

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
I Einleitung	1
1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau des Kolons	1
2 Elektrolyttransport am Kolon	4
2.1 Resorptionsmechanismen am Kolon	4
2.2 Sekretionsmechanismen am Kolon	6
2.3 Regulation der Sekretion am Kolon	7
2.3.1 cAMP und cGMP	8
2.3.2 PLC-IP ₃ -Ca ²⁺ -Signalweg	9
2.3.3 Der Calcium/Calmodulin-Weg	11
2.4 Chloridkanäle am Kolon	12
2.4.1 CFTR	12
2.4.2 CaCC - calciumaktivierte Chloridkanäle	13
3 Eigene Fragestellung	16
II Material und Methoden	17
1 Versuchstiere	17
2 Verwendete Lösungen	17
2.1 Lösungen für die Kryptenisolation	17
2.1.1 Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung	17
2.1.2 Isolationslösung	17
2.1.3 Auffang-Tyrode	18
2.2 Lösungen für die Imagingversuche	18
2.2.1 DiH-MEQ-Lösung	18
2.2.2 NaCl-Lösung	18
2.2.3 KCl-Lösung	19
2.2.4 KGluc-Lösung	19
2.2.5 Eichlösungen	19
2.3 Lösungen für die Immunhistochemie	20
2.3.1 Gelatinelösung zur Objekträgerbeschichtung	20
2.3.2 Gelatinelösung zur Gewebereinbettung	20
2.3.3 Phosphatpuffer (= PB)	20
2.3.4 Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung	20
2.3.5 Blockinglösung	21
2.3.6 Primärantikörperlösung	21
2.3.7 Sekundärantikörperlösung	21
2.3.8 DAPI (= 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat)-Lösung	21

2.4	Lösungen für die Ussingkammer-Messungen	22
2.4.1	KCl-Lösung	22
2.4.2	KGluc-Lösung	22
3	Substanzen	23
4	Die Gewebepreparation	25
4.1	Die Präparation der Darmschleimhaut	25
4.2	Die Präparation isolierter Krypten	26
5	Die Imaging-Technik	27
5.1	Der halogenidsensitive Farbstoff MEQ	27
5.2	Herstellung von DiH-MEQ aus MEQ	29
5.3	Kalibrierung der Fluoreszenz per Doppel-Ionophor-Technik	30
5.4	Die Ionophoren	33
5.4.1	Tributylzinn-Chlorid (TBT)	33
5.4.2	Nigericin	34
5.4.3	Valinomycin	35
5.5	Der Imagingstand	36
5.5.1	Mikroskop und elektrische Komponenten	36
5.5.2	Messkammern und Perfusionssystem	37
5.6	Die Imaging-Experimente	39
5.6.1	Aufladung der Krypten	39
5.6.2	Versuchsdurchführung	39
5.6.3	Stimulantien	41
5.6.4	Inhibitoren	42
5.7	Datenerfassung	43
6	Histochemische Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenz	43
6.1	Grundlagen der Immunfluoreszenz	43
6.2	Fluoreszenzmarkierung	45
6.2.1	Kryofixierung des Gewebes	45
6.2.2	Herstellung der Gewebeschnitte	45
6.2.3	Das Färbeprotokoll	46
6.2.4	Verwendete Antikörper	47
6.3	Mikroskopie	48
7	Die Ussingkammer-Technik	49
7.1	Die Messkammer	49
7.2	Elektrische Messungen	50
7.3	Versuchsdurchführung und Datenerfassung	53
8	Statistik	55
III	Ergebnisse	56
1	Das Versuchsprotokoll: Messungen unter depolarisierten Bedingungen	56

1.1	Aktivierung eines Chloridausstromes durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration	57
1.2	Beteiligung von CaCC-Kanälen an der Carbachol-induzierten Chloridsekretion	59
1.3	Kryptenachse	61
1.4	Vergleich mit Forskolin	63
2	Signaltransduktion	66
2.1	Die „klassischen“ Ca^{2+} -Signalkaskaden	66
2.1.1	Calcium/Calmodulin- Weg und Phospholipase C-Signalkaskade	66
2.2	Alternativer Signalweg: NO-Synthasen (NOS)	68
2.2.1	Funktionelle Bedeutung der NOS in der Signalkaskade	68
2.2.2	Immunhistochemische Lokalisation der NOS-Isoformen	70
2.3	Das Cytoskelett	74
2.3.1	Einfluss der Mikrotubuli auf den CaCC	74
2.3.2	Einfluss der Actinfilamente auf den CaCC	77
IV	Diskussion	79
1	Stimulation einer Chloridleitfähigkeit an isolierten Krypten	79
2	Calciumabhängigkeit der Chloridleitfähigkeit	81
3	Kryptenachse	82
4	Signalkaskade	83
5	Stickstoffmonoxid als second messenger	84
6	Das Cytoskelett	87
7	Zellmodell	90
V	Zusammenfassung	91
VI	Summary	93
VII	Abbildungsverzeichnis	95
VIII	Tabellenverzeichnis	95
IX	Literaturverzeichnis	96
X	Danksagung	105
XI	Erklärung	106

VII Abbildungsverzeichnis

Abb. I.1: Schematische Darstellung der Kolonwand.....	3
Abb. I.2: Darstellung der wichtigsten Mechanismen zur Resorption von Natrium, Kalium und Chlorid.....	5
Abb. I.3: Darstellung der wichtigsten Mechanismen zur Sekretion von Chlorid.....	6
Abb. I.4: Calcium-vermittelte Chloridsekretion nach muscarinergem Stimulation.....	10
Abb. I.5: Derzeit akzeptierte Topologie des CFTR.....	13
Abb. II.1: Einzelne Krypte, isoliert aus dem Kolon einer Ratte.....	26
Abb. II.2: Strukturformel von MEQ und DiH-MEQ.....	28
Abb. II.3: Fluoreszenzeigenschaften von MEQ (durchgehende Linien) und DiH-MEQ (gestrichelte Linie, modifiziert nach Biwersi & Verkman 1991).....	31
Abb. II.4: Tributylzinn-Chlorid (TBT).....	33
Abb. II.5: Nigericin.....	34
Abb. II.6: Valinomycin.....	36
Abb. II.7: Schematische Darstellung des Imaging-Setups.....	37
Abb. II.8: Falschfarbendarstellung zweier Krypten nach Aufladung mit MEQ.....	41
Abb. II.9: a) direkter Nachweis; b) indirekter Nachweis.....	44
Abb. II.10: Schema einer modifizierten Ussingkammer.....	50
Abb. II.11: Elektrisches Schaltkreismodell.....	51
Abb. II.12: a) Open-circuit-modus; b) Voltage-clamp-Modus.....	53
Abb. III.1: Carbachol-induzierte Erhöhung des MEQ-Signals.....	57
Abb. III.2: Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration durch Ca^{2+} -abhängige Sekretagogue.....	58
Abb. III.3: Vollständige Hemmung der Carbacholantwort durch DIDS.....	60
Abb. III.4: Hemmung des Carbacholeffekts durch SITS und DIDS.....	61
Abb. III.5 Vergleich der Änderung von $[\text{Cl}^-]_i$ entlang der Kryptenachse.....	62
Abb. III.6: Forskolin induzierte Änderung der MEQ-Fluoreszenzintensität.....	63
Abb. III.7: Forskolin-induzierter Abfall der intrazellulären Chloridkonzentration.....	65
Abb. III.8: Wirkung von Hemmstoffen der klassischen Ca^{2+} -Signaltransduktionswege auf den Carbacholeffekt.....	67
Abb. III.9: n-NOS-Signal im Kolonepithel.....	71
Abb. III.10: i-NOS-Signal im Kolonepithel.....	72
Abb. III.11: e-NOS-Signal im Kolonepithel.....	73
Abb. III.12: Stimulation eines Cl^- -Stroms durch die apikale Membran.....	76
Abb. IV.1: Zellmodell.....	90

VIII Tabellenverzeichnis

Tab. II.1: Wirkungsweise und Konzentrationen der eingesetzten Stimulanzien.....	41
Tab. II.2: Wirkungsweise und Konzentrationen der verwendeten Antagonisten.....	42
Tab. II.3: Verwendete Primärantikörper.....	47
Tab. II.4: Verwendeter Sekundärantikörper.....	47
Tab. III.1: Auswirkung der Inhibitoren der NOS auf die Carbacholantwort.....	69
Tab. III.2: Wirkung Mikrotubuli-depolymerisierender Substanzen in Imaging-Experimenten.....	75
Tab. III.3: Wirkung von Colchicin in der Ussingkammer.....	77
Tab. III.4: F-Actin wirksame Cytoskelett-Toxine in Imaging-Experimenten.....	78