelett denkbar. So führt eine Veränderung im Aktingerüst der HEK293-Zellen zu einer Reduktion des Ca²⁺-Influx über den Speicher-gesteuerten Kanal, ein Indiz für die Beteiligung des Zytoskeletts an der Regulation dieser Leitfähigkeit (Ma et al., 2000). Die Antwort des Kanals auf eine Speicherentleerung wird jedoch nicht vollständig durch eine Modifikation der Aktinstruktur geblockt. Eine zusätzliche Applikation pharmakologischer Substanzen, welche den IP₃-Rezeptor blocken, unterbindet den Ca²⁺-Einstrom dann vollends (Ma et al., 2000). Auch Bourguignon et al. (1993) weist auf die Wichtigkeit eines

intakten Zytoskeletts für die physiologische Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern hin.

IV.2.1.1 Regulation des nicht-selektiven Kationenkanals über eine Änderung des Zellvolumens

Die Bedeutung des Zytoskeletts bei der Kanalaktivierung hängt scheinbar vom Zellsystem ab. Wie oben beschrieben, dient es als Vermittler zwischen IP_3 -bedingter Entleerung der Speicher und einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Diese Vermittlerfunktion scheint auch zwischen Zellvolumenänderung und der Modifikation des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels vorhanden zu sein (Bajnath et al., 1995; Janmey, 1998). Eine Zunahme des Zellvolumens könnte indirekt über das Zellgerüst den nicht-selektiven Kationenkanal am Enterozyten aktivieren oder auf die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher bzw. den IP_3 -Rezeptor (Lang et al., 1998) wirken.

Die Zelle reagiert auf Änderungen ihres Volumens mit einer kompensatorischen Volumenzunahme (Regulatory Volume Increase = RVI) oder –abnahme (Regulatory Volume Decrease = RVD), hervorgerufen durch den Ein- bzw. Ausstrom osmotisch wirksamer Teilchen. In vielen Zellsystemen wird infolge einer Zellschwellung über nicht-selektive Kationenkanäle in der Plasmamembran die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht (McCarty & O’Neil, 1992; Lang et al., 1998). Andere Arbeiten weisen hingegen auf eine fehlende Konzentrationszunahme des Second Messengers infolge einer Zellschwellung (Hall et al., 1996; Niemeyer et al., 2000; Viana et al., 2001). Ca^{2+} aktiviert basolaterale Ca^{2+} -sensitive K^+ -Kanäle und $\text{Cl}^-(\text{Ca}^{2+})$ -Kanäle (Lang et al., 1998), letztere werden aber am

Kolonepithel der Ratte nicht vermutet (Greger, 2000). Die Hyperpolarisation der Zelle, resultierend aus dem Ausstrom von K^+ , fördert den Cl^- -Ausstrom und reduziert zusätzlich die Osmolarität des Zytoplasmas. Diese komplexen Ionenverschiebungen über die Zellmembran gehen mit einer regulatorischen Volumenabnahme einher (Kawahara et al., 1991), dienen dem Schutz der Zelle und wirken präventiv einer Schädigung der Zellmembran entgegen.

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Ausstrom von Cl^- und K^+ -Ionen, der an vielen Zellen durch einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels im Rahmen einer regulatorischen Volumenabnahme induziert wird, scheint die Provokation einer Zellschwellung mit einer $110 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaGluconat-Lösung eine *Inaktivierung* des nicht-selektiven Kationenkanals am distalen Kolon der Ratte auszulösen. Die Zelle hyperpolarisiert (s. Abb. III.7), vielleicht durch einen Ausstrom von K^+ , vielleicht durch eine Abnahme des Kationen-Einstroms in die Zelle. Der Einwärtsstrom nimmt dabei aber signifikant ab (s. Abb. III.8), was die Schlussfolgerung zulässt, dass nicht ein K^+ -Kanal, sondern der nicht-selektive Kationenkanal durch die Volumenänderung beeinflusst wird.

Folglich wird die Gegenregulation der Zelle bei Volumenzunahme hier *nicht* durch einen Ca^{2+} -Einstrom und eine daraus resultierende Aktivierung Ca^{2+} -sensitiver K^+ -Kanäle eingeleitet, im Gegenteil, die für den Ca^{2+} -Einstrom verantwortliche nicht-selektive Leitfähigkeit wird gehemmt. Eine Antwort auf diese unerwartete, „vom üblichen“ abweichende Reaktion könnte Frings et al. (1999) geben; nicht Ca^{2+} , sondern Na^+ ist das dominierende Kation ($6 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Ca}^{2+}$), welches über den nicht-selektiven

Kationenkanal einströmt. Eine Aufnahme von Na^+ in die Zelle würde die Osmolarität des Zytoplasmas erhöhen und einen konsekutiven Wassereinstrom zur Folge haben, dadurch eine Zellschwellung nur noch verstärken. Als Reaktion auf eine Zellschrumpfung im Rahmen einer kompensatorischen Volumenzunahme ist der gesteigerte Transport von Na^+ in das Zellinnere, d.h. die Aktivierung eines nicht-selektiven Kationenkanals eher zu beobachten (Ahmad et al., 1992).

Ein weitere Möglichkeit der Zelle einer Zellschwellung entgegen zu wirken, ohne die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu erhöhen, wäre eine direkte Aktivierung mechanosensitiver K^+ -Leitfähigkeiten (Dubinsky et al., 1999; Ribeiro et al., 2001). Eine Vielzahl von Ionenkanälen öffnen durch Zellmembrandehnung. Der erhöhte Druck steigert die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle, ohne ihre Selektivität oder die Einzel-Kanal-Leitfähigkeit zu beeinflussen. Der Mechanismus, der die gedehnte Membran mit den volumensensitiven Kanälen verbindet, ist noch nicht definiert. Diskutiert wird die Möglichkeit, dass Fettsäuren (Ordway et al., 1992), die durch Membrandehnung freigesetzt werden, oder Elemente des Zytoskeletts z.B. Spectrin (Sokabe et al., 1991), die mechanosensitiven Leitfähigkeiten aktivieren. Ribeiro et al. (2001) zeigte am Kolon der Ratte, dass eine regulatorische Volumenabnahme der Zelle unter Ca^{2+} -freien Bedingungen bzw. unter dem Einsatz von Lanthan, einem Blocker des nicht-selektiven Kationenkanals (Frings et al., 1999) mit einem K^+ -Efflux einhergeht. Trotz eines nicht-vorhandenen Ca^{2+} -Einstroms aus dem Extrazellulärraum aktivieren K^+ -Kanäle, wahrscheinlich aufgrund einer direkten Stimulierung durch Zellschwellung. Zusammenfassend ist der Second Messenger Ca^{2+} am Kolonepithel der Ratte während einer kompensatorischen

Volumenabnahme nicht verantwortlich für eine Aktivierung basolateraler K^+ -Leitfähigkeiten. Eine direkte oder indirekte Steuerung des nicht-selektiven Kationenkanals in Form einer Inaktivierung durch eine Zellschwellung scheint jedoch zu existieren.

IV.2.2 Die indirekte Kopplung Ca^{2+} -Speicher – Speicher-gesteuerter Kanal in der Plasmamembran

Verschiedene Untersuchungen lassen vermuten, dass an einigen Zelltypen, wie z.B. den T-Lymphozyten, der Konformations-Kopplungsmechanismus für einen kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom nicht verantwortlich sein kann (z.B. Jayaraman et al, 1995). Zudem ist eine zeitliche Latenz zwischen intrazellulärer Ca^{2+} -Speicherentleerung und Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals zu beobachten, die eine vermittelnde Signalkette in der Kommunikation der Mitwirkenden vermuten lassen könnte. Daten, die auf die Existenz eines löslichen Botenstoffs weisen, der als Signal für den kapazitativen Ca^{2+} -Influx dient, wurden schon mehrfach veröffentlicht (Randriamampita & Tsien, 1993; Bishof et al., 1995; Csutora et al., 1999; Trepakowa et al., 2000/2001). Art und Herkunft dieser Substanz sind viel diskutiert. Mögliche Signalstoffe, die in den Vermittlungsmechanismus involviert sein könnten, sind u.a. G-Proteine, Tyrosinkinasen, Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinasen, Proteinkinase C und der „ Ca^{2+} -Influx-Faktor“ (Übersicht bei Parekh & Penner, 1997). Trepakowa et al. (2000) demonstrierte an kultivierten glatten Muskelzellen die Wirkung des Ca^{2+} -Influx-Faktors als Vermittler zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und Speicher-gesteuerten Leitfähigkeiten. Exzidierte Membranabschnitte dieser Zellen wurden permeabilisierten T-Lymphozyten exponiert, die bei Speicherentleerung den Ca^{2+} -Influx-Faktor freisetzten

(Randriamampita & Tsien, 1993). Dieser diffundiert aus der permeabilisierten Zelle und aktiviert infolge die Speicher-gesteuerten Leitfähigkeit am isolierten Membranfleck (Trepakowa et al., 2000).

IV.2.2.1 Nicht-selektiver Kationenkanal und intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration unter cAMP-Wirkung

Zyklische Nukleotide wie z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) beeinflussen ebenfalls die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma (Putney, 1997); unsicher ist ihre Wirkung auf den nicht-selektiven Kationenkanal. Für cAMP sind diverse Effekte auf die Leitfähigkeiten am Rattenkolon beschrieben. Im Vordergrund steht die Aktivierung luminal vorhandender CFTR-Cl-Kanäle (z.B. Greger, 2000), zusätzlich öffnet cAMP basolaterale KvLQT_1 - K^+ -Leitfähigkeiten (Mall et al., 1999; Greger, 2000; Bleich & Warth, 2000). *Indirekt* führt auch eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zu einer Stimulation des Stroms über CFTR-Leitfähigkeiten. Die Steuerung erfolgt über die am Enterozyten dominierende Klasse der Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanäle. Mit einer Einzelkanal-Leitfähigkeit von 16 pS reagieren sie auf geringste Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen im Zytoplasma (Bleich et al., 1996). Werden, wie in meinen Untersuchungen, die Ca^{2+} -Speicher der Zelle durch die Erhöhung der intrazellulären Pufferkapazität (s. I.4.1; Kerst et al., 1995) entleert und dadurch der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst, agiert Ca^{2+} als Stimulus der basolateralen K^+ -Kanäle. Wie bereits erwähnt, führt die entstehende Hyperpolarisation zu einem Ausstrom von Cl^- über den CFTR-Kanal, der jedoch für seine Aktivierung auf cAMP angewiesen ist (Böhme et al., 1991; Allert et al., 1992; Strabel & Diener, 1995).

Die cAMP-Konzentration in der Zelle kann durch Forskolin manipuliert werden. Forskolin ist ein Diterpen aus den Wurzeln der indischen Pflanze „*Coleus forskohlii*“. Es greift direkt am katalytischen Zentrum der membranständigen Adenylatzyklase an und aktiviert das Enzym, welches die Umwandlung des intrazellulär vorhandenen ATP zu cAMP katalysiert. Der Second Messenger steuert u.a. über Proteinkinasen des Typs A Phosphorylierungsprozesse und vermittelt dadurch etliche Regulationsprozesse in der Zelle.

In der Literatur wurde häufig eine Depolarisation der Zelle durch die Applikation von Forskolin beschrieben (Böhme et al., 1991; Ecke et al., 1996b, Fischer et al., 1996; Diener et al., 1996; Schultheiß & Diener, 1998). Siemer und Gögelein (1993) schrieben die Zelldepolarisation einer Aktivierung der nicht-selektiven Kationenleitfähigkeit zu. Ecke et al. (1996b) widerlegte diese Annahme und vermutete hinter der Depolarisation vielmehr eine deutliche Steigerung der Cl⁻-Sekretion. Bleich et al. (1996) zeigte eine Inaktivierung des Ca²⁺-sensitiven 16 pS K⁺-Kanals, infolge der Applikation von Forskolin, einhergehend mit einer Reduktion der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, trotz einer parallelen Stimulation des nicht-selektiven Kationenkanals durch Carbachol (Fischer et al., 1996). Dies legte die Vermutung nahe, dass es durch cAMP, ungeachtet der Applikation des Acetylcholinderivats, zu einer Inaktivierung der Speicher-gesteuerten Leitfähigkeit kommen könnte (Fischer et al., 1996).

Jedoch sprechen die hier gezeigten Daten gegen eine Regulation des Kanals durch cAMP. Für diese Whole-Cell-Untersuchungen wurden Cl⁻- und K⁺-Ionen weder in der Pipetten- noch in der

Perfusionslösung verwendet, alleine eine Modifikation des Na^+ -Influx durch den nicht-selektiven Kationenkanal hätte eine Änderung des Stroms über der Membran und eine Spannungsänderung der Zelle provozieren können. Grund für den Ausschluss der K^+ - und Cl^- -Ionen: die Aktivierung des Cl^- -Kanals durch cAMP würde in Anwesenheit von Cl^- zu einem massiven Ausstrom des Ions führen, einhergehend mit einer Depolarisation der Zelle. Die Gegenwart von K^+ könnte ebenfalls eine Depolarisation bewirken, da cAMP die Offenwahrscheinlichkeit der dominierenden $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -Kanäle reduziert und K^+ in der Zelle akkumulieren würde. Diese Reaktionen der Zelle wären störend für die Auswertung des cAMP-Effekts auf den nicht-selektiven Kationenkanal, dessen Inaktivierung mit einer Hyperpolarisation des Enterozyten und einer Reduktion des Ein- und Auswärtsstroms einhergehen müsste. Die Applikation von Forskolin zeigte jedoch keine Wirkung auf diese Leitfähigkeit (s. Abb. III.5/6).

Ursache der bei Bleich et. al. (1996) beobachteten Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist möglicherweise eine Triebkraftänderung für Ca^{2+} infolge der massiven Depolarisation der Zelle durch die cAMP vermittelte Aktivierung luminaler CFTR- Cl^- -Kanäle (Lohrmann & Greger, 1993). Aus der Zelle strömendes Cl^- führt zu einem positiveren Membranpotential. Die Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom über den geöffneten nicht-selektiven Kationenkanal (Frings et al., 1999) wird reduziert, was eine verminderte Aktivierung Ca^{2+} -sensitiver K^+ -Kanäle (Nielsen et al., 1998) zur Folge hat. Der cAMP-aktivierte KvLQT1 -Kanal (Bleich & Warth, 2000) ist offensichtlich nicht in der Lage die Hemmung zu kompensieren. Daten aus Untersuchungen der Kolonkarzinomzelllinie HT29 zeigen, dass auch an dieser Zelllinie eine spannungsabhängige

Triebkraftänderung für Ca^{2+} (Leipziger et al., 1994; Fischer et al., 1996) erfolgt. Depolarisiert die untersuchte Zelle, ist der Speicher-gesteuerte Ca^{2+} -Influx vermindert, eine Hyperpolarisation hat eine Erhöhung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms zur Folge (Leipziger et al., 1994). Unterstützung findet dieser Prozess vermutlich durch eine cAMP-vermittelte Stimulation von Ca^{2+} -ATPasen (Starke, 2001). Die primär aktiven Transportproteine schleusen Ca^{2+} aus dem Zytoplasma und führen ebenfalls zu einer Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bleich et al., 1996).

IV.2.2.2 Stickstoffmonoxid (NO) – ein Molekül in der Regulation des nicht-selektiven Kationenkanals

NO, als anorganisches Molekül, besitzt ein breites Spektrum biologischer Funktionen mit unterschiedlichen Auswirkungen, abhängig vom jeweils untersuchten Zelltyp. Seine Wirkung als Relaxanz der glatten Gefäßmuskulatur und als Neurotransmitter sind nur einige Effekte auf den Organismus. Die molekularen Wirkmechanismen des NO sind ebenso vielschichtig. Es aktiviert die lösliche Guanylatzyklase mit nachfolgender Bildung des intrazellulären Botenstoffs cGMP (z.B. Putney, 1997), stimuliert die Zyklooxygenase, ein Schlüsselenzym der Prostaglandin-Synthese (Salvemini et al., 1995), und baut Superoxid (O_2^-) zu Peroxynitrit (ONOO^-) um (Beckman et al., 1990). Bei Zerfall des Peroxynitrits entsteht mit dem Hydroxyl-Radikal eine stark oxidierende Verbindung.

Gebildet wird NO unter dem katalytischen Einfluss der NO-Synthase (NOS) durch Abspaltung und Oxidation eines Stickstoff-Atoms von L-Arginin (Palmer et al., 1988). Seine Halbwertszeit

beläuft sich auf nur wenige Sekunden und es wird rasch zu Nitrat und Nitrit abgebaut, welche über die Niere ausgeschieden werden (Hönicka & Gerzer, 1997). Zusätzlich reagiert es mit schwefelhaltigen Aminosäuren und Proteinen zu S-Nitrosoverbindungen, die momentan als kurzfristige Speicherformen des NO diskutiert werden. Verschiedene Isoformen der NO-Synthase sind bekannt. Die konstitutive NOS (cNOS), vorkommend als endotheliale (NOS 3) und neuronale (NOS 1) Form, wird physiologisch exprimiert. Ihre Regulation erfolgt primär posttranslational über Ca^{2+} , Calmodulin und oxidative Koenzyme wie z.B. Häm oder Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat (NADP^+). Ihre Aktivität ist durch rasch einsetzende, reversible Abgabe picomolarer Konzentrationen von NO charakterisiert. Im Gegensatz zu diesen Isoformen sind weder mRNA noch Proteine der induzierbaren NOS (iNOS = NOS 2) in nicht-stimulierten Zellen nachweisbar. Eine Expression der NOS 2-mRNA findet vermutlich nur nach Stimulation durch z.B. Endotoxine und/oder Zytokine statt. Im Vergleich zur cNOS produziert die iNOS weitgehend unabhängig vom regulatorischen Einfluss des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels konstant nanomolare Konzentrationen von NO. Sie wird daher vorwiegend mit pathophysiologischen Ereignissen in Verbindung gebracht (Übersicht bei Bauer, 1997).

Im Darm wird NO an verschiedenen Orten produziert, so z.B. im Gefäßendothel, im enterischen Nervensystem, in glatten Muskelzellen und in Epithel- und Subepithelzellen (Übersicht bei Alican & Kubes, 1996). An dem hier untersuchten Gewebe konnte die cNOS durch Immunokolokalisation in Epithelzellen und Lamina propria eindeutig dargestellt werden (Wilson et al., 1996).

NO – Wirkung auf den Wasser- und Elektrolyttransport am Darm

Bisher vorhandene Daten über die Effekte von NO auf den Wasser- und Elektrolyttransport am Darm sind widersprüchlich. Schirgi-Degen und Beubler (1998) beschrieben bei in vivo-Versuchen für das Molekül eine proresorbierende Wirkung am Jejunum der Ratte (Schirgi-Degen & Beubler, 1998). Die intravenöse Infusion des unspezifischen NO-Synthase-Hemmers NG-Nitro-L-argininmethylester (L-NAME) induzierte eine dosisabhängige Netto-Flüssigkeitssekretion, die durch L-Arginin, das Substrat der NO-Synthase, und den NO-Donor Natrium-Nitroprussid (SNP) gehemmt wurde. Im Gegensatz zu dieser Untersuchung führte die Applikation verschiedener NO-Donoren am Kolon von Ratte und Mensch in vitro zu einer Stimulation der Cl⁻-Sekretion (Wilson et al., 1993; Tamai & Gaginella, 1993; Stack et al., 1996), übereinstimmend mit den hier beschriebenen Ergebnissen. Die unterschiedlichen Effekte der NO-Donoren am Dünn- und Dickdarm demonstrieren eine unverkennbare Abhängigkeit von in vitro-/in vivo-Studien und untersuchter Spezies. Am isolierten Darmgewebe scheint NO jedoch vorherrschend als Sekretagog zu agieren (Mourad et al., 1999).

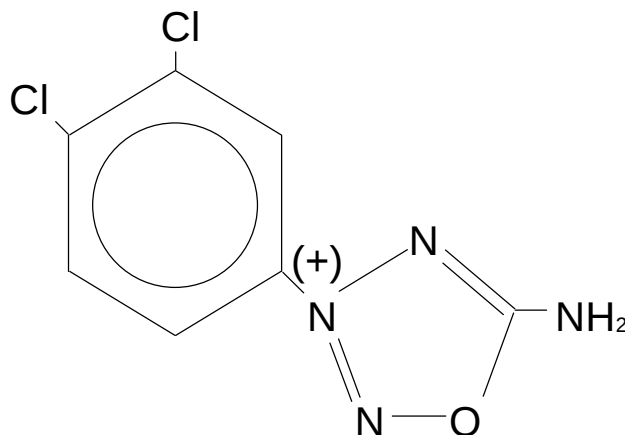
NO - Wirkung am Kolonepithel – Induktion einer Ca²⁺- abhängigen Cl⁻-Sekretion

Die Möglichkeit einer Stimulation der Cl⁻-Sekretion über die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ist bekannt. Dies setzt an der Zelle die Entleerung der Speicher und die Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals voraus.

An einigen Zelltypen, z.B. an der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT29/B6 und an Pankreasazinuszellen der Maus, konnte

gezeigt werden, dass NO die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration über eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher erhöht (Bischof et al, 1995; Watson et al, 1999). An Pankreasazinuszellen der Ratte präsentierte Xu et al. (1994) die vermittelnde Signalkette zwischen Ca^{2+} -Speicherentleerung und kapazitativem Ca^{2+} -Einstrom. Durch den Einsatz verschiedener Blocker und SNP als NO-Donor ergab sich die Vorstellung einer Stimulation der NOS durch Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. NO generiert den Second Messenger cGMP, welcher den Ca^{2+} -Influx über die Plasmamembran reguliert (Xu et al., 1994).

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse demonstrieren ebenfalls eine durch den NO-Donor GEA 3162 (s. Abb. IV.1) induzierte Cl^- -Sekretion am distalen Kolon der Ratte. Diese, im Vergleich zu anderen NO-Donoren, lipophile Substanz zeigt ihre pharmakologische Wirkung durch eine spontane äquimolare Freisetzung von NO (Karup et al., 1994, Kankaanranta et al., 1996; Holm et al., 1998). Ihre biologische Wirkung ist mit NO vergleichbar (Malo-Ranta et al., 1994), jedoch ist der chemische Prozess der NO-Abgabe noch nicht exakt dargestellt (Karup et al., 1994; Malo-Ranta et al., 1994). Ein weiterer Vorteil, neben der lipophilen Eigenschaft, ist die analog zu anderen NO-Donoren vernachlässigbare Produktion der Sauerstoffradikale Superoxid und Peroxynitrit parallel zur NO-Freisetzung (Holm et al., 1998). Diese Metaboliten werden bei der „NO-Synthese“ durch den Abbau des NO-Donors freigesetzt, verändern den Redox-Status der Zelle und können schädigende Effekte am untersuchten Epithel hervorrufen (Beckman et al, 1990).



1,2,3,4-Oxatriazolium,5-amino-3-(3,4-dichlorophenyl)-chlorid

Abb. IV.1

Strukturformel des lipophilen NO-Donors GEA 3162.

In Vorversuchen zeigte ein Vergleich verschiedener NO-freisetzender Substanzen, dass das lipophile GEA 3162 im Gegensatz zu konventionellen NO-Donoren, wie z.B. Natrium-Nitroprussid, die effizienteste Wirkung auf den am Kolonepithel der Ratte gemessenen Kurzschlussstrom hatte. Die physiologisch exprimierte cNOS (Wilson et al., 1996) scheint hier auch unter Kontrollbedingungen aktiv zu sein, da der Einsatz des unspezifischen NOS-Blockers LG-Nitro-L-Arginin den basal vorhandenen Kurzschlussstrom reduzierte (Daten nicht vorgestellt).

Die Applikation von GEA 3162 führte im permeabilisierten Patch zu einer Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals (s. Abb. III.14a/b), was sich an einer Zunahme des Ganzzellstroms und signifikanter Depolarisation zeigte. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration löste indirekt, über die Aktivierung basolateraler K^+ -Kanäle, eine Cl^- -Sekretion aus, zu sehen an einem

Anstieg des gemessenen Kurzschlussstroms in den Ussingkammer-Versuchen (s. Abb. III.9a). Da der Haupteinstrom von Ca^{2+} über die serosale Seite erfolgt (Frings et al., 1999), führte eine serosal Ca^{2+} -freie Lösung zu einer vollständigen Unterdrückung der Cl^- -Sekretion (s. Abb. III.9b) und demonstriert die Beteiligung von Ca^{2+} an dem durch NO ausgelösten Sekretionsprozess. 4 der 10 im permeabilisierten Patch untersuchten Zellen zeigten eine deutliche Hyperpolarisation. Die dabei gemessenen Whole-Cell-Ströme wiesen eine zur X-Achse parallele Verschiebung auf, ohne auf die Regulation eines Kanals zu deuten – ein Phänomen mit unklarer Genese. Denkbar wäre eine artifiziell hervorgerufene Reaktion durch den eingesetzten lipophilen NO-Donor, der sich, mit einer positiven Ladung behaftet (s. Abb. IV.1), in die Membran einlagert und das Zellinnere negativer erscheinen lässt. Da Kolonkrypten aus mehreren Zelltypen aufgebaut sind (s. I.1), könnten Zellen, z.B. enteroendokrine Zellen erfasst worden sein, die möglicherweise durch NO nicht regulatorisch beeinflusst werden.

Präparationsbedingt sind bei Ussingkammer-Studien Strukturen des enteralen Nervensystems vorhanden. Hier zeigte der Einsatz des Neurotoxins Tetrodotoxin (TTX) einen partiellen Abfall des Kurzschlussstroms und somit die Involvierung des enteralen Nervensystems. Des weiteren konnte ein stimulierender Effekt von NO auf Prostanoid-produzierende Zellen dargestellt werden (Daten nicht gezeigt). GEA 3162 ist jedoch sowohl in Anwesenheit von TTX als auch Indomethacin (= nicht-steroidales Antiphlogistikum = Blocker der Prostaglandin-Synthese) in der Lage einen Kurzschlussstrom zu erzeugen, d.h. die Zunahme des I_{sc} durch NO ist nicht allein auf enterales Nervensystem und

Prostaglandinwirkung zurückzuführen, so dass ein Teil der NO-Wirkung *direkt* dem Epithel zugesprochen werden muss. Untersuchungen von Wilson et al. (1993) und Stack et al. (1996) widersprechen diesen Ergebnissen auf den ersten Blick. In diesen Studien führte eine gleichzeitige Vorbehandlung des Rattenkolons mit TTX und Piroxicam, einem Zykllooxygenase-Hemmer, zu einer fast vollständigen Unterdrückung des durch SNP induzierten Isc. Diese Substanzen blocken die Freisetzung von Neurotransmittern und Prostaglandinen, die auch unter basalen Bedingungen die kontinuierliche Produktion des Second Messengers cAMP in der Zelle vermitteln (Craven & DeRubertis, 1981; Craven et al., 1983). Die elektrogene Anionensekretion durch den NO-Donor SNP wurde aufgrund dieser Ergebnisse vollständig dem enteralen Nervensystem und Prostanoid-produzierenden Zellen zugesprochen. Jedoch wird durch diese Substanzen *allein* die Cl⁻-Sekretion über apikale Cl⁻-Kanäle unterbunden. Die in meinen Untersuchungen durch Ca²⁺ induzierte Aktivierung basolateraler K⁺-Kanäle (Warth et al., 1999) bewirkt aufgrund der Triebkraftänderung normalerweise einen Ausstrom von Cl⁻ über *bereits geöffnete* Leitfähigkeiten. Sind die CFTR-Cl⁻-Kanäle durch Blockung des cAMP-Wegs geschlossen, kann, trotz der erhöhten Triebkraft für den Anionenausstrom, kein Kurzschlussstrom durch die SNP-Applikation ausgelöst werden. Daher stehen die Befunde von Wilson (1993) und Stack (1996) nicht im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen.

NO - Wirkung am Kolonepithel – Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals ohne die vorherige Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher

Die Konzentrationszunahme von Ca^{2+} in der Zelle kann über verschiedene Wege induziert werden. Für Pankreasazinuszellen der Ratte wurde die Vermutung geäußert, dass NO bzw. cGMP (z.B. Lucas et al., 2000) als Vermittler zwischen Ca^{2+} -Speicherentleerung und kapazitativem Ca^{2+} -Einstrom agieren könnten (Pandol & Schoeffield-Payne, 1990; Xu et al., 1994). Weiterhin wird an Hepatozyten, Endothelzellen und Pankreasazinuszellen eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch NO angenommen (Clementi, 1998; Watson et al., 1999), wodurch der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom indirekt aktiviert wird.

Die von mir präsentierten Daten zeigen jedoch keine Beteiligung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher an der NO-vermittelten Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals. Mittels der Imaging-Technik konnte durch GEA 3162 eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration um $98 \pm 15 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ dargestellt werden (s. Abb. III.10/11), jedoch war diese allein auf einen Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum zurückzuführen (s. Abb. III.12). Unter der Perfusion einer nominal Ca^{2+} -freien Lösung wäre durch Zusatz des NO-Donors ein Anstieg des Fluoreszenzsignals aufgrund der Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern zu erwarten, falls diese durch NO beeinflusst würden. Ein solches Ergebnis zeigte sich nicht. Die Applikation des Acetylcholinderivats Carbachol führte in den Ussingkammer-Messungen zu einem biphasischen Anstieg des Kurzschlussstroms, dessen initialer Peak durch die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher und seine späte Phase durch die Aktivierung des

nicht-selektiven Kationenkanals getragen wird. Dieser Carbachol-Effekt ist durch Zugabe von L-NAME nicht hemmbar, d.h. trotz einer Blockung der NO-Synthese interagieren Ca^{2+} -Speicher und nicht-selektiver Kationenkanal. Die beobachtete partielle Reduktion des durch Carbachol induzierten Kurzschlussstroms unter dem löslichen Guanylatzyklase-Hemmer LY 83583 widerspricht dieser Annahme auf den ersten Blick. Geht man von der Signalkette $\text{NOS} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{cGMP} \rightarrow \text{Proteinkinasen} \rightarrow \text{Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals}$ aus, würde man aufgrund der Stromabnahme eine Beteiligung von NO an der Interaktion Ca^{2+} -Speicher - Leitfähigkeit vermuten. Jedoch zeigte Mülsch et al. (1989), dass der Abbau von LY 83583 Superoxid-Anionen generiert, die zu H_2O_2 reagieren, welche, wie für die humane Kolontumorzelllinie T84 beschrieben, die cAMP-induzierte Cl^- -Sekretion hemmen (Duvall et al., 1998). So könnte die beobachtete partielle Hemmung der Cl^- -Sekretion eine Folge des LY 83583- Metabolismus sein und nicht zwangsläufig durch einen Block der basal aktiven cGMP-Produktion hervorgerufen werden.

Zusammenfassend wirkte der NO-Donors GEA 3162 in diesen Untersuchungen allein über eine Aktivierung des basolateral lokalisierten, nicht-selektiven Kationenkanals. Eine vorausgehende Speicherentleerung wurde nicht beobachtet. NO ist somit nicht das gesuchte physiologische Translationssignal in der Interaktion Speicherentleerung - kapazitativer Ca^{2+} -Einstrom. Die Aktivierung der Leitfähigkeit scheint parallel der physiologischen, Acetylcholin-aktivierten Signalkette abzulaufen. Die biochemischen Schritte der Stimulation sind hier jedoch unklar. Möglicherweise agiert der NO-Donor über den indirekten, klassischen NO/cGMP-Weg (Xu et al., 1994, Bischof et al., 1995; Duszyk, 2001) oder durch direkte

Modifikation des Kanalproteins über eine Nitrosylierung von Sulfhydryl-Gruppen (Favre et al., 1998; Ma et al., 1999; van Rossum et al., 2000).

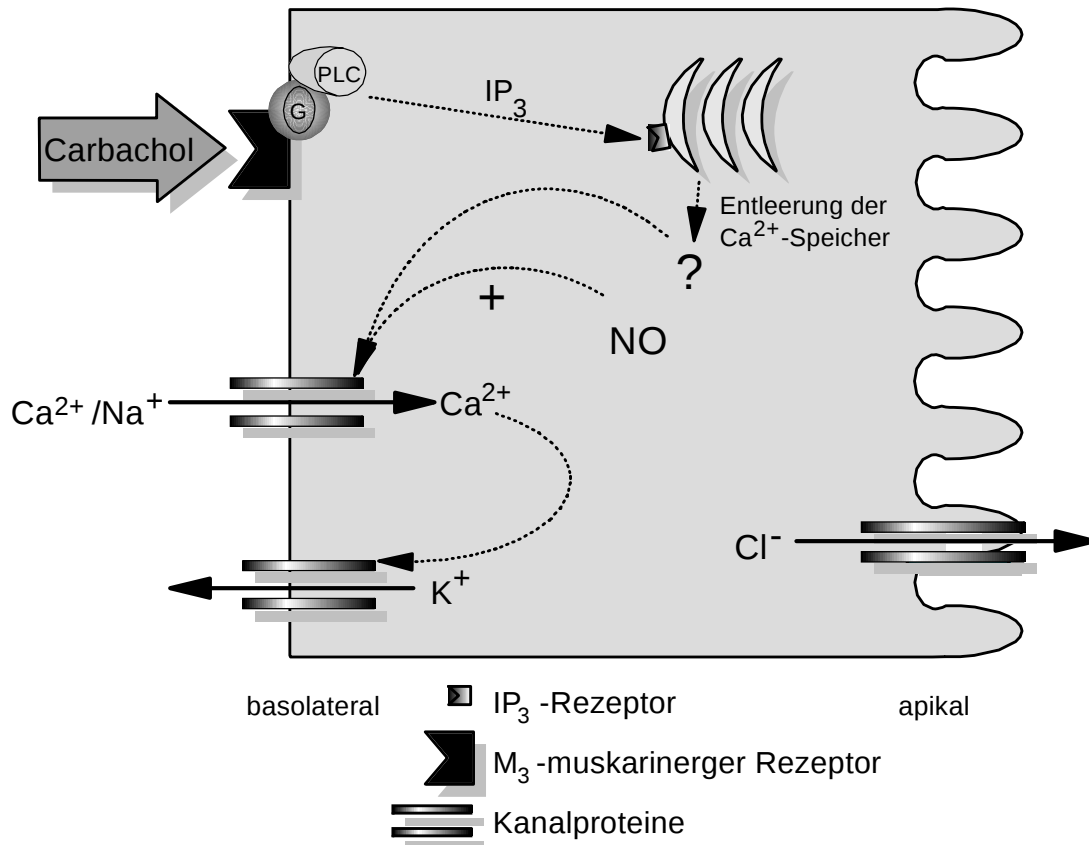


Abb.IV.2

Wirkung von Stickstoffmonoxid am Kolonepithel. PLC = Phospholipase C; G = G-Protein.

IV.3 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher – seine Funktion in der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase

Für die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase existieren diverse Zellkomponenten am Enterozyten, die je nach Bedarf die Konzentration des Second Messengers reduzieren oder erhöhen. Zwei dieser, miteinander agierenden Mechanismen, wurden hier bereits vorgestellt – intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher und nicht-selektiver Kationenkanal.

Die wahrscheinliche Involvierung eines weiteren Transportsystems wurde an glatten Muskelzellen der Ratte beschrieben (Arnon et al., 2000). Dort führte die Aktivierung einer Speicher-gesteuerten Leitfähigkeit zu einem Einstrom von Ca^{2+} und Na^+ , ähnlich der nicht-selektiven Leitfähigkeit am Kolonepithel der Ratte (Frings et al., 1999). Die erhöhte Na^+ -Konzentration im Zytosol reduzierte infolge den Ausstrom von Ca^{2+} und ließ einen Einfluss auf den Aktionsmodus des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers vermuten.

IV.3.1 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist ein elektrogener, sekundär aktiver Transporter in der Plasmamembran, der in den meisten Zellsystemen unter einem physiologischen Na^+ -Gradienten, aufrecht erhalten durch die Na^+/K^+ -Pumpe, 3 Na^+ -Ionen über die Membran in die Zelle und ein einzelnes Ca^{2+} -Ion aus der Zelle schleust (Lagnado & McNaughton, 1990; Yoshihashi et al., 1996; Blaustein & Lederer, 1999). Er dient damit, neben der primär aktiven Ausschleusung von Ca^{2+} durch die Ca^{2+} -ATPase, der Reduktion des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Abgesehen von der Regulation durch seine Substrate, wurde auf molekularer Basis eine Steuerung durch

Phosphorylierung und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) beobachtet (Philipson & Nicoll, 2000).

Der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher arbeitet bidirektional, d.h. er ist in der Lage seinen Transportmodus, abhängig von der relativen Triebkraft seiner Substrate, umzukehren und einen Influx von Ca²⁺-Ionen zu vermitteln (Blaustein & Lederer, 1999; Brini & Carafoli, 2000).

Diese Erkenntnis kommt z.B. bei einer Therapie mit Digitalis zum Tragen. Das Herzglykosid besitzt einen positiv inotropen Effekt auf die Herzmuskulatur, d.h. es wirkt durch eine Steigerung der Kontraktilität, resultierend aus einer Änderung im Aktionsmodus des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers. Dieser sekundär aktive Transporter arbeitet nahe seinem „Umkehrpunkt“. Eine Änderung des Na⁺-Konzentrationsgradienten durch eine Erhöhung des intrazellulären Na⁺-Spiegels bzw. eine Modifikation des elektrischen Gradienten in der Depolarisationsphase der Herzaktion führt zu einem Einwärtstransport von Ca²⁺ durch den Austauscher. Digitalis hemmt die Funktion der Na⁺/K⁺-Pumpe und führt zu einer Akkumulation von Na⁺ im Zytoplasma, einhergehend mit einer Hemmung oder Umkehr des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers. Ca²⁺ wird im Zytoplasma angereichert und steht nach der Speicherung im Sarkoplasmatischen Retikulum einer Aktivierung des kontraktilen Apparats der Muskelzelle zur Verfügung.

Der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher, als Mitwirkender in der Ca²⁺-Homöostase, ist parallel bzw. seriell zu den übrigen Akteuren geschaltet; z.B. dient das für den Herzmuskel überaus wichtige, mit hoher Dichte vorhandene Carrier-Protein (Niggli & Lederer, 1991) vorwiegend als Ca²⁺-Ausschleusungs-Instrument (Grantham &

Cannell, 1996). Es hat zum einen die Aufgabe, die über Speicher und spannungsabhängige Kanäle gelieferte Ca^{2+} -Menge für die Muskelkontraktion zügig aus der Zelle zu transportieren, um die Relaxierung des Muskels zu sichern. Zum anderen agiert es vermutlich einheitlich mit Ca^{2+} -Speicher und L-Typ Ca^{2+} -Kanal als Ca^{2+} -Einschleuser. Durch die Membrandepolarisation infolge des schnellen Einstroms von Na^+ zu Beginn des Aktionspotentials, schaltet es in den Influx-Modus und stimuliert eventuell sogar die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung über den Ryanodin-Rezeptor (Levesque et al., 1994; Wasserstrom & Vites, 1996).

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher wird an den verschiedenen Geweben in unterschiedlichem Ausmaß und mit physiologisch differierenden Transportmodi exprimiert. Der funktionelle Nachweis seiner Expression am Kolonepithel fehlte bis zum jetzigen Zeitpunkt.

IV.3.2 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher - funktioneller Nachweis seiner Expression am Kolonepithel

Der dominierende Einstrom von Na^+ über den nicht-selektiven Kationenkanal am Kolonepithel der Ratte, die physiologische Antwort auf eine Entleerung der Ca^{2+} -Speicher (Frings et al., 1999), ist eigentlich ein kontraproduktives Geschehen im Verlauf der Sekretionsinduktion, da sich aufgrund der zunehmenden Depolarisation die Triebkraft für eine Cl^- -Sekretion über den apikalen CFTR-Kanal und für eine Cl^- -Aufnahme über den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter reduziert. Das Vorhandensein eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers am Enterozyten und die von Arnon et al. (2000) beschriebene Interaktion mit dem nicht-selektiven Kationenkanal könnte dieses Paradoxon möglicherweise erklären.

In Fura-2 Studien wurde das initial angebotene extrazelluläre Na^+ durch das nicht-permeable NMDG^+ ersetzt. Dies führte zu einer Umkehr des physiologisch einwärts gerichteten Na^+ -Gradienten und infolgedessen zu einer Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (s. Abb. III.15/16/17). Nach Einsatz von Dichlorobenzamil, einem Blocker des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (Kaczorowski et al., 1985), war kein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (s. Abb. III.18) mehr zu beobachten. Dies weist auf die Expression eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers hin, der unter diesen Bedingungen Na^+ aus der Zelle und Ca^{2+} in die Zelle transportiert.

Die Verwendung von DCB in Fura-2/ Ca^{2+} -Studien ist problematisch, da das Molekül als aromatische Verbindung fluoreszierende Eigenschaften besitzt und somit die Ca^{2+} -Messungen beeinträchtigt. Es „quencht“, d.h. unterdrückt, die Fluoreszenzsignale von Fura-2 konzentrationsabhängig, ein Verhalten, das bei Benzamilorid, ein dem Dichlorobenzamil strukturell sehr ähnlichen Amiloridderivat, beschrieben wurde (Hudson et al., 1998).

Daher wurde die Frage, ob der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher am Kolonepithel unter basalen Bedingungen als ein Ca^{2+} -Ausschleusungs-Transporter arbeitet, versucht mit der Ussingkammer-Methode zu beantworten.

IV.3.3 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher – Ausschleusung von Ca^{2+} unter basal niedriger Cl^- -Sekretion

Unter basalen Bedingungen bewirkte Dichlorobenzamil an der Mehrzahl der untersuchten Gewebe einen sofortigen Anstieg des Kurzschlussstroms, der sich von der Cl^- -Präsenz abhängig und gegenüber dem Neurotoxin TTX unempfindlich zeigte. Das bedeutet: Dichlorobenzamil wirkt *direkt* am Enterozyten. Interessant war die Beobachtung, dass der Verlauf des Kurzschlussstroms infolge Zugabe des Blockers, abhängig vom basalen Isc, variierte. Mukosa-Submukosa-Präparate mit einem initial geringen Kurzschlussstrom zeigten nach Zugabe von DCB einen Anstieg (s. Abb. III.20a), Gewebe mit initial höherem Kurzschlussstrom einen Abfall des Isc (s. Abb. 20b). Vermutlich fungiert der am Kolonepithel vorhandene $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher bei basal geringem Kurzschlussstrom als Ca^{2+} -Ausschleuser, eine Hemmung durch DCB bewirkt eine Akkumulation von Ca^{2+} im Zytoplasma und aktiviert basolaterale Ca^{2+} -sensitive K^+ -Kanäle, deren Öffnen die Triebkraft für eine Cl^- -Sekretion steigert (Böhme et al., 1991). Ein basal höherer Kurzschlussstrom ist wahrscheinlich auf einen initialen Transport von Ca^{2+} in die Zelle zurückzuführen. Durch die Blockade des Carrier-Proteins sinkt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, basolaterale $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -Kanäle werden inaktiviert und die Triebkraft für den Cl^- -Ausstrom nimmt ab. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher unweit seines Gleichgewichtspotentials arbeitet.

Wie verläuft nun die Interaktion der genannten „Mitspieler“ in der Kontrolle der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase?

IV.3.4 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher - die physiologische Bedeutung des dominierenden Na^+ -Einstroms

Wurde durch das Acetylcholinderivat Carbachol über eine IP_3 induzierte Ca^{2+} -Speicherentleerung einhergehend mit einem kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom die Cl^- -Sekretion induziert (Schultheiß & Diener, 1998; Warth et al., 1999), führte eine Applikation von DCB *keineswegs* zu einer Potenzierung des Kurzschlussstroms (s. Abb. III.21). Eine Zunahme des Isc durch Blockade des Austauschers wäre zu erwarten, vorausgesetzt der Austauscher arbeitet weiterhin als Ca^{2+} -Ausschleuser.

Der Einstrom der beiden Kationen Na^+ und Ca^{2+} führt vermutlich zu zwei parallelen Effekten. Ca^{2+} füllt die Speicher und unterhält durch seine erhöhte intrazelluläre Konzentration die Plateauphase des Kurzschlussstroms (Lindqvist et al., 1998). Na^+ vermindert durch seine erhöhte intrazelluläre Konzentration die Triebkraft für den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher – schaltet diesen ab bzw. kehrt seinen Transportmodus vielleicht sogar um und unterstützt dadurch die Aufrechterhaltung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration während des Sekretionsprozesses.

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist somit als ein nicht zu vernachlässigender Akteur in der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase am Kolonepithel der Ratte anzusehen.

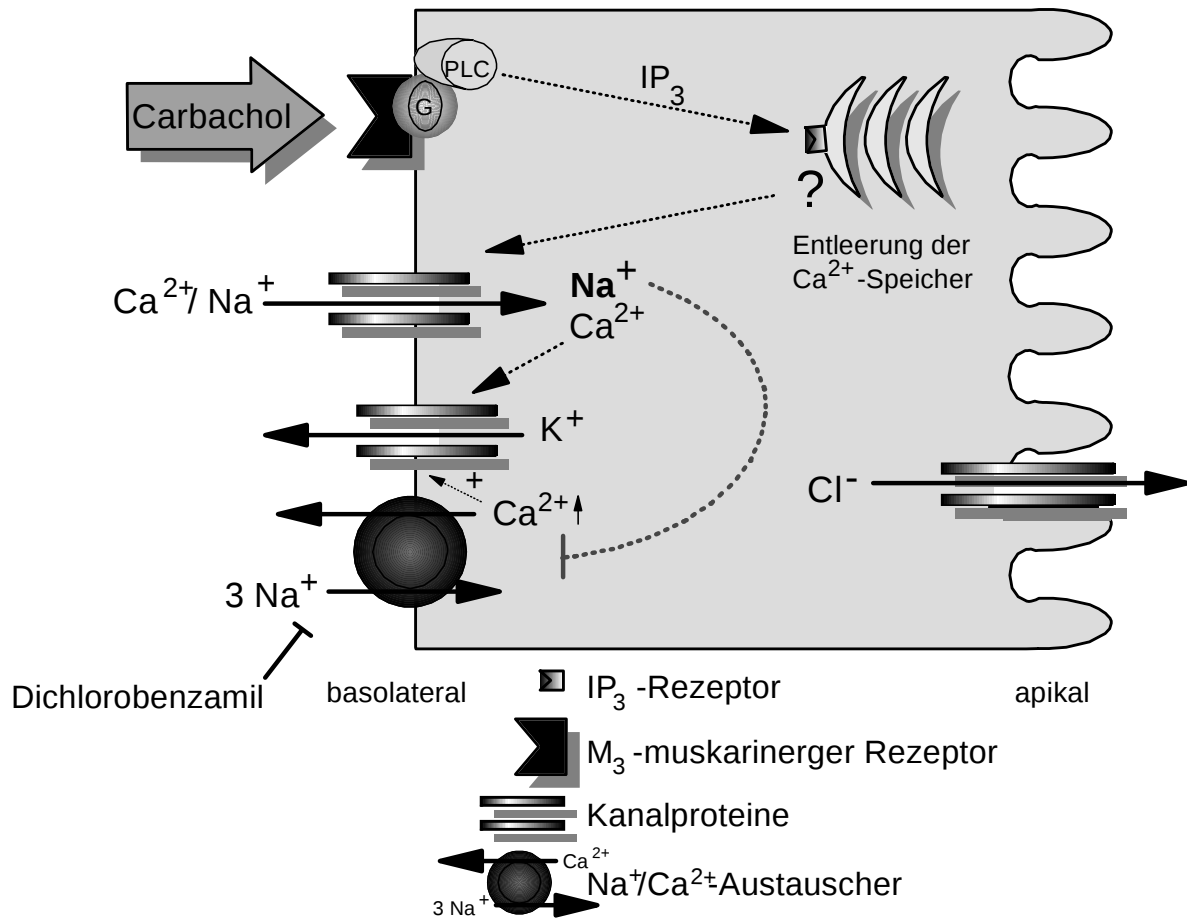


Abb.IV.3

Hemmung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers durch den dominierenden Na⁺-Einstrom über den aktivierten, nicht-selektiven Kationenkanal. PLC = Phospholipase C; G = G-Protein.

V Zusammenfassung

Die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher führt am distalen Kolon der Ratte zur Aktivierung einer für Ca^{2+} und für Na^{+} passierbaren Kationenleitfähigkeit. Diese Abläufe bewirken indirekt über die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels eine Cl^{-} -Sekretion in das Darmlumen.

Die Passage-Eigenschaften des Kationenkanals für monovalente und divalente Kationen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik an isolierten Krypten untersucht. Nach Stimulation der Leitfähigkeit durch eine Speicherentleerung führten die monovalenten Kationen zur Zunahme des Einwärtsstroms, sie permeierten mit der Sequenz $\text{Cs}^{+} > \text{Na}^{+} \geq \text{Li}^{+}$ und charakterisierten den Kationenkanal als nicht-selektiv. Im Gegensatz zu Na^{+} ist Ca^{2+} nicht nur in der Lage den nicht-selektiven Kationenkanal (NSKK) zu passieren, es bewirkt in höheren Konzentrationen zusätzlich eine Hemmung seines eigenen Einstroms. Die divalenten Kationen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} und Sr^{2+} führten in einer Konzentration von $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ausnahmslos zu einer Reduktion des Na^{+} -getragenen Einwärtsstroms. Sie zeigten allerdings einen unterschiedlich ausgeprägten Hemmeffekt auf den NSKK: $\text{Ca}^{2+} \geq \text{Mg}^{2+} \geq \text{Ba}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+}$.

Der Kopplungsmechanismus zwischen Speicherentleerung und Aktivierung des NSKK ist unklar; evtl. ist Stickstoffmonoxid (NO) daran beteiligt. GEA 3162, ein lipophiler NO -Donor, führte in Fura-2-Studien an isolierten Krypten zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), infolge eines Ca^{2+} -Einstroms aus dem Extrazellulärraum, der in Patch-Clamp-Untersuchungen mit einer Aktivierung des NSKK korrelierte. Jedoch konnte in Ussingkammer-

Versuchen eine Carbachol-induzierte Speicherentleerung mit einhergehender Aktivierung des NSKK nicht durch NO-Synthase-Hemmer beeinflusst werden. Demzufolge ist NO nicht der erhoffte Vermittler in der Kommunikation von Speicher mit Speicher-gesteuertem Kanal, sondern induziert einen parallelen Mechanismus, der zur Aktivierung des NSKK führt und unabhängig von der Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher agiert.

Fura-2-Untersuchungen demonstrierten, dass eine Substitution des extrazellulären Na^+ durch das impermeable N-Methyl-D-Glucamin (NMDG^+) zu einem deutlichen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führte, der durch einen Blocker des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, Dichlorobenzamil (DCB), unterdrückt wurde. Dies spricht für die Expression eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers am Kolonepithel der Ratte. In Ussingkammer-Studien führte DCB in der Mehrzahl der untersuchten Gewebe zu einer Zunahme der Cl^- -Sekretion aufgrund der Akkumulation von Ca^{2+} im Zytoplasma, was auf die basale Funktion des Austauschers als Ca^{2+} -Ausschleusungstransporter deutet. Die Applikation von DCB während der Stimulation der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Sekretion durch Carbachol zeigte jedoch keine Wirkung mehr. Dies weist auf eine Abschaltung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers parallel zur Aktivierung des NSKK hin. Vermutlich dient der Einstrom von Na^+ über den NSKK der Triebkraftreduzierung für die Ausschleusung von Ca^{2+} über den Austauscher und unterstützt dadurch die Anhebung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Sekretion.

VI Summary

The depletion of intracellular Ca^{2+} -stores activates a cation conductance in the plasma membrane of colonocytes which is permeable to Ca^{2+} and Na^{+} . The rise in intracellular Ca^{2+} -concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mediates the opening of basolateral K^{+} -channels thereby inducing a strong Cl^{-} secretion across apical Cl^{-} -channels.

The properties of this store-operated cation conductance in crypts isolated from rat distal colon were studied and revealed the absence of selectivity. The permeability of the nonselective cation conductance (NSCC) had the following sequence: $\text{Cs}^{+} > \text{Na}^{+} \geq \text{Li}^{+}$. Ca^{2+} is not only permeant for this conductance but in addition at a higher concentration it exerts an inhibition on its own influx. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} and Sr^{2+} inhibited with a different efficiency: $\text{Ca}^{2+} \geq \text{Mg}^{2+} \geq \text{Ba}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+}$.

The signal by which the stores activate the NSCC remains obscure; there are data arguing for nitric oxide (NO) as requested messenger. The lipophilic nitric oxide donor GEA 3162 induced an activation of the NSCC followed by a Ca^{2+} -dependent Cl^{-} -secretion. However the results indicate that NO is not the physiological signal involved in the communication between the intracellular stores and the NSCC.

In Fura-2 studies a replacement of extracellular Na^{+} by N-methyl-D-glucamine (NMDG $^{+}$) induced an increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ which was suppressed by the Na^{+} - Ca^{2+} -exchange inhibitor dichlorobenzamil (DCB) indicating the presence of an Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger within the colonic crypt cells. In Ussing chamber

experiments DCB induced an increase in I_{sc} due to a Ca^{2+} -dependent Cl^- -secretion in the majority of tissues tested indicating that this exchanger physiologically acts as a Ca^{2+} extruding transporter. When Ca^{2+} dependent secretion was stimulated by carbachol, DCB did no longer evoke an increase in I_{sc} , i.e. the exchanger is turned off. Therefore it is concluded that the influx of Na^+ across the NSCC serves to reduce the driving force for Ca^{2+} extrusion via the exchanger and thereby maintains the increase in the $[Ca^{2+}]_i$ during induction of secretion.

VII Literaturverzeichnis

AHMAD, I., KORBMACHER, C., SEGAL, AS., CHEUNG, P., BOULPAEP, EL., BARNSTABLE, C.J. (1992)

Mouse cortical collecting duct cells show nonselective cation channel activity and express a gene related to the cGMP-gated rod photoreceptor channel.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89** (21): 10262-10266.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. (1995)

Membrantransport kleiner Moleküle und Ionen als Grundlage der Membranerregbarkeit.

In: Molekularbiologie der Zelle. Hrsg.: Jaenicke, L., 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 599-650.

ALICAN, I. & KUBES, P. (1996)

A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction.

Am. J. Physiol. **270**: G225-237.

ALLERT, N., LEIPZIGER, J., GREGER, R. (1992)

cAMP and Ca^{2+} act co-operatively on the Cl^- conductance of HT29 cells.

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **421**(4): 403-5.

ARNON, A., HAMLYN, J.M., BLAUSTEIN, M.P. (2000)

Na^+ entry via store-operated channels modulates Ca^{2+} -signaling in arterial myocytes.

Am. J. Physiol. **278**: C163-173.

BAJNATH, R.B., DEKKER, K., DE JONGE, H.R. & GROOT, J.A. (1995)

Chloride secretion induced by phorbol dibutyrate and forskolin in the human colonic carcinoma cell line HT 29Cl.19A is regulated by different mechanisms.

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **430**: 705-712.

BARBRY, P. & HOFMAN, P. (1997)

Molekular biology of Na^+ absorption.

Am. J. of Physiol. **273**: G 571-585.

BARRETT, K.E. & KEELY, S.J. (2000)

Chloride secretion by the intestinal epithelium: Molecular basis and regulatory aspects.

Ann. Rev. Physiol. **62**: 535-572.

BAUER, M. (1997)

Stickstoffmonoxid.
Anästhesist **46**: 441-450.

BECKMAN, JS., BECKMAN, TW., CHEN, J., MARSHALL, PA., FREEMAN, BA. (1990)

Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (4): 1620-1624.

BERRIDGE, MJ. (1997)

Elementary and Global Aspects of Calcium Signalling .
The J. of Experimental Biology **200**: 315-319.

BERRIDGE, MJ., LIPP, P., BOOTMAN, MD. (2000)

The versatility and universality of calcium signalling.
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **1** (1): 11-21.

BEZPROZVANNY, I. & EHRLICH, B.E. (1995)

The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor.
J. Membr. Biol. **145**: 205-16.

BINDER, H.J. & SANDLE, G.I. (1994)

Electrolyte Transport in the Mammalian Colon.
In.: Physiology of the Gastrointestinal Tract – Volume 2, Third Edition,
Hrsg: Johnson, L.R.. Raven Press, New York. **64**: 2133-2171.

BINDER, H.J., SINGH, S.K., GEIBEL, J.P., RAJENDRAN, V.M. (1997)

Novel transport properties of colonic-crypt cells: Fluid absorption and Cl⁻ dependent Na⁺-H⁺-exchange.
Comp. Biochem. Physiol. **118A**: 265-269.

BISCHOF, G., BRENMAN, J., BREDT, D.S., MACHEN, T.E. (1995)

Possible regulation of capacitative Ca²⁺ -entry into colonic epithelial cells by NO and cGMP.
Cell Calcium **17**: 250-262.

BLAUSTEIN, M.P., LEDERER, W.J. (1999)

Sodium/calcium exchange: Its physiological implications.
Physiological Reviews. **79**: 763-854.

BLEICH, M., RIEDEMANN, N., WARTH, R., KERSTAN, D., LEIPZIGER, J., HÖR, M., VAN DRIESCHE, W., GREGER, R. (1996)

Ca²⁺ regulated K⁺ and nonselective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells.
Pflügers Archiv- Eur. J. Physiol. **419**: 144-151.

BLEICH, M., WARTH, R. (2000)

The very small-conductance K⁺ channel KvLQT1 and epithel function.
Pflügers Archiv- Eur. J. Physiol. **440**: 202-206.

BÖHME, M., DIENER, M. & RUMMEL, W. (1991)

Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts.
Pflügers Archiv- Eur. J. Physiol. **419**: 114-151.

BOULAY, G., BROWN, DM., QIN, N., JIANG, M., DIETRICH, A., ZHU, MX., CHEN, Z., BIRNBAUMER, M., MIKOSHIBA, K., BIRNBAUMER, L. (1999)

Modulation of Ca²⁺ entry by TRP- binding polypeptides of the 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R). Evidence for roles of TRP and the IP₃R in store depletion-activated Ca²⁺ entry.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 14955-14960.

BOURGUIGNON, L.Y., IIDA, N., JIN, H. (1993)

The involvement of the cytoskeleton in the regulating IP₃ receptor-mediated internal Ca²⁺ release in human blood platelets.
Cell. Biol. Int. **17**: 751-758.

BRINI, M. & CARAFOLI, E. (2000)

Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives.
Cell. Mol. Life Sci. **57** (3): 354-70.

CHANG, W., PRATT, SA., CHEN, TH., TU, CL., MIKALA, G., SCHWARTZ, A., SHOBACK, D. (2001)

Parathyroid cells express dihydropyridine-sensitive cation currents and L-type calcium channels.
Am. J. Physiol. **281**: E-180-189.

CHRISTENSEN, J. (1991)

Gross and microscopic anatomy of the large intestine
In: The large intestine- physiology, pathophysiology and disease
Raven Press LTD., New York.
J. Biol. Chemistry **270** (38): 22277-82.

CLEMENTI, E. (1998)

Role of Nitric oxide and its intracellular Signalling pathways in the Control of Ca²⁺ Homeostasis.
Biochem. Pharmacol. **55**: 713-718.

**COUGNON, M., PLANELLES, G., CROWSON, MS., SHULL, GE.,
ROSSIER, BC., JAISSE, F. (1996)**

The rat distal colon P-ATPase α -subunit encodes a Quabain-sensitive H, K
– ATPase
J. Biol. Chem. **271**: 7277-80.

CRAVEN, PA. & DeRUBERTIS, FR. (1981)

Stimulation of rat colonic mucosal Prostaglandin synthesis by Calcium and
Carbamylcholine: Relationship to Alterations in cyclic Nucleotide
metabolism.
Prostaglandins **21** (1): 65-81.

CRAVEN, PA., SAITO, R., DeRUBERTIS, FR. (1983)

Role of local prostaglandin synthesis in the modulation of proliferative
activity of rat colonic epithelium.
J. Clin. Invest. **72** (4): 1365-75.

**CSUTORA, P., SU, ZC., KIM, HJ., BUGRIM, A., CUNNINGHAM, KW.,
NUCCITELLI, R., KEIZER, JE., HANLEY, MR., BLALOCK, JE.,
MARCHASE, RB. (1999)**

Ca²⁺ influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted
of organellar calcium stores.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 121-126.

DIAMOND, JM. & WRIGHT, EM. (1969)

Biological membranes: The physical basis of ion and nonelectrolyte
selectivity.
Ann. Rev. Physiol. **31**: 581-646.

DIENER M., MESTRES P., BRIDGES R.J., RUMMEL W. (1989)

Functional and morphological changes during electric field stimulation of
rat colon descendens.
In.: Nerves and the Gastrointestinal Tract. Hrsg.: Singer M.v., Goebell H.,
MTP Press, Lancaster, Boston, The Hague, Dordrecht, pp. 705-712.

DIENER, M., Egleme, C., RUMMEL W. (1991)

Phospholipase C-induced anion secretion and its interaction with carbachol
in the rat colonic mucosa.
Eur. J. Pharmacol. **200**: 267-276.

DIENER, M., HUG, F., STRABEL, D., SCHARRER, E. (1996)

Cyclic AMP-dependent regulation of K⁺ transport in the rat distal colon.
Brit. J. Pharmacol. **118**: 1477-1487.

DING, S. & SACHS, F. (1999)

Ion Permeation and Block of P2X₂ Purinoceptor: Single channel recordings.
J. Membrane Biol. **172**: 215-223.

DING, S. & SACHS, F. (2000)

Inactivation of P2X₂ Purinoceptors by divalent cations.
J. of Physiology **522** (2): 199-214.

DUDEL, J. (1995)

Grundlagen der Zellphysiologie.
In: Physiologie des Menschen. 26. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **1**: 3-19.

DUBINSKY, W.P., MAYORGA-WARK, O., SCHULTZ, S.G. (1999).

Volume regulatory response of basolateral membrane vesicles from Necturus enterocytes: Role of the cytoskeleton.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 9421-9426.

DUSZYK, M. (2001)

Regulation of anion secretion by nitric oxide in human airway epithel cells.
Am. J Physiol. **281**: L450-457.

DUVALL, MD., GUO, Y., MATALON, S. (1998)

Hydrogen peroxide inhibits cAMP-induced Cl⁻ secretion across epithelial cells.
Am. J. Physiol. **275**: C1313-1322.

ECKE, D., BLEICH, M., GREGER, R. (1996a)

The amiloride inhibitable Na⁺ conductance of rat colonic crypt cells is suppressed by forskolin.
Pflügers Archiv - Eur. J. Physiol. **431**: 984-86.

ECKE, D., BLEICH, M., GREGER, R. (1996b)

Crypt base cells show forskolin-induced Cl⁻ secretion but no cation inward conductance.
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **431** (3): 427-434.

EISENMAN, G. & HORN, R. (1983)

Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels.
J. Membrane Biol. **76**: 197-225.

FAVRE, CJ., UFRET-VINCENTY, CA., STONE, MR., MA, HT., GILL, DL. (1998)

Ca²⁺ Pool Emptying stimulates Ca²⁺ Entry activated by S-Nitrosylation.
J. Biol. Chemistry **273**: 30855-30858.

- FISCHER, KG., LEIPZIGER, J., RUBINI-ILLES, P., NITSCHKE, R., GREGER, R. (1996)**
Attenuation of stimulated Ca^{2+} influx in colonic epithelial (HT29) cells by cAMP.
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **432** (4): 735-40.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. & JORGENSEN, AO. (1994)**
Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle.
Ann. Rev. Physiol. **56**: 509-34.
- FRINGS, M., SCHULTHEISS, G., DIENER, M. (1999)**
Electrogenic Ca^{2+} entry in the rat colonic epithelium.
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **439**: 39-48.
- FRIZZELL, R.A., KOCH, M.J., SCHULZ, S.G. (1976)**
Ion transport by rabbit colon. I. Active and passive components.
J. of Membr. Biol. **27**: 297-316.
- FRIZZELL, R.A., FIELD, M.J., SCHULTZ, S.G. (1979)**
Sodium-coupled chloride transport by epithelial tissues.
Am.J. Physiol. **236**: F1-8.
- FULLER, C.M. & BENOS, D.J. (2000)**
 Ca^{2+} -activated Cl^- channels: A newly emerging anion transport family.
News Physiol. Sci. **15**: 165-171.
- GANONG, W.F. (1995)**
Digestion & Absorption and Regulation of Gastrointestinal Funktion.
In: Review of Medical Physiology. 17th edition. Prentice-Hall International (UK) Limited, London. **25-26**: 431-71.
- GERLACH, D. (1985)**
Das Lichtmikroskop.
2. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart: 199-208.
- GRANTHAM, C.J. & CANNELL, MB. (1996)**
 Ca^{2+} influx during the cardiac action potential in guinea pig ventricular myocytes.
Circ. Res. **79** (2): 194-200.
- GREGER, R., BLEICH, M., LEIPZIGER, J., ECKE, D., MALL, M., KUNZELMANN, K. (1997)**
Regulation of ion transport in colonic crypts.
NIPS **12**: 62-66.

GREGER, R. (2000)

Role of CFTR in the colon.
Annu. Rev. Physiol. **62**: 467-91.

GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., TSIEN, RY. (1985)

A new generation of Ca^{2+} -indicators with improved fluorescence properties.
J. Biol. Chem. **260**: 3440-50.

HALL, A.C., STARKS, I., SHOULTS, C.L., RASHIDBIGI, S. (1996)

Pathways for K^+ transport across the bovine articular chondrocyte membrane and their sensitivity to cell volume.
Am. J. Physiol. **270**: C1300-C1310.

HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., SIGWORTH, F.J. (1981)

Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.
Pflügers Archiv - Eur. J. Physiol. **391**: 85-100.

HILLE, B. (2001)

Ionic channels of excitable membranes (3.Aufl.).
Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts

HÖNICKA, M. & GERZER, R. (1997)

Lösliche Guanylylzyklasen: Schlüsselenzym zum therapeutischen Einsatz des Prinzips NO.
Internist **38**: 427-437.

HOFMANN, T., SCHAEFER, M., SCHULTZ, G., GUDERMANN, T. (2000)

Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry.
J. Mol. Med. **78**: 14-25.

HOLM, P., KANKAANRANTA, H., METSÄ- KETELÄ, T., MOILANEN, E. (1998)

Radical releasing properties of nitric oxide donors GEA 3162, SIN-1 and S-nitroso-N-acetylpenicillamine.
Eur. J. Pharmacol. **346**: 97-102.

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

Depletion of intracellular Ca^{2+} -stores activates a calcium current in mast cells.
Nature **355**: 353-356.

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

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

HORN, R., MARTY, A. (1988)

Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method.
J. Gen. Physiol. **92**: 145-159.

HUDSON, C.A., ROJAS, J.D., SARVAZYAN, N., WESSON, D.E., MARTINEZ-ZAGUILAN, R. (1998)

Interaction between benzylamiloride and fura-2: studies in vitro and cardiac myocytes.
Archives of Biochemistry and Biophysics **356**: 25-34.

HURST, RS., ZHU, X., BOULAY, G., BIRNBAUMER, L., STEFANI, E. (1998)

Ionic currents underlying HTRP3 mediated agonist-dependent Ca^{2+} influx in stably transfected HEK293 cells.
FEBS **422** (3): 333-338.

IRVINE RF. & MOOR, RM. (1986)

Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca^{2+} .
Biochem. J. **240**: 917-920.

IRVINE, RF. (1990)

"Quantal" Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates- a possible mechanism.
FEBS **263**: 5-9.

JAYARAMAN, T., ONDRIASOVA, E., ONDRIAS, K., HARNICK, DJ., MARKS, AR. (1995)

The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signalling.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **92**: 6007-6011.

JANMEY, P.A. (1998)

The cytoskeleton and cell signalling: component localization and mechanical coupling.
Physiol. Rev. **78**: (3) 763-781.

KACZOROWSKI, G.J., BARROS, F., DETHMERS, J.K., TRUMBLE, M.J. (1985).

Inhibition of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in pituitary plasma membrane vesicles by analogues of amiloride.
Biochemistry **24**: 1394-1403.

KANKAANRANTA, H., RYDELL, E., PETERSSON, AS., HOLM, P., MOILANEN, E., CORELL, T., KARUP, G., VUORINEN, P., PEDERSON, SB., WENNMALM, A., METSÄ- KETELÄ, T. (1996)

Nitric oxide donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives.

Brit. J. Pharmacol. **117**: 401-406.

KARUP, G., PREIKSCHAT, H., WILHELMSSEN, ES., PEDERSEN, SB., MARCINKIEWICZ, E., CIESLIK, K., GRYGLEWSKI, RJ. (1994)

Mesoionic oxatriazole derivatives: a new group of NO-donors.

Pol. J. Pharmacol. **47**: 541-552.

KAWAHARA, K., OGAWA, A., SUZUKI, M. (1991)

Hypotonic activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cultured rabbit kidney proximal tubule cells.

Am. J. of Physiol. **260**: F27-F33.

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

Ca^{2+} -influx induced by store release and cytosolic Ca^{2+} chelation in HT29 colonic carcinoma cells.

Pflügers Arch.-Europ. J. Physiol. **430**: 653-665.

KERSTAN, D., GORDJANI, N., NITSCHKE, R., GREGER, R., LEIPZIGER, J. (1998)

Luminal ATP induces K^{+} -secretion via P2Y_2 receptor in rat distal colonic mucosa.

Pflügers Arch.- Europ. J. Physiol. **436**: 712-716.

KIDD, JF. & THORN, P. (2000)

Intracellular Ca^{2+} and Cl^{-} channel activation in secretory cells.

Ann. Rev. Physiol. **62**: 493-513.

KISELYOV, K., XU, X., MOZHAYEVA, G., KUO, T., PESSAH, I., MIGNERY, G., ZHU, X., BIRNBAUMER, L., MUALLEM, S. (1998)

Functional interaction between InsP_3 receptors and store-operated HTRP_3 channels.

Nature **396**: 478-482.

LAGNADO, L. & McNAUGHTON, PA. (1990)

Electrogenic properties of the $\text{Na}^{+}:\text{Ca}^{2+}$ exchange.

J. Membr. Biol. **113** (3): 177-91.

LANG, F., BUSCH, G.L., RITTER, M., VÖLKL, H., WALDEGGER, S., GULBINS, E., HÄUSSINGER, D. (1998)

Functional significance of cell volume regulatory mechanisms.
Physiological Reviews **78**: 247-306.

LEIPZIGER, J., FISCHER, KG., GREGER, R. (1994)

Voltage-dependent Ca^{2+} -influx in the epithelial cell line HT29:
simultaneous use of intracellular Ca^{2+} -measurements and nystatin
perforated patch-clamp technique.
Pflügers Arch.-Europ.J. Physiol. **426**: 427-432.

LEVESQUE, PC., LEBLANC, N., HUME, JR. (1994)

Release of calcium from guinea pig cardiac sarcoplasmic reticulum induced
by sodium-calcium exchange.
Cardiovasc. Res. **28** (3): 370-8.

LINDSTRÖM, CG., ROSENGREN, JE. , FORK, FT. (1979)

Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation.
Acta Radiol. Diagn. **20**: 523-536.

LINDQVIST, SM., SHARP, P., JOHNSON, IT., SATOH, Y., WILLIAMS, MR. (1998)

Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis.
Gastroenterology **115**: 1131-1143.

LIPKIN, M. (1985)

Growth and development of gastrointestinal cells.
Ann. Rev. Physiol. **47**: 175-197.

LOHRMANN, E. & GREGER, R. (1993)

Isolated perfused rabbit colon crypts: stimulation of Cl^- secretion by
forskolin.
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **425** (5-6): 373-80.

LUCAS, KA., PITARI, GM., KAZEROUNIAN, S., RUIZ-STEWART, I., PARK, J., SCHULZ, S., CHEPENIK, KP., WALDMAN, SA. (2000)

Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP.
Pharmacol. Rev. **52** (3): 375-414.

MA, HT., FAVRE, CJ., PATTERSON, RL., STONE, MR, GILL, DL. (1999)

Ca^{2+} Entry activated by S-Nitrosylation.
J. Biol. Chemistry **274**: 35318-35324.

- MA, HT., PATTERSON, RL., VAN ROSSUM, DB., BIRNBAUMER, L., MIKOSHIBA, K., GILL, DL. (2000)**
Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca^{2+} channels.
Science **287**: 1647-1651.
- MA, HT., VENKATACHALAM, K., LI, HS., MONTELL, C., KUROSAKI, T., PATTERSON, RL., GILL, DL. (2001)**
Assessment of the Role of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in the Activation of Transient Receptor Potential Channels and Store-operated Ca^{2+} Entry Channels.
The J. of Biolog. Chemistry **276** (22): 18888-18896.
- MALL, M., BLEICH, M., KUEHR, J., BRANDIS, M., GREGER, R., KUNZELMANN, K. (1999)**
CFTR-mediated inhibition of epithelial Na^{+} -conductance in human colon is defective in cystic fibrosis.
Am. J. Physiol. **277** (40): G 709-716.
- MALO-RANTA, U., YLÄ-HERTTUALA, S., METSÄ-KETELÄ, T., JAAKKOLA, O., MOILANEN, E., VUORINEN, P., NIKKARI, T. (1994)**
Nitric oxide donor GEA 3162 inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein.
FEBS Lett. **337**: 179-183.
- MARKERT, T., VAANDRAGER, A.B., GAMBARYAN, S., POHLER, D., HAUSER, C. (1999)**
Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestinae. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.
J.Clin. Invest. **96**: 822-30.
- McCARTY, NA. & O'NEIL, RG. (1992)**
Calcium signalling in cell volume regulation.
Physiol. Rev. **72**: 1037-1061.
- MONTERO, M., ALVAREZ, J., SCHEENEN, WJJ., RIZZUTO, R., MELDOLESI, J., POZZAN, T. (1997)**
 Ca^{2+} Homeostasis in the Endoplasmatic Reticulum: Coexistence of High and Low $[\text{Ca}^{2+}]$ Subcompartments in intact HeLa cells.
The J. of Cell Biology **139** (3): 601-611.
- MOURAD, FH., TURVILL, JL., FARTHING, MJG. (1999)**
Role of nitric oxide in intestinal water and electrolyte transport.
Gut **44**: 143-147.

MUALLEM, S. & LEE, MG. (1997)

High $[Ca^{2+}]_i$ domains, secretory granules and exocytosis.
Cell Calcium **22** (1): 1-4.

MÜLSCH, A., LÜCKHOFF, A., POHL, U., BUSSE, R., BASSENGE, E. (1989)

LY 835838 (6-anilino-5,8-quinolinedione) blocks nitrovasodilator-induced cyclic GMP increases and inhibition of platelet activation.
Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. **340**: 119-125.

NIEMEYER, MI., HOUGAARD, C., HOFFMANN, EK., JORGENSEN, F., STUTZIN, A., SEPULVEDA, FV. (2000)

Characterisation of a cell swelling-activated K^+ -selective conductance of ehrlich mouse ascites tumour cells.
J. Physiol. **524** (3): 757-767.

NIELSEN, MS., WARTH, R., BLEICH, M., WEYAND, B., GREGER, R. (1998)

The basolateral Ca^{2+} -dependent K^+ channel in rat colonic crypt cells.
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **435** (2): 267-272 .

NIGGLI, E. & LEDERER, WJ. (1991)

Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents.
Nature **349**: 621-4.

NOBLES, M., DIENER, M., MESTRES, P., RUMMEL, W. (1991)

Segmental heterogeneity of the rat colon in the response to activators of secretion on the cAMP-, the cGMP-, and the Ca^{2+} -pathway.
Acta Physiol. Scand. **142**: 375-386.

OGAWA, Y., KUREBAYASHI, N., MURAYAMA, T. (2000)

Putative roles of type 3 ryanodine receptor isoforms (RyR3)
Trends Cardiovasc. Med. **10** (2): 65-70.

ORDWAY, RW., PETROU, S., KIRBER, MT., WALSH, JV, SINGER, JJ. (1992)

Two distinct mechanisms of ion channel activation by membrane stretch: evidence that endogenous fatty acids mediate stretch activation of K^+ channels.
Biophys. J. **61**: A391

OZAWA, T. (2001)

Ryanodine-sensitive Ca release mechanism in non-excitabile cells.
Int. J. of Mol. Medicine **7**: 21-25

PALMER, RM., ASHTON, DS., MONCADA, S. (1988)

Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.
Nature **333**: 664-666.

PANDOL, SJ. & SCHOEFFIELD-PAYNE, MS. (1990)

Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell.
J. Biol. Chemistry **265** (22): 12846-53.

PAREKH, AB. & PENNER, R. (1997)

Store depletion and calcium influx.
Physiological Reviews **77**: 901-930.

PAREKH, AB., TERLAU, H., STÜHMER, W. (1993)

Depletion of InsP3 stores activates a Ca^{2+} and K^{+} current by means of a phosphatase and a diffusible messenger.
Nature **364**: 814-818.

PARSON, DS. & PATERSON CR. (1965)

Fluid and solute transport across rat colonic mucosa.
Quarterly Journal of Experimental Physiology **50**: 220-231.

PETERSEN, CCH. & BERRIDGE J. (1996)

Capacitative calcium entry is colocalised with calcium release in *Xenopus* oocytes: evidence against a highly diffusible calcium influx factor.
Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol. **432**: 286-292.

**PHILIPP, S., HAMBRECHT, J., BRASLAVSKI, L., SCHROTH, G.,
FREICHEL, M., MURAKAMI, M., CAVALIE, A., FLOCKERZI, V. (1998)**

A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells.
The EMBO J. **17** (15): 4274-4282.

PHILIPSON, KD. & NICOLL, DA. (2000)

Sodium-calcium exchange: a molecular perspective.
Annu. Rev. Physiol. **62**: 111-33.

PUTNEY, JW. (1997)

Capacitative Calcium Entry.
Springer Verlag, Heidelberg

**PUTNEY, JW., BROAD, LM., BRAUN, F-J., LIEVREMONT, J-P., BIRD,
GSJ. (2001)**

Mechanisms of capacitative calcium entry.
J. of Cell Science **114**: 2223-2229.

RANDRIAMAMPITA, C., TSIEN, RY. (1993)

Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx.
Nature **364**: 809-814.

RIBEIRO, R., HEINKE, B., DIENER, M. (2001)

Cell volume-induced changes in K^+ transport across the rat colon.
Acta Physiol. Scand. **171** (4): 445-58.

SALVEMINI, D., SETTLE, SL., MASFERRER, JL., SEIBERT, K., CURRIE, MG., NEEDLEMAN, P. (1995)

Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis.
Br. J. Pharmacol. **114** (6): 1171-1178.

SCHEFFLER, A. (1984)

Charakterisierung der Wirkung von Pharmaka auf die elektrophysiologischen Parameter gastrointestinaler Epithelgewebe mit einer Mikrocomputer gesteuerten Strom und Spannungsklemmeinrichtung.
Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin. Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, pp 24-40.

SCHIRGI-DEGEN, A. & BEUBLER, E. (1998)

Proabsorptive Properties of Nitric Oxide.
Digestion **59**: 400-403.

SCHULTHEISS, G., DIENER, M. (1998)

K^+ and Cl^- conductances in the distal colon of rat.
Gen. Pharmac. **31** (3): 337-342.

SIEMER, C., GÖGELEIN, H. (1993)

Effects of forskolin on crypt cells of rat distal colon. Activation of nonselective cation channels in the crypt base and of a chloride conductance pathway in other parts of the crypt.
Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **424** (3-4): 321-8.

SINGH, SK., BINDER, HJ., BORON, WF., GEIBEL, JP. (1995)

Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts.
J.Clin.Invest. **96**: 2373-2379.

SOBOTTA, J. & BECHER, H. (1972)

Verdauungsapparat.
In: Atlas der Anatomie des Menschen. Hrsg.: H. Ferner, J. Staubesand. 17. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien. Band 2 – 61-143.

SOKABE, M., SACHS, F., JING, Z. (1991)

Quantitative video microscopy of patch clamped membranes: stress, strain, capacitance and stretch channel activation.

Biophys. J. **59**: 722-728.

SOMASUNDARAM, B., NORMAN, JC., MAHAUT-SMITH, MP. (1995)

Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes.

Biochem. J. **309**: 725-729.

SORRENTINO, V. (1996)

The ryanodine receptor family of intracellular calcium release channels.

Adv. Pharmacol. **33**: 67-90.

STACK, WA., FILIPOWICZ, B., HAWKEY, CJ. (1996)

Nitric oxide donating compounds stimulate human colonic ion transport in vitro.

Gut **39**: 93-99.

STARKE, F. (2001)

Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme.

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (8.Auflage).

Herausgeber: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U.,

Starke, K.; Urban&Fischer Verlag, München Jena.

STRABEL D. & DIENER M. (1995)

Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon.

Eur. J. Pharmacol. **247**: 181-191.

SUH-KIM, H., WEI, X., KLOS, A., PAN, S., RUTH, P., FLOCKERZI, V., HOFMANN, I., REYES, E., BIRNBAUMER, L. (1996)

Reconstitution of the skeletal muscle dihydropyridine receptor: Functional interaction among alpha 1, beta, gamma and alpha-2-delta subunits.

Receptor channels **4** (4): 217-25.

TAMAI, H. & GAGINELLA, TS. (1993)

Direct evidence for nitric oxide stimulation of electrolyte secretion in the rat colon.

Free. Radic. Res. Commun. **19** (4): 229-39.

TREPAKOVA, ES., CSUTORA, P., HUNTON, DL., MARCHASE, RB., COHEN, RA., BOLOTINA, VM. (2000)

Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells.

The J. of Biol. Chemistry **275** (34): 26158-26163.

TREPAKOVA, ES., GERICKE, M., HIRAKAWA, Y., WEISBROD, RM., COHEN, RA., BOLOTINA, VM. (2001)

Properties of a Native Cation Channel activated by Ca^{2+} store depletion in Vascular Smooth Muscle cells.

The J. of Biol. Chemistry **276** (11): 7782-7790.

USSING, HH., ZEHRAN, K. (1951)

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. **23**: 110-127.

VAANDRAGER, AB., BOT, AGM., RUTH, P., PFEIFER, A., HOFMANN, F., DE JONGE, .R. (2000)

Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon.

Gastroenterology **118**: 108-114.

VAN ROSSUM, DB., PATTERSON, RL., MA, HT., GILL, DL. (2000)

Ca^{2+} Entry mediated by store depletion, S-Nitrosylation and TRP3 channels.

J. Biol. Chemistry **275**: 28562-28568.

VIANA, F., DE LA PENA, E., PECSON, B., SCHMIDT, RF., BELMONTE, C. (2001)

Swelling-activated calcium signalling in cultured mouse primary sensory neurons.

Eur. J. Neurosci. **13** (4): 722-734.

WANG, HZ. & VEENSTRA, RD. (1997)

Monovalent ion selectivity sequences of the rat Connexin 43 gap junction channel.

J. Gen. Physiol. **109**: 491-507.

WARTH, R., HAMM, K., BLEICH, M., KUNZELMANN, K., VON HAHN, T., SCHREIBER, R., ULLRICH, E., MENGEL, M., TRAUTMANN, N., KINDLE, P., SCHWAB, A., GREGER, R. (1999)

Molecular and functional characterization of the small Ca^{2+} - regulated K^{+} channel (rSK4) of colonic crypts

Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. **438**: 437-444.

WASSERSTROM, JA. & VITES, AM. (1996)

The role of Na^{+} - Ca^{2+} exchange in activation of excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes.

J. Physiol. **493** (2): 529-42.

- WATSON, EL., JACOBSON, KL., SINGH, JC., OTT, SM. (1999)**
Nitric oxide acts independently of cGMP to modulate capacitative Ca^{2+} entry in mouse parotid acini.
Am. J. Physiol. **277**: C262-270.
- WELSH, M.J., SMITH, P.L., FROMM, M., FRIZELL, R.A. (1982)**
Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion.
Science **218**: 1219-1221.
- WILSON, K.T., XIE, Y., MUSCH, M.W., CHANG, E.B. (1993)**
Sodium nitroprusside stimulates anion secretion and inhibits sodium chloride absorption in rat colon.
Pharmacol. Exp. Ther. **266**: 224-230.
- WILSON, KT., VAANDRAGER, AB., DE VENTE, J., MUSCH, MW., DE JONGE, HR., CHANG, EB. (1996)**
Production and localization of cGMP and PGE_2 in nitroprusside stimulated rat colonic ion transport.
Am. J. Physiol. **270**: C832-840.
- XU, X., STAR, RA. TORTORICI, G., MUALLEM, S. (1994)**
Depletion of Intracellular Ca^{2+} stores activates Nitric-oxide Synthase to generate cGMP and regulate Ca^{2+} Influx.
The J. of Biol. Chemistry **269** (17): 12645-12653.
- YAO, Y., FERRER-MONTIEL, AM., MONTAL, M., TSIEN, RY. (1999)**
Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger.
Cell **98**: 475-485.
- YOSHIHASHI, K., SHIBUYA, I., KANNO, T. (1996)**
Contribution of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in maintaining $[\text{Ca}^{2+}]_c$ at a stable state in rat pancreatic islets.
Jpn. J. Physiol. **46** (6): 473-80.
- ZHU, X., JIANG, M., PEYTON, M., BOULAY, G., HURST, R., STEFANI, E., BIRNBAUMER, L. (1996)**
Trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry.
Cell **85**: 661-671.
- ZHU, X., JIANG, M., BIRNBAUMER, L. (1998)**
Receptor-activated Ca^{2+} influx via human TRP3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells.
J. Biol. Chemistry **273**: 133-142.

VIII Danksagung

Einen herzlichen Dank an alle, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle sei *Herrn Prof. Dr. Martin Diener* gedankt für die Überlassung des Themas, die rasche, freundliche Bearbeitung von Fragen und Problemen, die während dieser Arbeit aufkamen und für seinen Enthusiasmus für die Physiologie, der begeisterte und motivierte.

Danke an *Herrn Dr. Gerhard Schultheiß*, der mich in jeder Phase dieser Doktorarbeit mit seinem „realistischen Optimismus“ hervorragend unterstützte und mir unermüdlich alle Fachfragen beantwortete,

an *Dr. Monika Frings* und *Dr. Guido Haschke* für die lebenswürdige Hilfestellung zu Beginn des Versuchsabschnitts,

an *Sarah Kocks* für die Diskussionsbeiträge und das ausdauernde Korrekturlesen,

an *Brigitta Brück*, *Eva Haas*, *Alice Metternich*, *Jolanta Murgott* und *Bärbel Schmidt*, die mir im Labor tatkräftig zur Seite standen und ohne deren Hilfe die Geschirrspülmaschine heute noch einiges aufzuarbeiten hätte,

an *Michael Haas* und *Silke Handstein* für die gewissenhafte Pflege der Versuchstiere und an *Karl-Hermann Maurer* für die lebenswürdige Hilfsbereitschaft im Lösen technischer Probleme,

Danksagung

an *alle Mitarbeiter des Instituts für Veterinär-Physiologie* für die angenehme und humorvolle Arbeitsatmosphäre, die diese Zeit für mich unvergesslich machen wird,

an *meine Eltern*, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer liebevoll unterstützt haben

und an *Richard*, der mir mit seiner Geduld und Liebe die Kraft gegeben hat die häufigen Trennungen voneinander zu bestehen.