

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

Regulation des Calcium-Signalwegs an einem sekretorischen Epithel

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

eingereicht von

Sarah Lán Kocks

Gießen 2003



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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

1. Auflage 2003

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

1st Edition 2003

© 2003 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

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

**Regulation des Calcium-Signalwegs an einem
sekretorischen Epithel**

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

Eingereicht von

Sarah Lán Kocks

Tierärztin aus
Mülheim a.d. Ruhr

Gießen 2003

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

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Scheiner-Bobis

Tag der Disputation: 24. April 2003

	Abkürzungen	1
I	Einleitung	3
1	Das Kolon – Aufbau und Funktion	3
2	Membranärer Transport	5
2.1	Transportprozesse am Kolonepithel	6
2.2	Second messenger „übersetzen“ extrazelluläre Signale	8
3	Calcium als intrazellulärer Botenstoff	10
4	Ca ²⁺ -Kanäle an erregbaren Strukturen	12
4.1	Intrazelluläre Organellen als Ca ²⁺ -Speicher	14
5	Der Ryanodinrezeptor	15
6	Ca ²⁺ -Rekrutierung an nicht erregbaren Geweben	17
7	Der Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher	19
8	Eigene Fragestellung	21
II	Material und Methoden	23
1	Versuchstiere	23
2	Elektrolytlösungen	23
2.1	Lösungen für die Präparation	23
2.2	Lösungen für die Imaging-Messungen	24
2.3	Lösungen für die Ussingkammer-Messungen	25
2.4	Lösungen für die Gelelektrophorese	25
3	Chemikalien	26
4	Oligonukleotide (Primer)	26
5	Enzyme und Nukleotide für PCR und rtPCR	27
6	Software	27
7	Gewebepräparation	28
7.1	Präparation der Darmschleimhaut	28
7.2	Präparation der isolierten Krypten	28
8	Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration mittels Fura-2	29

Inhaltsverzeichnis

8.1	Ca ²⁺ -Messungen an permeabilisierten Krypten	34
8.2	Mangan-Quench	34
8.3	Der Imaging-Messstand	35
9	Ussingkammer-Technik	39
9.1	Die Messkammer	39
9.2	Elektrophysiologisches Messprinzip	40
9.3	Datenerfassung und Versuchsablauf	43
10	Polymerasekettenreaktion	44
10.1	Isolation von Gesamt-RNA und mRNA	45
10.2	Qualitätsanalyse der RNA	46
10.3	Bestimmung von Menge und Reinheit der Gesamt-RNA	46
10.4	cDNA-Synthese	47
10.5	Polymerasekettenreaktion	48
10.6	Gelelektrophorese	49
11	Statistik	49
III	Ergebnisse	51
1	Beeinflussung des Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauschers durch Entleerung intrazellulärer Ca ²⁺ -Speicher	51
2	Einfluss von Ryanodin auf den intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegel	59
3	Wirkung der Ryanodinrezeptor-Blockade auf den intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegel	63
4	Einfluss von Koffein auf den intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegel	64
5	Wirkung des physiologischen Ryanodinrezeptor Agonisten cADP-Ribose	65
6	Beteiligung des Ryanodinrezeptors an der Ca ²⁺ -abhängigen Cl ⁻ -Sekretion am intakten Kolonepithel	68
7	Molekularbiologischer Nachweis des Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauschers	73
IV	Diskussion	75
1	Der Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher	76
1.1	Molekularbiologischer Nachweis des Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauschers	76

Inhaltsverzeichnis

1.2	Regulation des Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauschers	77
1.3	Nachweis einer positiven Rückkopplung zur Verstärkung des Ca ²⁺ - Signals	78
2	Intrazelluläre Ca ²⁺ -Speicher und Kanäle	80
3	Funktioneller Nachweis eines Ryanodinrezeptors am Kolonepithel der Ratte	81
3.2	Der Ryanodinrezeptor des Kolonepithels der Ratte: Ein Subtyp-2- Rezeptor?	86
3.3	CICR verstärkt die Antwort des Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauschers im Influx-Modus	87
3.4	Physiologische Bedeutung des Ryanodinrezeptors am Kolonepithel	87
4	Der Ryanodinrezeptor – ein Werkzeug zur Regulation der Ca ²⁺ - Homöostase am Kolonepithel?	90
V	Zusammenfassung	92
VI	Summary	94
VII	Literaturverzeichnis	96

Abkürzungen

AM	Acetoxymethylester
ADP/cADP	Adenosindiphosphat/ zyklisches (cyclic) Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BHQ	2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinon
BLAST	Basic Local Alignment Tool
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP/ cGMP	zyklisches (cyclic) 3',5'-Adenosin/Guanosin-Monophosphat
$[Ca^{2+}]_i$	intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
CICR	Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (engl: Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release)
CPA	Cyclopiazonsäure (engl.: Cyclopiazonic acid)
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/cDNA	Deoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid/complementary deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
G_T	transepitheliale Leitfähigkeit [S]
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)

Einleitung

IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
I _{sc}	Kurzschlussstrom
K _D	Dissoziationskonstante
MOPS	3-[N-morpholino]propansulfonsäure
ms	Millisekunden
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAADP	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCBI	National Center for Biotechnological Information
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher (engl.: exchanger)
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
NSKK	nicht-selektiven Kationen-Kanal
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PD	Potentialdifferenz
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
RNA/mRNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid/messenger ribonucleic acid)
RyR	Ryanodin Rezeptor
SEM	standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	sarkoplasmatische-endoplasmatische-Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SOC	speichergesteuerter Kanal (engl.: store operated channel)
TAE	Trisacetat
T _m	Schmelztemperatur (engl.: melting temperature)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin

I Einleitung

1 Das Kolon – Aufbau und Funktion

Für den Erhalt des Lebens ist die Zufuhr von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser zwingend notwendig. Der Gastrointestinaltrakt ist in diesem Zusammenhang das bedeutendste Organ, wobei der Dickdarm, neben dem bakteriellen Aufschluss unverdaulicher Kohlenhydrate, maßgeblich am Wasser- und Elektrolythaushalt beteiligt ist. Er stellt den letzten Abschnitt des Gastrointestinaltraktes dar. An der Iliozäkalklappe mündet der Dünndarm seitlich in den Dickdarm. Durch diese seitliche Einmündung bildet sich ein blindes Dickdarmende, das Zäkum. Der verbleibende Hauptanteil des Dickdarmes wird als Kolon bezeichnet und geht in den Enddarm (Rektum) über, der ebenfalls zum Dickdarm gezählt wird. Ist der Chymus (Nahrungsbrei) in den Dickdarm gelangt, ist die enzymatische Verdauung weitestgehend abgeschlossen. Die Wirkung der intestinalen bzw. pankreatischen Dünndarmsekrete nimmt kontinuierlich ab. Die weitere Verdauung wird von Darmbakterien und Protozoen übernommen, die in der Lage sind, Proteine und Kohlenhydrate zu spalten. Die wesentliche Funktion der Dickdarmschleimhaut ist die Resorption bzw. Sekretion von Wasser und Elektrolyten zur Konstanthaltung des inneren Milieus.

Der Aufbau der Dickdarmwand entspricht grundsätzlich dem eines häutig-muskulären Schlauches (s. Abb. I 1). Seine Mukosa besitzt im Gegensatz zum Dünndarm keine Zotten, sondern ausschließlich in die Tiefe reichende Krypten (Glandulae intestinales; s. Abb. II 1). Das Kryptenepithel ist aus unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzt. Der überwiegende Teil der Krypte wird aus *Enterozyten* gebildet. Sie sind sowohl für die Resorption als auch für die Sekretion von Elektrolyten und Wasser zuständig. Die *Becherzellen* produzieren Schleim. Die Gruppe der *enteroendokrinen Zellen* ist sehr heterogen, je nach Zelltyp können sie Somatostatin, Serotonin und Glukagon u.a. sezernieren (Übersicht bei Christensen

1991). Die am Kryptenfundus gelegenen *Stammzellen* teilen sich und wandern nach und nach an die Oberfläche. Im Verlauf dieser Migration differenzieren sie sich in die oben genannten Zelltypen und reifen aus (Lipkin 1985).

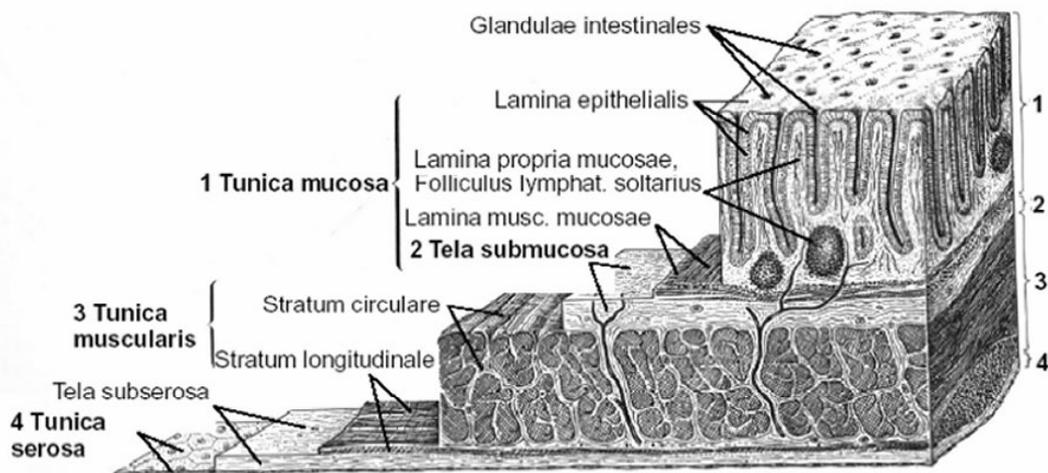


Abb. I 1: Schematische Darstellung der Kolon-Wand, Lupenvergrößerung (nach Sobotta & Becher 1972).

Über 90 % der Flüssigkeit, die aus dem Dünndarm in das Kolon gelangen, werden dort resorbiert. Liegen keine krankhaften Veränderungen vor, muss das Kolon des Menschen ca. 2 Liter pro Tag resorbieren. Steigt der ileozäkale Flüssigkeitsübertritt auf Grund einer Dünndarmerkrankung, ist das Kolon in der Lage, überschüssige Flüssigkeit (bis zu 6 Litern) zu resorbieren. Wird diese Grenze überschritten, kommt es zu einer klinisch manifesten Diarrhoe (Binder et al. 1991; Binder & Sandle 1994). Daneben besitzt das Kolon die Fähigkeit zur Sekretion, die hier sezernierte Flüssigkeit ist plasmatisot, Muzin-, HCO_3^- - und K^+ -reich.

Die ursprüngliche Vorstellung, dass Resorption und Sekretion am Kolonepithel räumlich getrennt seien, wobei die Sekretion an den Kryptenzellen und die Resorption

am Oberflächenepithel stattfinden sollte (Welsh et al. 1982), ist inzwischen widerlegt worden. Heute weiß man, dass die Funktion der verschiedenen Zellen nicht klar getrennt ist (Singh et al. 1995; Binder et al. 1997). Allerdings zeigt die Epithelzelle im Verlauf ihrer Entwicklung eine Veränderung bezüglich der Fähigkeit zu resorbieren bzw. zu sezernieren. Eine undifferenzierte Zelle des Kryptenfundus hat vor allem die Fähigkeit, NaCl zu sezernieren, wobei Cl^- transepithelial und Na^+ parazellulär in das Darmlumen gelangt. Im Laufe der Zellentwicklung verstärkt sich allerdings die Fähigkeit zu resorbieren, wobei aber gleichzeitig noch eine Sekretion möglich ist (Greger et al. 1997). Durch verschiedene second messenger ist die Zelle in der Lage, zwischen den beiden Transportrichtungen umzuschalten.

2 Membranärer Transport

Das Darmepithel grenzt den Körper von der Außenwelt, in diesem Fall dem Darmlumen, ab. Neben seiner Schutz- und Barrierefunktion ist das Darmepithel auch für einen kontrollierten Stoffaustausch zwischen dem Binnengewebe und der Außenwelt verantwortlich.

Der Stofftransport findet über die Plasmamembran statt. Die einfachste Form des Transportes, die Diffusion, ist nur für lipidlösliche oder kleinere ungeladene Moleküle, wie z.B. Harnstoff, H_2O , CO_2 oder O_2 möglich. Kanal- und Transportproteine, die in die Zellmembran integriert sind, ermöglichen auch einem breiteren Molekülspektrum den Übertritt von der einen auf die andere Epithelseite.

Kanalproteine besitzen eine wassergefüllte Pore, über die Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten diffundieren können. Aufgrund von Festladungen oder Bindungsstellen an der Kanalinnenseite zeigen die Ionenkanäle eine mehr oder weniger hohe Selektivität (Dudel 1995). Transporter- oder Carrierproteine binden hingegen das zu transportierende Molekül spezifisch. Durch eine Konformationsänderung des Carriers kommt es zu einer Translokation des zu transportierenden Moleküls. Die Transportmoleküle können durch direkten

Energieverbrauch angetrieben werden, um Moleküle entgegen eines Gradienten, also „bergauf“, zu transportieren. Das klassische Beispiel für einen solchen primär aktiven Transport ist die Na^+/K^+ -ATPase, die unter ATP Spaltung 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle und 2 K^+ -Ionen in die Zelle transportiert. Durch diesen aktiven Prozess kann das Membranpotential aufrechterhalten werden und die Zelle ist dadurch in der Lage, Energie zu speichern. Gleichzeitig dient er zum Antrieb vieler weiterer aktiver Prozesse (= sekundär aktiver Transport), die den Na^+ -Gradienten nutzen, um ein anderes Substrat entgegen seines Konzentrationsgradienten zu transportieren.

2.1 Transportprozesse am Kolonepithel

Am distalen Kolon werden Na^+ , K^+ sowie Cl^- resorbiert. Eine Sekretion von Cl^- und K^+ wird ebenfalls an diesem Darmabschnitt beobachtet (Übersicht bei Binder & Sandle 1994).

NaCl wird normalerweise elektroneutral resorbiert. Ein apikaler Na^+/H^+ -Antiporter und ein ebenfalls apikal gelegener $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter arbeiten dazu parallel. Das auf diesem Wege in die Zelle aufgenommene Na^+ wird auf der basolateralen Seite über die Na^+/K^+ -ATPase ausgeschleust. Chlorid verlässt die Zelle über basolaterale Cl^- -Kanäle (Diener et al. 1992; Catalan et al. 2002). Daneben wird auch eine Na^+ -Resorption über epitheliale Na^+ -Kanäle (= ENaC; Barbry & Hofman 1997) beschrieben.

K^+ wird über einen primär aktiven Mechanismus unter ATP-Verbrauch - über eine H^+/K^+ -ATPase - aus dem Darmlumen aufgenommen (Cougnon et al. 1996).

Im Rahmen der Wasser- und Elektrolytsekretion im distalen Kolon spielt die Cl^- -Sekretion eine herausragende Rolle, sowohl unter physiologischen Bedingungen, wie z.B. bei einer mechanischen Dehnung des Darms (Diener & Rummel 1990), als auch innerhalb von pathophysiologischen Vorgängen, wie der sekretorischen Diarrhoe (Field & Semrad 1993; Schultheiss & Diener 1998). Chlorid tritt über einen basolateral gelegenen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter, einen sekundär aktiven Transporter,

der durch den Na^+ -Gradienten energetisiert wird, in die Zelle ein. Eine apikale Cl^- -Leitfähigkeit ist für den Übertritt der Cl^- -Ionen in das Darmlumen verantwortlich; hier dient das Membranpotential und nicht der Konzentrationsunterschied als Triebkraft für den Cl^- -Austritt, da die intrazelluläre Cl^- -Konzentration niedriger ist als die extrazelluläre. Diese apikale Leitfähigkeit wird durch cAMP geöffnet. Eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt nur auf indirektem Wege zu einer Erhöhung der Cl^- -Sekretion (s.u.). Aus Gründen des Ladungsausgleichs kommt es - parallel zur Cl^- -Sekretion - zu einem parazellulären Na^+ -Fluss. Wasser folgt, ebenfalls parazellulär, zum Ausgleich des osmotischen Gradienten (Barrett & Keely 2000). Bei der apikalen Cl^- -Leitfähigkeit handelt es sich um einen CFTR-Kanal (CFTR = cystic fibrosis transmembrane regulator; Strabel & Diener 1995; Barrett & Keely 2000); Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle werden ebenfalls am Darmepithel vermutet (Barrett & Keely 2000). Neben den apikalen Cl^- -Kanälen befinden sich weitere in der basolateralen Membran der Enterozyten. Diese Cl^- -Kanäle sind an der Volumenregulation beteiligt (Diener et al. 1992).

Der oben erwähnte $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Kotransporter ist nicht nur für die Bereitstellung von Cl^- -Ionen zur Sekretion verantwortlich, sondern stellt auch K^+ -Ionen zur Sekretion bereit. Über apikal gelegene K^+ -Kanäle, die durch eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels stimuliert werden, kann K^+ in das Darmlumen übertreten (Binder & Sandle 1994; Kerstan et al. 1998; Schultheiss & Diener 1998). Diese K^+ -Kanäle kommen ebenfalls an der basolateralen Membran vor. Nach einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, zum Beispiel durch Stimulation muskarinerge M_3 -Rezeptoren durch den Neurotransmitter Acetylcholin, strömt K^+ über diese Kanäle entlang seines Konzentrationsgradienten aus der Zelle aus, was zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt (Bleich et al. 1996). Durch die Hyperpolarisation wird die Triebkraft für eine Cl^- -Sekretion erhöht. Über die apikalen Cl^- -Kanäle, die durch cAMP prästimuliert wurden, tritt Cl^- aus. Eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} führt somit auf indirektem Weg zur Cl^- -Sekretion (Schultheiss & Diener 1998).

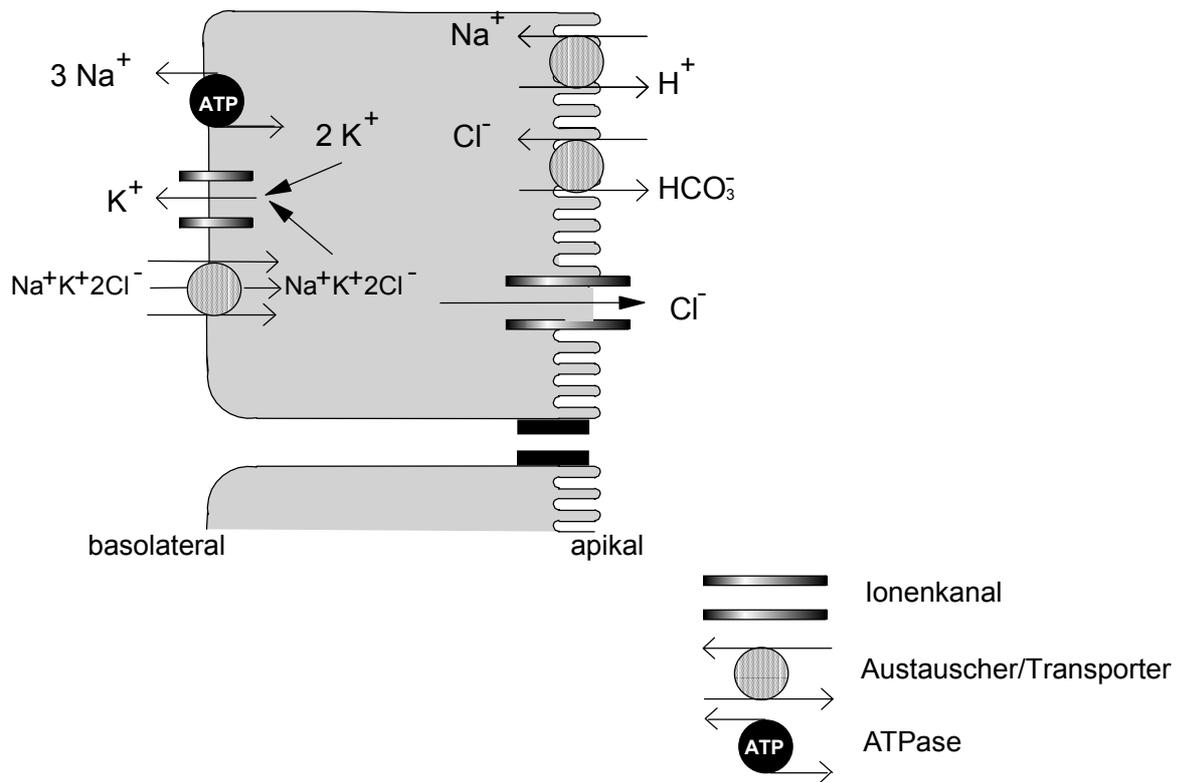


Abb. I 2: Wichtige Transportproteine am Kolonepithel (weitere Transportproteine s. Text). Die Resorption von NaCl findet am distalen Rattenkolon überwiegend elektroneutral über die parallel geschalteten Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher statt. Durch die Na^+/K^+ -ATPase wird ein Na^+ -Gradient aufgebaut, der für die Energetisierung anderer Transportprozesse wichtig ist. Auf der basolateralen Seite ist ein $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter für die Bereitstellung der Ionen zur Sekretion verantwortlich. Chlorid wird über apikal lokalisierte Cl^- -Kanäle sezerniert.

2.2 Second messenger „übersetzen“ extrazelluläre Signale

Extrazelluläre Signale führen im Kolon durch die Vermittlung intrazellulärer Botenstoffe zu einer Sekretion von NaCl und Wasser. Typische Sekretagoga sind Neurotransmitter, wie z.B. Acetylcholin (Tapper et al. 1978; O'Malley et al. 1995; Lindqvist et al. 1998), das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP; Binder et al. 1997), immunologische Faktoren, wie z.B. Histamin (Barrett & Keely 2000) oder parakrine Substanzen (Prostaglandine, Guanylin; Barrett & Keely 2000). Auch pathophysiologisch bedeutsame Faktoren, wie das hitzestabile Escherichia coli-Toxin

und das Choleratoxin können im Kolon Sekretionsvorgänge induzieren (Barrett & Keely 2000; Greger 2000).

Um diese extrazellulären Signale in eine für die Zelle brauchbare Information zu „übersetzen“, sind intrazelluläre Botenstoffe, die sog. second messenger, notwendig. Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklisches Guanosin-monophosphat (cGMP) und Ca^{2+} gehören zu den bedeutendsten unter den second messengern.

Nach Stimulation der membranständigen Adenylatzyklase durch ein G_s -Protein (mit „s“ für stimulierend) kommt es zur Bildung von *cAMP* aus ATP. Auslöser hierfür kann z.B. die Stimulation eines VIPergen Rezeptors durch seinen Agonisten sein. In Enterozyten aktiviert cAMP den apikalen Chloridkanal (= CFTR-Kanal) und führt auf diesem Wege zu einer Chloridsekretion. Gleichzeitig werden basolaterale K^+ -Kanäle vom Typ K_vLQT_1 aktiviert (Greger 2000), die nur eine geringe Leitfähigkeit (< 3 pS) aufweisen (Bleich & Warth 2000). Über diesen Weg wird die Triebkraft für einen Cl^- -Ausstrom erhöht. Über den cAMP-Weg werden der luminale Na^+/H^+ -Austauscher (Binder & Sandle 1994) und indirekt, über die Aktivierung des CFTR-Kanals, der epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC) gehemmt (Mall et al. 1999).

Zyklisches GMP entspricht in seiner Wirkung derjenigen des cAMP und führt im Kolon ebenfalls zu einer Chloridsekretion (Cuthbert et al. 1994; Markert et al. 1995). Es wird vermutet, dass cGMP die Aktivierung des CFTR-Kanals über eine cGMP regulierte Proteinkinase G II bewirkt (Markert et al. 1995). Zusätzlich erhöht cGMP den cAMP-Spiegels, indem es eine Phosphodiesterase hemmt (Nobles et al. 1991; Greger 2000).

Die Wirkung von Ca^{2+} beruht hauptsächlich auf einer Erhöhung der K^+ -Leitfähigkeit. Die dadurch entstehende Hyperpolarisation führt zu einer Triebkrafteerhöhung für den Cl^- -Ausstrom und somit zu einer Chloridsekretion. Ca^{2+} aktiviert schon im physiologischen Konzentrationsbereich einen K^+ -Kanal mit einer niedrigen Leitfähigkeit von ca. 15 pS. Dieser Kanal befindet sich basolateral und wurde als SK4-Kanal (s steht für small conductance) identifiziert (Warth et al. 1999).

Auch der oben bereits erwähnte K_vLQT_1 -Kanal, der ebenfalls basolateral vorkommt, wird anscheinend durch Ca^{2+} aktiviert (Bleich & Warth 2000). In der apikalen Membran kommt es durch Ca^{2+} zur Aktivierung eines bisher unidentifizierten K^+ -Kanals (Greger 2000). Es ist immer noch nicht ganz klar, ob Ca^{2+} direkt über Öffnung Ca^{2+} -sensitiver Cl^- -Kanäle zu einer Cl^- -Sekretion führen kann. Bisher konnte die Existenz Ca^{2+} -sensitiver Cl^- -Kanäle nur an kultivierten, noch nicht ausdifferenzierten Darmepithelzellen (T84 und HT29), aber nicht an nativem Kolonepithel nachgewiesen werden (Anderson & Welsh 1991; Morris & Frizzell 1993; Kidd & Thorn 2000).

3 Calcium als intrazellulärer Botenstoff

Wie bereits beschrieben gehört Ca^{2+} heute zu den am besten untersuchten intrazellulären Botenstoffen. Die Bedeutung von Ca^{2+} für die Steuerung physiologischer Vorgänge wurde erstmals von S. Ringer erkannt, der vor über 100 Jahren die essentielle Bedeutung von Ca^{2+} für die Herzkontraktion beschrieb (Ringer 1883). Auf dieser Entdeckung fußend wurde nach und nach die Bedeutung des Calciums, nicht nur für den Muskel, sondern für alle Körpergewebe, deutlich (z.B. Heilbrunn & Wiercinski 1947; Miledi 1973). Die im Vergleich zum Extrazellularraum sehr niedrige intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (sie liegt mit $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ um ca. 1000 – 10.000-fach niedriger) ist eine wichtige Voraussetzung, damit Ca^{2+} seiner Aufgabe als Botenstoff nachkommen kann. Zur Aufrechterhaltung des niedrigen Ca^{2+} -Spiegels bedient sich die Zelle verschiedener Mechanismen. Ca^{2+} -ATPasen, die sowohl in der Plasmamembran (PMCA = plasma membrane Ca^{2+} -ATPase) als auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (SERCA = sarcoplasmatische-endoplasmatische-Retikulum Ca^{2+} -ATPase) vorkommen, transportieren Ca^{2+} gegen seinen Konzentrationsgradienten in den Extrazellularraum bzw. in die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. Der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher nutzt (NCX) den transmembranären Na^+ -Gradienten, um Ca^{2+} aus der Zelle zu exportieren. Im Zytoplasma dienen Ca^{2+} -bindende Proteine, wie z.B. Calbindin, Parvalbumin oder Calmodulin, zur Abpufferung des freien Ions. Bei einem entsprechenden Stimulus mit nachfolgender

Kanalöffnung ist es so möglich, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration rasch zu erhöhen. Neben dem Extrazellulärraum dienen vor allem intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher der Rekrutierung des Botenstoffes. Intrazellulär kann Ca^{2+} zum einen im bereits erwähnten endoplasmatischen Retikulum, zum anderen in Mitochondrien und in der Kernmembran gespeichert werden.

An den intrazellulären Speichern vermitteln verschiedene Ca^{2+} -Kanäle den Ausstrom des Ions in das Zytoplasma. Unter anderem handelt es sich bei diesen Kanälen um einen IP_3 -Rezeptor, der in die Signalkaskade nach Stimulation muskarinerger Rezeptoren eingebunden ist (Abed-Latif 1986; Lindqvist et al. 1998). Ein ebenfalls gut untersuchter intrazellulärer Ca^{2+} -Kanal ist der Ryanodinrezeptor, bei dem es sich um einen Ca^{2+} -sensitiven Ca^{2+} -Kanal handelt.

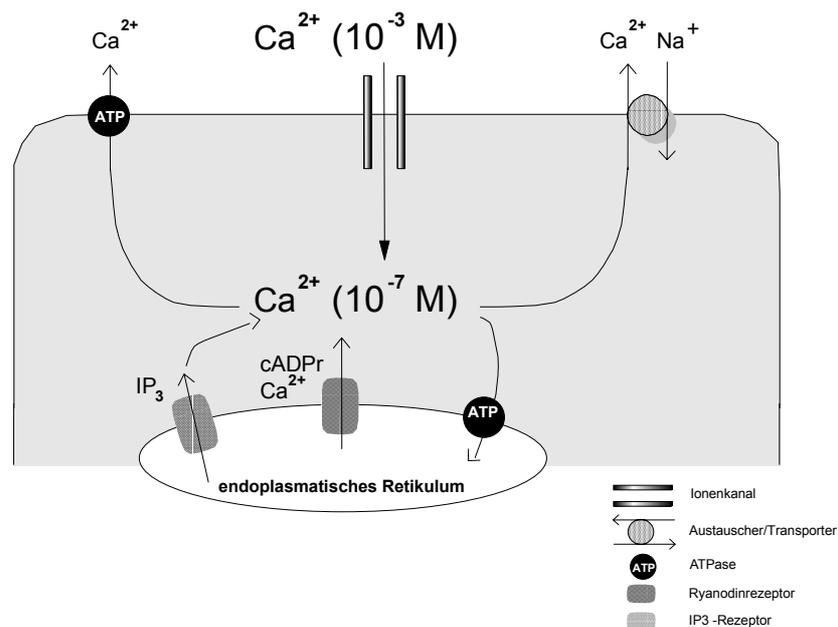


Abb. I 3: Schematische Darstellung wichtiger Regulatoren der Ca^{2+} -Homöostase (Weitere Regulatoren s. Text). Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran und am endoplasmatischen Retikulum transportieren Ca^{2+} entgegen seines Konzentrationsgradienten aus dem zytoplasmatischen Raum. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in der Zellmembran dienen ebenfalls dazu, den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel niedrig zu halten. Am endoplasmatischen Retikulum dienen IP_3 -Rezeptoren und Ryanodinrezeptoren zur schnellen Bereitstellung des Botenstoffes (cADPr = zyklische ADP-Ribose, ein Agonist am Ryanodinrezeptor).

4 Ca^{2+} -Kanäle an erregbaren Strukturen

In der Plasmamembran existieren verschiedene Ca^{2+} -Kanal-Typen. Einige von ihnen sind ligandengesteuert, jedoch ist zum heutigen Zeitpunkt wesentlich mehr über die spannungsgesteuerten Kanäle bekannt. Sie kommen typischerweise in erregbaren Geweben, wie z.B. dem Herzmuskel, vor und sind in zwei Subgruppen unterteilt: Die erste Gruppe, *T-Kanäle* (mit „T“ sowohl für tiny conductance als auch für transient current) reagieren auf niedrige Membranpotentiale. Die Ca^{2+} -Kanal-Gruppe, die auf hohe Membranpotentiale reagiert, lässt sich ihrerseits wiederum in die vier folgenden Klassen unterteilen: B-, L-, N- und P-Kanäle, wobei „B“ für brain, „L“ sowohl für long-lasting current als auch für large conductance und „P“ für Purkinje Zellen steht. N- Kanäle lassen sich nicht eindeutig zuordnen (Tsien & Wheeler 1999; Brini & Carafoli 2000). Der L-Typ-Kanal, der besonders gut untersucht ist, hat eine Leitfähigkeit von 15-25 pS, was einer Anzahl von $3 \cdot 10^6$ Ca^{2+} -Ionen in der Sekunde entspricht, die bei Öffnung eines einzigen Kanalmoleküls in die Zelle einströmen (Reuter et al. 1982). Trotz unterschiedlicher Eigenschaften entspricht sich der Aufbau der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle weitestgehend (Hille 2001). So ist auch der L-Typ Ca^{2+} -Kanal, wie die anderen bisher geklonten spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle, aus fünf Untereinheiten aufgebaut (s. Abb. I 4): Einer $\alpha 1$ -, einer $\alpha 2$ -, einer β -, einer γ - und einer δ -Untereinheit, wobei die $\alpha 2$ - und die δ -Untereinheit durch eine Disulfid-Brücke verbunden sind (Tsien & Wheeler 1999). Die $\alpha 1$ -Untereinheit bildet den Ca^{2+} -Kanal und dient als Spannungssensor (Brini & Carafoli 2000). Die Rolle der anderen Untereinheiten ist noch nicht eindeutig geklärt.

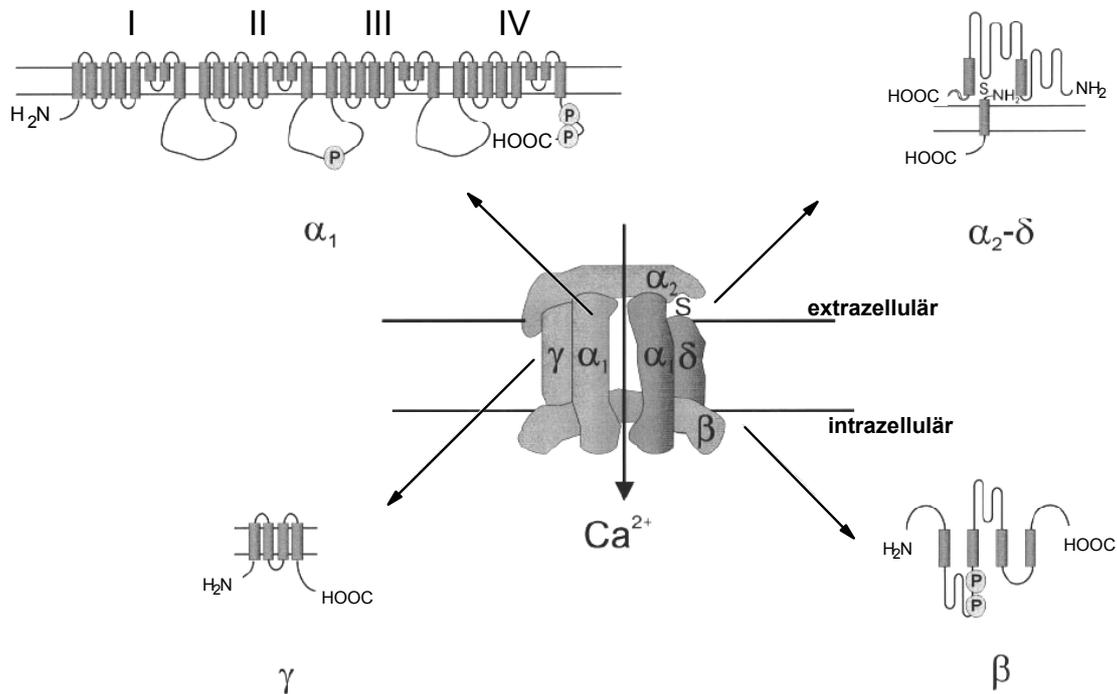


Abb. I 4: Membrantopologie der Subtypen des L-Typ Ca^{2+} -Kanals. Der Kanal besteht aus fünf Untereinheiten. Die α_1 -Untereinheit ist ein großes membranspannendes Protein, das die Ca^{2+} -Pore ebenso wie den Spannungssensor beinhaltet. Die α_2 - und die δ -Untereinheit sind durch eine Disulfid-Brücke verbunden. Die β -Untereinheit liegt gänzlich intrazellulär, die γ -Untereinheit ist membranständig. (Quelle: Hofmann et al. 1994, modifiziert nach Brini & Carafoli 2000).

In Muskelzellen ist ein L-Typ Ca^{2+} -Kanal, dessen Eigenschaften sich von anderen L-Typ-Kanälen etwas unterscheiden, für die elektromechanische Kopplung essentiell. Der auch als Dihydropyridinrezeptor (s. Abb. I 5) bezeichnete Kanal dient hauptsächlich als Spannungssensor und weniger als Ca^{2+} -Kanal. Über die Fußregion des Ryanodinrezeptors, der als Ca^{2+} -Kanal am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, stehen die beiden Rezeptoren in Verbindung (Abb. I 5; Fill & Copello 2002). Durch ein Aktionspotential kommt es - über die Kommunikation zwischen den beiden Rezeptoren - zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern.

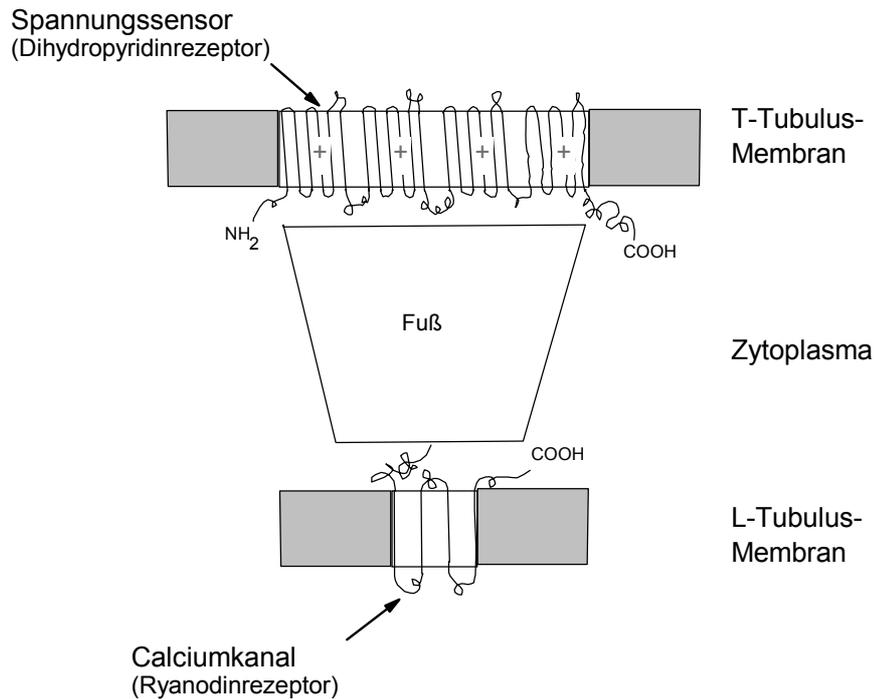


Abb. I 5: Schematische Darstellung des Ryanodinrezeptors im Skelettmuskel. Der Ryanodinrezeptor steht über seine Fußregion in engem Kontakt zum membranären Spannungssensor, dem Dihydropyridinrezeptor. Im Skelettmuskel geht man von einer physikalischen Verbindung zwischen diesen beiden Rezeptoren aus (Fill & Copello 2002). T-Tubulus = transversaler Tubulus (Plasmamembran); L-Tubulus = longitudinaler Tubulus (Membran des endoplasmatischen-Retikulums).

Das meiste für die Kontraktion benötigte Ca^{2+} wird im Herzmuskel, ebenso wie im Skelettmuskel, aus dem endoplasmatischen Retikulum rekrutiert. Allerdings ist hier die Ca^{2+} -Freisetzung nicht direkt spannungsgesteuert, sondern folgt einem sich selbst verstärkenden Mechanismus; das über L-Typ-Kanäle einströmende Ca^{2+} führt über Ryanodinrezeptoren zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (CICR = Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -Release) aus den intrazellulären Speichern (Mc Pherson & Campbell 1993).

4.1 Intrazelluläre Organellen als Ca^{2+} -Speicher

Zellorganellen - wie das endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien und auch der Nukleus - erfüllen eine wichtige Rolle in der Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes der

Zelle. Sie dienen als Ca^{2+} -Reservoir und können bei Bedarf in kurzer Zeit große Mengen an Ca^{2+} -Ionen zur Verfügung stellen. Durch verschiedene Mechanismen, die zum Teil bereits beschrieben wurden, kann ein Ca^{2+} -Ausstrom aus diesen Speichern initiiert werden. Die bedeutendste Rolle unter diesen Speichern kommt dem endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum zu.

Über IP_3 -Rezeptoren können Ca^{2+} -Ionen aus dem intrazellulären Speicher freigesetzt werden. Neben den IP_3 -Rezeptoren spielen Ryanodinrezeptoren eine wichtige Rolle als intrazelluläre Ca^{2+} -Kanäle.

5 Der Ryanodinrezeptor

An vielen Zellen ist es bekannt, dass Ca^{2+} durch positive Rückkopplung zu einer Verstärkung des eigenen Signals führen kann. Verantwortlich für diesen CICR (s.o.) sind Ca^{2+} -sensitive Rezeptoren an intrazellulären Speichern, die Ryanodinrezeptoren.

Ryanodinrezeptoren sind Mitte der 80er Jahre an Herz- und Skelettmuskeln identifiziert worden (Fleischer et al. 1985; Pessah et al. 1985). Es handelt sich bei den Ryanodinrezeptoren um eine Familie intrazellulärer Ca^{2+} -Rezeptoren. Man unterscheidet bisher drei Mitglieder der Rezeptorfamilie (RyR-1 bis -3), die durch drei unterschiedliche Gene kodiert werden (Mc Pershon & Campbell 1993). Ihre Bedeutung für die elektromechanische Kopplung im Muskel wurde bald deutlich. Noch bis vor kurzem dachte man, dass Ryanodinrezeptoren muskelspezifisch seien, oder sich zumindest auf erregbare Zellen beschränken würden. Inzwischen sind Ryanodinrezeptoren auch an vielen anderen Zelltypen nachgewiesen worden (siehe z.B. bei Clementi et al. 1996; Ozawa & Nishiyama 1997; Ozawa 2001). Dabei scheint das Vorkommen von RyR-1 auf den Skelettmuskel und, mit einer niedrigen Expressionsrate, auf das Kleinhirn beschränkt zu sein (Ozawa 2001). Nach Angaben von Franzini-Amstrong & Protasi (1997) scheint der RyR-1 aber auch in glatter Muskulatur vorzukommen. Anders als dieser Rezeptortyp wurden die beiden anderen Typen des Ryanodinrezeptors (RyR-2 und -3) auch in nicht erregbaren Zellen

nachgewiesen (Übersicht bei Ozawa 2001). Diese beiden Rezeptortypen konnten ebenfalls an der Darmepithel-Zelllinie T84 gefunden werden (Verma et al. 1996) und scheinen auch in die Signaltransduktion an anderen Epithelzellen, wie pankreatischen Azinuszellen der Ratte, eingebunden zu sein (Leite et al. 2002).

Die molekulare Struktur des Ryanodinrezeptors ist der des IP_3 -Rezeptors sehr ähnlich. Durch ihre im Vergleich zu IP_3 -Rezeptoren höhere Leitfähigkeit kommen Ryanodinrezeptoren immer dann zum Einsatz, wenn innerhalb kurzer Zeit große Mengen an Ca^{2+} benötigt werden (Franzini-Amstrong & Protasi 1997), z.B. bei der elektromechanischen Kopplung. Das Ryanodinrezeptor-Molekül setzt sich aus vier Homotetrameren zusammen, die zusammen ein Gewicht von ungefähr 565 kD haben (Ozawa 2001). Neben den vier großen Untereinheiten existieren noch vier kleinere, zentrale Lappen, die gegenüber den Hauptdomänen um 45° rotiert sind. Da die kleineren Domänen in situ nicht sichtbar sind, schlussfolgert man, dass es sich bei ihnen um den intramembranären kanalformenden Anteil des Ryanodinrezeptors handelt (Franzini-Amstrong & Protasi 1997). Da Ryanodin nahe, aber nicht im Innern der vermutlichen transmembranären Domäne bindet, wird das Molekül auch teilweise als „Ryanodinrezeptor/ Ca^{2+} -release channel complex“ bezeichnet (Franzini-Amstrong & Protasi 1997). Sowohl für den Skelettmuskel als auch für den Herzmuskel werden zwei verschiedenen Ryanodin-Bindungsstellen beschrieben (z.B. bei Ozawa 2001). Es werden eine hochaffine Bindungsstelle, die für die stimulierende Wirkung des Ryanodins verantwortlich ist, und eine niederaffine Bindungsstelle unterschieden. Bei einigen Ryanodinrezeptortypen anderer Gewebe (z.B. Leber, Corneaepithel) konnte bisher nur eine der Ryanodin-Bindungsstellen, die hochaffine, nachgewiesen werden (Ozawa 2001). Neben Ca^{2+} gehört auch zyklische ADP-Ribose zu den physiologischen Agonisten des Ryanodinrezeptors. Ob cADP-Ribose dabei eigenständig zu einer Stimulation führt oder den Rezeptor nur gegenüber Ca^{2+} sensibilisiert, ist nicht klar (Galione & Churchill 2000; Pérez et al. 1998). Daneben sind auch verschiedene pharmakologische Substanzen in der Lage, einen CICR auszulösen oder zu

unterdrücken. Ryanodin gehört zu den klassischen Stimulatoren dieses Mechanismus. Konzentrationsabhängig kann Ryanodin aber auch antagonistisch wirken, was sowohl an erregbaren als auch an nicht erregbaren Geweben beschrieben wurde (Hwang & van Bremen 1987; Coronado et al. 1994; Franzini-Amstrong & Protasi 1997; Sorrentino 1995; Ozawa 2001). Auch Koffein wird allgemein als Stimulator des CICR angesehen. Allerdings scheint die stimulierende Wirkung von Koffein auf die Subtypen-1 und -2 des Ryanodinrezeptors beschränkt zu sein. Am Subtyp-3 des Rezeptors konnte keine Koffein-Wirkung nachgewiesen werden (Giannini et al. 1992). Eine weitere pharmakologische Substanz, die den Ryanodinrezeptor blockiert, ist Ruthenium Rot. Pathologische Bedeutung hat der Ryanodinrezeptor im Krankheitskomplex der malignen Hyperthermie (Büch & Büch 1985).

6 Ca^{2+} -Rekrutierung an nicht erregbaren Geweben

An nicht erregbaren Strukturen, wie dem Kolonepithel, wurden bisher keine spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle nachgewiesen. Alternativ exprimieren nichterregbare Zellen in ihrer Plasmamembran speichergesteuerte Kanäle, die sogenannten „store operated channels“ (SOC; Putney 1997; Liu & Ambudkar 2001). Diese Leitfähigkeit wird nach einer Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aktiviert, man spricht auch von einem „kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom“. Am Kolonepithel handelt es sich bei dieser Leitfähigkeit um einen nicht-selektiven Kationen-Kanal (NSKK), der für Na^+ in weit höherem Maße permeabel ist als für Ca^{2+} (Frings et al. 1999).

Physiologisch kommt es nach Stimulation eines muskarinergen M_3 -Rezeptors, z.B. durch Acetylcholin, zur Aktivierung eines G_q -Proteins. Dieses Protein aktiviert seinerseits eine Phospholipase $\text{C}\beta$, die die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. IP_3 bindet an spezifische Rezeptoren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, was zu einem Ca^{2+} -Ausstrom aus in das Zytoplasma führt (Lindqvist et al. 1998). Im Anschluss werden speichergesteuerte Kanäle in der Plasmamembran aktiviert und es

erfolgt ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum. Ein solcher kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom konnte auch an der Kolonkarzinomzelllinie HT29 (Leipziger et al. 1994) nachgewiesen werden (s. Abb. I 6).

Experimentell kann man durch die Blockade der sarkoplasmatisch-endoplasmatischen-Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher bewirken. Die Ca^{2+} -Pumpe ist dafür verantwortlich, überschüssiges Ca^{2+} aus dem Zytoplasma in die Speicher zu befördern. Wird sie gehemmt, kommt es zu einer langsamen Speicherentleerung.

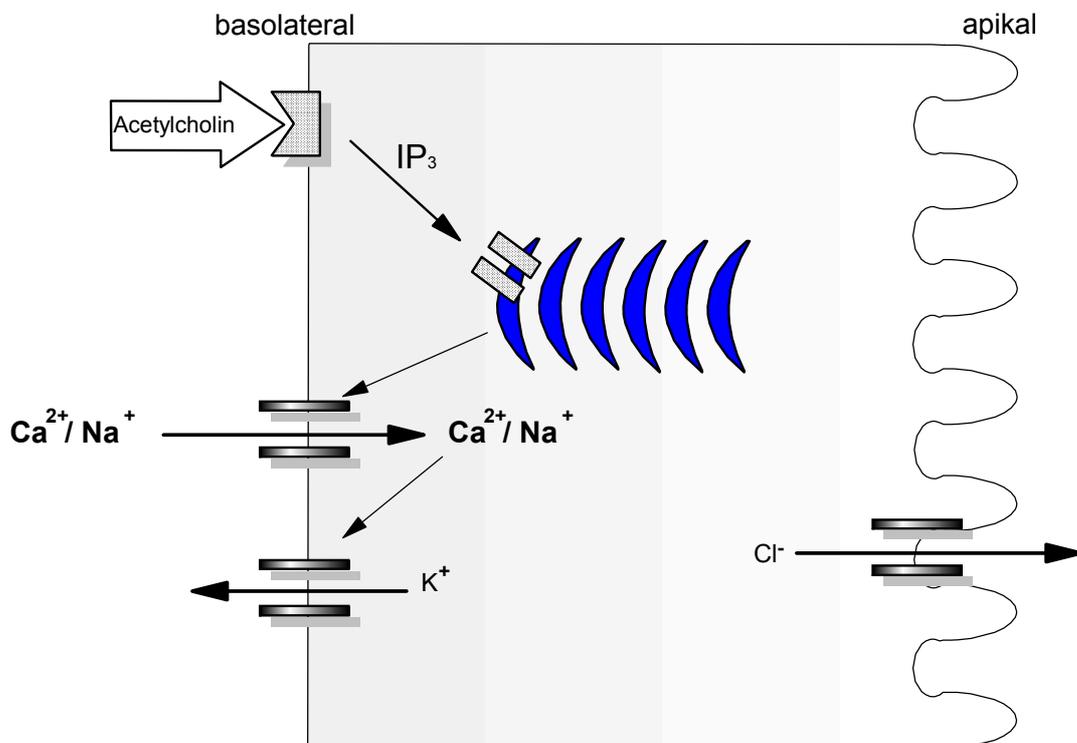


Abb. I 6: Modell des klassischen Ca^{2+} -Signalwegs. Nach Stimulation muskarinergeer Rezeptoren durch Acetylcholin kommt es nach IP_3 -Bildung zur Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher. Die Speicherentleerung ist von einem kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom über speichergesteuerte, nicht-selektive Kationenkanäle (SOC) gefolgt. Der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel aktiviert K^+ -Kanäle an der basolateralen Membran. Am Ende der Signalkaskade steht eine Cl^- -Sekretion.

7 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist ein elektrogener, sekundär aktiver Transporter. Der elektrochemische Na^+ -Gradient, der durch die Na^+/K^+ -Pumpe aufgebaut wird, dient als Antrieb für den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der in den meisten Geweben 3 Na^+ -Ionen gegen ein einzelnes Ca^{2+} -Ion in die Zelle transportiert (Lagnado & McNaughton 1990; Yoshihashi et al. 1996; Blaustein & Lederer 1999). In den 1960er Jahren wurden am Herzmuskel des Meerschweinchens und an Tintenfisch-Axonen erstmals Hinweise auf einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher gefunden (Reuter & Seitz 1968; Baker et al. 1969). Seither konnte er in fast allen Zelltypen höherer Säugetiere nachgewiesen werden; er stellt einen der wichtigsten Mechanismen zur Aufrechterhaltung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase dar. Die Eigenschaften des Austauschers scheinen dabei in den meisten Zellen sehr ähnlich zu sein. Unter basalen Bedingungen dient der Austauscher dem Ca^{2+} -Auswärtstransport, da die Triebkraft für einen Na^+ -Einstrom überwiegt (Blaustein & Lederer 1999). Im Herzmuskel, wo das Carrier-Protein bereits lange bekannt ist, spiegelt sich seine Bedeutung in der hohen Dichte, in der das Molekül vorhanden ist, wider (Niggli & Lederer 1991). Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher dient hier überwiegend dem Auswärtstransport von Ca^{2+} . Unter Ruhebedingungen schleust er das, aufgrund des elektrochemischen Gradienten in die Zelle strömende, Ca^{2+} aus und gewährleistet so einen basal niedrigen Ca^{2+} -Spiegel (Schulze et al. 1993), der Voraussetzung für die Muskelrelaxation ist. Zu Beginn des Aktionspotentials schaltet der Austauscher infolge des starken Na^+ -Einstroms mit resultierender Zelldepolarisation in den Ca^{2+} -Influx-Modus und trägt damit, parallel zu den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen, zur Bereitstellung des Ca^{2+} für die elektromechanische Kopplung bei (Levesque et al. 1994; Wasserstrom & Vites 1996). Dabei wird das Ca^{2+} -Signal vermutlich über eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung verstärkt (Levesque et al. 1994).

Je nach relativer Triebkraft seiner Substrate kann der Austauscher seine Arbeitsrichtung also umkehren (Blaustein & Lederer 1999; Brini & Carafoli 2000).

Durch seine Bidirektionalität vermittelt der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher auch die Wirkung von Herzglykosiden. Die positiv inotrope Wirkung der Herzglykoside beruhen auf einer Änderung des Na^+ -Gradienten (Wu & Fry 2001). Durch Blockade der Na^+/K^+ -ATPase verschiebt sich der Na^+ -Gradienten, auf diese Weise wird der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher negativ beeinflusst (Reuter et al. 2002). Ca^{2+} wird in geringerem Maße abtransportiert und steht für die elektromechanische Kopplung zur Verfügung.

Die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher „Familie“ besteht, soweit bisher bekannt, aus drei unterschiedlichen Genen: NCX-1, NCX-2 und NCX-3 (Übersicht bei Blaustein & Lederer 1999). Die sehr ähnlichen Hydropathie-Eigenschaften der drei Moleküle lassen auf starke Übereinstimmungen zwischen den Genen schließen. In der Tat besteht zwischen den einzelnen Austauscher-Subtypen eine paarweise Homologie von 80 bis 95 % (Kraev et al. 1996). Der erste $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der kloniert wurde, stammte aus dem Herzmuskel eines Hundes (Nicoll et al. 1990). Aus bisherigen Untersuchungen geht hervor, dass der Subtyp-1 des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers die weiteste Gewebeverteilung hat. Auch der Subtyp-2 des Austauschers scheint ubiquitär vorzukommen (Brini & Carafoli 2000). Der Subtyp-3 konnte dagegen (bisher) nur im Gehirn und im Skelettmuskel gefunden werden (Übersicht bei Blaustein & Lederer 1999). Die NCX-Moleküle bestehen aus 11 transmembranären Domänen und einer großen zytoplasmatischen Schleife, die zwischen den transmembranären Domänen 5 und 6 liegt (Blaustein & Lederer 1999; Brini & Carafoli 2000). Die zytoplasmatische Schleife beinhaltet Regulierungsstellen, wobei an ihrem C-terminalen Ende unterschiedliche Splicevarianten vorkommen können, so dass die Subtypen des NCX viele verschiedene Isoformen besitzen (Blaustein & Lederer 1999; Brini & Carafoli 2000).

In immunhistochemischen Studien an glatten Muskelzellen und Astrozyten zeigte sich, dass der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nur in begrenzten Gebieten der Plasmamembran lokalisiert ist (Goldman et al. 1994; Chen et al. 1995). Diese Bereiche liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zu sarkoplasmatischem bzw.

endoplasmatischem Retikulum (Chen et al. 1995). Eine Interaktion zwischen diesen beiden Strukturen ist also sehr wahrscheinlich.

Am Kolonepithel der Ratte ist der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in die Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Sekretion involviert. Durch eine Erhöhung des intrazellulären Na^+ -Spiegels infolge einer IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Speicherentleerung (s.o.) wird der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher „abgeschaltet“, d.h. er transportiert kein Ca^{2+} mehr in den Extrazellularraum und trägt somit zur Aufrechterhaltung eines erhöhten Ca^{2+} -Spiegels - und damit auch zur Aufrechterhaltung einer Cl^- -Sekretion - bei (Seip et al. 2001). Weitere regulatorische Mechanismen sind für den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher der Enterozyten bisher nicht bekannt.

8 Eigene Fragestellung

Die Regulatoren des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels sind, wie beschrieben, eng miteinander verknüpft. In manchen Fällen sind die verschiedenen Mechanismen auch direkt aneinander gekoppelt. So löst eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher z.B. einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom über den nicht-selektiven Kationen-Kanal (NSKK) aus.

Am Kolonepithel der Ratte konnte erst kürzlich ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher funktionell nachgewiesen werden, der in vielen anderen Geweben eine wichtige Rolle in der Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes spielt. Ein molekularbiologischer Nachweis des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers aus dem Rattenkolon fehlt bisher noch. Ob der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher durch andere Mechanismen des Ca^{2+} -Haushaltes gesteuert wird, ist bisher nicht klar. Aus immunhistochemischen Untersuchungen an glatten Muskelzellen und Astrozyten weiß man, dass der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in der Plasmamembran so lokalisiert ist, dass er in unmittelbarer Nachbarschaft zum endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum liegt (Goldman et al. 1994; Chen et al. 1995). Eine Interaktion zwischen dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und intrazellulären Speichern scheint also sehr wahrscheinlich zu sein. Daher sollte zuerst ein molekularbiologischer

Nachweis des NCX erfolgen und seine Regulation über den Füllungszustand der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher untersucht werden.

Aus den ersten Untersuchungen meiner Arbeit ergaben sich Hinweise auf die Existenz eines positiven Rückkopplungsmechanismus für Ca^{2+} am Kolonepithel. Verantwortlich für eine sogenannte Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung sind i.d.R. Ryanodinrezeptoren, so dass sich im Folgenden der Schwerpunkt meiner Arbeit auf die Identifizierung und Charakterisierung des Ryanodinrezeptors am Kolonepithel verlagerte.

Insgesamt sollten folgenden Fragen durch meine Untersuchungen beantwortet werden:

- Kann der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher durch molekularbiologische Methoden im Kolonepithel nachgewiesen werden?
- Wird der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher durch den Füllungszustand der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher reguliert?
- Existiert am nativen Kolonepithel eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung und ist ein Ryanodinrezeptor für diesen Mechanismus verantwortlich?
- Welche physiologische Bedeutung kommt dem Ryanodinrezeptor am Kolonepithel zu?

II Material und Methoden

1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es handelte sich um Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts. Für Messungen an isolierten Krypten wurden Tiere mit einer Körpermasse zwischen 100 – 180 g bzw. mit einem Alter von maximal 9 Wochen verwendet. Bei schwereren und dementsprechend älteren Tieren ist eine Isolierung intakter Krypten nicht mehr möglich (Schultheiss et al. 2002). Für die Ussingkammer-Versuche spielten Alter und Gewicht der Tiere keine Rolle. Futter und Wasser stand den Ratten ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden unter einem 12-Stunden-hell-12-Stunden-dunkel-Regime gehalten.

2 Elektrolytlösungen

2.1 Lösungen für die Präparation

Die Kolonschleimhaut wurde in einer Bicarbonat-gepufferten Parsons-Lösung (Parson & Peterson 1965) aufbewahrt. Diese enthielt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 107; NaHCO_3 25; NaH_2PO_4 0,2; Na_2HPO_4 1,8; KCl 4,5; CaCl_2 1,25; MgSO_4 1, Glucose 12. Die Lösung wurde mit Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) begast. Der pH wurde mit $\text{NaHCO}_3/\text{HCl}$ auf 7,4 eingestellt.

Die Isolationslösung für die Krypten enthielt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 107; NaHCO_3 25; NaH_2PO_4 0,2; Na_2HPO_4 1,8; KCl 4,5; Glucose 12; EDTA (Ethyldiamin-N,N,N',N',-tetraessigsäure) 10 mit $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ bovinem Serumalbumin (BSA). Die pH-Einstellung auf 7,4 erfolgte mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und HCl unter Carbogenbegasung. Die Lösung wurde auf eine Temperatur von $37\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt.

Die isolierten Krypten wurden in einer kaliumreichen, chloridarmen Tyrode-Lösung aufgefangen, die im Folgenden auch als Auffangtyrode bezeichnet wird

(Böhme et al. 1991, Diener et al. 1991). Diese Lösung bestand aus (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): Kaliumgluconat (KGluc) 100; KCl 30; N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure) (HEPES) 10; NaCl 20; MgCl_2 1; CaCl_2 1,25; Glucose 12,2; Natriumpyruvat 5 und BSA 1 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Der pH-Wert dieser Tyrode wurde mit KOH/HCl auf 7,4 titriert.

2.2 Lösungen für die Imaging-Messungen

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurde als eine $1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Stammlösung in DMSO (Dimethylsulphoxid) angesetzt. Das Detergenz Pluronic[®] F-127 (BASF, Weyanodotte, USA) wurde eingesetzt, um die Löslichkeit des Fura-2-AM zu verbessern. Pluronic[®] wurde in DMSO 20-prozentig gelöst ($200\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Die isolierten Krypten wurden mit $2,5\cdot 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fura-2 und Pluronic[®] ($50\text{ }\mu\text{l}$ pro ml Auffangtyrode) für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Krypten im Anschluss an die Inkubation zweimal mit der Auffangtyrode (s.o.) gespült. Im weiteren Verlauf wurden die Krypten bis zur Messung unter Lichtschutz aufbewahrt.

Als Standard-Lösung für die Versuche wurde eine $140\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl/Tyrode-Lösung verwendet. Sie enthielt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): NaCl 140; KCl 5,4; HEPES 10; Glucose 5; CaCl_2 1,25; MgCl_2 1. Der pH-Wert wurde mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt. In Versuchen, in denen die Transportrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers umgekehrt werden sollte, wurde Na^+ in dieser Lösung äquimolar durch das impermeable Kation N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt.

In den Versuchen mit Saponin-permeabilisierten Krypten wurde eine Lösung als Superfusionsmedium verwendet, die in ihrer Zusammensetzung weitestgehend dem intrazellulären Medium entsprach. Im Folgenden wird diese Lösung als „intrazellulär-ähnliche Lösung“ bezeichnet. Diese enthielt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): KGluc 10; KCl 30; NaCl 10; MgCl_2 2; EGTA 0,1; Tris 10; ATP 1. Weiterhin enthielt die Lösung Creatin-

Phosphokinase ($3000 \text{ U}\cdot\text{l}^{-1}$) und Phosphocreatin ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) als ATP-Regenerationssystem. Der pH-Wert wurde mit Tris/HCl auf 7,2 eingestellt.

2.3 Lösungen für die Ussingkammer-Messungen

Für die Ussingkammer-Experimente wurde die oben beschriebene Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung (Parson & Paterson 1965) als Standardlösung verwendet.

2.4 Lösungen für die Gelelektrophorese

Alle nachfolgenden Lösungen wurden mit Ribonuclease (RN-ase) freiem Wasser angesetzt. Dafür wurde destilliertes Wasser mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) in einem Verhältnis von 1000:1 vermischt und anschließend autoklaviert. Vor dem Autoklavieren musste das Gemisch über Nacht ruhen.

RNA-Gele wurden mit einer denaturierenden Lösung angesetzt, die auch als Laufpuffer diente. Es wurde eine zehnfach konzentrierte Stocklösung angesetzt; diese enthielt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): 3-[N-morpholino]propansulfonsäure (MOPS; freie Säure) 200; Natrium Acetat 50; EDTA (Dinatrium-Salz) 10. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Zur Herstellung der einfach konzentrierten Gebrauchslösung wurde zu 100 ml der zehnfach konzentrierten Stocklösung 20 ml einer 12,3-molare Formaldehydlösung und 880 ml RN-ase-freies Wasser zugesetzt; die Formaldehydkonzentration in der Gebrauchslösung betrug 2 Volumen %.

Die DNA-Gele wurden mit einem Trisacetat (= TAE)-Puffer hergestellt. Dieser diente ebenfalls als Laufpuffer für diese Gele. Der TAE-Puffer war wie folgt zusammengesetzt (Angaben in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): Trisacetat 40; EDTA 1.

3 Chemikalien

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

2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinon (BHQ; Tocris, Bristol, UK)

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

Fura-2-Pentapotassium-Salz (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

N-Methyl-D-Glucamin (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Ryanodin (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland)

Thapsigargin (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland)

N-Methyl-D-Glucamin (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Universal Agarose (PeqLab, Erlangen, Deutschland)

Zyklische ADP-Ribose (Biomol, Hamburg, Deutschland)

Poly-L-Lysin (Biochrom KG, Berlin, BRD) wurde als Lösung ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) zur Beschichtung von Deckgläschen benutzt. Dadurch haften die isolierten Krypten fester auf dem Glas.

4 Oligonukleotide (Primer)

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Primerpaare sind im folgenden, einschließlich ihres Zielmoleküls und der Länge des von ihnen amplifzierten Fragments, tabellarisch dargestellt.

Ziel-molekül	Oligonukleotid-Sequenz	Fragmentlänge (bp)
NCX-1	5' GAGGAAATGAAACCACCGAA 3'	812
	5' TCATCTTGGTCCCTCTCATC 3'	
GAPDH	5' TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGG 3'	714
	5' CAGGCGGCATGTCAGATCCACAAC 3'	

5 Enzyme und Nukleotide für PCR und rtPCR

Um RNA in cDNA umzuschreiben wurde eine Murine-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim, Deutschland) genutzt. RNasin (rekombinant; Promega, Mannheim, Deutschland) wurde dem Reaktionsansatz zugesetzt um RNase-Aktivitäten zu verhindern.

Als DNA-abhängige DNA-Polymerase wurde eine *Taq* DNA Polymerase (rekombinant; Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) genutzt. Als Substrat für die Synthese von DNA-Teilstücken wurden Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP; 10 mol·l⁻¹; Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) benötigt.

Als Längenstandard bei der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurde eine 100 bp DNA-Leiter (PeqLab, Erlangen, Deutschland) eingesetzt.

6 Software

Für die molekularbiologischen Versuche wurde online auf folgende Programme zugegriffen:

DNA-Sequenzen wurden aus der Nukleotiddatenbank des National Center for Biotechnological Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) ermittelt. Um mehrere DNA-Sequenzen zu vergleichen wurde auf das „multiple sequence alignment“ Programm ClustalW (Higgins et al. 1994) zugegriffen (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html#>).

Die Auswahl der Oligonukleotide wurde durch das Programm Vektor NTI[®] unterstützt. Dasselbe Programm diente der Berechnung der Primer-Schmelztemperatur (T_m-Wert). Um die Spezifität der Primer für den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher zu überprüfen wurden die ausgewählten Oligonukleotide mit dem Basic Local Alignment Tool (BLAST) Programm des National Center for Biotechnological Information im BLASTn Suchmodus (Altschul et al. 1997) mit den Sequenzen der Datenbank verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>).

7 Gewebepräparation

7.1 *Präparation der Darmschleimhaut*

Die Ratten wurden durch einen Genickschlag betäubt und anschließend durch Entbluten getötet (genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen). Die Bauchhöhle wurde in der Linea alba eröffnet und durch zwei Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens der Zugang zur Bauchhöhle erleichtert. Das Kolon wurde distal an seinem Übergang zum Rektum, der durch einen Lymphknoten gekennzeichnet ist (Lindström et al. 1979), abgesetzt. Mittels stumpfer Präparation wurde das Kolon vom Mesenterium gelöst. Durch einen zweiten Schnitt am Übergang zum Caecum wurde das Kolon aus dem Körper gelöst und sofort in eisgekühlte, Carbogen-begaste Parsons-Lösung (s.o.) gegeben. Das Darmlumen wurde mit eisgekühlter Parsons-Lösung gespült und so von Kot gereinigt. Anschließend wurde der Darm auf einen Kunststoffstab mit einem Durchmesser von 5 mm gezogen. Die Tunica serosa und muscularis wurden mit der Hand abpräpariert. Das so erhaltene Mucosa-Submucosa-Präparat wurde in ungefähr drei Zentimeter lange Abschnitte unterteilt. Um diese in die Ussingkammer zu spannen, wurde der Darm am Mesenterialansatz in Längsrichtung aufgeschnitten.

7.2 *Präparation der isolierten Krypten*

Für die Isolation der Krypten eignet sich nur der distale Teil des Kolons. Im Gegensatz zum proximalen Kolon weist das distale Kolon keine Schrägstreifung der Schleimhaut auf und ist so leicht zu unterscheiden (Lindström et al. 1979). Nach der oben beschriebenen Methode wurde vom distalen Kolon ein Mucosa-Submucosa-Präparat hergestellt. Es wurde ebenfalls entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten und anschließend mit Cyanacrylatkleber auf Plexiglashalter geklebt (Schultheiss et al. 2002). Das Gewebe wurde nun für 6 – 10 Minuten, je nach Alter, Geschlecht und Gewicht der Tiere in einer Calcium-freien, EDTA-haltigen Isolationslösung (s.o.) bei 37 °C unter Carbogenbegasung inkubiert. Nach der

Inkubation wurde der Halter in einen Vibromischer (Chemap, Volketswil, Schweiz) eingespannt und in Auffangtyrode (s.o.) geschüttelt, so dass sich die Krypten von der Darmschleimhaut lösten. Unter optischer Kontrolle wurden mit Hilfe einer Mikropipette (10 – 100 μ l) 30 μ l der Kryptensuspension aufgenommen und auf runde, mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen aufgebracht (Schultheiss et al. 2002). Die 30 μ l Kryptensuspension wurden mit Auffangtyrode auf 100 μ l aufgefüllt. Die Präparate konnten bis zu 6 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden.

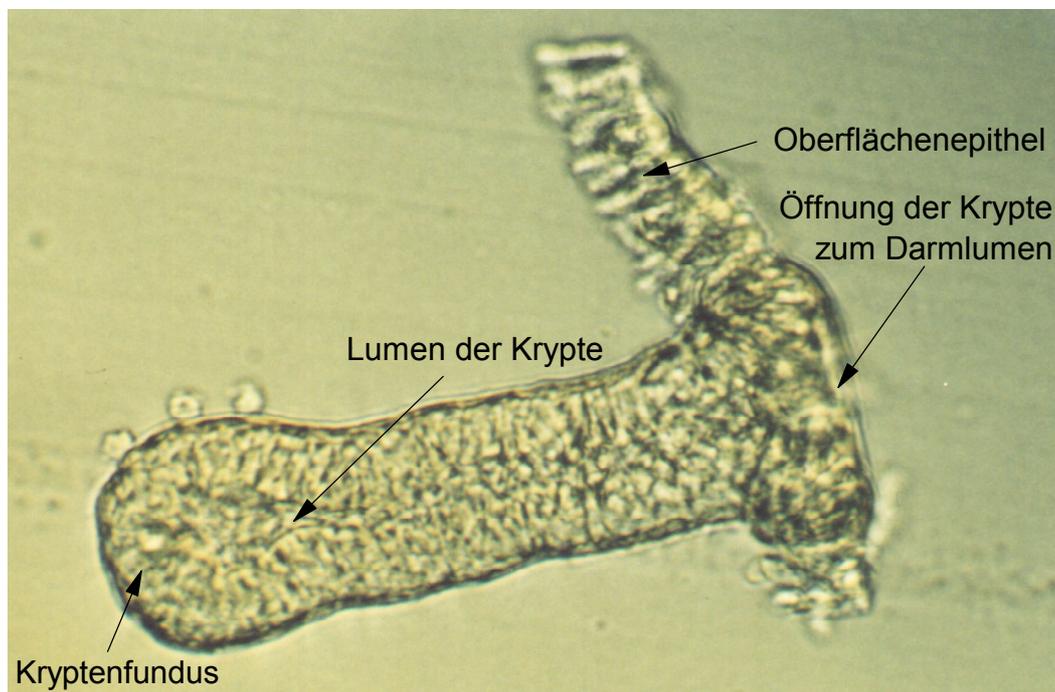


Abb. II 1 : Isolierte Krypte.

8 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels Fura-2

Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration können mittels selektiver Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. Die ersten Vertreter dieser Gruppe wurden von Roger Tsien (Tsien 1980) entwickelt. Durch die chemische Modifikation des Ca^{2+} -Chelators EGTA erhielt er das Vorläufermolekül 1,2-bis (2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA; Baylor & Hollingworth

2000). Wie EGTA hat BAPTA eine hohe Affinität gegenüber Ca^{2+} , ist allerdings in geringerem Maße pH-sensitiv. BAPTA bildet das „Rückgrat“ der Ca^{2+} -Indikator-Farbstoffe; an dieses Grundmolekül können verschiedene Farbstoffe gebunden werden.

Fura-2 ist ebenfalls ein Mitglied dieser Farbstofffamilie. BAPTA stellt im Fura-2-Molekül, sowie in den anderen Farbstoffen auch, den Ca^{2+} -Chelatbildner dar. Ca^{2+} wird durch die vier Säurereste klauenartig umfasst (griech.: Chele = Klaue). Fura-2 selbst kann als stark negativ geladenes Molekül die Zellmembran nicht permeieren. Um die Zelle ohne den Einsatz invasiver Methoden (z. B. Mikroinjektion) mit dem Farbstoff aufladen zu können, bedient man sich des ungeladenen Acetoxymethyl(AM)-Esters (Abb. II 2). Dieser ist membrangängig, allerdings ist er nicht fähig Ionen zu binden. Innerhalb der Zelle wird der AM-Ester durch verschiedene unspezifische Esterasen in das aktive Fura-2 gespalten.

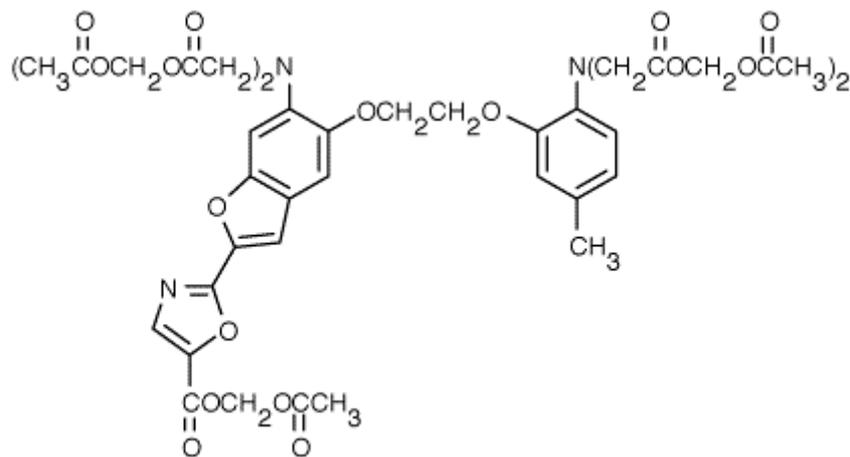


Abb. II 2: Fura-2 Acetoxymethyl(AM)-Ester.

Auf diese Weise wird der aktive Fluoreszenzfarbstoff in der Zelle „gefangen gehalten“: Nach der Spaltung der Esterbindung ist das Molekül aufgrund seiner negativen Ladung nicht mehr in der Lage, die Zelle zu verlassen; ein Ausspülen des Farbstoffes, z. B. durch die Superfusion, ist nicht möglich.

Die Fluoreszenzfarbstoffe können anhand ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften charakterisiert werden. Man unterscheidet die Wellenlängen-stabilen Farbstoffe („wavelength stable dyes“) von den Wellenlängen-shift Farbstoffen („wavelength shifting dyes“). Während die Wellenlängen-stabilen Farbstoffe weder ein unterschiedliches Exzitations- noch Emissionsverhalten zeigen – je nachdem, ob sie ein Ion gebunden haben oder nicht -, sind die Wellenlängen-shift Farbstoffe in der Lage entweder ihr Exzitations- oder Emissionsmaximum zu ändern. Fura-2 zählt aufgrund seiner zwei verschiedenen Anregungswellenlängen, je nachdem, ob Ca^{2+} gebunden ist oder nicht, zu den Wellenlängen-shift Farbstoffen. Die Möglichkeit, den freien Farbstoffanteil vom ionengebundenen Farbstoffanteil zu unterscheiden, ist der entscheidende Vorteil, den die Wellenlängen-shift Farbstoffe gegenüber den Wellenlängen-stabilen Farbstoffen besitzen. Diese Eigenschaft nutzt man für eine Verhältnis(Ratio)-Messung. Hierbei werden die Emissionswerte des Ionen-gebundenen Anteils durch die des freien Farbstoffes dividiert. Im Falle von Fura-2 wird der Quotient aus der Emission bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm gebildet. Bei dieser Verhältnismessung wird das zu messende Präparat in einem Abstand von wenigen ms erst mit 340 nm und dann mit 380 nm angeregt. Der Quotient, der aus dem Fluoreszenzsignal gebildet werden kann, spiegelt den Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wider. In Abbildung II 3 erkennt man, dass das Emissionsmaximum für den Ionen-gebundenen Farbstoff genau bei 340 nm liegt. Im Nenner wählt man, abweichend vom Emissionsmaximum des Ionen-freien Farbstoffs (360 nm), die Emission bei 380 nm um die maximale dynamische Spannweite zwischen den beiden Farbstoffanteilen zu erhalten. In der Abbildung ist ebenfalls zu erkennen, dass sich die Emissionsstärke des freien Farbstoffes und desjenigen, der

Ca^{2+} -Ionen komplex gebunden hat, bei 360 nm nicht unterscheiden (= Schnittpunkt der Kurven). An dieser, auch als isoemissiven Punkt bezeichneten Stelle ist es nicht möglich, die beiden Farbstoffvarianten von einander zu unterscheiden.

Verschiedene Faktoren können die Genauigkeit von Imaging-Versuchen beeinflussen. Bei der Ratiomessung wirken sich diese Faktoren auf beide Wellenlängen gleich aus, werden also bei der Quotientenbildung „herausgekürzt“ oder zumindest vermindert. Im Vergleich zu einfachen Fluoreszenzmessungen weist die Ratiomessung daher folgende Vorteile auf (Tsien & Poenie 1986):

- Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist unabhängig von der absoluten Farbstoffkonzentration in der Zelle.
- Der Grad der Farbstoffaufladung beeinflusst die Messung nicht.
- Morphologische Faktoren, wie z. B. die Zelldicke, sind unbedeutend.
- Messartefakte, die durch das Austreten von Farbstoff oder durch Ausbleichen entstehen können, werden reduziert.

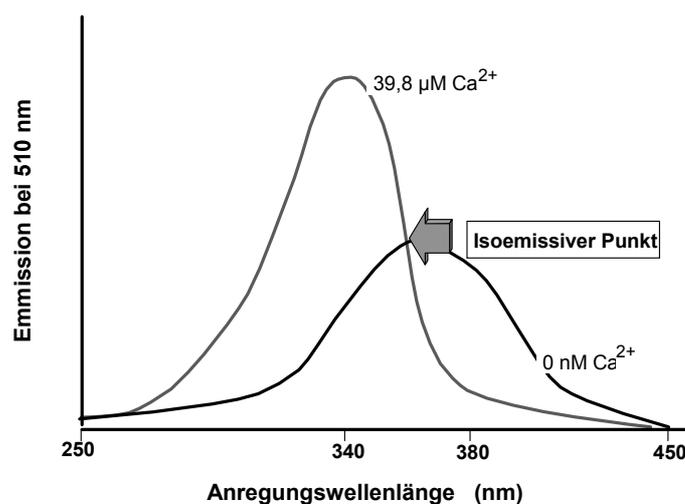


Abb. II 3: Exzitationsspektren von Fura-2 bei 2 verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der Indikatorfarbstoffe ist die Dissoziationskonstante (K_D). Sie beschreibt die Ca^{2+} -Konzentration, bei der 50 % des Farbstoffes das Zielion gebunden haben. Die Dissoziationskonstante ist also ein Maß für die Affinität des Farbstoffes zu seinem Zielion. Je kleiner K_D ist, desto größer ist die Affinität. Mit einer K_D für Ca^{2+} von $224 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hat Fura-2 seinen optimalen Messbereich zwischen ca. $2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $20.000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ca^{2+} . Daher eignet sich Fura-2 optimal für intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen. Die physiologische Ca^{2+} -Konzentration unter Ruhebedingungen (ca. $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) fällt genau in den optimalen Messbereich des Farbstoffs. Da sich durch den sigmoidalen Verlauf der Bindungskurve über 90 % der Veränderungen in einem engen Ca^{2+} -Konzentrationsbereich abspielen, ist es besonders wichtig, dass die Konzentration des zu messenden Ions innerhalb dieses Bereiches liegt und genügend Spielraum zur Verfügung steht, um die Veränderungen des Konzentrationsspiegels messen zu können (Abb. II 4).

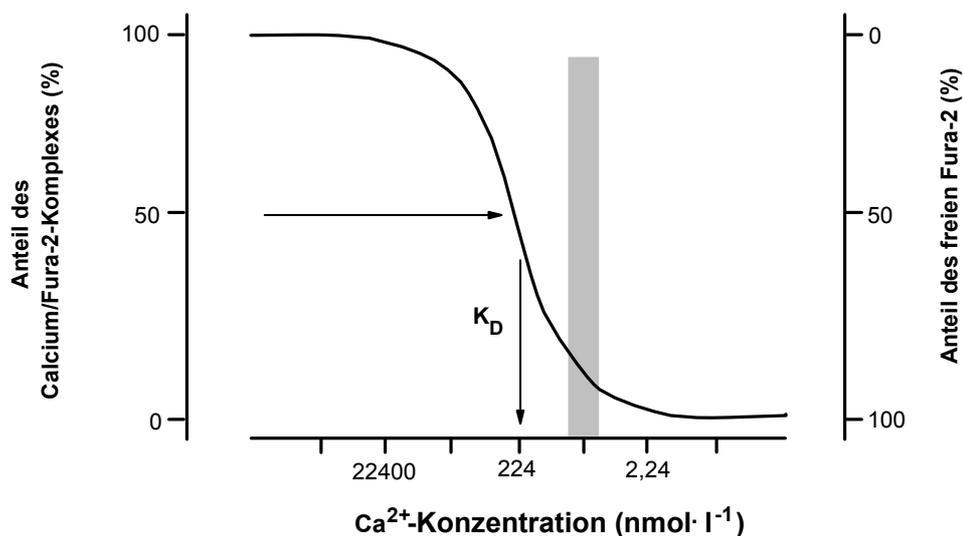


Abb. II 4: Bindungsverhalten von Fura-2 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. Als graue Säule ist der Bereich der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (ca. $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) in Ruhe eingezeichnet.

8.1 Ca^{2+} -Messungen an permeabilisierten Krypten

Für die Permeabilisation der Krypten wurde Saponin ($10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), gelöst in der intrazellulär-ähnlichen Lösung, eingesetzt. Da über die Poren der permeabilisierten Zellen Fura-2 austreten kann, enthielt das Superfusionsmedium freies Fura-2 in einer Konzentration von $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

8.2 Mangan-Quench

Für Versuche, bei denen der Eintritt von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Medium gemessen wurde, kam die Mangan-Quench-Methode zum Einsatz (Xu et al. 1994). Mangan wird als divalentes Kation wie Ca^{2+} an Fura-2 gebunden. Hat Fura-2 allerdings einen Chelatkomplex mit Mn^{2+} gebildet, verliert es seine fluoreszierenden Eigenschaften (Hatae et al. 1996). In Folge eines Mn^{2+} Einstroms kommt es also zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals (Quench). Um die Mangan-Einstromrate unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration messen zu können, wurden die Versuche bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm durchgeführt und es wurden keine Verhältniswerte gebildet. Wie bereits beschrieben ist das Emissionssignal bei 360 nm, dem isoemissiven Punkt, unabhängig vom Ca^{2+} -Spiegel. In dieser Arbeit wurde die Technik des Mn^{2+} -Quenches eingesetzt, um die Aktivität des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers zu bestimmen. Mn^{2+} ($5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurde der Standard-Tyrode zugesetzt. Der bei 360 nm gemessene Abfall des Fluoreszenzsignals war gleichbedeutend mit einem Mn^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum.

8.3 Der Imaging-Messstand

8.3.1 Mikroskop und elektronische Komponenten

Die Calcium-Imaging-Versuche wurden an einem inversen Lichtmikroskop (Olympus IX-50, Olympus Optical, Japan) durchgeführt, ausgestattet mit einem Epifluoreszenz-Setup und einer Imageanalyse-Software (Till Photonics, Martinsried, Deutschland; s. Abb. II 5).

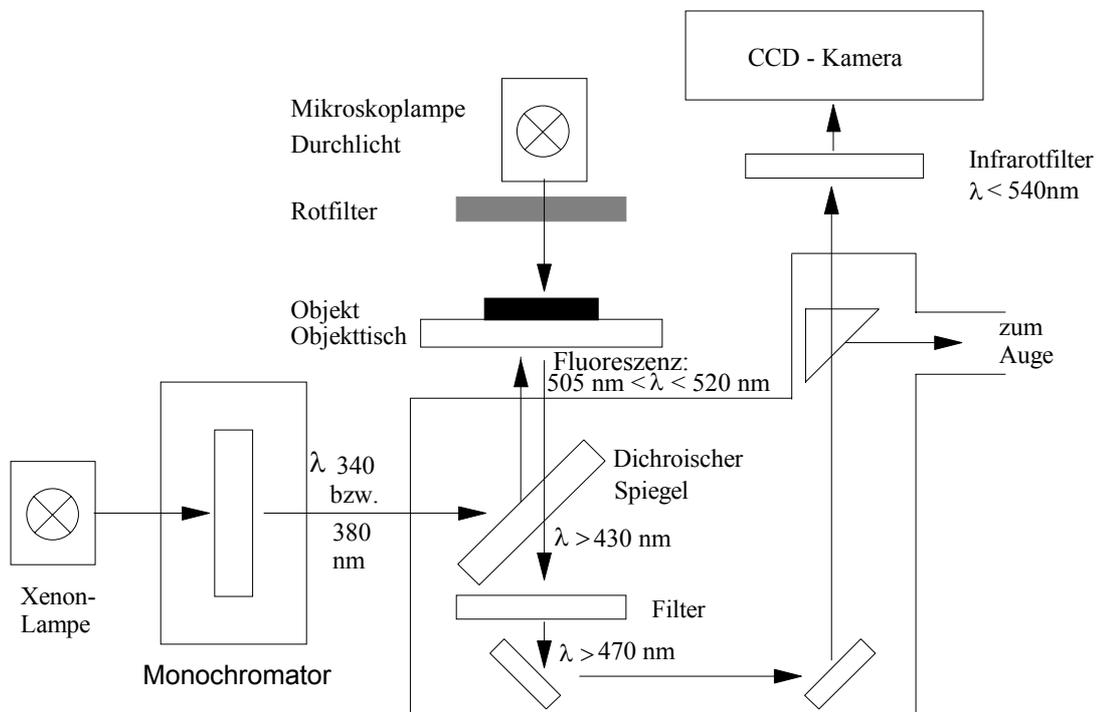


Abb. II 5: Optisches System für die Fluoreszenzmessung.

Zur Anregung des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffs Fura-2 wurde eine Monochromatoreinheit (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) verwendet. Über eine integrierte Xenon-Lichtquelle werden Lichtwellen generiert, die über Spiegel in einen Lichtleiter gerichtet werden. Der Lichtleiter ist über einen Epifluoreszenz-Kondensor mit dem Mikroskop verbunden. Das Anregungslicht wird über einen dichroischen Spiegel (Grenzwellenlänge 430 nm) auf das Objekt gelenkt. Die vom Objekt emittierte Fluoreszenz (510 nm) kann durch den Spiegel treten und mit Hilfe

einer CCD-Kamera (Till Photonics, Martinsried, Deutschland), die an das Mikroskop angeschlossen ist, detektiert werden. Die Kamera stellt die Verbindung zwischen optischem System und Software her. So können während der Messung fortlaufend „live displays“ aufgezeichnet werden, auf denen die Änderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zu beobachten sind.

8.3.2 Messkammern und Perfusionssystem

Als Messkammern dienten Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland). In die Mitte des Schalenbodens wurde ein Loch von 10 mm gebohrt. Die isolierten Krypten wurden, wie bereits beschrieben, auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen gebracht und in Vorinkubationsschalen (Nunc Brand Products, Roskilde, Dänemark) eine Stunde mit Fura-2-AM ($2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und Pluronic[®] (50 μl pro ml Auffangtyrode) bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert (siehe auch Kap. II 2.2). Anschließend wurde der nicht resorbierte Farbstoff mit Auffangtyrode ausgespült. Die mit Krypten behafteten Deckgläschen wurden mit Hilfe einer Silikonpaste (Baysilone[®], Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) unter die gebohrte Öffnung der Zellkulturschalen geklebt. Die Schalen wurden in eine Halterung auf dem Objektisch des Mikroskops eingesetzt. Die Superfusion des Präparates erfolgte hydrostatisch. Über Infusionsbestecke (LDKS Oversan Industria Biomedica S.p.A. Mailand, Italien), die in einer Kanüle endeten, wurden die Lösungen in die Messkammer geleitet. Der Zulauf erfolgte kontinuierlich mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 1 ml pro Minute. Um das Flüssigkeitsvolumen innerhalb der Messkammer konstant bei ungefähr 3 ml zu halten, war gegenüber dem Zulauf eine Absaugvorrichtung positioniert. Zu- und Ablaufeinrichtung waren mit einem Magneten am Objektisch fixiert. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

8.3.3 Versuchsdurchführung

Im Sichtfeld des Mikroskops wurde eine intakte Krypte justiert. Nachdem der Strahlengang des Mikroskops auf die Kamera umgeleitet worden war, konnte mit Hilfe der Imaging-Software ein Bild der Krypte auf den Monitor des Computers übertragen werden. Hier wurde die Fluoreszenzintensität durch Falschfarben dargestellt. In einer Farbskala, die von blau über grün und gelb bis zu rot reichte, wurde den am wenigsten fluoreszierenden Bereichen der Krypte die Farbe blau und den am stärksten fluoreszierenden Bereichen die Farbe rot zugewiesen. Im Bereich des Kryptenfundus (s. Abb. II 1) wurden Messregionen markiert (regions of interest = ROI). Im Verlauf des Experiments wurden die Veränderungen des Ca^{2+} -Spiegels dieser Bereiche aufgezeichnet. Zu Beginn jeden Experimentes wurde das Präparat einer $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl/Tyrode-Lösung ausgesetzt, so dass sie sich in einem annähernd physiologischen Milieu befanden. Erst wenn sich eine Stabilisierung der Grundlinie (Basallinie) eingestellt hatte, wurde ein Lösungswechsel bzw. eine Substratapplikation vorgenommen. Zur Auswertung wurde das Fura-2-Fluoreszenzverhältnis unter Basalbedingungen von demjenigen nach Substratapplikation subtrahiert (Δ Ratio; siehe z.B. Abb. III 4).

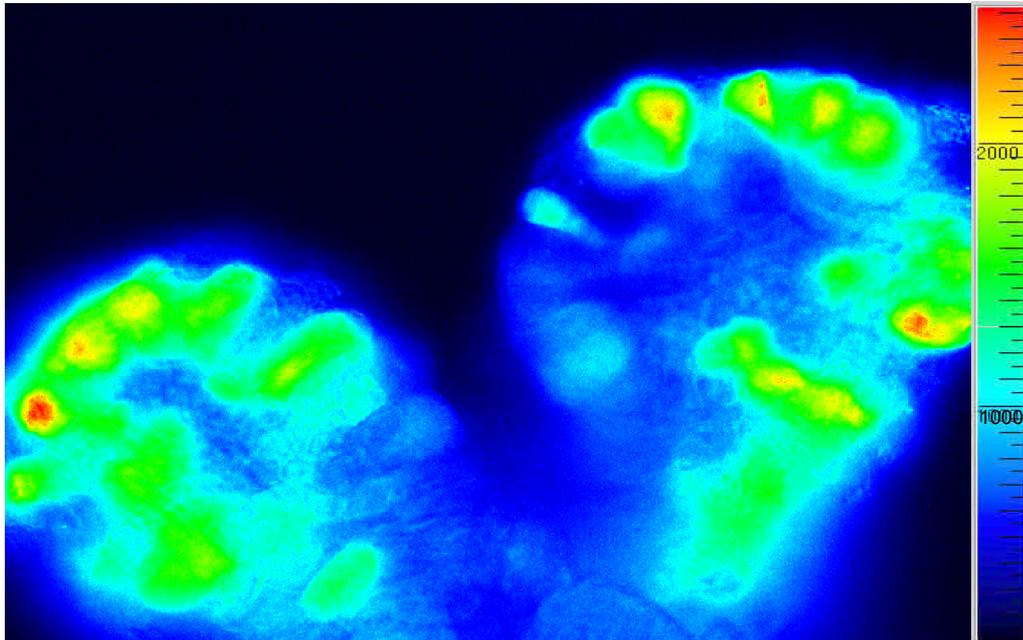


Abb. II 6: Falschfarbendarstellung zweier mit Fura-2 aufgeladenen Krypten. Im Bildausschnitt ist jeweils der Fundusbereich der Krypten zu sehen.

8.3.4 Datenerfassung

Die Zellen wurden abwechselnd mit einer Wellenlänge von 340 und 380 nm angeregt, die Lichtpulse hatten eine Dauer von 20 ms. Die Sammelrate betrug 0,2 Hz, d.h. es wurde alle 5 s ein Bildpaar registriert. Die Emission über 470 nm wurde durch den dichroischen Spiegel zu einer CCD-Kamera geleitet und in digitale Bilder umgesetzt. Mit Hilfe der Imageanalyse-Software „TILLvisION“ (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) wurden die von der Kamera erfassten Daten in Zahlenwerte (Ratio-Werte) umgesetzt. Diese Daten wurden gleichzeitig auch in Form eines Graphen dargestellt, so dass die Veränderungen der Ratio kontinuierlich während des Versuchs verfolgt werden konnten. Zur weiteren Auswertung wurden die Daten auf der Festplatte gespeichert.

9 Ussingkammer-Technik

9.1 Die Messkammer

Diese Technik wurde Anfang der 50er Jahre von Hans H. Ussing zur Quantifizierung elektrogener Transportprozesse entwickelt (Ussing & Zerahn 1951). Die heute für diese Technik eingesetzten Messkammern entsprechen nicht mehr im Detail den von Ussing entworfenen Kammern, weswegen man auch von „modifizierten Ussingkammern“ spricht (Abb. II 7). Die hier verwendete Kammer bestand aus zwei Plexiglashälften, die durch Schrauben verbunden werden können. Um die Kammern wasserdicht zu verschließen, wurde ein dünner Silikonfilm auf die Kontaktflächen der Kammerhälften aufgebracht. Zur Befestigung des Gewebes sind an der Innenfläche der einen Hälfte spitze Metallstifte eingelassen. Nachdem die beiden Kammerhälften verbunden wurden, stellte das Gewebe die Trennfläche zwischen zwei mit Pufferlösung gefüllten Kompartimenten dar. Die Kompartimente beiderseits des Gewebes, das eine Oberfläche von 1 cm^2 hatte, fassten ein Volumen von 3,5 ml. Über einen temperierten Wasserkreislauf war es möglich, die Versuchstemperatur der Badlösung konstant auf 37 °C zu halten. Zum Lösungsaustausch und zur Zugabe von Wirkstoffen befand sich an der Oberseite jeder Kammerhälfte ein Zugang. An der unteren Kammerseite sorgten zwei Gasfritten dafür, dass das Gewebe ausreichend mit Carbogen versorgt und der pH-Wert der Lösungen konstant auf 7,4 gehalten werden konnte. Unter diesen Bedingungen können die epithelialen Funktionen 6 Stunden aufrecht erhalten werden. Innerhalb dieser Versuchszeit sind elektronenmikroskopisch keine Veränderungen der Gewebemorphologie zu erkennen (Diener et al. 1989).

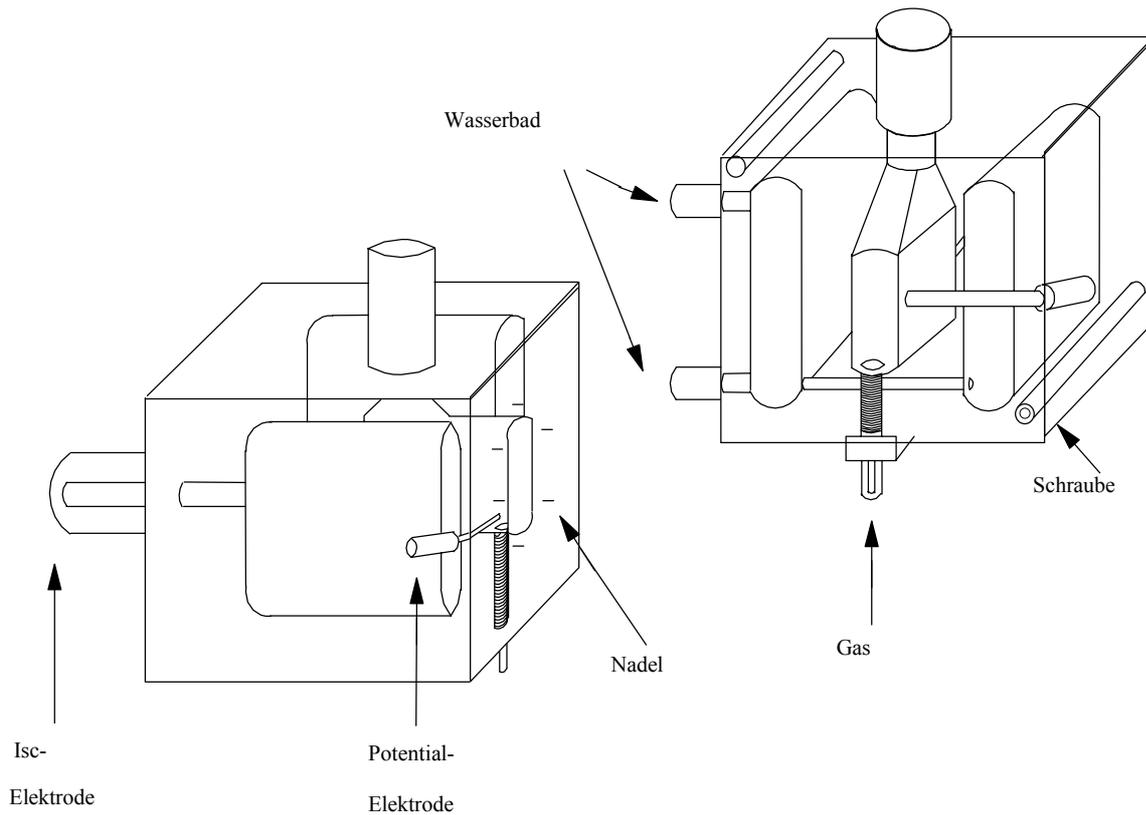


Abb. II 7: Schema einer modifizierten Ussingkammer, bestehend aus zwei Plexiglashälften.

9.2 Elektrophysiologisches Messprinzip

Ussing und Zerahn (1951) entwickelten ein System zur Erfassung transepithelialer Potentialdifferenzen. In diesem System wird das Gewebe als ein elektrischer Widerstand betrachtet, so dass zur Messung der transepithelialen Potentialdifferenz ein Ersatzschaltkreis aufgestellt werden kann (Abb. II 8).

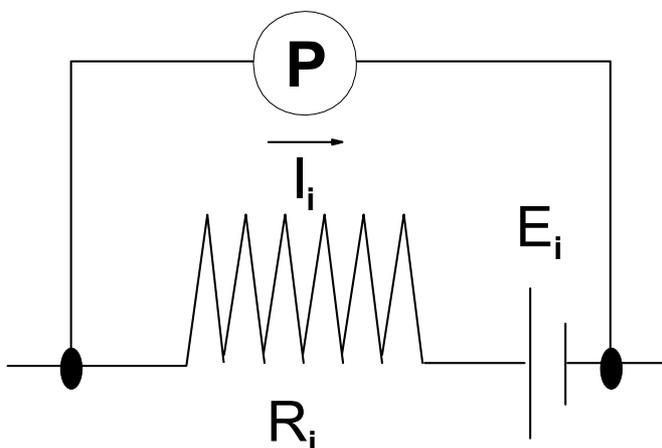


Abb. II 8:

Prinzip der Erfassung elektrogener Ionenverschiebungen anhand eines elektrischen Schaltkreismodells.
 P =Potentialdifferenz,
 E_i =elektromotorische Kraft,
 I_i =Ionenfluss, R_i = Widerstand.

Zur Zeit der Entwicklung dieser Technik setzte man ein Potentiometer und eine manuell regelbare Batterie ein. Inzwischen wird das System über einen Computer gesteuert. Hierzu wurde das Programm WinClamp (Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland) eingesetzt. Mit Hilfe der verwendeten Messeinrichtung ließen sich transepitheliale Potentialdifferenz (PD_T ; „T“ = Tissue), Gewebeleitfähigkeit (G_T = Kehrwert des Widerstandes) und der Kurzschlussstrom (I_{sc}) erfassen bzw. beeinflussen. Um die Parameter messen zu können, befand sich die Agarbrücke, die mit einem Elektrodenpaar (Ag/AgCl-Elektroden) verbunden war, nur ca. 1 mm vom eingespannten Gewebe entfernt. Es war notwendig, dass der Abstand der Messelektroden zum Gewebe so gering war, um einen Potentialabfall durch den Lösungswiderstand sehr gering zu halten. Ein zweites Elektrodenpaar (Ag/AgCl-Elektroden) diente der Stromapplikation. Dieses Paar war möglichst weit vom Gewebe entfernt angebracht, um eine gleichmäßige Stromdichte zu erzeugen. Beide Elektrodenpaare wurden über eine Agarbrücke (5 % Agar in Parsons-Lösung) mit der Messkammer verbunden.

Die Messeinrichtung konnte je nach gewünschten Versuchsbedingungen unterschiedlich eingestellt werden (Abb. II 9). Man unterscheidet zwischen:

- Open-circuit-Modus
- Voltage-clamp-Modus

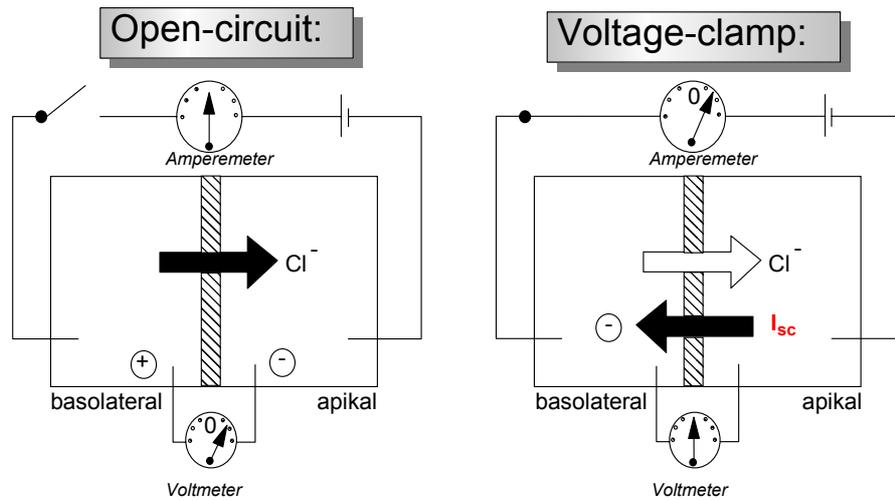


Abb. II 9: Durch spontane Chloridsekretion entwickelt sich eine transepitheliale Potentialdifferenz, die als treibende Kraft für weitere Ionenbewegungen dient. Im voltage-clamp-Modus wird dieser Gradient durch einen von außen angelegten Strom aufgehoben. I_{sc} = Kurzschlussstrom.

Unter den Bedingungen des **open-circuit-Modus** wird die transepitheliale Potentialdifferenz direkt gemessen. Nach dem Einspannen des Gewebes in die Ussingkammer wurden zuerst open-circuit-Bedingungen vorgegeben, um dem Gewebe die Möglichkeit zu geben, unbeeinflusst wieder zu Gleichgewichtsbedingungen zu finden. Das eingespannte Kolongewebe sezerniert spontan Anionen, insbesondere Cl^- und HCO_3^- (Strabel & Diener 1995). Dadurch entsteht eine Potentialdifferenz, bei der die Serosaseite gegenüber dem Lumen positiv geladen ist. Nach ca. einer Minute wurden dem Gewebe **voltage-clamp-Bedingungen** vorgegeben. Die „Spannungsklemme“ bietet die Möglichkeit, das transepitheliale Potential PD_T durch Einspeisen eines Stromes auf bestimmte Werte einzustellen. Dadurch lassen sich die elektrophysiologischen Bedingungen für den Ionentransport verändern. Eine besondere Form des Voltage-clamps stellt der **short-circuit-Modus** dar. Hierbei wird das PD_T auf 0 mV geklemmt, wobei der hierzu notwendige Strom als Kurzschlussstrom (I_{sc}) bezeichnet wird. Der I_{sc} entspricht in seiner Größe also der

Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen an diesem Epithel. Unter diesen Versuchsbedingungen herrscht kein elektrischer Gradient. Bei Verwendung identischer Pufferlösung auf beiden Seiten des Gewebes besteht auch kein chemischer Gradient für Ionenbewegungen durch das Gewebe. Lässt sich unter diesen Voraussetzungen ein Nettotransport für ein Ion ermitteln, bedeutet das, dass es sich um einen aktiven oder sekundär aktiven Transportvorgang handelt. Ein positiver I_{sc} zeigt dabei einen Netto-Anionentransport von der serosalen zur mucosalen Epithelseite bzw. einen Netto-Kationentransport in umgekehrte Richtung an. Der Strom wird in $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ angegeben, was gleichbedeutend ist mit dem Transport eines einwertigen Ions pro Zeit und Fläche, mit: $1\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Die Versuche dieser Arbeit wurden unter short-circuit-Bedingungen durchgeführt. Während der Messung im voltage-clamp-Modus wirken Strompulse mit einer Amplitude von $\pm 50 \mu\text{A}$ für eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe ein. Aus der resultierenden Potentialänderung lässt sich mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes [Spannung (U) = Widerstand (R)·Strom (I)] der Gewebewiderstand errechnen. Die Gewebeleitfähigkeit G_T entspricht dem reziproken Wert des Widerstandes.

Mit $R_T = U/I$ ergibt sich für sie also $G_T = I/U$. Die Gesamtleitfähigkeit stellt die Summe aller Einzelleitfähigkeiten dar (Scheffler 1984).

9.3 Datenerfassung und Versuchsablauf

Unter short-circuit-Bedingungen wurde zur Stabilisierung des G_T eine Äquilibrierungszeit von 60 Minuten eingehalten. Die Messwerte von PD_T , I_{sc} und G_T wurden über den Computer alle 6 Sekunden erfasst und gespeichert. Am Ende des Versuchs wurden die Minutenwerte ausgedruckt, parallel dazu wurden die Daten in ein Tabellen-Kalkulations-Programm exportiert (Lotus, 1-2-3).

Die Basallinie (Kurzschlussstrom unter basalen Versuchsbedingungen) wurde aus den letzten drei Minutenwerten vor der Substanzzugabe gemittelt. Als Peak wird der höchste Wert nach Substanzzugabe bezeichnet.

Eine Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Sekretion wurde mit dem stabilen Acetylcholinderivat Carbachol ausgelöst. Es wurde eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ gewählt, die einen maximalen Anstieg des I_{sc} auslöst (Diener et al. 1989).

Indometacin wurde in einer Versuchsserie eingesetzt um die endogene Produktion von Prostaglandinen zu hemmen. Die eingesetzte Konzentration betrug $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Bridges & Rummel 1983). Prostaglandine können zum einen direkt zu einer Cl^- -Sekretion führen, zum anderen über die Stimulation sekreto-motorischer Neurone (Binder & Sandle 1994). Daher wurde das Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) eingesetzt, um die Beteiligung von enteralen Neuronen an der Induktion eines I_{sc} zu untersuchen. TTX wurde in einer Konzentration von $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt (Andres et al. 1985).

10 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: *Polymerase chain reaction* = PCR) wurde 1983 von Kary B. Mullis (Mullis 1990) entwickelt. Diese Nukleinsäure-Analysetechnik hatte gegenüber den bis dahin bekannten Techniken den Vorteil, dass über eine Vervielfältigung des gewünschten Nukleinsäureabschnittes (sog. *Targetamplifikation*) eine sehr hohe Sensitivität erlangt werden konnte. Für die DNA-Vervielfältigung wird ein Enzym, die DNA-Polymerase, genutzt. Um die Reaktion starten zu können, wird ein kurzes DNA-Startermolekül (Primer) benötigt. Dieses lagert sich an die Matrizen-DNA an (= Annealing) und wird durch die DNA-Polymerase entsprechend verlängert. Ein zweiter Primer ist komplementär zu einem Abschnitt des Gegenstranges der DNA und dient der Synthese des zweiten DNA-Stranges. In jedem Zyklus der PCR wächst somit die Anzahl der Zielmoleküle exponentiell. Damit das Annealing stattfinden kann, müssen die DNA-Doppelstränge durch Hitze getrennt werden. Um die Aktivität der DNA-Polymerase in diesem Schritt nicht durch Denaturierung zu beeinträchtigen, nutzt man hitzebeständige Polymerasen aus thermophilen Bakterien. Die am häufigsten verwendete Polymerase ist die *Taq*-

DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, das aus den heißen Quellen des Yellowstone-Nationalparks isoliert wurde. In Abb. II 10 ist der Verlauf einer PCR schematisch dargestellt.

In dieser Arbeit wurde die PCR genutzt, um im Kolonepithel der Ratte einen bisher nur funktionell dargestellten Austauscher, den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Seip et al. 2001), auch molekularbiologisch nachzuweisen.

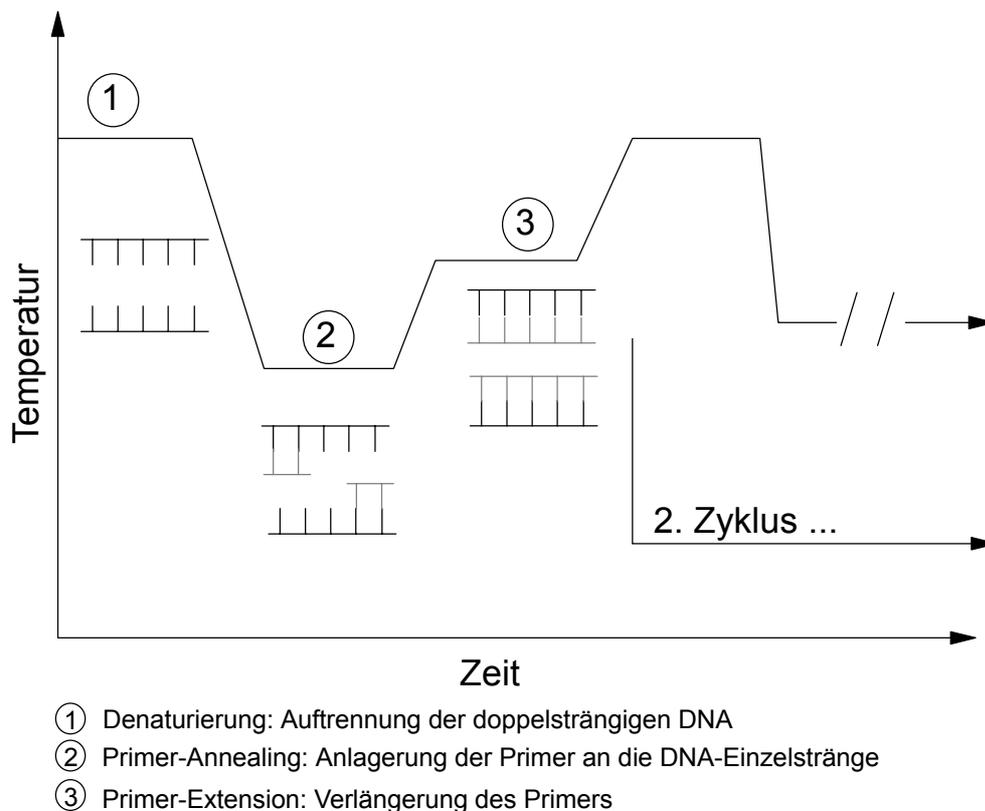


Abb. II 10: Temperaturverlauf einer Polymerase-Kettenreaktion. Pro PCR-Zyklus wird die Anzahl der Zielmoleküle verdoppelt.

10.1 Isolation von Gesamt-RNA und mRNA

Zur RNA-Isolation wurden die Proben der Kontrollgewebe (Herz, Gehirn) kurz nach dem Töten der Ratte entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Epithelzellen des Darmes ohne Verunreinigung aus den tiefer liegenden Gewebsschichten zu erhalten, wurden, wie für die Fura-2-Experimente beschrieben, isolierte Krypten gewonnen. Diese wurden durch Zentrifugation (5 min bei 300·g)

angereichert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Aus dem Gewebe bzw. den Zellen wurde dann mit Hilfe des RNeasy Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) Gesamt-RNA gewonnen. Aus dieser Gesamt-RNA wurde ebenfalls mit einem Kit der Firma Qiagen (OligotexTM Kit) die polyadenylierte mRNA (= Poly-A⁺-RNA) isoliert und bis zum Umschreiben in komplementäre DNA (= cDNA) bei -20 °C gelagert.

10.2 Qualitätsanalyse der RNA

Zur Analyse der RNA-Qualität wurde die isolierte Gesamt-RNA auf ein denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel (1 g Agarose in 100 ml denaturierendem Puffer; s. Kap. II 2.4) aufgetragen. Ansteigende RNA-Probenvolumina (1 µl; 2 µl; 5 µl) wurden mit einem Farbstoffgemisch auf 10 µl ergänzt, bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte in denaturierendem Laufpuffer (s. Kap. II 2.4) bei ca. 120 V, für ca. 30 Minuten.

10.3 Bestimmung von Menge und Reinheit der Gesamt-RNA

Vor der mRNA-Isolation wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Firma Biorad, München, Deutschland) die Konzentration der Gesamt-RNA bestimmt. Es wurde die Absorption bei 260 nm (A_{260}) gemessen, wobei eine Einheit gleichbedeutend mit einer Konzentration von 33 µg RNA·cm⁻¹ war (Lottespeich & Zorbas 1998). Proben, bei denen die Messwerte unter 0,1 lagen, wurden nicht weiter verwertet. Um die Reinheit der RNA zu bestimmen wurde das Verhältnis aus den Messwerten bei 260 nm und bei 280 nm gebildet (A_{260}/A_{280}). Eine reine RNA hat einen A_{260}/A_{280} Verhältniswert von 1,9-2,1 in 10 mmol·l⁻¹ Tris bei einem pH von 7,5 (Lottespeich & Zorbas 1998; nach Angaben des Rneasy[®] Mini Handbook der Firma Qiagen).

10.4 cDNA-Synthese

Um die gewonnene Poly-A⁺-RNA in komplementäre cDNA umzuschreiben, wurde eine rtPCR (rt = reverse Transkription) durchgeführt. Die Menge der Poly-A⁺-RNA wurde nicht photometrisch bestimmt um kein Probenmaterial zu verbrauchen. Für die reverse Transkription von Poly-A⁺-RNA werden T₁₅-Primer verwendet. Sie bestehen aus 15 Thymidylat-Resten, die mit dem Poly-A⁺-Schwanz der mRNA DNA/RNA-Heterohybride bilden. Da die Konzentration der Poly-A⁺-RNA in der Regel sehr niedrig ist, wurde immer die maximale Probenmenge eingesetzt (15,1 µl). Die Probe wurden mit 2,0 µl T₁₅-Primer (Konzentration: 0,5 mg·ml⁻¹) für 5 Minuten bei 70 °C in einem Thermomischer (Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland) präinkubiert, um eine Anlagerung des Primers zu ermöglichen. Nach dieser Präinkubation wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt, bis der restliche Reaktionsansatz zum RNA/Primer-Gemisch gegeben wurde (s.u.).

2,00 µl	T ₁₅ -Primer (0,5 mg·ml ⁻¹)
15,10 µl	Poly-A ⁺ -RNA
5,00 µl	5xPuffer ^①
1,25 µl	dNTP-Mix (10 mmol·l ⁻¹)
0,65 µl	RNAsin (40 u·µl ⁻¹)
1,00 µl	reverse Transkriptase (200 u·µl ⁻¹)

Tab. II 1: Reaktionsansatz zur reversen Transkription von Poly-A⁺-RNA

Der gesamte Ansatz wurde dann für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert. Die resultierende cDNA wurde 1:10 mit RN-ase freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

^① Vom Hersteller der reversen Transkriptase mitgeliefert.

10.5 Polymerasekettenreaktion

Nach der RNA-Isolation und der Synthese von cDNA wurden die Proben mittels der oben beschriebenen PCR auf die Existenz eines für den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher kodierenden Nukleinsäureabschnittes untersucht. Die Reaktionen wurden wie in Tab. II 2 angegeben zusammengestellt.

17,0 µl	cDNA ^②
1,0 µl	Primer (3' → 5')
1,0 µl	Primer (5' → 3')
2,5 µl	10xPuffer ^③
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mmol·l ⁻¹)
1,0 µl	dNTP-Mix (10 mmol·l ⁻¹)
1,0 µl	Taq DNA Polymerase (rekombinant ; 1u·µl ⁻¹)

Tab. II 2: Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion

Es wurden Primer für den Nachweis der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher-mRNA eingesetzt. Zur Kontrolle wurden auch Primer zum Nachweis der ubiquitär vorkommenden Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-mRNA (= GAPDH) verwendet. Die PCR wurde dann mit Hilfe eines Thermocyclers (Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Über eine integrierte Software konnte der Ablauf der PCR programmiert werden. In Tab. II 3 ist das verwendete Programm aufgeführt.

^② Je nach Konzentration der ursprünglichen RNA Probe wurde die Menge der eingesetzten cDNA variiert. Wurden weniger als 17,0 µl cDNA eingesetzt, wurden diese mit RN-ase freiem Wasser auf 17 µl ergänzt.

^③ Vom Hersteller der Taq-DNA-Polymerase mitgeliefert.

1. Zyklus			2.-11. Zyklus			12.-32. Zyklus		
Denaturierung	94 °C	5 min	Denaturierung	94 °C	1 min	Denaturierung	94 °C	1 min
Primer-Annealing	50 °C	30 s	Primer-Annealing	50 °C	30 s	Primer-Annealing	48 °C	30 s
Primer-Extension	72 °C	1 min	Primer-Extension	72 °C	1 min	Primer-Extension	72 °C	1 min

Tab. II 3: Darstellung eines PCR-Protokolles. In den ersten 11 Zyklen wird eine höhere Annealing Temperatur gewählt, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. In den nachfolgenden Zyklen wird diese Temperatur vermindert, um eine höhere Ausbeute zu.

10.6 Gelelektrophorese

Die PCR-Amplifikate wurden mittels Elektrophorese auf einem Agarosegel (1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer) aufgetrennt. Die Proben wurden mit einem Farbstoff gemischt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V und dauerte 20 bis 30 min. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid (10^{-5} mmol·l⁻¹ in Aqua dest.) gefärbt, so dass die DNA-Banden mittels Fluoreszenzlicht (Anregungswellenlänge 312 nm) sichtbar gemacht werden konnten. Die Dokumentation erfolgte digital mit Hilfe des Windows-Programms „Phoretix Grabber“, das mit einem Geldokumentationssystem der Firma Biostep (Erzg., Deutschland) gekoppelt war.

11 Statistik

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

Vor jedem statistischen Vergleich zweier unabhängiger Versuchsreihen wurde ein F-Test durchgeführt. Danach wurden entsprechend mit einem nicht parametrischen

(Mann-Whitney-U-Test) oder mit einem ungepaarten Students-t-Test die Signifikanzen ermittelt. Wurden Daten einer Versuchsserie verglichen, fand der gepaarte Students-t-Test Anwendung. Das gewählte Signifikanzniveau betrug jeweils 5 % ($p < 0,05$). Die Berechnungen erfolgten mittels einer Statistik Software (Dataxiom Software Inc, Statmost 3,5 for Windows 95/NT)

III Ergebnisse

1 **Beeinflussung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers durch Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher**

In einer ersten Serie von Experimenten wurde die Empfindlichkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher gegenüber Blockern der sarkoplasmatisch-endoplasmatischen-Retikulum Ca^{2+} -ATPase (= SERCA), welche als Ca^{2+} -Pumpe die intrazellulären Speicher aktiv befüllt, untersucht. Eine SERCA-Blockade verhindert die Wiederbefüllung der intrazellulären Speicher mit Ca^{2+} und führt so indirekt zu einer langsamen Speicherentleerung. Das pflanzliche Alkaloid Thapsigargin wurde Ende der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts aus der Pflanze *Thapsia garganica* isoliert und als SERCA-Blocker entdeckt (Takemura et al. 1989). Später konnte der Thapsigargin-Effekt auch durch andere Substanzen wie Cyclopiazonsäure (CPA) und 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinon (BHQ) nachgeahmt werden (Mason et al. 1991; Parekh & Penner 1997).

An isolierten Krypten aus dem Kolon der Ratte konnte durch die oben aufgeführten Wirkstoffe ein Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses ausgelöst werden (Abb. III 1), was deren Wirksamkeit als SERCA-Blocker nahe legt. Alle verwendeten Blocker waren in etwa gleich stark wirksam. In parallel durchgeführten Ussingkammer-Experimenten wirkte der SERCA-Blocker CPA am deutlichsten (Daten nicht gezeigt), weswegen in den weiterführenden Untersuchungen ausschließlich CPA zur SERCA-Blockade, also zur Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, verwendet wurde.

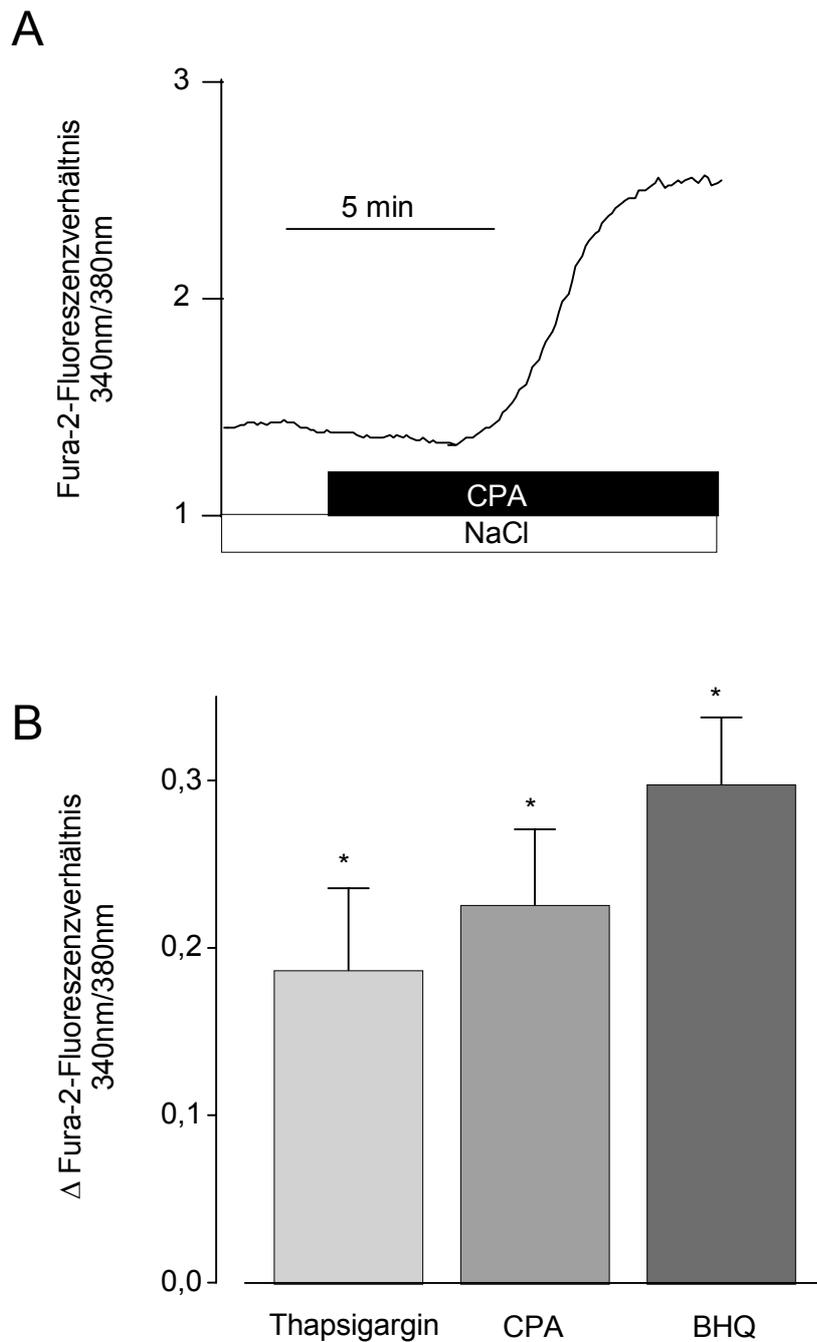


Abb. III 1A: Die Blockade der SERCA, hier mit Cyclopiazonsäure (CPA; 10^{-5} mol·l $^{-1}$), führt zu einem Anstieg des intrazellulären Ca $^{2+}$ -Spiegels. Dieser Anstieg spiegelt sich in einem Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses wider. Der Original-Kurvenverlauf ist repräsentativ für n = 6. **B:** Alle eingesetzten SERCA-Blocker führen zu einem Anstieg des intrazellulären Ca $^{2+}$ -Spiegels; hier angegeben als Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses über die Grundlinie vor Zugabe des Inhibitors (Δ Ratio). Für jeden Inhibitor gilt n = 6. Thapsigargin (10^{-6} mol·l $^{-1}$), BHQ = 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinon (10^{-5} mol·l $^{-1}$). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM; * = P < 0,05 (paariger t-Test) vs. Basallinie vor Zugabe des Inhibitors.

In den folgenden Versuchen wurde getestet, inwieweit die Speicherentleerung einen Einfluss auf die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers hat. Um eine Aktivität des Austauschers mittels Ca^{2+} -Imaging bestimmen zu können, muss die Arbeitsrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers umgekehrt werden, so dass er Ca^{2+} in die Zelle transportiert und einen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses bewirkt. Dadurch, dass der Austauscher nahe seines Umkehrpotentials arbeitet (Blaustein & Lederer 1999), kann eine solche Richtungsumkehr durch Superfusion mit einer Na^+ -freien Tyrode, in der Na^+ äquimolar durch das impermeable Kation N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt wird, bewirkt werden (Seip et al. 2001). In Kontrollexperimenten konnte auf diese Weise das basale Fura-2-Fluoreszenzverhältnis um $0,55 \pm 0,12$ erhöht werden (Abb. III 2 und 4). Wie von Seip et al. (2001) gezeigt, lässt sich dieser Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses komplett durch einen Blocker des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers wie z.B. Dihydrochlorobenzamil unterdrücken. Wurde die Arbeitsrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers umgekehrt, nachdem eine Speicherentleerung durch CPA stattgefunden hatte, so war der resultierende Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses deutlich geringer als im Kontrollexperiment ($0,023 \pm 0,85$; Abb. III 3 und 4).

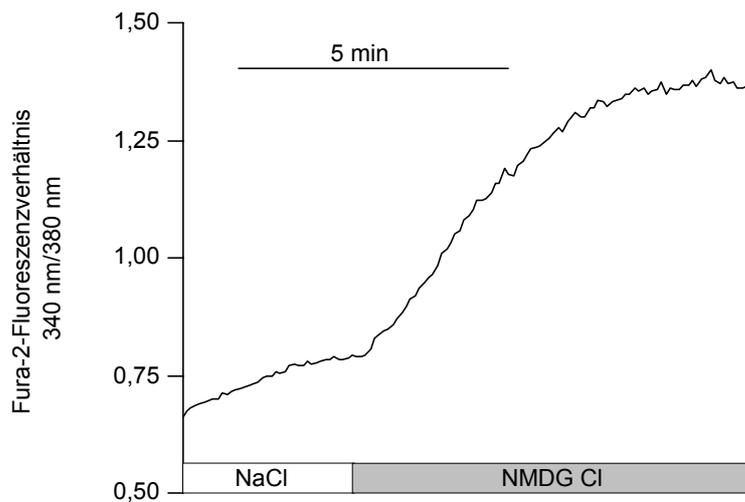


Abb. III 2: Durch Umkehr des Na^+ -Gradienten (Superfusion mit einer Na^+ -freien Tyrode, in der Na^+ äquimolar durch das impermeable Kation N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt wird) wird der Arbeitsmodus des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers so verändert, dass er Ca^{2+} in die Zelle transportiert. In der Originalaufzeichnung ist das durch einen Anstieg des Fura-2 Fluoreszenzverhältnis zu erkennen. (Statistik s. Abb. III 4).

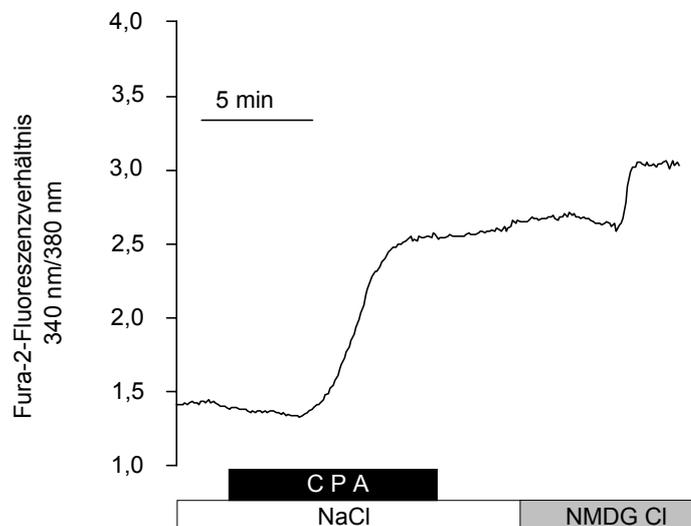


Abb. III 3: Wie im Kontrollexperiment wurde auch hier die Arbeitsrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers durch eine Na^+ -freie Superfusion verändert. In dieser Lösung wurde Na^+ äquimolar durch das impermeable Kation N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt. Die vorherige Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch Cyclopiazonsäure (CPA; $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) führt in diesem Experiment aber zu einer Verminderung des durch NMDG-Cl ausgelösten Änderung des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses (Statistik s. Abb. III 4).

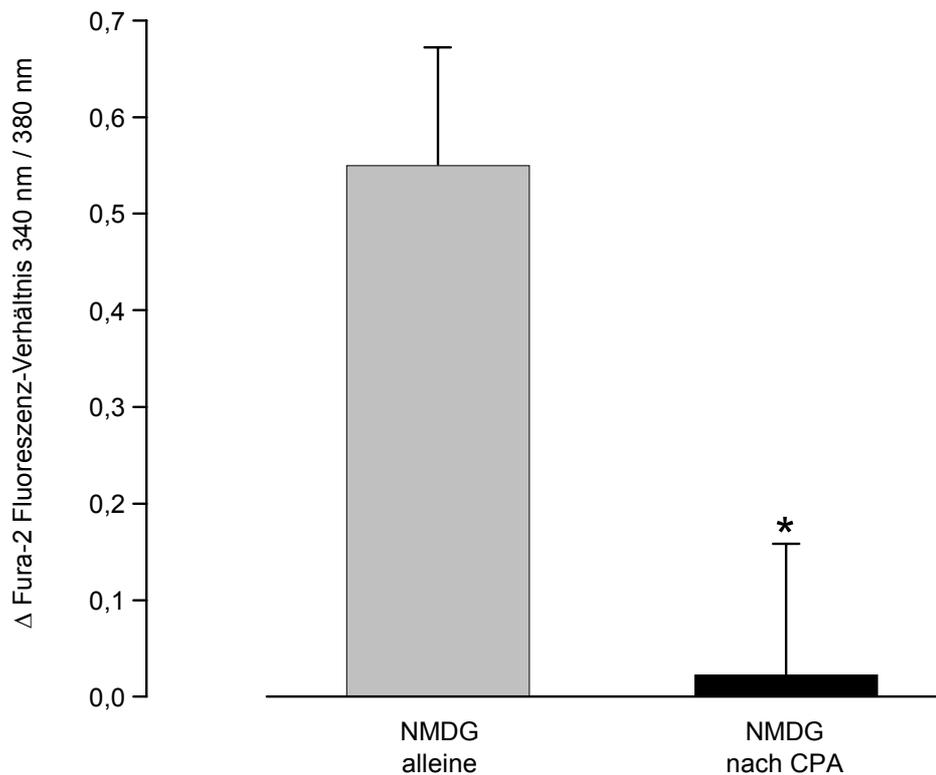


Abb. III 4: Anstieg im Fura-2-Fluoreszenzverhältnis gegenüber der Basallinie durch NMDG-Cl Tyrode (nach 5 min) mit (schwarzer Balken, $n = 5$) und ohne (grauer Balken, $n = 9$) vorherige Speicherentleerung durch Cyclopiazonsäure (CPA; 10^{-5} mol \cdot l $^{-1}$). * = $P < 0,05$ CPA vorbehandelt vs. ohne CPA; unpaariger Students-t-Test.

Auf den ersten Blick erscheint es so, als würden die entleerten Ca^{2+} -Speicher einen hemmenden Einfluss auf den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ausüben. Die bisher eingesetzte Methode erfasst aber lediglich Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration; sie erlaubt keinen Rückschluss, ob der Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum oder durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern verursacht wurde. Zur direkten Bestimmung der Eintrittsrate divalenter Kationen eignet sich die Mangan-Quench-Methode (Xu et al. 1994; Trepakova et al. 1999). Als divalentes Kation wird Mangan wie Ca^{2+} an Fura-2 gebunden. Hat Fura-2 allerdings einen Chelatkomplex mit Mn^{2+} gebildet, verliert es seine fluoreszierenden Eigenschaften; es kommt also zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals (sog. Quench). Um die Mangan-Einstromrate unabhängig von der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration messen zu können, wurde bei diesen Versuchen eine Exzitationswellenlänge von 360 nm (isoemissiver Punkt; s. Abb. II 3) gewählt, dementsprechend wurden keine Verhältniswerte gebildet. Wie bereits im Kapitel II 8 beschrieben, ist das Emissionssignal bei 360 nm, dem isoemissiven Punkt, unabhängig vom intrazellulären Ca^{2+} .

Die Bestimmung der Quench-Rate wird in Abb. III 5 verdeutlicht: Wird Mangan in das Superfusionsmedium gegeben sinkt die Fluoreszenzintensität, die bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm gemessen wird – es findet also ein Quench des Fura-2-Signals durch Mangan statt. Die Quench-Rate ist gleichzusetzen mit einem Abfall des Fluoreszenzverlaufs.

Um die Quench-Rate zu bestimmen wurde das Fluoreszenzsignal mit einer Sammelrate von 0,2 Hz gemessen und als Graph aufgezeichnet. Die Steigung der Kurve wurde anschließend durch Differenzierung für jeden Messpunkt bestimmt. Als maximale Quench-Rate wird der maximale Abfall innerhalb des untersuchten Kurvenabschnittes bezeichnet.

Wird Mangan in das Perfusionsmedium gegeben, sinkt das Fura-2-Signal, das bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm gemessen wird, mit einer Rate von – $2,5 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ (Abb. III 5; n = 6).

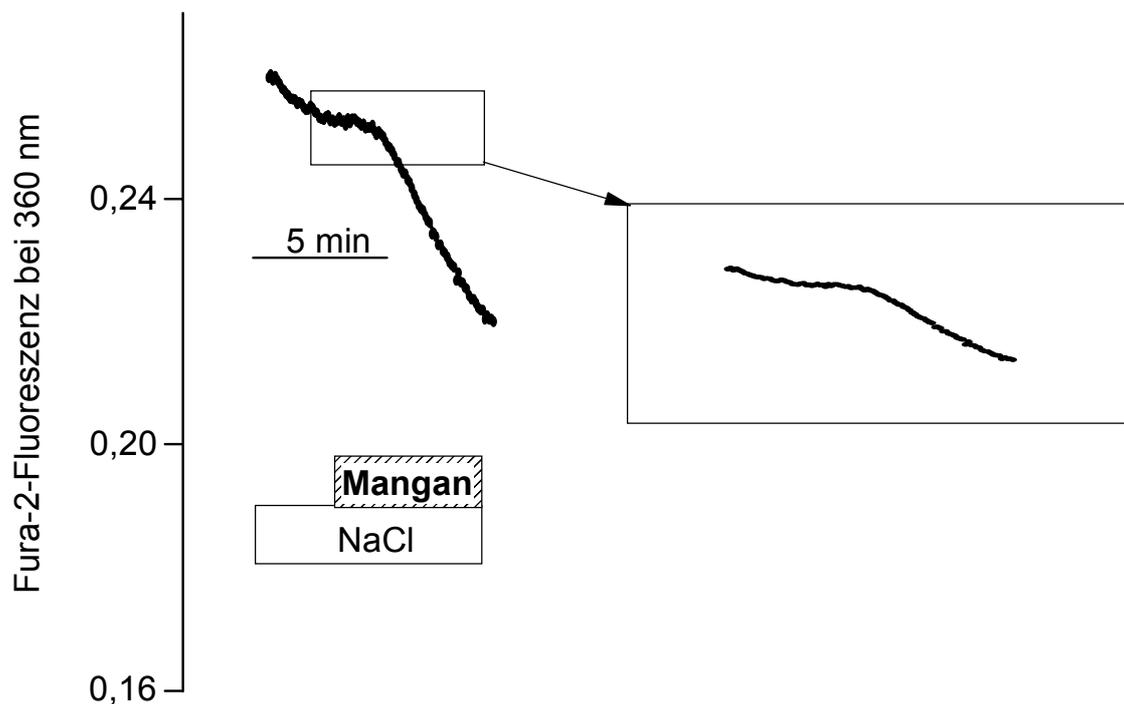
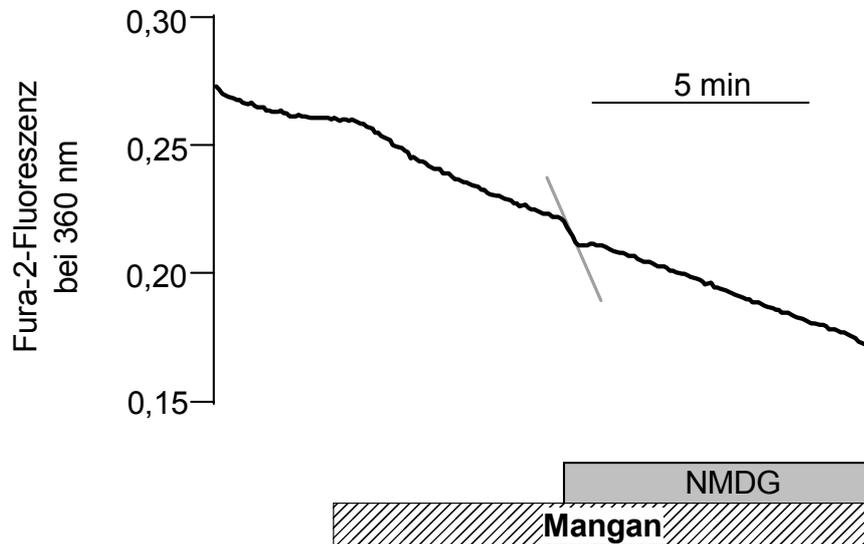


Abb. III 5: Mangan ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; gestreifter Balken) bindet intrazellulär an Fura-2. Der resultierende Chelatkomplex ist nicht fluoreszierend, wodurch es nach Mn^{2+} -Einstrom zu einem Absinken des Fura-2-Signals kommt. Das wird in der Vergrößerung noch einmal verdeutlicht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kurve bei Mangan Zugabe deutlich gegenüber der vorherigen Basallinie abfällt. Die Messung erfolgt unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm.

Wurde die Arbeitsrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers durch die Gabe einer Na^+ -freien Lösung umgekehrt, stieg die Quench-Rate nach ca. 20 Sekunden um das etwa zehnfache an ($-2,3 \cdot 10^{-2} \pm 5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) ($n = 6$, $P < 0,05$ gegen den Mangan-induzierten Quench ohne NMDG^+ , paariger Students-t-Test; Abb. III 6A). Dieser Effekt wurde nicht durch eine vorherige SERCA-Blockade beeinflusst. In Anwesenheit des Blockers CPA stieg die NMDG^+ -induzierte Quench-Rate auf einen Wert von $-3,2 \cdot 10^{-2} \pm 8 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (Abb. III 6B; $n = 8$, $P > 0,05$ versus NMDG^+ -induzierten Quench in Abwesenheit von CPA). Eine Verminderung der Austauscheraktivität nach Speicherentleerung liegt also nicht vor.

A



B

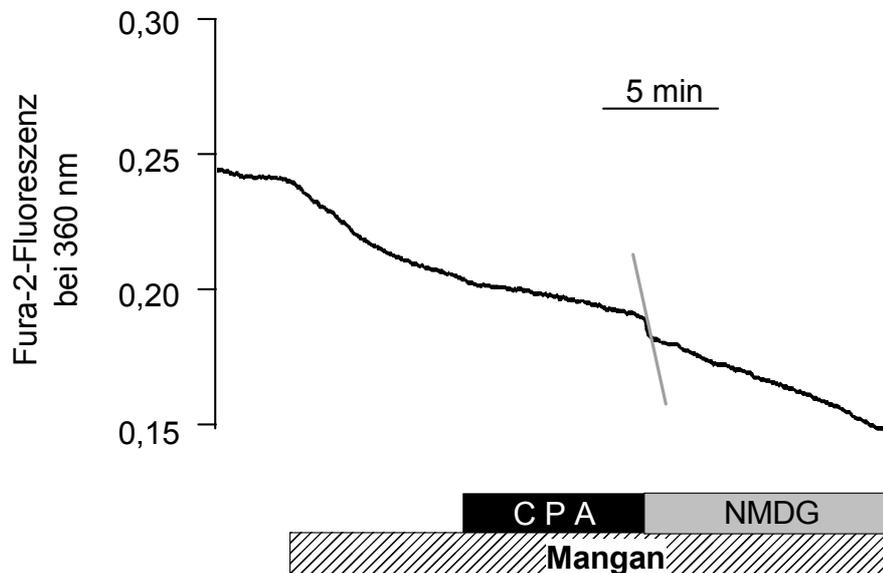


Abb. III 6A: Durch die Gabe einer Na^+ -freien $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NMDG-Cl-Tyrode Lösung wird der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in seiner Arbeitsrichtung umgekehrt. Das extrazellulär angebotene Mn^{2+} wird über den Austauscher anstelle von Ca^{2+} in die Zelle transportiert. Durch die Gerade wird angezeigt, dass die Quench-Rate innerhalb kurzer Zeit steigt. **B:** Eine vorherige Speicherentleerung durch SERCA-Blockade verändert die Stärke des NMDG^+ -induzierten Quenchs nicht; Statistik siehe Text.

2 Einfluss von Ryanodin auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel

Offensichtlich ist eine Hemmung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers nicht für die verminderte Austauscherantwort, d.h. für den verminderten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, auf Na^+ -freie Lösung verantwortlich. Die beobachtete Sensitivität gegenüber einer SERCA-Blockade könnte aber auch folgende Ursache haben: Durch einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nach der Austauscher-Umkehr könnte ein positiver Rückkopplungs-Mechanismus für Ca^{2+} , ein sogenannter Ca^{2+} -induzierter Ca^{2+} -Release (CICR), ausgelöst werden. Ryanodin, ein Alkaloid aus der Pflanze *Ryana speciosa*, wirkt als Agonist an Ca^{2+} -sensitiven intrazellulären Ca^{2+} -Kanälen (Coronado et al. 1994). Aus der Literatur ist eine stimulierende oder hemmende Wirkung von Ryanodin, abhängig von der Konzentration, auf den CICR bekannt (Hwang & van Breemen 1987; Coronado et al. 1994; Sorrentino 1995; Franzini-Amstrong & Protasi 1997; Ozawa 2001).

Um eine mögliche konzentrationsabhängige Wirkung von Ryanodin an Kolonkrypten feststellen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Ryanodin-Konzentrationen im Bereich von 10^{-7} bis $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingesetzt. Bei kumulativer Gabe führte Ryanodin in allen getesteten Konzentrationen (zwischen 10^{-7} und $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (Abb. III 7A). Aus diesen Versuchen kann also bis zu einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ keine Hemmung durch Ryanodin nachgewiesen werden.

In einer zweiten Versuchsserie wurde zur Überprüfung dieser Beobachtung direkt, d.h. ohne Vorstimulation durch niedrige Konzentrationen, eine hohe Konzentration an Ryanodin den Krypten appliziert. Erstaunlicherweise wurde dann aber kein Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beobachtet. Unter diesen Bedingungen führte die hohe Ryanodin-Konzentration sogar zu einem leichten Abfallen des intrazellulären Ca^{2+} (die Fura-2-Ratio sank um $-0,17 \pm 0,13$ innerhalb von 20 min, $n = 8$, $p > 0,05$

gegenüber der Basallinie). An dieser Stelle kann nur spekuliert werden, dass die hohe Ryanodin-Konzentration zu einer Blockade des CICR führt, solange keine vorherige Stimulation der Rezeptoren (wie bei der kumulativen Gabe) stattgefunden hat.

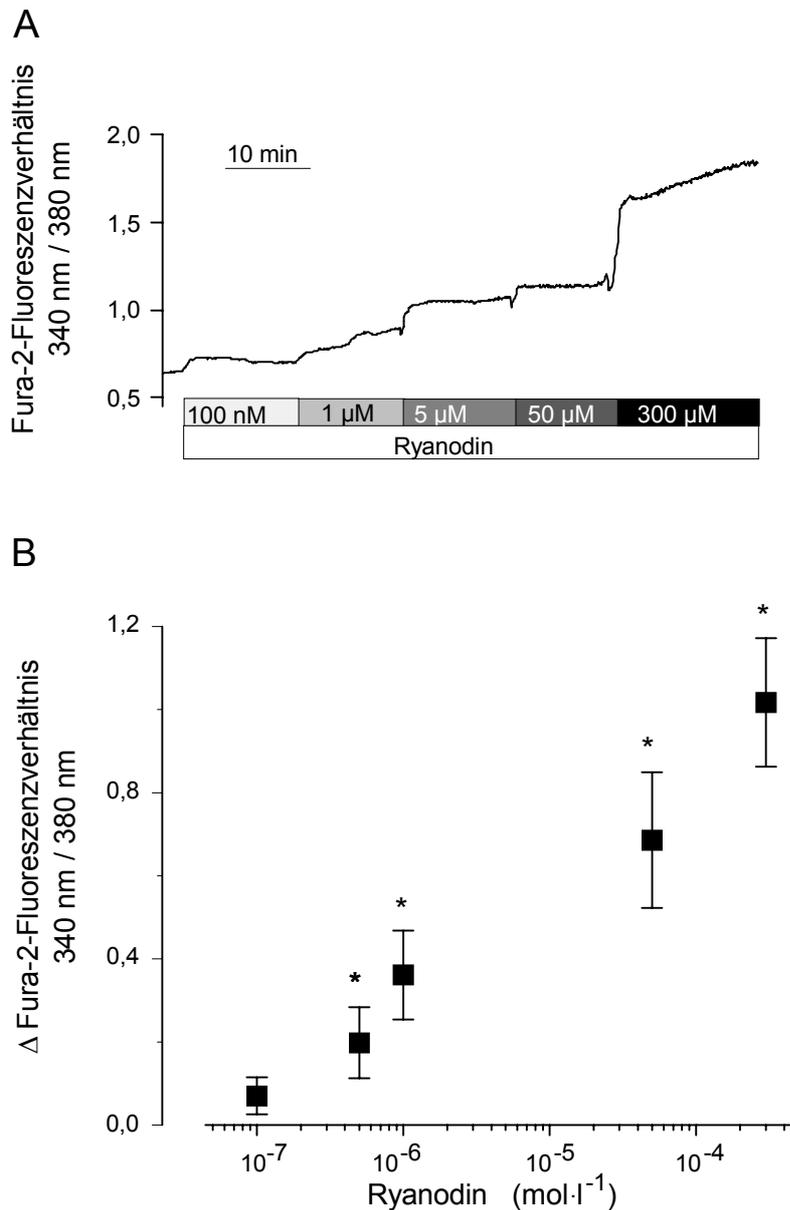


Abb. III 7 A: Bei kumulativer Gabe führen alle getesteten Ryanodin-Konzentrationen zu einem Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses (Originalkurvenverlauf; Bsp. für n = 8). **B:** Konzentrationsabhängiger Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses von Fura-2 (Δ Ratio) durch Ryanodin gegenüber der vorherigen Basallinie (dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, n = 8, * P < 0,05 versus Basallinie; paariger Students-t-Test).

Nachdem die Wirksamkeit von Ryanodin am Kolonepithel der Ratte gezeigt werden konnte, wurde in den weiterführenden Untersuchungen mit einer Ryanodin-Konzentration von $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ gearbeitet (Abb. III 8).

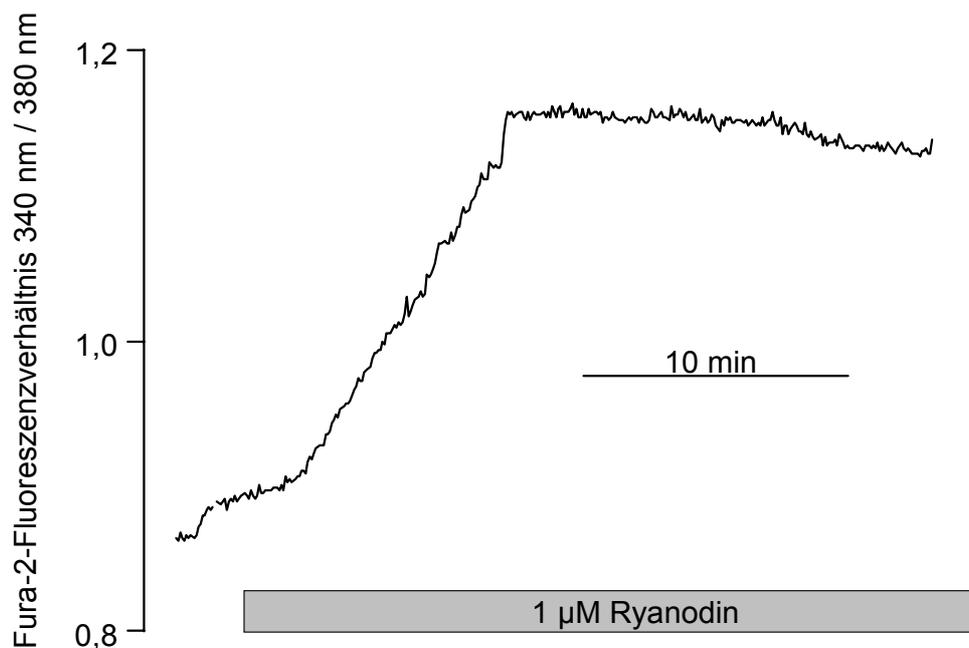


Abb. III 8: $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ryanodin führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Der dargestellte Kurvenverlauf ist repräsentativ für 6 Krypten. Statistik siehe Abb. III 9B.

Zum weiteren Beweis für die funktionelle Expression des Ryanodinrezeptors wurde ein bekannter Inhibitor der Ca^{2+} -sensitiven intrazellulären Ca^{2+} -Speichern, Ruthenium Rot (Sorrentino 1995; Franzini-Amstrong & Protasi 1997), eingesetzt. Ruthenium Rot wurde dem Superfusionsmedium in einer Konzentration von $5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zugesetzt. In Anwesenheit von Ruthenium Rot verursachte Ryanodin ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) keinen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses mehr (Abb. III 9).

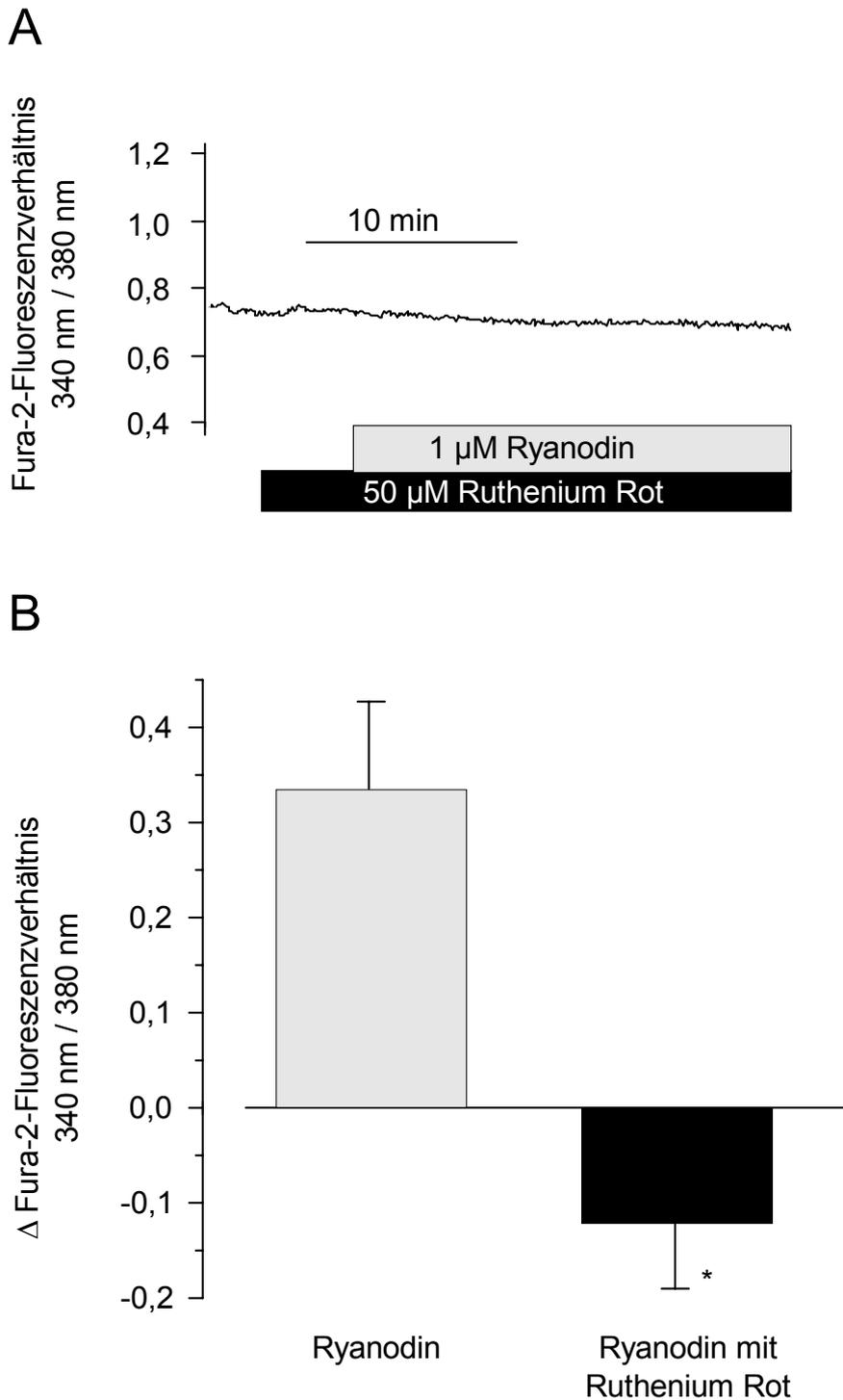


Abb. III 9A: In Anwesenheit von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Ruthenium Rot ist Ryanodin ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) nicht mehr in Lage einen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses zu bewirken (vergleiche hierzu Abb. III 8). **B:** Ryanodin-induzierter Anstieg der Fura-2 Ratio (Δ Ratio) ohne (grauer Balken) und mit Ruthenium Rot (schwarzer Balken); $n = 6$; * $P < 0,05$ gegenüber dem Anstieg in Abwesenheit von Ruthenium Rot; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3 Wirkung der Ryanodinrezeptor-Blockade auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel

In Kapitel III 1 wurde beschrieben, dass eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher die Antwort des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, der im Influx-Modus arbeitet, vermindert. Zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen kam die Überlegung auf, ob ein CICR als Verstärkermechanismus bei der Ca^{2+} -Antwort nach Umkehr des Austauschers beteiligt ist. Um dies zu überprüfen wurde erneut Ruthenium Rot als Blocker des CICR genutzt. Unter Kontrollbedingungen wurde durch die Na^+ -freie NMDG-Cl Tyrode Lösung ein Anstieg der Fura-2-Fluoreszenzratio von $0,55 \pm 0,12$ nach 5 min erzielt ($n = 9$). In Anwesenheit von Ruthenium Rot ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) betrug dieser Anstieg nur noch $0,11 \pm 0,04$ ($n = 5$, $P < 0,05$ gegenüber dem NMDG⁺-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in Abwesenheit von Ruthenium Rot; unpaariger Studentst-Test). Die Reaktion des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers scheint also durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern positiv verstärkt zu werden. In Abb. III 10 wird die Beeinflussung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch eine Umkehr des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers unter unterschiedlichen Bedingungen noch einmal zusammenfassend dargestellt.

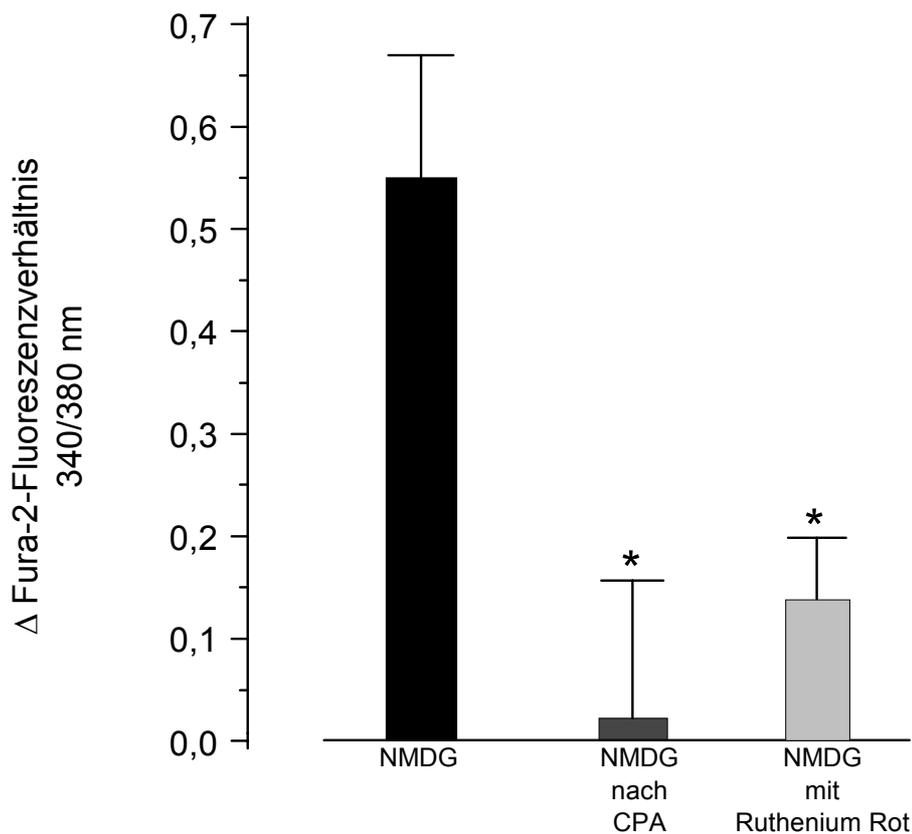


Abb. III 10: Unter Kontrollbedingungen führt eine Na^+ -freie NMDG-Cl-Tyrode Lösung durch Umkehr des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zu einem Anstieg des Fura-2 Fluoreszenzsignals (schwarze Säule). Nach einer Speicherentleerung durch CPA ist der durch Umkehr des Austauschers resultierende Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzsignals deutlich geringer (dunkelgraue Säule). Das Gleiche gilt, wenn Ryanodinrezeptoren durch Ruthenium Rot blockiert werden (hellgraue Säule); $n = 6 - 9$; * $P < 0,05$ gegen die Kontrolle; unpaariger Students-t-Test; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

4 Einfluss von Koffein auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel

Das Methylxantin Koffein wird ebenfalls als ein Verstärker des CICR angesehen (Sorrentino 1995). Es ist generell anerkannt, dass Koffein die Sensibilität des Ryanodinrezeptors gegenüber Ca^{2+} erhöht (Lee et al. 1995). Auch an isolierten Kolonkrypten war es möglich durch Koffein ($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zu bewirken. Dies spiegelte sich in dem Fura-2-Fluoreszenzverhältnis, das durch Koffein von einem Basalwert von $1,3 \pm 0,2$ auf ein Maximum von $1,7 \pm 0,2$ anstieg ($n = 10$; $P < 0,05$; paariger Students-t-Test).

5 Wirkung des physiologischen Ryanodinrezeptor Agonisten cADP-Ribose

Der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(NAD⁺)-Metabolit, zyklische ADP-Ribose (cADP-Ribose), ist als physiologischer Agonist an Ryanodinrezeptoren bekannt (Galione et al. 1991; Lee et al. 1995; Clementi et al. 1996; Lee 1999; Galione & Churchill 2000). Um die Wirkung von cADP-Ribose an Kolonkrypten der Ratte zu untersuchen, war es auf Grund der Molekülgröße (541,3 D) und der Struktur notwendig, die Zellen mittels Saponin (10 mg·l⁻¹) zu permeabilisieren (Schulz 1990). Dieses pflanzliche Glykosid wirkt als mildes nicht ionisches Detergenz. Durch eine Komplexbildung mit Membran-Cholesterol (und anderen unkonjugierten β -Hydroxysterolen) formt Saponin Poren, die für Moleküle bis zu 200 kD permeabel sind. Da durch diese Poren auch Fura-2 aus der Zelle austreten kann, ist es notwendig, auch im Superfusionsmedium freies Fura-2 (5·10⁻⁶ mol·l⁻¹) anzubieten, so dass die permeabilisierten Zellen nicht an dem Farbstoff verarmen können. Bereits vor der Permeabilisierung wurden die Zellen in einer intrazellulär-ähnlichen Lösung inkubiert; diese Lösung wurde auch in der restlichen Zeit des Versuches verwendet. Die Permeabilisierung selbst verursachte immer einen steilen Anstieg des Fura-2 Fluoreszenz-Verhältnisses. Diesem Anstieg liegt vermutlich die niedrige Ca²⁺-Puffer-Kapazität der intrazellulär-ähnlichen Lösung zugrunde (EGTA 0,1 mmol·l⁻¹). Für in-vitro Messungen wird von manchen Autoren eine millimolare Ca²⁺-Puffer Konzentration empfohlen, um das Fura-2 Signal nicht durch eine Ca²⁺-Kontamination der Lösung zu beeinflussen (Baylor & Hollingworth 2000). Da es bei einer EGTA-Konzentration im millimolaren Bereich nicht ausgeschlossen werden kann, dass es zu einer Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher kommt (Frings et al. 1999), wurde in den hier durchgeführten Versuchen eine 0,1 mmol·l⁻¹ EGTA-Lösung eingesetzt. Zugabe von cADP-Ribose (10⁻⁵ mol·l⁻¹) löste einen weiteren Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses aus (Abb. III 11). Innerhalb von einer Minute stieg das

Fluoreszenzverhältnis um $0,13 \pm 0,04$ ($n = 8$; $P < 0,05$, paariger Students-t-Test gegen die vorherige Basallinie).

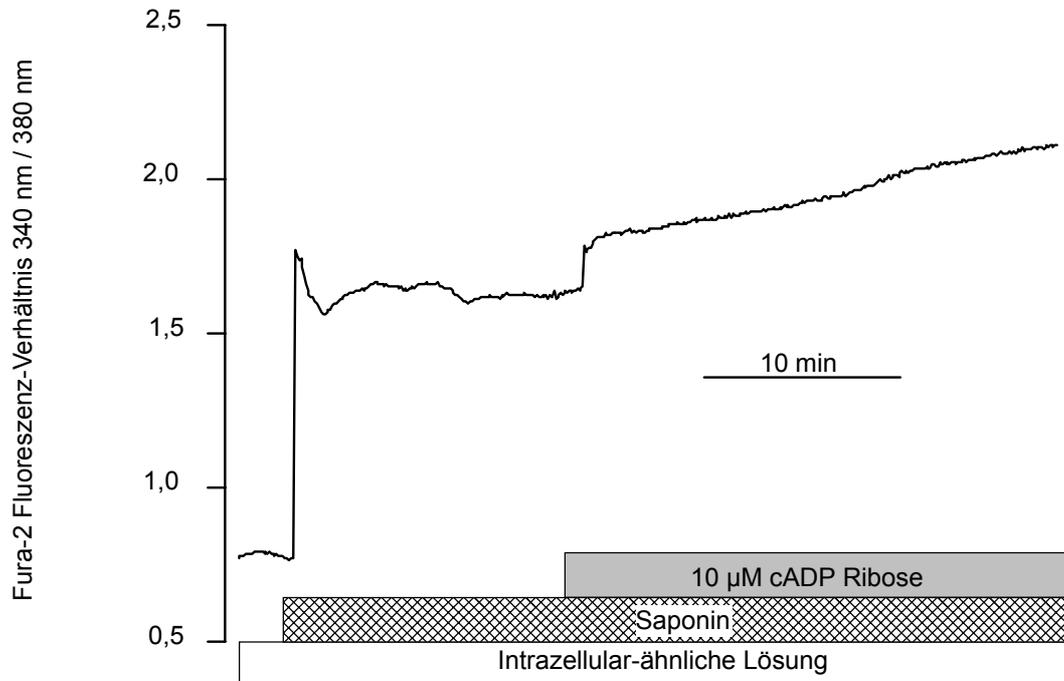


Abb. III 11: In mit Saponin ($10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; kariertes Balken) permeabilisierten Krypten verursacht cADP-Ribose ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; grauer Balken) einen signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, erkennbar durch einen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses. Der Original-Kurvenverlauf ist repräsentativ für 8 Experimente; Statistik s. Text.

Wie es auch beim Ryanodin-Effekt der Fall war, konnte die cADP-Ribose-Wirkung durch $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ruthenium Rot gehemmt werden (Abb. III 12). In Anwesenheit dieses Inhibitors konnte nur ein kleiner Abfall des Fluoreszenz-Verhältnisses (ΔRatio nach einer Minute in cADP-Ribose: $-0,024 \pm 0,026$, $n = 5$, $p > 0,05$, paariger Students-t-Test) beobachtet werden. Im Gegensatz zu seiner Wirkung an intakten Zellen (vergl. Abb. III 9A), verursachte Ruthenium Rot in den permeabilisierten Zellen einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Die Begründung für diesen paradoxen Anstieg ist möglicherweise in der höheren Konzentration von Ruthenium Rot zu finden, die unter den Bedingungen einer

Permeabilisierung im intrazellulären Raum herrscht. Durch das stärkere Anfluten der Substanz kann es zu möglichen Nebeneffekten, wie z.B. einer Hemmung von Ca^{2+} -ATPasen, kommen (Alves et al. 1986; Taylor & Board 1998; Watanabe et al. 2002).

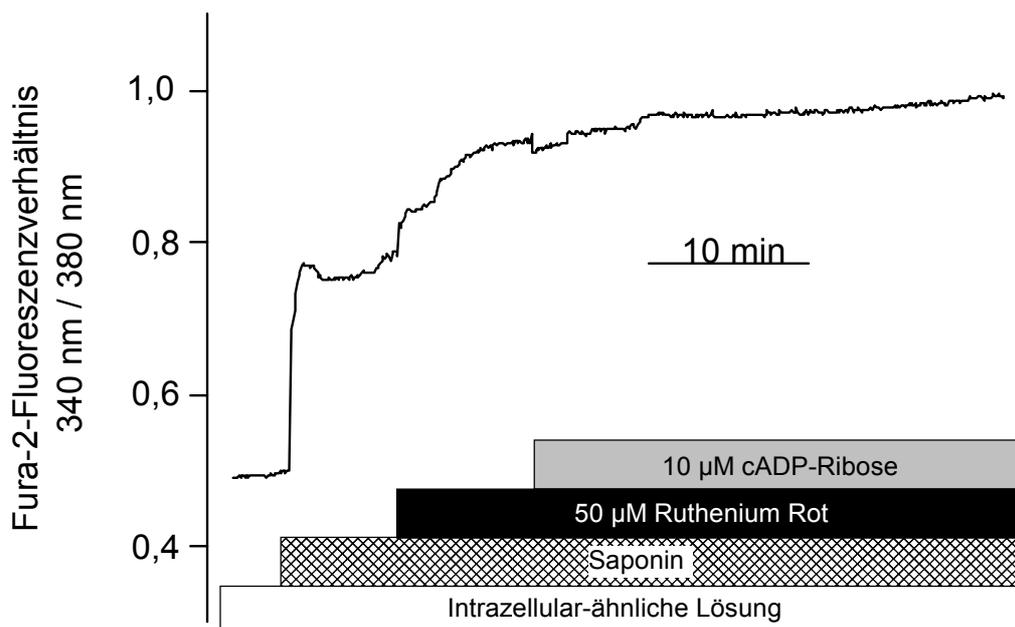


Abb. III 12: Der cADP-Ribose-Effekt wird durch Ruthenium Rot ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; schwarzer Balken) unterdrückt. Der Original-Kurvenverlauf ist repräsentativ für 5 Experimente; Statistik s. Text.

6 Beteiligung des Ryanodinrezeptors an der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Sekretion am intakten Kolonepithel

Die folgenden Experimente dienten der Frage, ob die funktionell nachgewiesenen Ryanodinrezeptoren eine Rolle bei der Steuerung von Sekretionsprozessen am Kolonepithel der Ratte spielen.

In Ussingkammer-Experimenten wurde durch Ryanodin ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Kurzschlussstroms (I_{sc}) evoziert (Abb. III 13). Ein Anstieg des I_{sc} wird zum überwiegenden Teil von einer Anionen-Sekretion getragen.

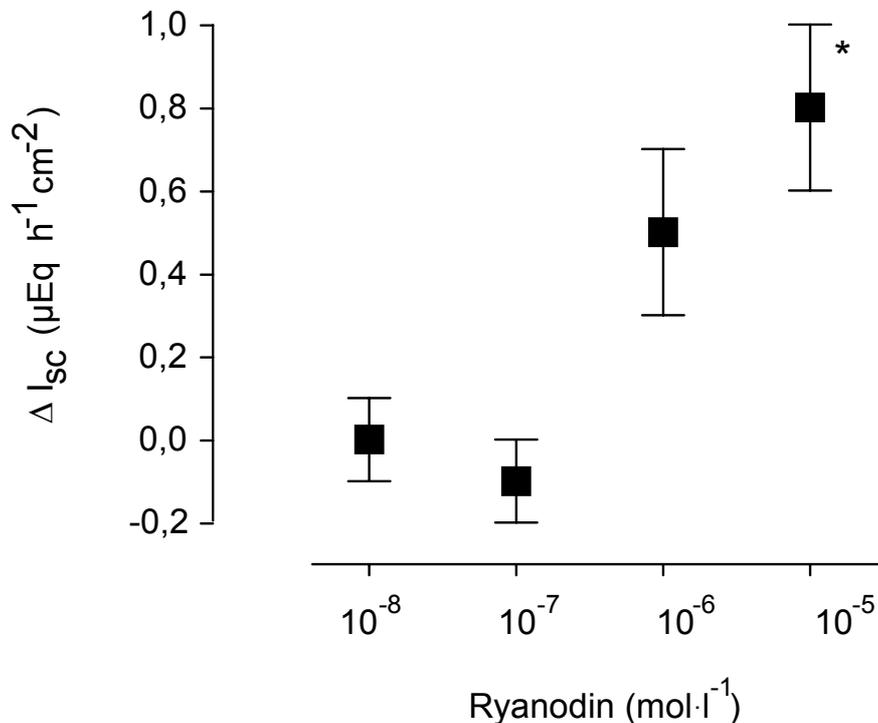


Abb. III 13: Ryanodin (auf der mukosalen und serosalen Seite appliziert) induziert im Kolonepithel der Ratte einen konzentrationsabhängigen Anstieg des I_{sc} gegenüber der Basallinie (ΔI_{sc}). Vor der Gabe jeder neuen Konzentration wurde die Badlösung auf jeder Seite des Gewebes dreimal gegen frischen Puffer getauscht. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$. * $P < 0,05$ versus der Basallinie vor Ryanodin Gabe (paariger Students-t-Test).

Um die oben geäußerte Vermutung, dass Ryanodinrezeptoren eventuell in der Vermittlung einer Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Sekretion beteiligt sind, zu überprüfen, wurden wiederum die Blocker dieses Rezeptors genutzt. Durch den Muskarinrezeptor-Agonist Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; serosale Seite) wird eine Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Sekretion ausgelöst. Carbachol verursacht dabei eine komplexe Veränderung des Kurzschlussstroms (Abb. III 13): Ein initialer Peak ist von einem biphasischen Abfall des I_{sc} gefolgt (Strabel & Diener 1995). Der Peak erreichte ein Höhe von $10,8 \pm 1,1 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ über der vorherigen Basallinie. 10 min nach Applikation der Substanz war der I_{sc} bereits wieder auf einen Wert von $3,0 \pm 0,7 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ über der Basallinie gesunken ($n = 8$, $P < 0,05$ versus Basallinie für beide; paariger Students-t-Test; Abb. III 14).

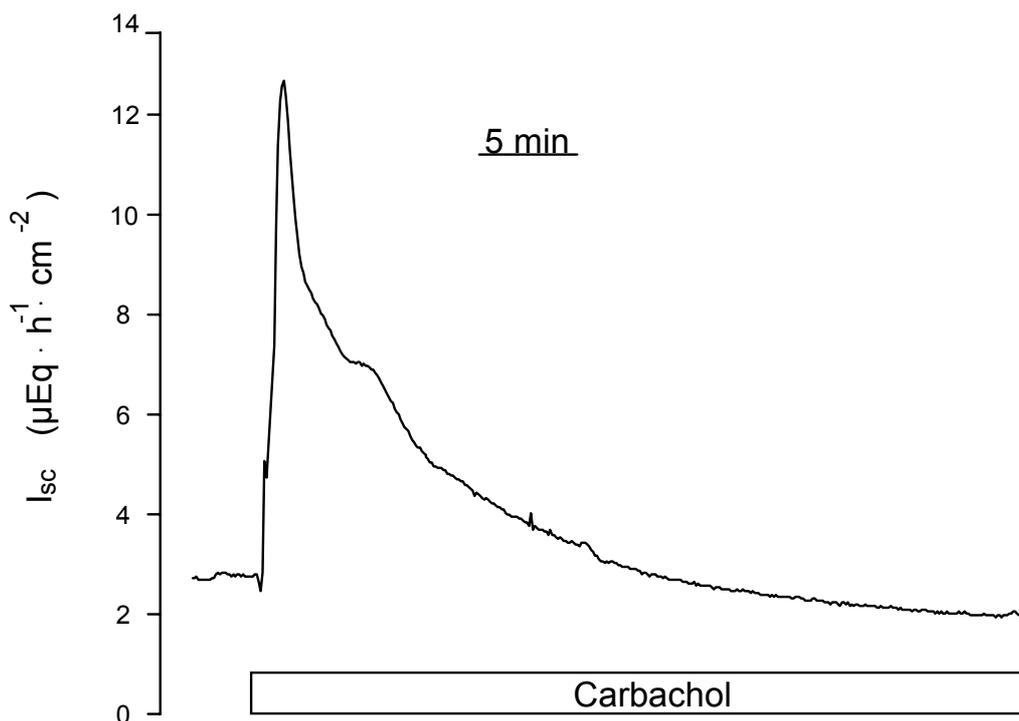


Abb. III 14: Der Original-Kurvenverlauf (repräsentativ für 8 Experimente) zeigt die komplexe Wirkung des Muskarinrezeptor-Agonisten Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite; weißer Balken) auf den I_{sc} im distalen Kolon der Ratte; Statistik siehe Text.

Ruthenium Rot ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; serosal) verursachte einen zweiphasigen Wechsel des I_{sc} ; ein vorübergehender Abfall von $-0,6 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 7$, $P < 0,05$ versus Basallinie, paariger Students-t-Test) war von einem lang anhaltendem Anstieg auf $2,2 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ über der vorherigen Basallinie ($n = 7$, $P < 0,05$ versus Basallinie, paariger Students-t-Test; Abb. III 15) gefolgt. Dieser unerwartete Anstieg des Kurzschlussstroms konnte durch den Cyclooxygenase-Blocker Indometacin ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; serosal) unterdrückt werden. In Anwesenheit von Indometacin betrug der Anstieg durch Ruthenium Rot nur noch $1,1 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ über der vorherigen Basallinie (unpaariger Students-t-Test, $P < 0,05$ versus Kontrolle, $n = 7$). Um den Effekt von Ruthenium Rot auf das enterale Nervensystem zu untersuchen, wurde ein Blocker spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle, Tetrodotoxin (TTX), eingesetzt. Durch das Nervengift des Kugelfisches konnte der Anstieg des Kurzschlussstroms, den Ruthenium Rot auslöst, vermindert werden (Abb. III 17). Ruthenium Rot führt somit wahrscheinlich subepithelial zu einer Ausschüttung sekretorisch aktiver Substanzen, wie z.B. Prostaglandinen, die sekreto-motorische Neurone stimulieren, so dass es zu einem Anstieg des Kurzschlussstroms kommt.

In Anwesenheit von Ruthenium Rot konnte Carbachol immer noch zu einem Anstieg des I_{sc} führen. Allerdings war dieser Anstieg nur vorübergehend; bereits nach 10 min war der I_{sc} auf einen Wert gefallen, der um $-1,9 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ unterhalb des alleine durch Ruthenium Rot ausgelösten I_{sc} lag ($n = 7$, $P < 0,05$, paariger Students-t-Test). Der Einsatz einer niedrigeren Konzentration von Ruthenium Rot, wie sie z.B. in Fura-2 Experimenten eingesetzt wurde ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), zeigte keine Wirkung; vermutlich, da in der intakten Schleimhaut im Vergleich zu isolierten Krypten zusätzliche Diffusionsbarrieren vorhanden sind (Daten nicht aufgeführt).

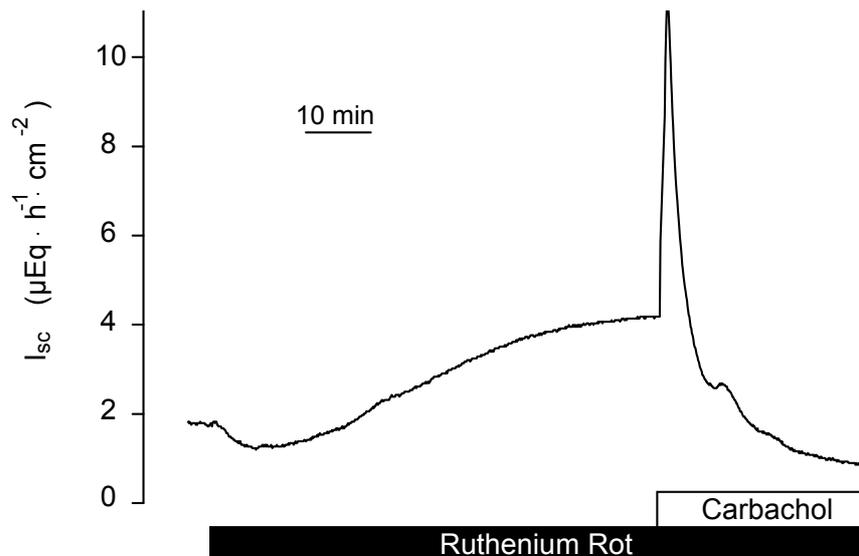


Abb. III 15: In Anwesenheit von Ruthenium Rot ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; Applikation auf der serosalen Seite; schwarzer Balken) ist die Carbachol-Wirkung zeitlich verkürzt. Ruthenium Rot selbst induziert einen Anstieg des I_{sc} . Die Originalkurve ist repräsentativ für 7 Versuche (Statistik siehe Text).

Auch durch eine hohe Konzentration von Ryanodin ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ mukosal und serosal) konnte der Carbachol induzierte Kurzschlussstrom gehemmt werden (Abb. III 15). Eine Applikation der Substanz in der zweiten, abfallenden Phase der Carbachol-Antwort verursachte ein rasches Sinken des I_{sc} um $-1,4 \pm 0,3 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 7$, $P < 0,05$ versus I_{sc} vor Ryanodin-Gabe, paariger Students-t-Test) innerhalb von 3 min. In einer zeitabhängigen Kontrolle sank der I_{sc} nur um $-0,7 \pm 0,2 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n = 8$, $P < 0,05$ versus Abfall in Anwesenheit von Ryanodin, unpaariger Students-t-Test). Wie im Falle von Ruthenium Rot mussten innerhalb der Ussingkammer-Experimente auch höhere Konzentrationen an Ryanodin ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ anstelle von $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) verwendet werden als in den Fura-2-Versuchen.

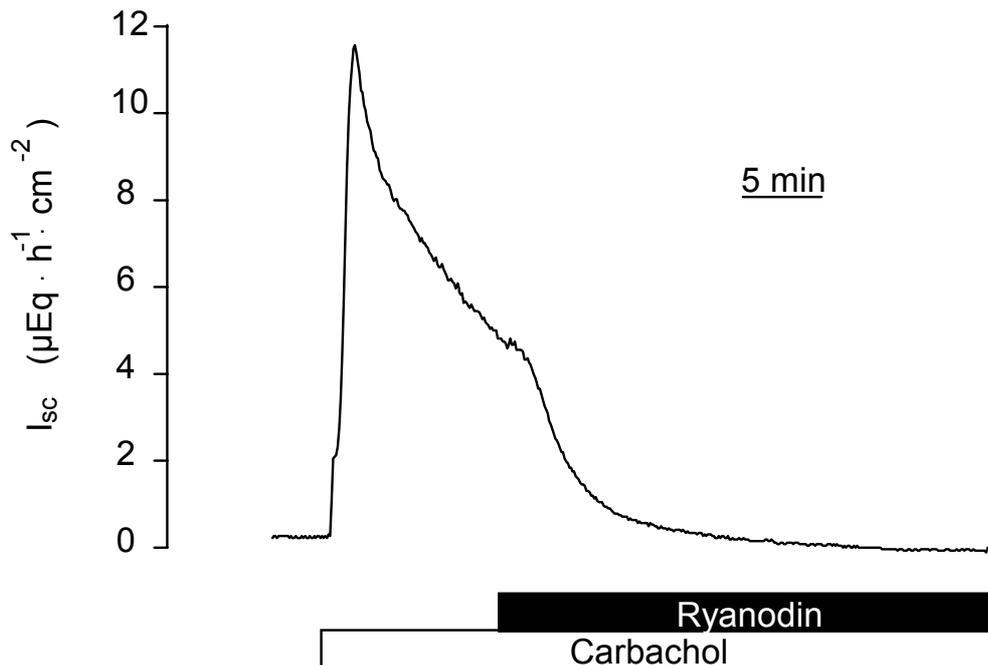


Abb. III 16: Hoch-konzentriertes Ryanodin ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der mukosalen und serosalen Seite; schwarzer Balken) führt zu einer Hemmung des Carbachol-induzierten I_{sc} . Die Originalkurve ist repräsentativ für 7 Experimente; Statistik s. Text.

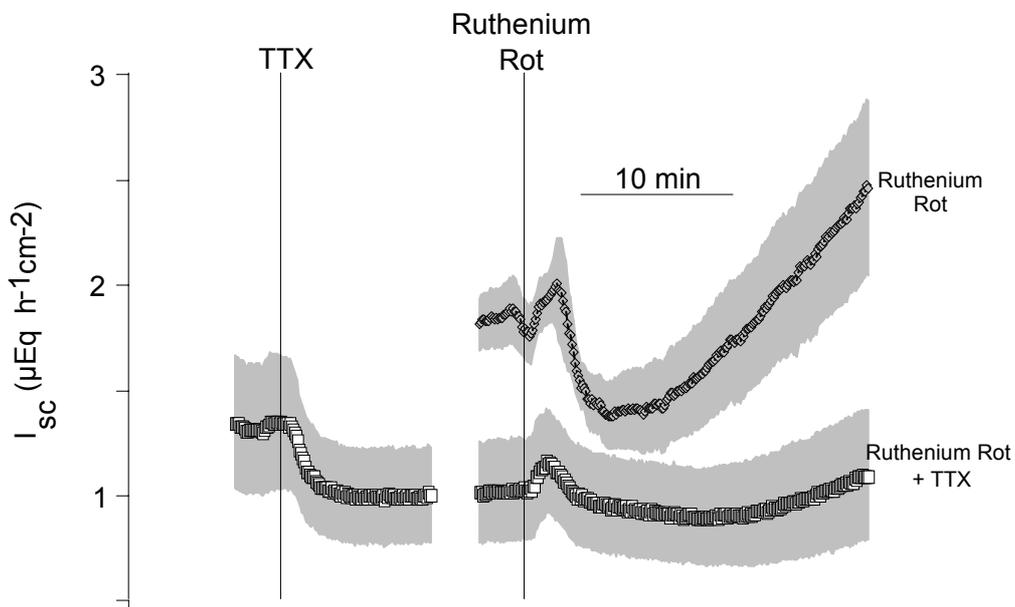


Abb. III 17: Der durch Ruthenium Rot ($5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosale Seite) verursachte Anstieg des I_{sc} wird in Anwesenheit von Tetrodotoxin (TTX; $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosale Seite) unterdrückt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 7 bis 8 Versuchen \pm SEM (grauer Bereich). Der maximale Anstieg durch Ruthenium Rot betrug in Anwesenheit von TTX $0,8 \pm 0,2 \text{ µEq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (unpaariger t-Test, $P < 0,05$ versus Kontrolle).

Innerhalb einer weiteren Versuchsreihe sollte ermittelt werden, ob Ryanodin den Carbachol-induzierten Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ in Fura-2 beladenen Krypten beeinflusst. Eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Carbachol verursachte einen Anstieg des Fura-2 Fluoreszenzverhältnisses, mit einem maximalen Anstieg von $0,32 \pm 0,13$. Innerhalb von 3 Minuten war die Fluoreszenz-Ratio bereits auf ein „Plateau“ gefallen, das nur noch um $0,20 \pm 0,09$ ($n = 7$) oberhalb der Basallinie lag. Beide Werte wurden durch $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Ryanodin vermindert, allerdings nicht vollständig unterdrückt. In Anwesenheit dieses Blockers betrug der maximale Anstieg durch Carbachol nur noch $0,20 \pm 0,05$ und das Plateau nur noch $0,10 \pm 0,04$ ($n = 6$); Durch die hohe Variabilität der Carbachol-Antwort in den Fura-2 Experimenten an isolierten Krypten konnte für diese Daten keine statistische Signifikanz erreicht werden.

7 Molekularbiologischer Nachweis des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers

Für den molekularbiologischen Nachweis des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers wurden Primer eingesetzt, die anhand der Sequenz des NCX-Subtyp-1 der Ratte ausgesucht wurden. Als Referenzgewebe diente die Herzmuskulatur der Ratte. Zur Kontrolle der Reaktion wurde je Gewebe eine Positivkontrolle eingesetzt, in der die ubiquitär vorkommende mRNA für das Enzym Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen wurde. Die PCR-Produkte wurden auf ein einprozentiges Agarose Gel aufgetragen und anschließend unter Fluoreszenzlicht beurteilt. Abb. III 18 zeigt den Nachweis der Existenz der mRNA eines Na^+/Ca^{2+} -Austauschers im Kolonepithel der Ratte. Sowohl in der cDNA, die aus dem Herzmuskel der Ratte gewonnen wurde, als auch in der cDNA aus isolierten Krypten kann mit dem NCX-Primerpaar eine Bande entsprechender Größe (812 bp) nachgewiesen werden. Positiv (GAPDH)- und Negativ (H_2O)-Kontrolle zeigen die erwarteten Ergebnisse.

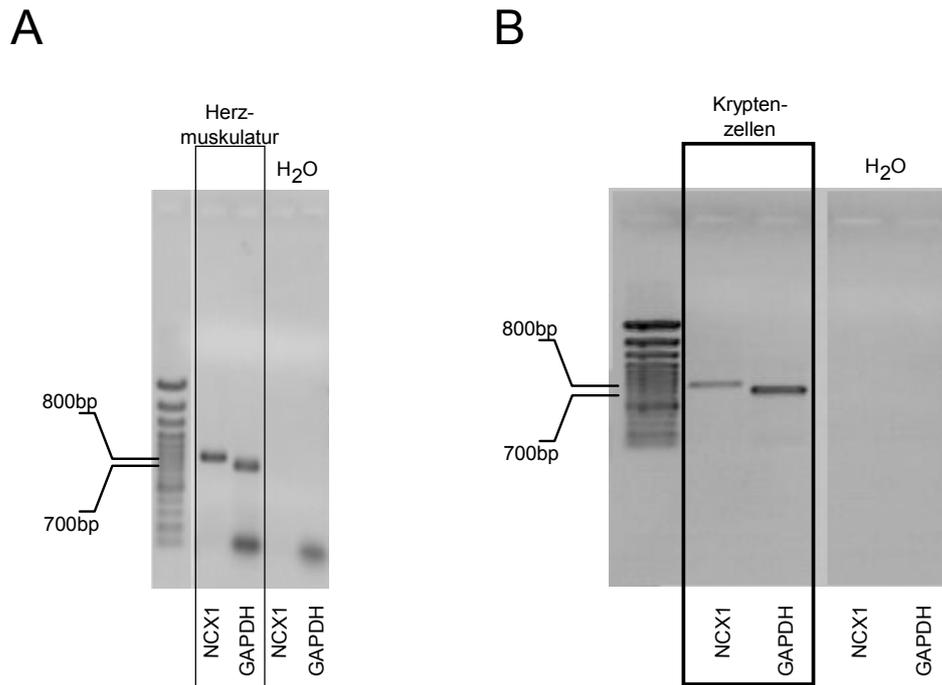


Abb. III 18: Die Primerpaare für den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher Subtyp-1 (NCX1) und des Housekeeping-Gens GAPDH amplifizieren innerhalb einer PCR-Reaktion DNA-Abschnitte in entsprechender Länge (s. Kap. II 4). **A:** cDNA aus der Herzmuskulatur diente als Positivkontrolle. **B:** Auch in Epithelzellen des Rattenkolons konnte ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nachgewiesen werden.

IV Diskussion

Calcium ist ein bedeutender Signal-Botenstoff in allen Zellen. Am Epithel des Rattenkolons vermittelt Ca^{2+} sekretorische Prozesse. Um seiner Rolle als Botenstoff nachkommen zu können, muss die intrazelluläre Konzentration des Ions ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) schnell und präzise reguliert werden können. Die bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit am Kolonepithel bekannten Signalwege sind in Abb. IV 1 zusammengestellt:

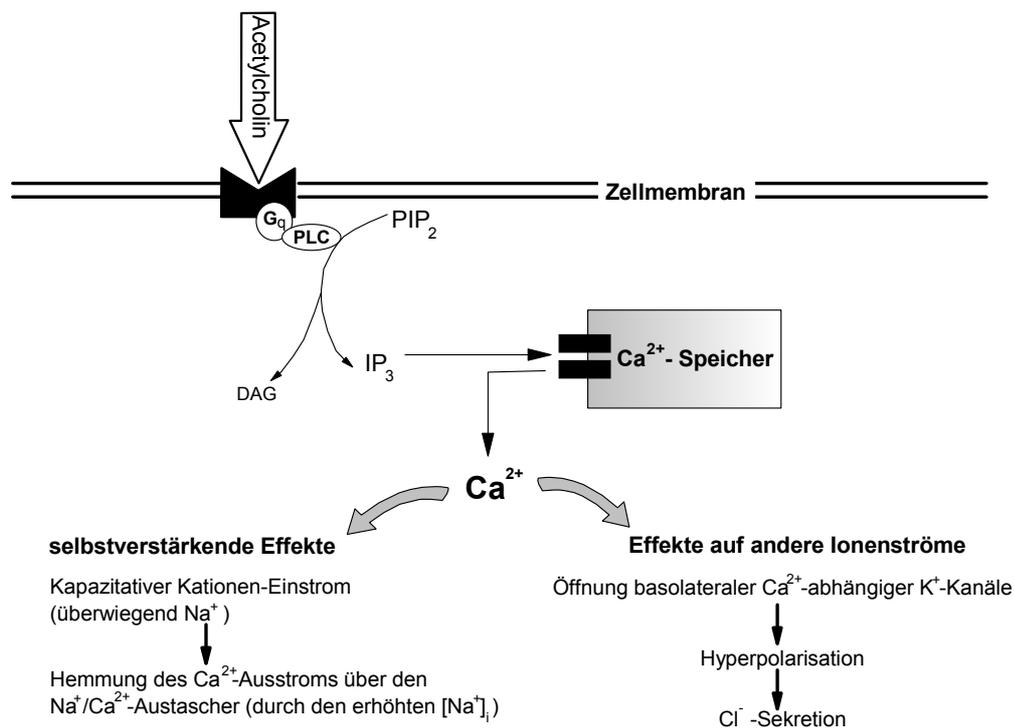


Abb. IV 1: Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Signalweges am Kolonepithel. G = G-Protein; PLC = Phospholipase C; IP₃ = Inositol-1,4,5-trisphosphat; DAG = Diacylglycerol; PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen weitere Erkenntnisse zur Regulation des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers auf und beweisen die Existenz eines positiven Rückkopplungs-Mechanismus für Ca^{2+} über Ryanodinrezeptoren am Kolonepithel.

1 Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher

Primäres Ziel der Untersuchungen war eine genauere Charakterisierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, der kürzlich am Kolonepithel funktionell nachgewiesen werden konnte (Seip et al. 2001). Dazu gehörte sowohl ein molekularbiologischer Nachweis als auch die genauere Untersuchung seiner Funktion.

1.1 Molekularbiologischer Nachweis des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers

Nachdem der funktionelle Nachweis des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers bereits erbracht worden ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit mittels PCR auch ein molekularbiologischer Nachweis geführt werden. Auf Grund der hohen Homologie zwischen den Austauscher-Subtypen (80 – 95 %; Kraev et al. 1996) eignet sich die PCR nicht für eine Unterscheidung zwischen NCX-1 bis -3. Um solch eine Unterscheidung zu treffen, wäre eine immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern, die speziell gegen die einzelnen Austauscher-Subtypen gerichtet sind, geeignet. Auf eine solche Untersuchung wurde jedoch verzichtet, da sich das ursprüngliche Ziel der Arbeit im Laufe der Untersuchungen verschob.

Da der Subtyp-1 des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers die weiteste Gewebeverteilung zeigt, wurden die Primer, die für die PCR genutzt wurden, anhand der Basensequenz des NCX-1 der Ratte ausgewählt. Dieses Primerpaar führt sowohl in cDNA, die aus Kryptenzellen gewonnen wurde, sowie in der cDNA des Kontrollgewebes (Herz) zu einer Amplifikation von Fragmenten mit einer Länge von ca. 800 bp (s. Abb. III 18). Vergleicht man diesen Wert mit der gewünschten Fragmentlänge von 812 bp (s. Kap. II 4), erkennt man, dass es sich tatsächlich um ein Amplifikat aus dem NCX-Gen handelt. Allerdings kann eine Kreuzreaktion mit einem der anderen Subtypen nicht ausgeschlossen werden, weswegen man für eine spezifischere Aussage die Immunhistochemie hinzuziehen müsste.

1.2 Regulation des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers

Viele der Mechanismen, die an der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind, beeinflussen sich gegenseitig. So wird z.B. der nicht-selektive Kationenkanal am Kolonepithel der Ratte durch eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher geöffnet und weiteres Ca^{2+} kann, gemeinsam mit anderen Kationen, in die Zelle einströmen. Durch die unmittelbare Nachbarschaft, die der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in einigen Geweben zu den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (Goldman et al. 1994; Chen et al. 1995) hat, scheint eine Interaktion zwischen diesen beiden Strukturen wahrscheinlich zu sein. Ob solch eine Interaktion besteht, war eine der Ausgangsfragen dieser Arbeit.

Zur Speicherentleerung wurden Blocker der sarkoplasmatisch-endoplasmatischen-Retikulum Ca^{2+} -ATPase (= SERCA) verwendet. Durch die SERCA-Blockade wird die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher verhindert, so dass die Ca^{2+} -Speicher langsam entleert werden. Die Wirksamkeit der SERCA-Blockade zeigt sich in Fura-2-Experimenten durch eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, was durch einen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses erkennbar ist. In einer Serie vorbereitender Versuche wurde die Wirksamkeit von drei verschiedenen SERCA-Blockern getestet. Alle getesteten Blocker (Thapsigargin, BHQ, CPA) bewirkten einen deutlichen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (Abb. III 1). Die Wirkstärke der einzelnen Blocker unterschied sich nur geringfügig, so dass jeder der Blocker für den Einsatz in weiterführenden Experimenten prinzipiell geeignet war. Da CPA in parallel durchgeführten Ussingkammer-Experimenten am deutlichsten wirkte (Daten nicht gezeigt), wurde für die weiteren Versuche CPA zur Speicherentleerung eingesetzt.

Um die Funktion des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zu untersuchen, wurde in der Superfusion Na^+ äquimolar durch das impermeable Kation NMDG^+ ersetzt. Dadurch wurde der physiologisch in die Zelle gerichtete Na^+ -Gradient umgekehrt. Infolge

dessen wurde die Transportrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers umgekehrt, so dass er nun im Ca^{2+} -Influx-Modus arbeitete, was durch einen Anstieg des Fura-2 Fluoreszenz Verhältnisses deutlich wurde (Abb. III 2). Durch eine Ca^{2+} -Speicherentleerung wurde der durch eine Na^+ -freie NMDG-Cl-Superfusion ausgelöste $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, im Vergleich zu einer Kontrolle, vermindert (Abb. III 2, 3 und 4). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass tatsächlich eine Interaktion zwischen Ca^{2+} -Speichern und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher stattfinden könnte, d.h. eine vorherige Speicherentleerung führt möglicherweise zu einer Hemmung des Carriers. Allerdings erlauben diese Daten nicht, zu unterscheiden, wodurch der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} bedingt ist. Erhöht sich der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel, allein durch einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum, also über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, oder ist z.B. zusätzlich eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern beteiligt?

Im Falle einer Beteiligung der intrazellulären Speicher ist eine vorherige Speicherentleerung logischerweise von einer Verminderung des Ca^{2+} -Signals nach Umkehr des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers gefolgt. Um das differenzieren zu können, wurde die Mangan-Quench-Technik (Xu et al. 1994) eingesetzt.

1.3 Nachweis einer positiven Rückkopplung zur Verstärkung des Ca^{2+} -Signals

Um nachzuvollziehen, ob eine Hemmung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers durch die Speicherentleerung stattfindet, war es nötig, den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärmedium direkt nachzuweisen. Dazu wurde die Mangan-Quench-Technik verwendet. Mangan wird dabei im Extrazellulärmedium angeboten und durch seine, dem Ca^{2+} ähnlichen, Ladungseigenschaften wie Ca^{2+} in die Zelle aufgenommen. Intrazellulär bindet Mn^{2+} an Fura-2. Der entstehende Chelatkomplex ist nicht fluoreszierend, ein Mangan-Einstrom zeigt sich daher in einem Abfall des Fluoreszenzsignals (= Quench). In diesem Fall muss das Präparat am isoemissiven Punkt mit einer Wellenlänge von 360 nm angeregt werden, um die Messung

unabhängig von Änderungen des intrazellulären Calciumspiegels durchführen zu können. Unter diesen Bedingungen wurde die gleiche Versuchsanordnung verwendet wie in Kap. IV 1.2 beschrieben. Nach Umkehr des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers durch eine Na^+ -freie NMDG-Cl-Tyrode sank das Fluoreszenzsignal deutlich. Durch den Mn^{2+} -Einstrom über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher kam es zu einem verstärkten Quenchen des Fura-2-Signals. Die Quench-Rate, die dem Abfall der Fluoreszenzkurve entspricht (s. Kap. III 1), zeigte keinen Unterschied, wenn vor der Superfusion mit einer Na^+ -freien Tyrode die intrazellulären Speicher durch SERCA-Blockade entleert wurden (s. Abb. III 6).

Die anfängliche Vermutung, dass eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher zu einer Hemmung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers führt, wurde also nicht bestätigt. Welche andere Interaktion zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern einer- und dem Austauscher andererseits würde den verminderten Ca^{2+} -Anstieg durch den umgekehrten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nach Speicherentleerung erklären?

Wird der Ca^{2+} -Anstieg infolge einer Umkehr des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers nicht allein durch den Einstrom von außen induziert, ließe sich das beobachtete Phänomen erklären. Falls der Ca^{2+} -Einstrom intrazellulär eine positive Rückkopplung auslöst, würde sich die Antwort des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers aus zwei Komponenten zusammensetzen: Erstens einem Einstrom von außen und zweitens einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Reserven. Fällt in so einem Fall die zweite Komponente weg, vermindert sich der absolute Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Da eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher zu einer Verminderung der Austauscherantwort führt, liegt der Rückschluss nahe, dass der Ca^{2+} -Eintritt über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher intrazellulär zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern führt. Diese Hypothese sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden.

2 Intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher und Kanäle

In fast allen Zellen spielen intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher eine essenzielle Rolle bei der Kontrolle des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels. Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER), dienen als Ca^{2+} -Speicher. Ein Ausstrom von Ca^{2+} aus diesen Speichern kann z.B. durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst werden, aber auch durch Botenstoffe wie z.B. IP_3 . Mitochondrien scheinen allerdings unter physiologischen Bedingungen keine besondere Rolle während einer Signalübertragung zu spielen, da sie erst durch abnorm hohe Ca^{2+} -Konzentrationen stimuliert werden (Lee 1999). Das endoplasmatische Retikulum, bzw. im Muskel das sarkoplasmatische Retikulum, wird prinzipiell in den Ca^{2+} -Signalweg einbezogen. Dabei scheint das endoplasmatische Retikulum nicht nur auf Stimulation durch IP_3 , sondern auch auf zyklische ADP-Ribose (cADP-Ribose), einen weiteren Botenstoff, zu reagieren (Lee 1999). Neben den bisher beschriebenen Ca^{2+} -Speichern vermutet Lee die Existenz eines weiteren Ca^{2+} -Speichers, der sensitiv auf NAADP (= Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) reagiert.

Eine herausragende Rolle unter den intrazellulären Ca^{2+} -Kanäle spielen der IP_3 -Rezeptor und der Ryanodinrezeptor (Leite et al. 2002). Der IP_3 -Rezeptor bindet den ubiquitär vorkommenden second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat und ist in die Signalkaskade nach Stimulation muskarinerger Rezeptoren (Abed-Latif 1986; Lindqvist et al. 1998; s. Abb. IV 1) eingebunden. Die weite Verbreitung IP_3 -sensitiver Rezeptoren in erregbaren und nicht erregbaren Zellen ist seit langem bekannt. Der zweite der intrazellulären Ca^{2+} -Kanäle reagiert empfindlich auf das pflanzliche Alkaloid Ryanodin, weswegen dieser Rezeptortyp als Ryanodinrezeptor bezeichnet wird.

3 Funktioneller Nachweis eines Ryanodinrezeptors am Kolonepithel der Ratte

3.1.1 Biphasische Ryanodinwirkung

Ryanodinrezeptoren verstärken in vielen Zellen intrazelluläre Ca^{2+} -Signale durch eine positive Rückkopplung. Ryanodin ist ein Agonist an diesen intrazellulären Ca^{2+} -sensitiven Rezeptoren. Auch am Kolonepithel der Ratte führt Ryanodin zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Das ist an dem konzentrationsabhängigen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses zu erkennen (s. Abb. III 7). Von vielen anderen Geweben ist bekannt, dass Ryanodin in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedliche Wirkungen aufweist (Hwang & van Breemen 1987; Coronado et al. 1994; Sorrentino 1995; Franzini-Amstrong & Protasi 1997; Ozawa 2001). In niedrigen Konzentrationen stimuliert es einen CICR, in hohen Konzentrationen hemmt es diesen. Je nach Zelltyp scheint die Grenze, an der die Wirkung umschlägt, zu variieren. Untersuchungen an Skelett- und Herzmuskelzellen (siehe z.B.: Meissner 1986; Gilchrist et al. 1992; Humerickhouse et al. 1993) sowie an Lebermikrosomen (Bazotte et al. 1991) zeigten eine Stimulation des CICR durch niedrigen Ryanodin Konzentrationen bis zu $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; oberhalb dieser Konzentration verursachte Ryanodin eine Hemmung (Coronado et al. 1994). Im Gegensatz dazu kam es bei Untersuchungen an nicht erregbaren Zellen, wie den Azinus-Zellen der Parotis, erst ab einer Ryanodin Konzentration von $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu einer Hemmung des CICR (Ozawa & Nishiyama 1997). Aus diesem Grund wurde in den vorliegenden Untersuchungen ein sehr großer Konzentrationsbereich (10^{-7} bis $3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) gewählt. Wurden die ansteigenden Ryanodin-Konzentrationen additiv appliziert, führten alle zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Auch durch höhere Konzentrationen wurde keine Hemmung des Ca^{2+} -Release ausgelöst, wie man erwartet hätte. Wurde die höchste Konzentration Ryanodin alleine appliziert, war sie überraschender Weise nicht mehr in der Lage, einen Ca^{2+} -Anstieg zu bewirken, es lag also offensichtlich eine

Hemmung des CICR vor. Über die Ursache dieser paradoxen Ergebnisse kann nur spekuliert werden:

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass ein bereits stimulierter Ryanodinrezeptor, dessen Ca^{2+} -Kanal geöffnet ist, durch ansteigende Konzentrationen Ryanodin nicht wieder geschlossen werden kann. Diese Erklärung würde aber der gängigen Vorstellungen der Interaktion zwischen Ryanodin und seinem Rezeptor widersprechen. Entsprechend seiner beiden Effekte (agonistisch bzw. antagonistisch) geht man davon aus, dass für Ryanodin hoch- und niederaffine Bindungsstellen existieren (Franzini-Amstrong & Protasi 1997; Ozawa 2001). Franzini-Amstrong & Protasi beschreiben diesen Effekt als negativ allosterische Hemmung zwischen vier initial gleichen Bindungsstellen: Das erste Ryanodinmolekül bindet mit hoher Affinität an den offenen Kanal und verhindert sein Schließen. Dabei wird die Affinität für eine Bindung an die verbleibenden drei Bindungsstellen vermindert. Drei weitere Bindungsschritte folgen, wobei jeder mit einer weiteren Verminderung der Affinität verbunden ist. Die sinkende Bindungsaffinität resultiert dabei aus der Interaktion der Rezeptormonomere. Ist letztendlich pro Monomer ein Ryanodinmolekül gebunden, wird der Kanal blockiert.

Eine weitaus plausible Erklärung für die beobachtete, paradoxe Reaktion auf hohe Konzentrationen Ryanodin könnte in der Beteiligung von IP_3 -Rezeptoren an der Ca^{2+} -Antwort liegen. Ein erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel wirkt sich positiv auf die Sensitivität der IP_3 -Rezeptoren gegenüber ihrem Liganden aus (Bezprozvanny et al. 1991; Thrower et al. 2001; Meldolesi 2002; Schuster et al. 2002). Werden ansteigende Ryanodin-Konzentrationen kumulativ gegeben, bewirken die niedrigen Konzentrationen eine Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern und damit eine Erhöhung des intrazellulären Calciums. Im Folgenden sind dann also auch IP_3 -Rezeptoren verstärkt ansprechbar; welchen Anteil sie auf die Erhöhung des intrazellulären Calciums haben, kann in dieser Versuchsanordnung nicht unterschieden

werden. Wird Ryanodin direkt hochkonzentriert zu den Krypten gegeben, wird kein Ca^{2+} freigesetzt, da es sofort zu einer Kanalblockade kommt. Eine Sensibilisierung von IP_3 -Rezeptoren findet also nicht statt.

Auch an intaktem Kolonepithel zeigte Ryanodin eine entsprechende Wirkung. In Ussingkammer-Versuchen wurden Konzentrationen von 10^{-8} bis $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ eingesetzt. Erst durch die höchste Konzentration wurde ein statistisch signifikanter Anstieg des Kurzschlussstroms (I_{sc}) ausgelöst. Ein Anstieg des Kurzschlussstroms ist gleichzusetzen mit einem Anstieg der Cl^- -Sekretion. Das innerhalb der Ussingkammer-Experimente höhere Konzentrationen Ryanodin als in Imaging Experimenten benötigt werden, um einen Effekt hervorzurufen, liegt wahrscheinlich an den zusätzlichen Diffusionsbarrieren, die die intakte Mukosa im Vergleich zu den isolierten Krypten besitzt.

3.1.2 Ruthenium Rot verhindert einen CICR

Ruthenium Rot wirkt antagonistisch an Ryanodinrezeptoren und führt zu einer massiven Hemmung der Rezeptoren (Sorrentino 1995; Franzini-Amstrong & Protasi 1997). In Imaging-Experimenten war es möglich, durch Ruthenium Rot den durch Ryanodin ausgelösten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zu unterdrücken (s. Abb. III 9). Diese Versuchsreihe liefert einen weiteren Hinweis für die funktionelle Existenz des Ryanodinrezeptors in Kolonkrypten.

3.1.3 Wirkung des intrazellulären Botenstoffs cADP-Ribose

Die Bedeutung von Ca^{2+} als Signalbotenstoff wurde bereits erwähnt. Anders als andere Botenstoffe wie z.B. zyklische Nukleotide wird Ca^{2+} nicht intrazellulär synthetisiert, sondern nach Aktivierung der Zelle aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Da der extrazelluläre Stimulus, der zu einer Ca^{2+} -Freisetzung führt, nur eine Aktivierung membranärer Rezeptoren bewirkt, ist es nötig, den Abstand zwischen diesen Rezeptoren und den Ca^{2+} -Kanälen des Speichers mit weiteren Botenstoffen zu

überwinden. Ein bedeutender Botenstoff ist hier das IP_3 , das, wie bereits beschrieben, z.B. nach Muskarinrezeptor-Stimulation synthetisiert wird und zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern führt.

Die Rolle von cADP-Ribose als möglicher Botenstoff wird diskutiert. Dabei soll cADP-Ribose unabhängig vom IP_3 -Weg über eine Aktivierung von Ryanodinrezeptoren zu einer Ca^{2+} -Freisetzung führen (Galione & Churchill 2000). Vermutlich führt cADP-Ribose dabei nicht selbst zur Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle, sondern sensibilisiert die Ryanodinrezeptoren als Co-Agonist gegenüber Ca^{2+} (Lee 1993; Perèz et al. 1998; Galione & Churchill 2000). Physiologisch wird cADP-Ribose intrazellulär durch ADP-Ribosyl-Zyklasen aus NAD^+ (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) synthetisiert. Setzt man es experimentell ein müssen die Zellen permeabilisiert werden, da cADP-Ribose aufgrund seiner Moleküleigenschaften nicht in der Lage ist in die Zellen zu diffundieren. Zur Perforation der Zellen wurde Saponin in einer Konzentration von $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ verwendet; die durch Saponin gebildeten Poren sind für Moleküle bis zu 200 kD durchgängig. Da unter diesen Versuchsbedingungen die intrazelluläre Flüssigkeit durch das Superfusionsmedium ausgewaschen wird, wurde als Superfusion eine Lösung verwendet, die in ihrer Ionenzusammensetzung der intrazellulären Lösung entspricht (s. Kap II 2.2.).

Wie in Abb. III 11 zu erkennen ist, war die Permeabilisierung immer von einem steilen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses begleitet. Verschiedene Ursachen können diesem prompten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} zugrunde liegen. Würden die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher ebenfalls durch Saponin permeabilisiert, müsste aufgrund des hohen Konzentrationsgefälles sofort Ca^{2+} in die Zelle strömen. Nach Untersuchungen von Schulz (1990) führt Saponin in der verwendeten Konzentration zwar zu einer Permeabilisierung der Zellmembran, intrazelluläre Membranen werden aber, da sie im Gegensatz zur Plasmamembran weniger Cholesterol enthalten, erst

durch höhere Konzentrationen ($> 200 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) angegriffen (Schulz 1990). Wahrscheinlich gilt dieser Sachverhalt auch für Kryptenzellen.

Eine weitere Erklärung für den plötzlichen Ca^{2+} -Anstieg bei Permeabilisierung könnte sein, dass das Ca^{2+} mit dem Perfusionsmedium in die Zelle gelangt. Entspricht die Zusammensetzung der intrazellulär-ähnlichen Lösung, in Hinblick auf die Ca^{2+} -Konzentration also tatsächlich dem Zytoplasma? Um eine Ca^{2+} -Konzentration zu gewährleisten, die den intrazellulären Konzentrationen entspricht, ist es notwendig, eine hohe Ca^{2+} -Puffer-Kapazität anzuwenden. Deswegen wird von manchen Autoren empfohlen, bei in-vitro Messungen eine Puffer-Konzentration im millimolaren Bereich zu verwenden. Die hier verwendete EGTA-Konzentration liegt mit $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ deutlich unter diesen Empfehlungen. Daher ist anzunehmen, dass der Ca^{2+} -Anstieg durch den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Superfusionsmedium zustande kommt. Trotz dieses Effektes ist es nicht sinnvoll, eine höhere Ca^{2+} -Puffer-Konzentration einzusetzen, da dies zu einer Entleerung intrazellulärer Speicher führen würde (Frings et al. 1999) und somit den Versuch beeinträchtigen würde.

Zyklische ADP-Ribose war in der Lage, in den permeabilisierten Krypten einen weiteren Ca^{2+} -Anstieg auszulösen (Abb. III 11). Um nachzuweisen, dass cADP-Ribose über den selben Mechanismus wirkt wie Ryanodin, wurde cADP-Ribose zu permeabilisierten Krypten gegeben, die mit Ruthenium Rot vorbehandelt worden sind. Unter diesen Bedingungen war cADP-Ribose nicht mehr in der Lage, einen Ca^{2+} -Anstieg zu bewirken (s. Abb. III 12). An permeabilisierten Krypten fällt auf, dass Ruthenium Rot, im Gegensatz zu seiner Wirkung in unpermeabilisierten Krypten (s. Abb. III 9A), einen paradoxen Ca^{2+} -Anstieg verursacht. Durch die Permeabilisierung gelangt Ruthenium Rot schneller und leichter in die Zellen, so dass die tatsächliche intrazelluläre Konzentration unter diesen Bedingungen vermutlich höher ist als in nicht permeabilisierten Kryptenzellen. Durch die höhere Konzentration kann die Substanz möglicherweise Nebeneffekte ausbilden, die ihrerseits einen Ca^{2+} -Anstieg bewirken.

Eine solche Wirkung ist z.B. eine Hemmung von Ca^{2+} -ATPasen, die normalerweise für den Transport des Ca^{2+} aus dem Zytoplasma verantwortlich sind (Alves & de Meis 1986; Taylor & Board 1998; Watanabe et al. 2002).

Neben dem pharmakologischen Wirkstoff am Ryanodinrezeptor zeigt somit auch ein physiologischer Agonist des Rezeptors eine Wirkung am Kolonepithel. Aus der Tatsache, dass die Wirkung beider Agonisten durch einen Blocker des Rezeptors unterdrückt wird, kann geschlossen werden, dass der Wirkung derselbe zelluläre Mechanismus zu Grunde liegt. Allerdings kann aus diesen Versuchen kein Rückschluss gezogen werden, ob cADP-Ribose auch unter physiologischen Bedingungen von Bedeutung ist.

3.2 Der Ryanodinrezeptor des Kolonepithels der Ratte: Ein Subtyp-2-Rezeptor?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bezüglich des Ryanodinrezeptors nur funktionelle Untersuchungen durchgeführt, es war also nicht möglich zwischen den Rezeptorsubtypen zu unterscheiden, wie es z.B. eine weitergehende molekularbiologische oder eine immunhistochemische Untersuchung möglich gemacht hätte. Allerdings gaben die funktionellen Untersuchungen einen Hinweis auf den möglicherweise im Kolonepithel vorhandenen Rezeptorsubtyp:

Durch Koffein werden nach Angaben aus der Literatur (Giannini et al. 1992) nur die Subtypen 1 und 2 des Ryanodinrezeptors, aber nicht der Subtyp-3 angesprochen. Am Kolonepithel konnte durch $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Koffein ein statistisch signifikanter Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses gegenüber des basalen Niveaus verursacht werden (Kap. III 4). Eine Stimulation des Ryanodinrezeptors durch Koffein scheint also am Kolonepithel möglich. Die bisher in der Literatur beschriebene Gewebeverteilung der Subtypen lässt ein Vorkommen des RyR-1 am Kolonepithel als unwahrscheinlich erscheinen (s. Kap. IV 3). Hingegen konnten die Subtypen 2 und 3 bereits an T84-Zellen, einer Tumorzelllinie aus dem menschlichen Kolon,

nachgewiesen werden (Verma et al. 1996). Kombiniert man diese Angaben aus der Literatur mit den hier vorgestellten funktionellen Untersuchungen, erhält man einen vagen Hinweis, dass es sich bei dem Ryanodinrezeptor des Kolonepithels eventuell um einen Subtyp 2 Rezeptor handeln könnte.

3.3 CICR verstärkt die Antwort des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im Influx-Modus

Wie bereits in Kap. IV 1.2. beschrieben wurde, führt eine Superfusion isolierter Krypten mit einer Na^+ -freien NMDG-Cl-Tyrode zu einer Umkehr des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, so dass dieser im Ca^{2+} -Influx-Modus arbeitet. Durch Blockade des Ryanodinrezeptors mit Ruthenium Rot wird der Austauscher-vermittelte Ca^{2+} -Anstieg deutlich reduziert (s. Abb. III 10). Die Hypothese, dass der Ca^{2+} -Anstieg nach einer Austauscher-Umkehr sowohl aus einem Ca^{2+} -Einstrom über den Austauscher als auch aus einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern über einen CICR-Mechanismus zusammengesetzt ist, konnte damit bestätigt werden.

Aus der zusammenfassenden Abbildung III 10 lässt sich ableiten, dass nicht allein die Ca^{2+} -Freisetzung über Ryanodinrezeptoren an der Verstärkung des Ca^{2+} -Signals beteiligt ist. Eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher vermindert das Ca^{2+} -Signal noch stärker als die alleinige Blockade des CICR-Mechanismus. Es scheint also ein weiterer Ca^{2+} -Freisetzungs-Mechanismus beteiligt zu sein. Die oben diskutierte Beteiligung von IP_3 -Rezeptoren scheint auch hier wieder plausibel. Wird durch einen Ca^{2+} -Anstieg nicht nur ein CICR ausgelöst, sondern auch IP_3 -Rezeptoren gegenüber ihrem Agonisten sensibilisiert, tragen beide Mechanismen zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} bei.

3.4 Physiologische Bedeutung des Ryanodinrezeptors am Kolonepithel

Geht man davon aus, dass der Ryanodinrezeptor in die Ca^{2+} -Signalkaskade des Kolonepithels physiologisch eingebunden ist, muss er letztendlich auch zu einer Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Sekretion beitragen. Im Versuch wird die Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -

Sekretion durch einen Muskarinrezeptoragonisten, wie zum Beispiel Carbachol, ausgelöst. Die komplexe Veränderung des I_{sc} durch Carbachol mit initialem Peak und biphasischem Abfall des I_{sc} (s. Abb. III 14) müsste im Fall einer Ryanodinrezeptor-Beteiligung durch Antagonisten dieses Rezeptors beeinflusst werden. Der biphasische Abfall des Carbachol-induzierten Kurzschlussstroms (I_{sc}) wird durch eine selbstlimitierende Carbacholwirkung erklärt. Der Carbachol-vermittelte Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} führt demzufolge nicht nur zu einer Chlorid-Sekretion, sondern auch durch die Freisetzung mittelkettiger Fettsäuren zu einer Inhibition apikaler Cl^- - und basolateraler K^+ -Kanäle und dadurch letztendlich zu einer Downregulation der Cl^- - Sekretion (Schultheiss et al. 2001).

Ruthenium Rot unterdrückt die zweite Phase des Carbachol-induzierten Anstiegs des I_{sc} (s. Abb. III 14). Der initiale Peak ist immer noch vorhanden, aber bereits nach 10 Minuten ist der I_{sc} -Wert unter den vorherigen Basalwert gesunken. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass Ryanodinrezeptoren für die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Sekretion verantwortlich sind. Innerhalb der Ussingkammer-Experimente bildet Ruthenium Rot eine zusätzliche Wirkung aus. Der Wirkstoff verursacht eine zweiphasige Änderung des I_{sc} . Ein vorübergehender Abfall war von einem lang anhaltenden Anstieg gefolgt. Wahrscheinlich wird dieser Anstieg durch Ausschüttung sekretorisch aktiver Substanzen, wie z.B. Prostaglandinen, aus dem subepithelialen Gewebe ausgelöst. Wird experimentell nämlich die Cyclooxygenase durch Indometacin gehemmt und so der Arachidonsäure-Stoffwechsel unterbrochen, so dass keine Prostaglandine synthetisiert werden, ist Ruthenium Rot nicht mehr in der Lage, einen transepithelialen Strom auszulösen. Durch Blockade der Erregungsweiterleitung in subepithelialen Neuronen mittels Tetrodotoxin (TTX) (s. Abb. III 17) konnte gezeigt werden, dass die subepithelial ausgeschütteten Substanzen über eine Stimulation sekreto-motorischer Neurone zu einer Cl^- -Sekretion führen. Das Gift des Kugelfisches wirkt selektiv an spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen

(Habermann 2001). Da diese Strukturen innerhalb des Kolonepithels nur im Bereich der submukösen Nerven vorkommen, kann ausgeschlossen werden, dass TTX auf einem anderen Weg als der Blockade nervaler Erregungsweiterleitung wirkt. TTX selbst verursacht eine Verminderung des I_{sc} durch die Blockade submuköser Nervenzellen (Binder & Sandle 1994).

Innerhalb der Ussingkammer-Experimente wurde eine, im Vergleich zu Imaging-Experimenten, hohe Konzentration Ruthenium Rot eingesetzt ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ statt $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Ussingkammer-Versuche, die mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt wurden, zeigten keine Wirksamkeit der Substanz, vermutlich aufgrund der zusätzlichen Diffusionsbarrieren.

Da Ruthenium Rot durch seine subepithelialen Nebeneffekte kein spezifischer Ryanodinrezeptor-Blocker ist, wurde hoch konzentriertes Ryanodin zur Unterdrückung eines CICR eingesetzt. Auch im Falle von Ryanodin wurden, wie bei Ruthenium Rot, in dieser Versuchsanordnung höhere Konzentrationen ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ anstelle von $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) eingesetzt als in Fura-2-Versuchen. Wurde Ryanodin in der zweiten Phase der Carbachol-Antwort appliziert, fiel der I_{sc} rasch ab und sank auf das Niveau der vorherigen Basallinie (s. Abb. III 16). Die Plateauphase des Carbachol-induzierten Kurzschlussstroms wird also durch Blockade des Ryanodinrezeptors vollständig unterdrückt. Bisher wurde nur von einer Beteiligung des CICR an der Aufrechterhaltung der Cl^- -Sekretion ausgegangen. Dieses Ergebnis scheint auf den ersten Blick die Aussage zu belegen, dass die zweite Phase der Ca^{2+} -induzierten Cl^- -Sekretion vollständig durch diesen positiven Feedback-Mechanismus getragen wird. In Kap. IV 3.1.1 wurde aber bereits diskutiert, dass es wahrscheinlich ist, dass IP_3 -Rezeptoren durch den Ca^{2+} -Ausstrom aus Ryanodinrezeptoren gegenüber ihrem Agonisten sensibilisiert werden. Auch innerhalb der hier vorgestellten Ergebnisse ist eine Beteiligung von IP_3 -Rezeptoren an der I_{sc} -Antwort wahrscheinlich. Da sich die beiden Mechanismen aber gegenseitig positiv beeinflussen, wobei der CICR der

initiale Mechanismus zu sein scheint, ist es logisch, dass der Kurzschlussstrom ganz unterdrückt wird, wenn der auslösende Mechanismus gehemmt ist.

Die Ussingkammer-Daten weisen darauf hin, dass eine positive Rückkopplung im Sinne eines CICR für die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Sekretion verantwortlich ist. Diese Ergebnisse konnten jedoch wegen der hohen Variabilität der Ca^{2+} -Antwort auf Carbachol nicht eindeutig durch Imaging-Experimente bestätigt werden. Daher kann letztendlich keine definitive Aussage über die physiologische Relevanz dieser Ergebnisse getroffen werden kann. Wodurch die hohe Variabilität der Ca^{2+} -Antwort zustande kommt, ist nicht geklärt.

4 Der Ryanodinrezeptor – ein Werkzeug zur Regulation der Ca^{2+} -Homöostase am Kolonepithel?

Die bisher bekannten Regulatoren der Ca^{2+} -Homöostase sind in Abb. IV 2 noch einmal zusammenfassend dargestellt. Neben diesen Mechanismen wird ein weiterer Ca^{2+} -Kanal, der Ryanodinrezeptor, im Rattenkolon funktionell exprimiert. Auch er ist in Abb. IV 2 dargestellt. Aus anderen Geweben, wie z.B. dem Herzen, ist es bekannt, dass diese Rezeptoren für einen positiven Rückkopplungsmechanismus, die sog. Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung verantwortlich sind. Auf Grund der hier dargestellten Ergebnisse ist es nicht möglich, die genaue physiologische Bedeutung des Ryanodinrezeptors im Rattenkolon zu bestimmen, allerdings geben die dargestellten Untersuchungen einen starken Hinweis darauf, dass die Rezeptoren an der Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Sekretion beteiligt sind.

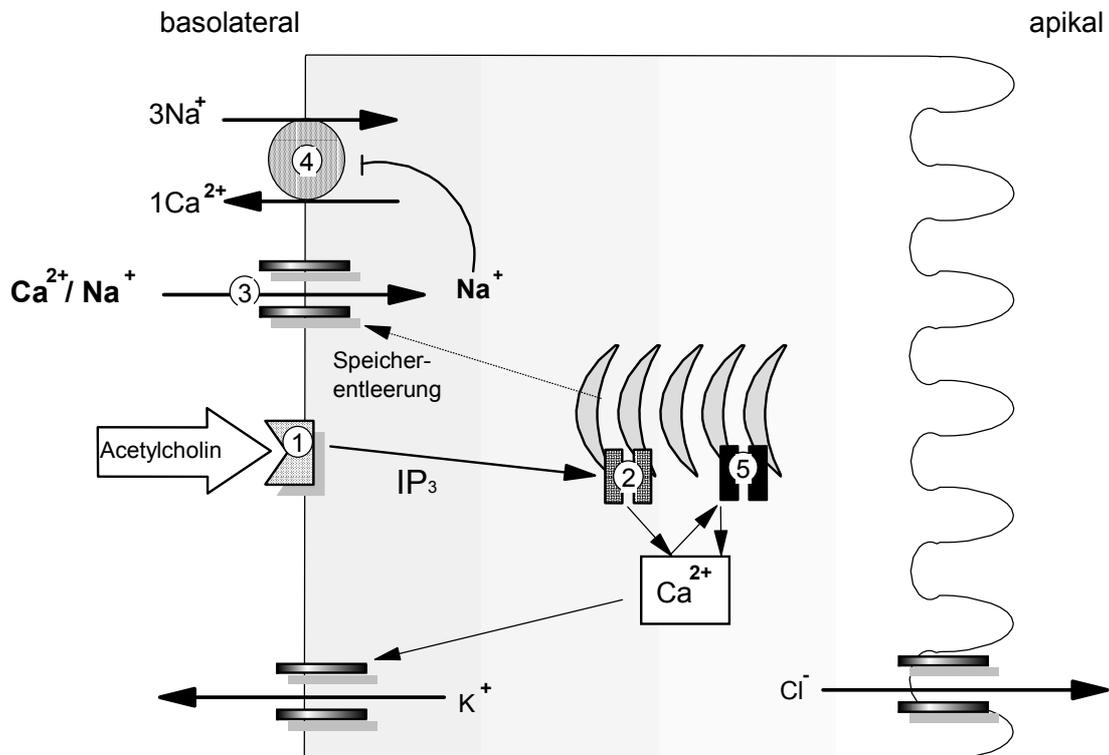


Abb. IV 2: Stimulation muskarinergere Rezeptoren (1), z.B. mit dem Sekretagog Acetylcholin, löst eine Ca²⁺-Signalkaskade aus: Die Bildung von IP₃ führt zu einer Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern über IP₃-Rezeptoren (2). Diese Speicherentleerung ist von einem kapazitiven Kationeneinstrom über den nicht-selektiven, speichergesteuerten Kationenkanal (3; SOC) aus dem Extrazellulärraum gefolgt. Das zusammen mit Ca²⁺ einströmende Na⁺ führt zu einer Hemmung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers (4), der unter basalen Bedingungen Ca²⁺ aus der Zelle transportiert. Alle Mechanismen tragen zu einem erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Spiegel bei. Ryanodinrezeptoren (5), deren funktioneller Nachweis durch diese Arbeit erfolgte, können im Sinne einer positiven Rückkopplung an der Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels beteiligt sein.

V Zusammenfassung

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist ein wichtiger Regulator der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase. Am Kolonepithel ist dieses Carrier-Protein bereits funktionell nachgewiesen worden. Mittels PCR war es möglich einen molekularbiologischen Nachweis über die Existenz des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in Kolonkrypten zu führen. Fura-2-Experimente gaben den Hinweis, dass der Austauscher über den Füllungsstatus intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher reguliert wird. Mit Hilfe der Mangan-Quench-Methode wurde dies widerlegt, gleichzeitig wiesen die Ergebnisse dieser Versuche darauf hin, dass an Kolonkrypten ein positiver Feedback-Mechanismus für Ca^{2+} existiert. Solch ein Mechanismus wird als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) bezeichnet; Ca^{2+} -sensitive Ca^{2+} -Rezeptoren an den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (Ryanodinrezeptoren) sind verantwortlich für die Ca^{2+} -Freisetzung. Sowohl durch Fura-2 als auch durch Ussingkammer-Experimente konnte im Kolonepithel ein Ryanodinrezeptor funktionell nachgewiesen werden.

Ryanodin, ein pharmakologischer Agonist an diesen Rezeptoren, zeigte in Fura-2-Experimenten einen konzentrationsabhängigen Effekt. In Fura-2-Experimenten bewirken Konzentrationen zwischen 10^{-7} und $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels wenn sie kumulativ appliziert werden. Wird die höchste Konzentration alleine verabreicht ist kein Ca^{2+} -Anstieg beobachtet; es scheint eine Hemmung des Ryanodinrezeptors vorzuliegen. Zyklische ADP-Ribose ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) wirkt als intrazellulärer Botenstoff ebenfalls agonistisch am Ryanodinrezeptor und bewirkte in isolierten Kolonkrypten einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Die Wirkung beider Agonisten konnte durch den Ryanodinrezeptorblocker Ruthenium Rot ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) unterdrückt werden. Auch das Methylxanthin Koffein, das generell als Agonist des CICR angesehen wird, löste an isolierten Kolonkrypten einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} aus.

In Ussingkammer-Experimenten konnte Ryanodin einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Kurzschlussstroms bewirken, was einen weiteren Beweis für die Existenz eines Ryanodinrezeptors darstellt. Um die physiologische Bedeutung des Ryanodinrezeptors für das Kolonepithel zu ermitteln, wurde in Ussingkammer-Experimenten durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) eine Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Sekretion induziert. Wurde gleichzeitig der Ryanodinrezeptor inhibiert, entweder durch Ruthenium Rot ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) oder hochkonzentriertes Ryanodin ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), war die Cl^- -Sekretion deutlich reduziert. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine positive Rückkopplung im Sinne eines CICR an der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Sekretion beteiligt ist.

VI Summary

The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger is one of the most important regulators of the intracellular Ca^{2+} homeostasis. For the colonic epithelium the existence of a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger has already been proven functionally. Using the PCR-method it was possible to verify this on the molecular level. Fura-2 experiments pointed out that the exchanger might be regulated by the filling state of the intracellular Ca^{2+} -stores. By dint of the Manganese quench method this hypothesis was vitiated. The results of the quench studies also gave a hint for the existence of a positive feedback mechanism for Ca^{2+} , which is referred to as a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (CICR). Fura-2 as well as Ussing chamber experiments gave evidence for the functional expression of ryanodine receptors in the rat colonic epithelium.

Ryanodine, a pharmacological agonist on these receptors, showed a concentration-dependent effect in Fura-2 studies. Ryanodine concentrations between 10^{-7} and $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ caused an increase in the intracellular Ca^{2+} level, when administered cumulatively. However, when the highest concentration was administered alone, no rise in the intracellular Ca^{2+} concentration could be observed, suggesting an inhibition of the receptor. Cyclic ADP ribose ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) is an intracellular messenger which acts as a stimulator of the CICR. At isolated colonic crypts cADP ribose induced a rise in the intracellular Ca^{2+} concentration. The effect of both agonists was suppressed by ruthenium red, a blocker of ryanodine receptors. The methylxanthine coffein is generally accepted to act as an agonist of CICR. In Fura-2 studies it induced also a rise in the intracellular Ca^{2+} level of colonic crypts.

In Ussingchamber experiments ryanodine evoked a concentration-dependent increase in short circuit current, giving a further hint for the existence of ryanodine receptors in the colonic epithelium. To investigate the physiological relevance of ryanodine receptors in this tissue, a Ca^{2+} -dependent Cl^- -secretion was induced by

carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). If the ryanodine receptor was inhibited simultaneously either by ruthenium red ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) or high-concentrated ryanodine ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), the chloride secretion was clearly diminished, suggesting a physiological involvement of the ryanodine receptor in Ca^{2+} -dependent Cl^{-} -secretion.

VIII Literaturverzeichnis

- Abed-Latif AA (1986).** Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol Rev* 38: 227-272.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Alves EW, de Meis L (1986).** Effect of compound 48/80 and ruthenium red on the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261: 16854-16859
- Anderson MP, Welsh M (1991).** Calcium and cAMP activate different chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6003-6007.
- Andres H, Rock R, Bridges RJ, Rummel W, Schreiner J (1985).** Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa. *J Physiol* 364: 301-312.
- Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, Steinhardt RA (1969).** The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J Physiol (Lond)* 200: 431-58.
- Barbry P, Hofman P (1997).** Molecular biology of Na^{+} absorption. *Am J Physiol* 273: 571-85.
- Barrett, KE, Keely SJ (2000).** Chloride Secretion by the Intestinal Epithelium: Molecular Basis and Regulatory Aspects. *Annu Rev Physiol* 62: 535-572.
- Baylor SM, Hollingworth S (2000).** Measurement and interpretation of cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ signals from calcium-indicator dyes. *News Physiol Sci* 15: 19-26.
- Bazotte RB, Pereira B, Higham S, Shoshan-Barmatz V, Kraus-Friedmann N (1991).** Effects of ryanodine on calcium sequestration in the rat liver. *Biochem Pharmacol* 42: 1799-1803.
- Binder HJ, Sandle GI (1994).** Electrolyte transport in the mammalian colon. *In: Physiology of the gastrointestinal tract – Vol. 2, Third Edition, Hrsg.: Johnson LR, Raven Press, New York* 64: 2133-2171.

- Binder HJ, Sandle GI, Rajendran VM (1991).** Colonic fluid and electrolyte transport in health and disease. *In: The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology, and Disease. Hrsg.: Philips SF, Pemperton JH and Shorter RG, Raven Press, New York: 141-68.*
- Binder HJ, Singh SK, Geibel JP, Rajendran VM (1997).** Novel transport properties of colonic-crypt cells: Fluid absorption and Cl^- dependent Na^+ - H^+ -exchange. *Comp Biochem Physiol 118A: 265-269.*
- Blaustein MP, Lederer J (1999).** Sodium calcium exchange: Its physiological implications. *Physiol Rev 79: 763-854.*
- Bleich M, Riedmann N, Warth R, Kerstan D, Leipziger J, Hör M, Van Driesche W, Greger R (1996).** Ca^{2+} regulated K^+ and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol 432: 1011-1022.*
- Bleich M, Warth R (2000).** The Very Small-Conductance K^+ Channel KvLQT1 and Epithelial Function. *Pflügers Arch - 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 Arch -Eur J Physiol 419: 114-151.*
- Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich BE, (1991).** Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature 1991 351: 751-754.*
- Bridges RJ, Rummel W (1983).** Effects of indometacin on baseline electrolyte transport across the isolated mucosa of the rat. *Nato Advanced Research Workshop on Icosanoids and Ion Transport: 67.*
- Brini M, Carafoli E (2000).** Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci 57: 354-370.*
- Büch U, Büch HP (1985).** Maligne Hyperthermie. *Anästhesiologie und Intensivmedizin 2: 49-57.*
- Catalan M, Cornejo I, Figueroa CD, Niemeyer MI, Sepulveda FV, Cid LP (2002).** CIC-2 in guinea pig colon: mRNA, immunolabeling, and functional evidence for surface epithelium localization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283: G1004-1013.*

- Chen F, Mottino G, Klitzner TS, Philipson KD, Frank JS (1995).** Distribution of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange protein in developing rabbit myocytes. *Am J Physiol* 268: 1126-1132.
- Christensen J (1991).** Gross and microscopic anatomy of the large intestine. In: *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology, and Disease*. Hrsg.: Philips SF, Pemperton JH and Shorter RG, Raven Press, New York: 13-35.
- Clementi E, Riccio M, Sciorati C, Nistico G, Meldolesi J. (1996).** The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 271: 17739-17745.
- Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan D (1994).** Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 266: C1485-1504.
- Cougnon, M, Planelles G, Crowson MS, Shull GE, Rossier BC, Jaisser F (1996).** The rat distal colon p-ATPase alpha subunit encodes a ouabain-sensitive H,K-ATPase. *J Biol Chem* 271: 7277-7280.
- Cuthbert AW, Hickman ME, Mac Vinish LJ, Evans MJ, Colledge WH, Ratcliff R, Seale PW, Humphrey PP (1994).** Chloride secretion in response to guanylin in epithelia from normal and transgenic cystic fibrosis mice. *Br J Pharmacol* 112: 31-36.
- Diener M, Eglème C, Rummel W (1991).** Phospholipase C-induced anion secretion and its interaction with carbachol in the rat colonic mucosa. *Eur J Pharmacol* 118: 1477-1487.
- Diener M, Knobloch SF, Bridges RJ, Keilmann T, Rummel W (1989).** Cholinergic-mediated secretion in the rat colon: neuronal and epithelial muscarinic responses. *Eur J Pharmacol*: 219-229.
- Diener M, Nobles M, Rummel W (1992).** Activation of basolateral Cl^- -channel in the rat colonic epithelium during regulatory volume decrease. *Pflügers Arch* 421: 530-538.
- Diener M, Mestres P, Bridges RJ, Rummel W (1989).** Functional and morphological changes during electric field stimulation in the rat distal colon. In: *Nerves and the gastrointestinal tract*. Hrsg.: Singer MV, Goebel H, MTP Press Limited member of the Kluwer Academic Publisher Group, Lancaster/Boston/The Hague/Dordrecht: 705-712.

- Diener M, Rummel W (1990).** Distension-induced secretion in the rat colon: mediation by prostaglandins and submucosal neurons. *Eur J Pharmacol* 178: 47-57.
- Dudel J (1995).** Grundlagen der Zellphysiologie. In: *Physiologie des Menschen*. Hrsg.: Schmidt RF, Thews G 26. Auflage. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 3-19.
- Field M, Semrad CE (1993).** Toxicogenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. *Annu Rev Physiol* 55: 631-655.
- Fill M, Copello JA (2002).** Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological Reviews*, 82: 893-922.
- Fleischer S, Ogunbunmi EM, Dixon MC, Flier EAM (1985).** Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7256-7259.
- Franzini-Amstrong C, Protasi F (1997).** Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev* 77: 699-729.
- Frings M, Schultheiss G, Diener M (1999).** Electrogenic Ca²⁺ entry in the rat colonic epithelium. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 439: 39-48.
- Galione A, Churchill GC (2000).** Cyclic ADP ribose as a calcium-mobilizing messenger. *Sci Stke* 2000: 1.
- Galione A, Lee HC, Busa WB, (1991).** Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 253: 1143-1146.
- Giannini G, Clementi E, Ceci R, Marziali G, Sorrentino V, (1992).** Expression of a ryanodine receptor-Ca²⁺ channel that is regulated by TGF-beta. *Science* 3: 91-94.
- Gilchrist JSC, Belacastro AN, Katz A (1992).** Intraluminal Ca²⁺ dependence of Ca²⁺ and ryanodine-mediated regulation of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *J Biol Chem* 267: 20850-20856.
- Goldman WF, Yarowsky PJ, Juhaszova M, Krueger BK, Blaustein MP (1994).** Sodium/calcium exchange in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14: 5834-5843.
- Greger R (2000).** Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol* 62: 467-491.

- Greger R, Bleich M, Leipziger J, Ecke D, Mall M, Kunzelmann K (1997).** Regulation of ion transport in colonic crypts. *News Physiol Sci* 12: 63-66.
- Habermann E (2001).** Tierische Gifte. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie – 8. Auflage*, Hrsg.: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. BI Wissenschaftsverlag Mannheim/Leipzig/Wien/Zürich. S. 1107-1117.
- Hatae J, Fujishiro N, Kawata H, (1996).** Spectroscopic properties of fluorescence dye fura-2 with various divalent cations. *Jpn J Physiol* 46: 423-429.
- Heilbrunn LV, Wiercinski FJ (1947).** The action of various cations on muscle protoplasm. *J Cell Comp Physiol* 29: 15-32.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Hille B (2001).** Ionic channels of excitable membranes. 3. Auflage, *Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts*.
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V (1994).** Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 17: 399-418.
- Humerickhouse RA, Besch HR, Gerzon K, Ruest L, Sutko JL, Emmick JT (1993).** Differential activating and deactivating effects of natural ryanodine congeners on the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum: evidence for separation of effects at functionally distinct sites. *Mol Pharmacol* 44: 412-421.
- Hwang KS, van Breemen C (1987).** Ryanodine modulation of ⁴⁵Ca efflux and tension in rabbit aortic smooth muscle. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 408: 343-350.
- Kerstan D, Gordjani N, Nitschke R, Greger R, Leipziger J (1998).** Luminal ATP induces K⁺ secretion via a P2Y2 receptor in rat distal colonic mucosa. *Pflügers Arch* 436: 712-716.
- Kidd JF, Thorn P (2000).** Intracellular Ca²⁺ and Cl⁻-channel activation in secretory cells. *Annu Rev Physiol* 62: 493-513.
- Kraev A, Chumakov I, Carafoli E (1996).** Molecular biological studies of the cardiac sodium-calcium exchanger. *Ann N Y Acad Sci* 15: 103-109.

- Lagnado L, McNaughton PA (1990).** Electrogenic properties of the $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ exchange. *J Membr Biol* 113: 177-191.
- Lee HC (1993).** Potentiation of calcium- and caffeine-induced calcium release by cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 268: 293-299.
- Lee HC (1999).** A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: CADP-Ribose and NAADP. *Biol Chem* 380: 785-793.
- Lee HC, Aarhus R, and Graeff RM (1995).** Sensitization of calcium-induced Calcium release by cyclic ADP-Ribose and Calmodulin. *Biol Chem* 270: 9060-9066.
- Leipzig 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 – Eur J Physiol* 426: 427-432.
- Leite MF, Burgstahler AD, Nathanson MH (2002).** Ca^{2+} waves require sequential activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors in pancreatic acini. *Gastroenterology* 122: 415-427.
- Levesque PC, Leblanc N, Hume JR (1994).** Release of calcium from quinea pig cardiac sarcoplasmic reticulum induced by sodium-calcium exchange. *Cardiovasc Res* 28: 523-536.
- Lindström CG, Rosengren JE, Fork FT (1979).** Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiologica Diagnosis Stockholm* 20: 523-536.
- Lindqvist SM, Sharp P, Johnson IT, Yohichi S, 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.
- Liu X, Ambudkar IS (2001).** Characteristics of a store-operated calcium-permeable channel. sarcoendoplasmic reticulum calcium pump function controls channel gating. *J Biol Chem* 276: 29891-29898.

- Lottespeich F, Zorbas H (1998).** Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.*
- 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: 709-16.
- Markert T, Vaandrager AB, Gambaryan S, Pohler D, Hausler C, Walter U, De-Jonge HR, Jarchau T, Lohmann SM (1995).** Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest* 96: 822-830.
- Mason MJ, Garcia-Rodriguez C, Grinstein S, (1991).** Coupling between intracellular Ca²⁺ stores and the Ca²⁺ permeability of the plasma membrane. Comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone, and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes. *J Biol Chem* 5: 20856-20862.
- Mc Pherson PS, Campbell KP (1993).** The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem* 5: 13765-137658.
- Meissner G (1986).** Ryanodine activation and inhibition of the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261: 6300-6306.
- Meldolesi J (2002).** Rapidly exchanging Ca²⁺ stores: ubiquitous partners of surface channels in neurons. *News Physiol Sci* 17: 144-149.
- Miledi R (1973).** Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc R Soc London Ser B* 183: 421-425.
- Morris AP, Frizzell RA (1993).** Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels in undifferentiated human colonic cells (HT-29). II. Regulation and rundown. *Am J Physiol Cell Physiol* 264: 977-985.
- Mullis KB (1990).** Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum Der Wissenschaft* 6 (1990): 60-67.
- Nicoll DA, Longoni S Philipson KD (1990).** Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Science* 250: 562-565.

- Niggli E, Lederer WJ (1991).** Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature* 349: 621-624.
- 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 Ca²⁺-pathway. *Acta physiol Scand* 142: 375-386.
- O'Malley KE, Farrel CB, O'Boyle KM, Baird FW (1995).** Cholinergic activation of Cl⁻ secretion in rat colonic epithelia. *Eur J Pharmacol* 275: 83-89.
- Ozawa T (2001).** Ryanodine-sensitive Ca release mechanism in non-excitabile cells. *Int J Mol Med* 7: 21-25.
- Ozawa T, Nishiyama A (1997).** Characterization of ryanodine-sensitive Ca²⁺ release from microsomal vesicles of rat parotid acinar cells: Regulation by cyclic ADP-ribose. *J Membr Biol* 156: 231-239.
- Parekh AB, Penner R (1997).** Store depletion and calcium Influx. *Physiol Rev* 77: 902-930.
- Parson, DS, Paterson CR (1965).** 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.
- Pérez CF, Marengo JJ, Bull R, Hidalgo C (1998).** Cyclic ADP-ribose activates caffeine-sensitive calcium channels from sea urchin egg microsomes. *Am J Physiol* 274: 430-439.
- Pessah IN, Waterhouse AL, Casida JE (1985).** The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 128: 449-456.
- Putney JW (1997).** Capacitative calcium entry. *Springer Verlag, Heidelberg*.
- Reuter H, Henderson SA, Han T, Ross RS, Goldhaber JI, Philipson KD (2002).** The Na⁺-Ca²⁺ exchanger is essential for the action of cardiac glycosides. *Circ Res* 90: 305-308.
- Reuter H, Seitz N (1968).** The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol (Lond)* 195: 451-70.

- Reuter H, Stevens CF, Tsien RW, Yellen G (1982).** Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature* 297: 501-504.
- Ringer S (1883).** A further contribution regarding the influence of different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol (Lond)* 4: 29-43.
- Scheffler A (1984).** Charakterisierung der Wirkung von Pharmaka auf die elektrophysiologischen Parameter gastrointestinaler Epithelgewebe mit einer Mikrocomputer gesteuerten Strom und Spannungseinrichtung. *Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin. Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschulen Aachen. S. 24-40.*
- Schultheiss G, Diener M (1998).** K^+ and Cl^- conductance in the distal colon of the rat. *Gen Pharmacol* 31: 337-342.
- Schultheiss G, Kocks SL, Diener M (2002).** Methods for the study of ionic currents and Ca^{2+} -signals in isolated colonic crypts. *Biol Proc Online* 3: 70-78.
- Schultheiss G, Ribeiro R, Diener M (2001).** Fatty acids inhibit anion secretion in rat colon: apical and basolateral action sites. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 442: 603-613.
- Schulz I (1990).** Permeabilizing cells: some methods and applications for the study of intracellular processes. *Methods Enzymol* 192: 280-300.
- Schulze D, Kofuji P, Hadley R, Kirby MS, Kieval RS, Doering A, Niggli E, Lederer WJ (1993).** Sodium/calcium exchanger in heart muscle: molecular biology, cellular function, and its special role in excitation-contraction coupling. *Cardiovasc Res* 27: 1726-1734.
- Schuster S, Marhl M, Höfer T (2002).** Modelling of simple and complex calcium oscillations - From single-cell response to intercellular signalling. *Eur J Biochem* 269: 1333-1355.
- Seip G, Schultheiss G, Kocks SL, Diener M (2001).** Interaction between store-operated nonselective cation channels and Na^+ - Ca^{2+} -exchanger during colonic secretion. *Exp Physiol* 86: 461-468.
- 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.: Ferner H, Staubesand J; 17. Auflage. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien. Band 2, 61-143.*
- Sorrentino V (1995).** The ryanodine receptor family of intracellular calcium release channels. *Adv Pharmacol 11: 67-89.*
- 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.*
- Takemura, H, Hughes AR, Thastrup O, and Putney JW (1989).** Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J. Biol. Chem. 264: 12266-12271.*
- Tapper EJ, Powell DW, Morris SM (1978).** Cholinergic-adrenergic interactions on intestinal ion transport. *Am J Physiol 235: 402-409.*
- Taylor CW, Board LM (1998).** Pharmacological analysis of intracellular Ca²⁺ signalling: problems and pitfalls. *Trends Pharmacol Sci 19: 370-375.*
- Thrower EC, Hagar RE, Ehrlich BE (2001).** Regulation of Ins(1,4,5)P₃ receptor isoforms by endogenous modulators. *Trends in Pharmacol Sci 22: 580-586.*
- Trepakova ES, Cohen RA, Bolotina VM (1999).** Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-dependent refilling of Ca²⁺ stores. *Circulation Res 84: 201-209.*
- Tsien RY (1980).** New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry 19: 2396-2404.*
- Tsien RY, Poenie M (1986).** Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling. *TIBS 11: 450-455.*
- Tsien RW, Wheeler DB (1999).** Voltage-gated calcium channels. *In: Calcium as a Cellular Regulator. Hrsg.: Carafoli E, Klee C, Oxford University Press, New York. 171-199.*

- 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.
- Verma V, Carter C, Keable S, Bennett D, Thorn P (1996).** Identification and function of type-2 and type-3 ryanodine receptors in gut epithelial cells. *Biochem J* 319: 449-454.
- Warth R, Hamm K, Bleich M, Kunzelmann K, von Hahn T, Schreiber R, Ullrich E, Mengel M, Trautmann N, Kindle P, 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: 529-542.
- Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B (2002).** Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* 277: 13569-13577.
- Welsh MJ, Smith PL, Fromm M, Frizell RA (1982).** Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science* 218: 1219-1221.
- Wu C, Fry CH (2001).** $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange and its role in intracellular Ca^{2+} regulation in guinea pig detrusor smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: 1090-1096.
- Xu X, Star RA, Tortorici G, Muallem S (1994).** Depletion of intracellular Ca stores activates nitric-oxide synthase to generate cGMP and regulate Ca influx. *J Biol Chem* 269: 12645-12653.
- 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 islet cells. *Jpn J Physiol* 46: 473-480.

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

An erster Stelle bedanke ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Martin Diener** für die Überlassung des Themas. Durch seine unermüdliche Geduld bei der Bearbeitung aller Fragen und Probleme habe ich während der Zeit meiner Doktorarbeit sehr viel lernen können. Vielen Dank für seine stete Hilfe und seine Unterstützung, aber auch für seinen Enthusiasmus für die Physiologie, der ansteckte und motivierte.

Danke an *Herrn PD Dr. Gerhard Schultheiß*, für die anregenden fachlichen Diskussionen und für seine große Hilfsbereitschaft,

an *Dr. Gisela Seip* für die lebenswürdige Hilfestellung zu Beginn des Versuchsabschnitts und für die Diskussionsbeiträge,

an *Brigitta Brück, Eva-Maria Haas, Alice Metternich* und *Bärbel Schmidt*, für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente,

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

an alle Mitarbeiter des Instituts für Veterinär-Physiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre,

an *Robert P. Saunders*, der mich mit viel Geduld in die Methode der PCR eingewiesen hat und an *Joachim Geyer*, der mir im Laufe der Versuch immer wieder mit seinem Rat zur Seite stand.

an *Herrn Prof. Dr. Petzinger* für die Initiierung und Organisation des Graduiertenkollegs „Molekulare Veterinärmedizin“,

an alle Doktoranden des Graduiertenkollegs für die fachliche Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre,

an alle Professoren und Dozenten, die die zahlreichen Fortbildungen und Seminare des Graduiertenkollegs ermöglicht haben

und an **meine Eltern**, die mich während des Studiums und der Promotion so bedingungslos und liebevoll unterstützt haben.

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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


ISBN: 978-3-89687-627-0


9 783896 876270