

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V

I Einleitung	1
1 Anatomische und funktionelle Charakterisierung des Versuchsgewebes – Kolon der Ratte	1
2 Resorption und Sekretion am Kolonepithel	4
2.1 Resorptionsvorgänge am Kolon	5
2.2 Sekretionsvorgänge am Kolon	6
2.3 Regulation der Resorptions- und Sekretionsvorgänge am Kolon	8
2.3.1 cAMP-vermittelte Sekretion	9
2.3.2 cGMP-vermittelte Sekretion	10
2.3.3 Ca^{2+} -vermittelte Sekretion	10
3 Einfluss des enterischen Nervensystems auf Transportprozesse am Kolon	11
4 Gasotransmitter	12
5 Kohlenstoffmonoxid	13
6 Eigene Fragestellung	16
II Material und Methoden	17
1 Versuchstiere	17
2 Verwendete Lösungen	17
2.1 Lösungen für Ussingkammer-Versuche	17
2.1.1 Bicarbonat-gepufferte Parsonslösung (Standard)	17
2.1.2 Chloridfreie Parsonslösung	18
2.1.3 Kaliumchloridreiche Parsonslösung	18
2.1.4 Standard-Tyrodellösung	18
2.1.5 Chlorid- und bicarbonatfreie Tyrodellösung	18
2.1.6 Natriumfreie Tyrodellösung	19
2.2 Lösungen für Ca^{2+} -Imaging-Versuche	19
2.2.1 Isolationslösung	19
2.2.2 Auffanglösung	19
2.2.3 Standard-Tyrodellösung	19
2.2.4 Fura-2 AM-Lösung	20
2.2.5 Ca^{2+} -freie Tyrodellösung	20
2.3 Lösungen für immunhistochemische Markierungen	20
2.3.1 Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung	20
2.3.2 Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung	20
2.3.3 Phosphatpuffer (PB)	20
2.3.4 Fixierungslösung	21
2.3.5 Kresylviolett-Färbelösung	21
2.3.6 Blockinglösung	21

2.3.7 Primärantikörperlösungen	21
2.3.8 Sekundärantikörperlösungen	22
2.3.9 DAPI-Lösung	22
2.4 Lösungen zur Beschichtung der Glasplättchen	22
2.4.1 Poly-L-Lysin-Lösungen	22
3 Substanzen	23
4 Herstellung von inaktiviertem CORM-2	24
5 Beschichtung der Glasplättchen	24
6 Gewebepräparation	25
6.1 Herstellung eines Mucosa-Submucosa-Präparats	25
6.2 Präparation isolierter Krypten	26
6.3 Herstellung eines Submucosa-Präparats (intaktes Häutchenpräparat des Plexus submucosus)	27
7 Ussingkammer-Versuche	28
7.1 Theorie der Ussingkammer-Technik	28
7.2 Die Messkammer	31
7.3 Versuchsdurchführung und Datenerfassung	33
8 Ca ²⁺ -Imaging mit Fura-2 AM	34
8.1 Theorie des Ca ²⁺ -Imagings	34
8.2 Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM	36
8.3 Der Ca ²⁺ -Imaging-Messstand	38
8.4 Die Imaging-Messkammer mit Perfusionssystem	39
8.5 Ca ²⁺ -Imaging-Experimente an isolierten Krypten	39
8.5.1 Aufladung der Krypten	39
8.5.2 Versuchsdurchführung	39
8.5.3 Datenerfassung	41
8.6 Ca ²⁺ -Imaging Experimente am intakten Häutchenpräparat des Plexus submucosus	41
8.6.1 Aufladung der Häutchenpräparate	41
8.6.2 Versuchsdurchführung und Datenerfassung	41
9 Immunfluoreszenz-Analyse	43
9.1 Theorie der Immunfluoreszenz	43
9.2 Die verwendeten Antikörper	44
9.3 Negativkontrollen	47
9.4 Fluoreszenzmarkierung	47
9.4.1 Paraformaldehydfixation	47
9.4.2 Kryofixation	48
9.4.3 Herstellung der Gewebeschnitte	49
9.4.4 Versuchsdurchführung/Färbeprotokolle	49
9.4.4.1 Einfachmarkierung	49
9.4.4.2 Doppelmarkierung	53
9.4.5 Mikroskopie	53
10 Polymerasekettenreaktion (PCR)	55

10.1 Theorie der PCR	55
10.2 Isolation von mRNA	57
10.3 Quantitative Bestimmung der Gesamt-RNA	58
10.4 Synthese von cDNA	58
10.5 Oligonukleotide (Primer)	59
10.6 Versuchsdurchführung	59
10.6.1 Hämoxygenase I + II	60
10.7 Gelelektrophorese	61
11 Statistik	62
 III Ergebnisse	 63
1 Kohlenstoffmonoxid-induzierte Veränderungen des intestinalen Ionentransports	63
1.1 CORM-2-induzierter Anstieg des Kurzschlussstroms am distalen Rattenkolon	63
1.2 Desensitivierung des Gewebes durch mehrfache CORM-2-Applikation	65
1.3 Der CORM-2-induzierte I_{sc} wird von einer Anionensekretion getragen	66
1.3.1 Anionensubstitutionsversuche	66
1.3.2 Versuche mit Transportinhibitoren auf der basolateralen Membranseite	68
1.3.3 Versuche mit Transportinhibitoren auf der apikalen Membranseite	68
1.4 CORM-2 induziert Ionenbewegungen an der apikalen Membran	70
1.5 CORM-2 induziert Ionenbewegungen an der basolateralen Membran	73
2 Beteiligung von sekretomotorischen Neuronen am CO-Effekt	75
3 Untersuchung auf endogene Produktion von CO im distalen Rattenkolon	77
3.1 Immunhistochemischer Nachweis der Hämoxygenase I und II	77
3.2 Molekularbiologischer Nachweis der Hämoxygenase I und II	80
3.3 Einfluss endogener CO-Produktion auf den Ionentransport	81
4 Signalkaskade	83
4.1 Kollokalisation von Hämoxygenasen und Stickstoffmonoxid-Synthasen	83
4.2 Der CO-Effekt ist unabhängig von einer sGC-Aktivierung	86
4.3 CORM-2 bewirkt einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration	87
4.4 Veränderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration an intakten Häutchenpräparaten des Plexus submucosus durch CORM-2	90
4.5 Interaktionen von CORM-2 mit Sekretagogen	91
 IV Diskussion	 94
1 CORM-2-induzierter Anstieg des Kurzschlussstroms	94
2 CORM-2 induziert eine Anionensekretion am distalen Kolon der Ratte	95
3 Einfluss von CORM-2 auf die apikale Membran	96
4 Einfluss von CORM-2 auf die basolaterale Membran	97
5 Beteiligung von sekretomotorischen Neuronen am CO-Effekt	98
6 Endogene Produktion von CO	99
7 Signalkaskade	100

Inhaltsverzeichnis

7.1 sGC/cGMP-Signalkaskade ist nicht am CO-Effekt beteiligt	100
7.2 CORM-2-induzierte Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels	103
8 Interaktionen mit Sekretagogen	105
9 Zellmodell	107
V Zusammenfassung	108
VI Summary	109
VII Abbildungsverzeichnis	110
VIII Tabellenverzeichnis	111
IX Literaturverzeichnis	112
X Danksagung	121
XI Erklärung	122