

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor

**Untersuchung der Ionentransportmechanismen,
die für die Volumenveränderung kultivierter
Parietalzellen bei Stimulation der Säuresekretion
verantwortlich sind**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ALEXANDER TOBIAS HEINZMANN
aus Reutlingen

2003

Dekan: Herr Professor Dr. C. D. Claussen
1.Berichterstatter: Frau Professor Dr. U. Seidler
2.Berichterstatter: Herr Professor Dr. H. Oßwald

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Säuresekretion der Parietalzelle | 2 |
| 1.1.1 | Rezeptoren der Parietalzellen | 2 |
| 1.1.2 | Vorgänge bei Stimulation der Säuresekretion | 2 |
| 1.1.3 | Die H ⁺ /K ⁺ -ATPase | 3 |
| 1.1.4 | Beteiligung von K ⁺ Kanälen an der Säuresekretion | 4 |
| 1.1.4.1 | Der K ⁺ Kanal KCNQ1 | 5 |
| 1.1.4.2 | Der Kir4.1 und Kir5.1 | 7 |
| 1.1.4.3 | Basolaterale K ⁺ Kanäle | 7 |
| 1.1.4.4 | Inhibition von K ⁺ Kanälen | 8 |
| 1.1.5 | Beteiligung von Cl ⁻ Kanälen an der Säuresekretion | 8 |
| 1.1.5.1 | Der Cl ⁻ Kanal ClC-2 | 8 |
| 1.1.5.2 | Inhibition von Cl ⁻ Kanälen | 9 |
| 1.2 | Mechanismen der Volumenregulation | 10 |
| 1.2.1 | Regulationsmöglichkeiten der Zelle | 10 |
| 1.2.1.1 | Mechanismen der Zellschrumpfung | 10 |
| 1.2.1.2 | Mechanismen der Zellschwellung | 11 |
| 1.2.2 | Intrazellulärer Signalweg der Volumenregulation | 12 |
| 1.3 | Volumenregulation der Parietalzelle | 14 |
| 1.4 | Experimentelles Modell | 16 |
| 1.5 | Fragestellung | 17 |
| 2 | Material und Methodik | 18 |
| 2.1 | Materialien | 18 |
| 2.1.1 | Flüssigchemikalien | 18 |
| 2.1.2 | Feststoffe | 18 |
| 2.1.3 | Gase | 20 |
| 2.1.4 | Fertigarzneimittel | 20 |
| 2.1.5 | Tiere zur Zellpräparation | 20 |
| 2.1.6 | Verbrauchsmaterialien | 20 |
| 2.1.7 | Geräte | 21 |
| 2.1.8 | Stammlösungen | 22 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|---|----|
| 2.2 | Zellpräparation | 23 |
| 2.2.1 | Vorbereitung | 23 |
| 2.2.1.1 | Herstellung der Puffer | 23 |
| 2.2.1.2 | Herstellung der Nykoden [®] -Gradienten | 24 |
| 2.2.1.3 | Matrigel [®] | 25 |
| 2.2.1.4 | Kulturschälchen | 25 |
| 2.2.1.5 | Medium | 25 |
| 2.2.1.6 | Elutriatorpflege | 27 |
| 2.2.2 | Operation des Kaninchens | 27 |
| 2.2.3 | Zelltrennung | 28 |
| 2.2.3.1 | Enzymatische Verdauung | 28 |
| 2.2.3.2 | Zelltrennung durch Gegenstromzentrifugation | 29 |
| 2.2.3.3 | Nykoden [®] -Zentrifugation | 30 |
| 2.2.4 | Zellzählung | 30 |
| 2.2.5 | Beurteilung der Reinheit der einzelnen Zellfraktionen | 31 |
| 2.2.6 | Kultivierung | 31 |
| 2.2.7 | Mediumswechsel | 31 |
| 2.3 | Verwendete Lösungen, Inhibitoren und Stimulantien | 32 |
| 2.3.1 | Lösungen | 32 |
| 2.3.2 | Stimulantien und Inhibitoren | 35 |
| 2.4 | Messung der Säuresekretion | 36 |
| 2.4.1 | Verwendete Lösungen und Stimulantien | 36 |
| 2.4.2 | Versuchsablauf | 37 |
| 2.4.2.1 | Präinkubation | 37 |
| 2.4.2.2 | Stimulation | 37 |
| 2.4.2.3 | Lyse der Zellen und Radioaktivitätsmessung | 38 |
| 2.5 | Messung des Zellvolumens und der Volumenänderung | 39 |
| 2.5.1 | Färbung | 39 |
| 2.5.2 | Messung | 39 |
| 2.5.2.1 | Messkammer | 39 |
| 2.5.2.2 | Montage der Messkammer | 39 |
| 2.5.2.3 | Auswahl der zu messenden Zellen | 40 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.5.2.4 | Messung des Fluoreszenzsignals | 40 |
| 2.6 | Messung des intrazellulären pH und der pH-Änderung | 42 |
| 2.6.1 | Färbung | 42 |
| 2.6.2 | Messung | 42 |
| 2.6.2.1 | Messkammer | 42 |
| 2.6.2.2 | Montage der Kammer | 42 |
| 2.6.2.3 | Auswahl der zu messenden Zellen | 43 |
| 2.6.2.4 | Messung des Fluoreszenzsignals | 44 |
| 2.6.2.5 | Bestimmung der intrinsischen Pufferkapazität | 44 |
| 2.7 | Auswertung der Messdaten und Statistik | 46 |
| 2.7.1 | Verarbeitung der Rohdaten des Laserscanmikroskopes | 46 |
| 2.7.2 | Verarbeitung der Rohdaten des Fluoreszenzmikroskopese | 46 |
| 2.7.3 | Weiterbearbeitung und Zusammenfassung der Messdaten | 46 |
| 2.7.4 | Berechnung des Protonenfluxes | 48 |
| 2.7.5 | Statistische Auswertung | 48 |
| 3 | Ergebnisse | 49 |
| 3.1 | Parietalzellkultur | 49 |
| 3.1.1 | Parietalzellisolierung | 49 |
| 3.1.1.1 | Enzymatische Verdauung | 49 |
| 3.1.1.2 | Gegenstromzentrifugation | 50 |
| 3.1.1.3 | Dichtegradientenzentrifugation | 50 |
| 3.1.2 | Parietalzellkultur | 50 |
| 3.1.3 | Validierung der Kultur | 51 |
| 3.2 | Messung der Säuresekretion in stimulierten Parietalzellen | 52 |
| 3.2.1 | Bedeutung der Stimulierbarkeit der Säuresekretion | 52 |
| 3.2.2 | Kontrollgruppen | 52 |
| 3.2.3 | Stimulation mit verschiedenen Substanzen | 52 |
| 3.2.4 | Inhibition von K^+ und Cl^- Kanälen | 54 |
| 3.2.4.1 | K^+ Kanal | 54 |
| 3.2.4.2 | Cl^- Kanal | 56 |
| 3.3 | Messung des Zellvolumens in stimulierten Parietalzellen | 58 |
| 3.3.1 | Kontrollgruppe | 58 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.2 | Bedeutung von K^+ und Cl^- Leitfähigkeit für die Zellschrumpfung | 60 |
| 3.3.2.1 | K^+ Kanal | 60 |
| 3.3.2.2 | Cl^- Kanal | 65 |
| 3.3.3 | Bedeutung der Protonenpumpe für die Zellschrumpfung | 67 |
| 3.3.4 | Bedeutung der NHE-Isoformen für die Volumenerholung | 70 |
| 3.4 | Messung des intrazellulären pH in stimulierten Parietalzellen | 74 |
| 3.4.1 | Ausschlusskriterien bei Versuchsbeginn | 74 |
| 3.4.2 | Verhalten des intrazellulären pH bei K^+ und Cl^- Kanalblockade | 74 |
| 3.5 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 77 |
| 3.5.1 | Aminopyrinaufnahme | 77 |
| 3.5.2 | Calcein-Konzentrationsänderung | 78 |
| 3.5.3 | Protonenflux | 78 |
| 4 | Diskussion | 79 |
| 4.1 | Diskussion des Versuchmodells | 79 |
| 4.1.1 | Isolierte Zellen und Membranvesikel | 79 |
| 4.1.2 | Magenepithel, DrüsenSchläuche, handdissezierte Magendrüsen | 80 |
| 4.1.3 | Primärkultur von Parietalzellen aus dem Kaninchenmagen | 80 |
| 4.1.3.1 | Abtrennung der Parietalzellen | 80 |
| 4.1.3.2 | Vermeidung von Kontaminationen mit Mikroorganismen | 81 |
| 4.1.3.3 | Beurteilung des gewählten Versuchmodells | 82 |
| 4.1.4 | Optimierung der Methoden | 83 |
| 4.2 | Messung der Säuresekretion | 85 |
| 4.2.1 | Untersuchung der an der Säuresekretion beteiligten K^+ Kanäle | 85 |
| 4.2.1.1 | Stimulation mit Forskolin und Inhibition mit 293B | 85 |
| 4.2.1.2 | Stimulation mit Carbachol und Inhibition mit 293B | 86 |
| 4.2.1.3 | Beteiligung basolateraler K^+ Kanäle | 86 |
| 4.2.2 | Untersuchung der an der Säuresekretion beteiligten Cl^- Kanäle | 87 |
| 4.3 | Messung des Zellvolumens | 89 |
| 4.3.1 | Beteiligung von K^+ Kanälen an der initialen Zellschrumpfung | 89 |
| 4.3.2 | Beteiligung von Cl^- Kanälen an der initialen Zellschrumpfung | 91 |
| 4.3.3 | Einfluss der H^+/K^+ -ATPase auf die initiale Zellschrumpfung | 92 |
| 4.3.4 | Übersicht über den initialen Schrumpfungsprozess | 92 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3.5 | Der Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher und seine Bedeutung an der RVI | 94 |
| 4.4 | Messung des intrazellulären pH | 96 |
| 4.5 | Kurzer Ausblick | 97 |
| 5 | Zusammenfassung und Schlussfolgerung | 98 |

1 Einleitung

Die Parietalzellen des Magens machen etwa einen prozentualen Anteil von 30-40% an der gesamten Schleimhaut des Magens aus. Sie sind in klar abgegrenzten Drüsenbereichen der Magenschleimhaut, nämlich in der Fundus- und Korpusregion lokalisiert (38). Die Mukosaoberfläche ist mit Schleimzellen besetzt, während in den ins Magenlumen mündenden Drüsen mehrere Zelltypen vorkommen, darunter Parietalzellen, Hauptzellen, Schleimzellen, ECL-Zellen und undifferenzierte Zellen. „Parietal“ beschreibt die vorstehende Position der Zellen in der Drüsenwand, welche auf die Zellgröße von bis zu 25 μm (73) zurückzuführen ist. Die Parietalzellen der Magenschleimhaut sezernieren einen Magensaft, dessen pH bei 1 bis 1.5 liegt und dessen HCl-Konzentration bis zu 160 mM beträgt. Wesentlichen Beitrag dazu leistet die H^+/K^+ -ATPase, die in der apikalen Membran der Parietalzelle lokalisiert ist. Sie kann auf verschiedene Wege aktiviert werden.

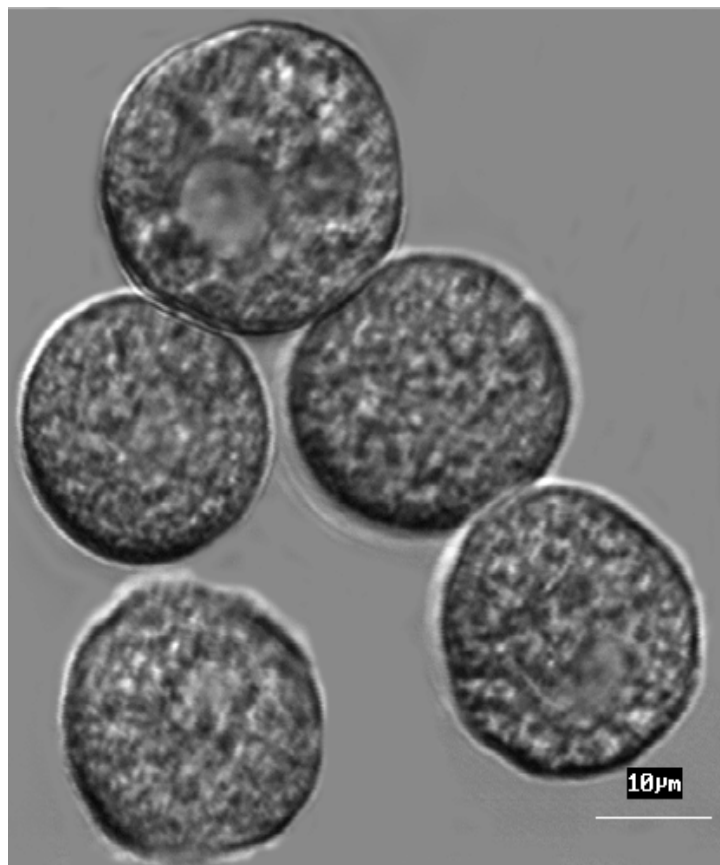


Abb. 1: Parietalzellen bei Blick durch ein konfokales Mikroskop. Die Parietalzellgröße beträgt etwa 25 μm .

1.1 Säuresekretion der Parietalzelle

1.1.1 Rezeptoren der Parietalzellen

Die Parietalzelle verfügt über mindestens drei Arten aktivierender Rezeptoren, nämlich solche für Histamin (H_2), Azetylcholin (M_3) und Gastrin (CCK_B). Es gilt heutzutage als gesichert, dass der Großteil des Effekts von Azetylcholin und Gastrin über die Freisetzung von Histamin aus enterochromaffinen Zellen vermittelt wird (84).

In der vorliegenden Arbeit wurden zweierlei verschiedene Substanzgruppen zur Stimulation der Säuresekretion verwendet. Im Einzelnen waren das Carbachol, ein Azetylcholinrezeptagonist, (163) und Forskolin (36), welches ein Aktivator der Adenylatzyklase ist. Man nimmt an, dass der H_2 -Rezeptor an G_S gekoppelt ist, um die Adenylatzyklase, die zyklisches 3'-5'- Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt, zu aktivieren. Dadurch wird wiederum die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert (37,39,41,118). Die M_3 und die CCK_B -Rezeptoren aktivieren wahrscheinlich über G_q die Phospholipase C (PLC), welche Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol herstellt. Dabei setzt das Inositol-1,4,5-trisphosphat Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei und Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (27,37,41,42). Die PKA scheint der primäre aktivierende Faktor zu sein. Dies ist darauf zurück zu führen, dass maximale Stimulierung von isolierten Drüsenläschen oder Zellen erreicht wurde, wenn der intrazelluläre cAMP-Gehalt maximal erhöht war (36).

1.1.2 Vorgänge bei Stimulation der Säuresekretion

Bei Säurestimulation der Parietalzelle verschmelzen intrazelluläre tubulovesikuläre Strukturen mit intrazellulären Kanälkuli. Dies führt zum Auftreten von verlängerten Mikrovilli in den Drüsenlumina. Die so entstandenen Mikrovilli entsprechen der apikalen Membran der Parietalzelle. Aktivierung der Säuresekretion wird durch zwei gleichzeitig auftretende funktionelle Veränderungen erreicht, nämlich durch Fusion der Tubulovesikel mit der apikalen Membran (11,61,65), wodurch H^+/K^+ -ATPase-Moleküle an die Oberfläche gelangen (191), und durch Permeabilitätserhöhung der apikalen

Membran für KCl (116,207). Der detaillierte Signalweg bis zur Aktivierung der H^+/K^+ -ATPase ist noch nicht vollständig charakterisiert (84).

1.1.3 Die H^+/K^+ -ATPase

Zentrales Enzym der Parietalzellfunktion ist die, aus α - und β -Einheit (165) bestehende, apikal lokalisierte H^+/K^+ -ATPase, welche durch Immunhistochemie in intrazellulären Tubulovesikeln nachgewiesen wurde (175). Sie vermittelt den elektroneutralen Austausch von H^+ gegen K^+ und produziert so einen pH von unter 1 im Kanalikulus (146,157,159,199). Ist die Parietalzelle im Ruhezustand, so liegt eine doppelte Restriktion der H^+/K^+ -ATPase vor. Dies liegt daran, dass sich das Enzym einerseits in zytoplasmatischen Tubulovesikeln befindet und andererseits, dass die Permeabilität der tubulovesikulären Membran für KCl so gering ist, dass die Pumpe inaktiv ist, obwohl ATP zur Verfügung steht.

Die H^+/K^+ -ATPase kann durch zwei Gruppen von Antagonisten gehemmt werden, von denen hier beispielhaft Omeprazol (95,197) und SCH28080 (3,124,198) erwähnt seien, da sie Anwendung in den folgenden Versuchen fanden.

Die drei Substrate Mg-ATP, H^+ und K^+ sind unbedingt von Nöten, um die Funktion der H^+/K^+ -ATPase aufrecht zu erhalten (158). Dabei scheint es so, als ob der Vorrat an Mg-ATP und H^+ zu keinem Zeitpunkt der limitierende Faktor ist. Der Hauptfaktor, der die H^+/K^+ -ATPase, also den Austausch von H^+ gegen K^+ über die apikale Membran beeinflusst, scheint an das Vorhandensein einer Sekretion von K^+ in die sekretorischen Kanälchen, also zur Bereitstellung von genügend K^+ auf der extrazytosolischen Seite, zu sein (73). Desweiteren fordert das Vorhandensein von HCl auf der luminalen Seite eine Cl^- Sekretion über die apikale Membran. Zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials, stehen der Parietalzelle eine Reihe von Transportsystemen, die sich überwiegend in der basolateralen Membran der Zelle befinden, zur Verfügung (siehe Abb. 2)

Die Mechanismen der K^+ und Cl^- Sekretion (147) über die apikale Membran (208) und deren Zusammenhang mit der H^+/K^+ -ATPase werden im folgenden näher betrachtet.

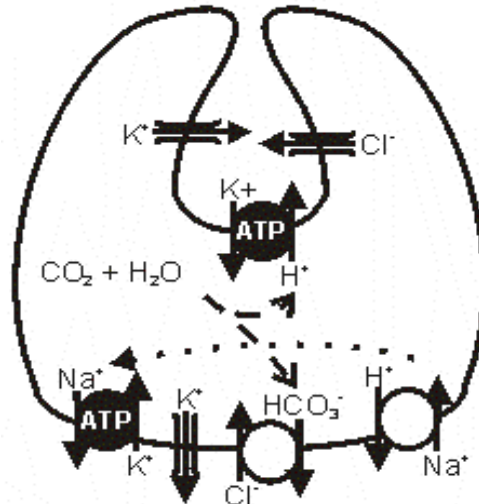


Abb. 2: Mutmaßliche Transportsysteme der Parietalzelle. In der Grafik oben entspricht der apikalen, in der Grafik unten entspricht der basolateralen Membran. Freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. H. Rossmann.

1.1.4 Beteiligung von K^+ Kanälen an der Säuresekretion

Die H^+/K^+ -ATPase verbindet die Abgabe von Protonen über die apikale Membran mit der Aufnahme von K^+ Ionen. Für die Aufrechterhaltung und die Regulation der Protonenpumpe ist es deswegen elementar, dass das aufgenommene K^+ wieder über die apikale Membran abgegeben wird (191,206). Hierfür möglicherweise in Frage kommender K^+ Kanäle, sind der KCNQ1 (73) und die K^+ Kanäle Kir4.1 und Kir5.1 (80).

Desweiteren sind an der Regulation der Säuresekretion und an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials auch basolaterale K^+ Kanäle beteiligt, auf die später eingegangen werden soll.

1.1.4.1 Der K^+ Kanal KCNQ1

Das Gen, das für den KCNQ1 (KvLQT1) K^+ Kanal kodiert, ist, wenn es mutiert, für das „Long QT-Syndrom Typ 1“ verantwortlich. 1996 wurde es erstmals auf Chromosom 11p15.5 entdeckt und kloniert (201). Bei dieser sehr seltenen Krankheit, die sowohl autosomal dominant (Romano-Ward-Syndrom) als auch autosomal rezessiv (Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom) vererbt wird, kommt es durch eine Erniedrigung der Flimmerschwelle zu gehäuftem Auftreten von Herzrhythmusstörungen.

Bei KCNQ1 knockout Mäusen traten Taubheit und eine Hyperplasie der epithelialen Zellen des Magens, vor allem der Fundus- und Korpusregion auf. Außerdem fand sich eine deutliche Vermehrung an Parietalzellen, die jedoch nicht in der Lage waren Säure zu sezernieren, so dass der pH des Magens deutlich alkalischer als gewöhnlich war. Einhergehend mit dieser Hypochlorhydrie zeigte sich eine Hypergastrinämie. Die Ergebnisse legten nahe, dass es sich bei den defekten Zellen, unter anderem um die Parietalzellen des Magens handelte (106).

Im Herz und im Innenohr von Nagetieren kommen die beiden Untereinheiten KCNQ1 und KCNE1 (I_{sk} (181), $minK$ (152)) zusammen vor und bilden den K^+ Kanal I_{ks} (8,67,144,164,190,212). Der KCNE1 reguliert den KCNQ1, dort wo sie gemeinsam vorkommen (28,32,92,123,145).

Abgesehen vom Herz und Innenohr, konnte der KCNQ1 in vielen unterschiedlichen Geweben, wie den Nieren, dem Pankreas, dem Dünndarm, dem Dickdarm und auch dem Magen nachgewiesen werden (18,45,211).

Die Untereinheit KCNE1 konnte außerdem in den Nieren, dem Magen und dem Pankreas, nicht jedoch im Dünndarm, der Lunge, der Leber, dem Thymus und im Skelettmuskel nachgewiesen werden (58).

Der KCNE1 scheint jedoch im Magen keine, beziehungsweise nur eine untergeordnete Rolle bei der Säuresekretion zu spielen. Dies zeigten Experimente mit der KCNE1 knockout Maus (73). Grundsätzlich scheint jedoch die An- bzw. Abwesenheit von KCNE1 den KCNQ1 zu regulieren.

KCNE2 und KCNE3 konnten beide im Magen von Nagetieren und im Magen des Menschen nachgewiesen werden (73).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der KCNQ1, welcher sich durch Forskolin stimulieren lässt (203), eine Grundvoraussetzung für die cAMP-vermittelte Cl⁻ Sekretion in der Schleimhaut des Kolons ist (4,62,110,203), wo er mit der Untereinheit KCNE3 (MiRP2) den dort gelegenen K⁺ Kanal bildet (167). Kürzlich wurde gezeigt, dass der KCNE2 (MiRP1) zusammen mit der Untereinheit HERG (1), die den K⁺ Kanal I_{Kr} bilden, ebenfalls mit KCNQ1 in Verbindung stehen (186).

Die beiden Untereinheiten KCNE1 und HERG bilden zusammen einen Membrankomplex, der den I_{Kr} reguliert (121).

Table 1: Der KCNQ1 und die mit ihm in Verbindung stehenden K⁺ Kanäle.

| Kaliumkanal | Verteilung | Verbindung / Funktion |
|-----------------------------------|---|--|
| KCNQ1 (KvLQT1) | Herz, Innenohr, Niere, Pankreas, Gastrointestinaltrakt | KCNE1: I _{Ks} / Regulation KCNE2: Regulation KCNE3: K ⁺ Kanal im Kolon HERG: Regulation |
| KCNE1 (I _{sK} , minK) | Herz, Innenohr, Niere, Magen, Pankreas | KCNQ1: I _{Ks} / Regulation HERG: I _{Kr} Regulation |
| KCNE2 (MiRP1) | Herz, Magen | KCNQ1: Regulation HERG: I _{Kr} |
| KCNE3 (MiRP2) | Herz, Magen | KCNQ1: K ⁺ Kanal im Kolon |
| HERG | Herz, Magen | KCNQ1: Regulation KCNE1: I _{Kr} Regulation KCNE2: I _{Kr} |

1.1.4.2 *Der Kir4.1 und Kir5.1*

Die Arbeitsgruppe von Hagen et al. (80) lokalisierten zusätzlich zu dem von Grahammer et al. (73) apikal lokalisiertem KCNQ1 zwei weitere K^+ Kanäle in der Parietalzelle, die für die Säuresekretion und deren Regulation verantwortlich zu sein scheinen. Es handelt sich um den Kir4.1 und den Kir5.1.

In aktuellen Versuchen gelang es Hagen et al. geringe Mengen Kir4.1-mRNA und Kir5.1-mRNA im Magen von Ratten nachzuweisen. Durch Nachweis mit Antikörpern konnte der Kir4.1 zwar apikal, allerdings nicht mit der H^+/K^+ -ATPase kolokalisiert werden. Vielmehr zeigte das Signal nach immunhistochemischer Antikörperfärbung einen „dünnen Streifen“, parallel zur apikalen Membran der Parietalzelle. Hagen et al. postulierten, dass die beiden K^+ Kanäle Kir4.1 und Kir5.1 während der Säuresekretion K^+ über die apikale Membran ins Lumen des Magens abgeben, und das sie einen wesentlichen Beitrag zur Regulation der Säuresekretion in der Parietalzelle leisten (80).

1.1.4.3 *Basolaterale K^+ Kanäle*

Die Parietalzelle besitzt sowohl Ca^{2+} - als auch cAMP-abhängige basolaterale K^+ Kanäle (125,161,180,188), welche sich durch Histamin (55,81), Carbachol (119,189) und Forskolin (174) aktivieren lassen und an der Säuresekretion beteiligt sind (99).

Die Ca^{2+} -abhängigen K^+ Kanäle werden durch Mg^{2+} und ATP reguliert. Außerdem scheint eine Phosphorylierungsreaktion an den Regulationsmechanismen beteiligt zu sein (98). Ihnen kommt eine große Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials der Parietalzelle zu (9,74,100,113,122,164,196,202,203)

1.1.4.4 Inhibition von K⁺ Kanälen

Als Inhibitor von K⁺ Kanäle kommt in vielen Arbeitsgruppen Ba²⁺ zum Einsatz (166,176). Dieses scheint K⁺ Kanäle unspezifisch zu inhibieren (161). ChTX inhibiert basolaterale Ca²⁺-abhängige K⁺ Kanäle (107). Als Hemmstoff des KCNQ1 steht das Chromanol 293B zur Verfügung (16,110,210). Spezifischere Untersuchungen haben gezeigt, dass 293B zwar die Untereinheit KCNE1 (178) und I_{Ks} Kanäle blockiert (210), nicht jedoch I_{Kr}-Kanäle und HERG assoziierte Kanäle (29). Andere Arbeitsgruppen dagegen fanden zwar eine Assoziation von 293B mit KCNQ1, nicht jedoch mit KCNE1 (111).

Es konnte für 293B gezeigt werden, dass es in Konzentrationen über 20 µM zusätzlich zu dem K⁺ Kanal KCNQ1 auch andere K⁺ Kanäle, unter anderem den Kv1.1, den Kir2.1 (178), den Kv4.3, den Kv1.5 (210) und den I_{To} (21) blockiert. (73). Mehrere Arbeitsgruppen sprechen von einer cAMP-abhängigen K⁺ Kanalblockade durch 293B (17), hingegen scheint der KCNQ1 auch durch Carbachol, also Ca²⁺ aktivierbar zu sein.

1.1.5 Beteiligung von Cl⁻ Kanälen an der Säuresekretion

Die Sekretion von HCl über die apikale Membran der Parietalzelle fordert mindestens 3 Komponenten, die an der Säuresekretion und somit auch an der Regulation beteiligt sein müssen (Kap. 1.1.3). Dies sind im Einzelnen die H⁺/K⁺-ATPase (84,199), ein K⁺ Kanal (73,79,147) und ein Cl⁻ Kanal (53,56,115,140,208). Es gibt Hinweise darauf, dass es sich hierbei um den ClC-2 handeln könnte.

1.1.5.1 Der Cl⁻ Kanal ClC-2

Der Cl⁻ Kanal ClC-2, ein Mitglied der ClC Cl⁻ Kanalfamilie, konnte bereits aus der Magenschleimhaut der Ratte (90,184), des Kaninchens (117) und des Menschen (47) kloniert werden. Er zeigt alle Eigenschaften, die der Cl⁻ Kanal haben muss, der für die Cl⁻ Sekretion über die apikale Membran der Parietalzelle im Magen verantwortlich ist. Dazu gehören Spannungsabhängigkeit (93,136), Aktivierung durch niederen extrazytosolischen

pH (52,117,168,172,177) und Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (117,137,172,183).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der ClC-2 Kanal in der apikalen Membran der Parietalzelle vorkommt, dort eng mit der H⁺/K⁺-ATPase verbunden ist und sie sogar zu regulieren scheint (171).

In HTC-Zellen der Ratte scheint der ClC-2 außerdem eine wesentliche Rolle bei der Volumenregulation innezuhaben (151).

1.1.5.2 Inhibition von Cl Kanälen

Cl⁻ Kanäle könne auf sehr potente Weise in unterschiedlichen Zellen durch NPPB blockiert werden (7,72,162). Auch speziell der ClC-2 lässt sich durch NPPB inhibieren (78,68).

Bei Blockierung von Chloridkanälen wird die basale Säuresekretionsrate, sowie die Säuresekretionsrate unter Stimulation mit Forskolin, Histamin und Carbachol, in Parietalzellen, vermindert (115).

1.2 Mechanismen der Volumenregulation

Abgesehen von wenigen Ausnahmen ist die Zellmembran für Wasser hochpermeabel. Vor allem ein osmotisches Ungleichgewicht zwischen dem Intrazellulär- und dem Extrazellulärraum zieht eine erhebliche Verschiebung von Wasser nach sich, was mit einer erheblichen Zellschwellung oder Zellschrumpfung, mit anschließender Lyse der Zelle einhergehen kann. Es ist deshalb von Nöten, dass Zellen eine Vielzahl von Mechanismen zur Verfügung stellen, mit denen sie ihr Volumen über die Zellmembran regulieren können.

1.2.1 Regulationsmöglichkeiten der Zelle

Nach der Zugabe von anisotonomem Medium mit nachfolgender Schrumpfung oder Schwellung, können viele Zellen ihr Ausgangsvolumen durch Aktivierung von bestimmten Iontentransportmechanismen wieder erreichen. Die regulatorische Volumenzunahme (regulatory volume increase, RVI) beschreibt das Schwellen einer Zelle nach Schrumpfung in hypertonem Medium, während das Schrumpfen einer Zelle nach vorangehendem Schwellen in hypotonem Medium regulatorische Volumenabnahme (regulatory volume decrease, RVD) genannt wird. Die meisten Zellen sind in der Lage ihr osmotisches Gleichgewicht innerhalb weniger Minuten wieder herzustellen.

1.2.1.1 Mechanismen der Zellschrumpfung

Die häufigste Gegenmaßnahme der Zelle gegen Zellschwellung besteht in der Aktivierung von K^+ Kanälen und Anionenkanälen. Die Anionenkanäle, die durch die Schwellung der Zelle aktiviert werden, erscheinen unselektiv und daher für Cl^- und für HCO_3^- (103), sowie für organische Ionen und neutrale organische Osmolyte durchgängig zu sein (34,96).

Es wurden bisher einige K^+ Kanäle gefunden, die für die RVD verantwortlich gemacht werden können. Dazu gehört der Kv1.3 (60), der Kv1.5 (64) und der minK Kanal (30). Die volumenregulierenden Cl^- Kanäle beinhalten den ClC-2 Kanal (76,87,88,184), BRI-VDAC (59), I_{Clin} (77) und das P-Glycoprotein (150).

Es scheint, dass I_{Cl} und das P-Glycoprotein den volumenregulierenden Cl^- Kanal steuern (150).

Abgesehen von diesen Kanälen ist an der Volumenregulation auch der elektronenneutrale KCl-Kotransporter (104,141) beteiligt. Dieser Transporter scheint vor allem bei einer isotonischen Zellschwellung aktiviert zu werden (69). Andere Zellen wiederum geben KCl durch das gleichzeitige Aktivieren eines K^+/H^+ - und eines Cl^-/HCO_3^- -Austauschers nach extrazellulär ab (19). Erythrozyten aktivieren nach ihrer Schwellung einen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher und gleichzeitig eine Ca^{2+} -ATPase (138), welches das aufgenommene Ca^{2+} wieder nach extrazellulär transportiert. Zellschwellung kann die Na^+/K^+ -ATPase aktivieren (192) oder inhibieren (205). Die H^+/K^+ -ATPase im Magen wird durch Schwellung der Zellen stimuliert (170).

Es gibt darüber hinaus noch unselektive Kationenkanäle, welche ihrerseits Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanäle (46,182) und die HCO_3^- Abgabe (66) aktivieren.

1.2.1.2 Mechanismen der Zellschwellung

Die bei vorausgegangener Zellschrumpfung am häufigsten aktivierten Ionentransportmechanismen in Zellen sind der $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter (71) und der Na^+/H^+ -Austauscher (75,187). Da der Na^+/H^+ -Austauscher, die Zelle alkalisiert, wird gleichzeitig der Cl^-/HCO_3^- -Austauscher aktiviert.

Von den geklonten NHE-Isoformen (94,195) werden nach vorausgegangener Zellschrumpfung NHE1 (57), NHE2 (94) und NHE4 (20) stimuliert wohingegen NHE3 (14) inhibiert wird.

Außerdem scheint der Anionenaustauscher AE2, nicht hingegen AE1 an der regulatorischen Volumenzunahme (RVI) beteiligt zu sein (89).

In manchen Zellen wird die Ionenzunahme durch Aktivierung von Na^+ Kanälen und oder unselektiven Kationenkanälen (2,31,35) vermittelt. Durch den Na^+ Einstrom in die Zelle kommt es anschließenden zu einem gleichgerichteten Cl^- Einstrom. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Zellen den Ausstrom von K^+ und Cl^- durch Inhibierung dieser Kanäle (102) unterbinden und so der Volumenabnahme entgegenwirken (148).

1.2.2 Intrazellulärer Signalweg der Volumenregulation

Zellschwellung und Zellschrumpfung stellen große Anforderungen an die intrazellulären Signalwege. Das Wissen darüber ist noch sehr unvollständig und längst sind noch nicht alle Mechanismen verstanden. Die hier folgende Abhandlung hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Sie soll lediglich einen orientierenden Überblick geben.

Zellschwellung führt zur Verdünnung, Zellschrumpfung zur Konzentration intrazellulärer Substanzen. Die Konzentration dieser Substanzen, vor allem der intrazellulären Proteine, beeinflusst wesentlich die Funktion der Zelle (26,70,179). Volumenregulatorische Mechanismen können durch Veränderung der Proteinzusammensetzung aktiviert oder inhibiert werden. So wird in Erythrozyten beispielsweise der Na^+/H^+ -Austauscher (48) und der KCl (126) Symport wesentlich hiervon reguliert.

Volumenänderungen führen ebenfalls zu einer Änderung des Zytoskeletts. Eine bedeutende Rolle spielen dabei Aktinfilamente und Mikrotubuli (51). Beide sind wesentlich an einer Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten, darunter auch Hemmung und Aktivierung von K^+ Kanälen beteiligt.

Aber nicht nur das Zytoskelett, sondern auch die Zellmembran selbst ist an der Volumenregulation beteiligt. Eine Vielzahl von Transportsystemen wird durch Dehnung der Zellmembran (160) und deren Potentialänderung reguliert. Aktivierung von K^+ Kanälen und ein niederes Anfangsmembranpotential begünstigen eine Hyperpolarisation, hingegen begünstigt eine Aktivierung von Anionen und unselektiven Kationen zusammen mit einem hohen Anfangsmembranpotential eine Depolarisation. Hyperpolarisation oder Depolarisation führen, je nach Zelltyp, zu einer entsprechenden Änderung der Transportsysteme mit folgender Zellschwellung oder Schrumpfung.

Durch Umverteilung der Ionen kann sich der zytosolische pH ändern. Man hat beobachtet, dass Zellschwellung in der Regel zu einer intrazellulären

Azidifizierung (109,193) führt. Dies wird durch den Verlust von HCO_3^- über Anionenkanäle (204), durch Freisetzung von H^+ aus dem intrazellulären Verbund und durch Aktivierung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers erklärt (109). Zellschrumpfung führt dagegen normalerweise zu einer Alkalisierung. Wesentlichen Beitrag dazu leistet der Na^+/H^+ -Austauscher.

Vielen intrazellulären Ionen kommt eine große Bedeutung bei Kontrolle des Zellvolumens zu. Die wichtigsten davon sind Cl^- , Mg^{2+} und Ca^{2+} .

Für Ca^{2+} konnte gezeigt werden, dass es K^+ Kanäle aktiviert. Trotz allem konnte für Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanäle, welche sich durch Charybdotoxin inhibieren lassen, nicht gezeigt werden, dass sie die ursächlichen Kanäle für die Schwellung in Ehrlich-Zellen sind (91). Auch scheint die Aktivierung von K^+ Kanälen durch Ca^{2+} nur einen geringen Beitrag zur RVD zu leisten (85). Im Gegensatz zu K^+ Kanälen, scheinen in den meisten Geweben, volumenregulierende Cl^- Kanäle unabhängig vom freien Ca^{2+} zu sein (82).

Nach Zellschwellung aktiviert Magnesium den KCl-Kotransporter (RVD) (10), hingegen nach Zellschrumpfung den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter (114) und den Na^+/H^+ -Austauscher (139) (RVI).

Cl^- spielt eine wesentliche Rolle bei der Volumenregulation durch Wasser nach osmotischer Schwellung oder Schrumpfung und bei der Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters (86) und des Na^+/H^+ -Austauschers (149).

1.3 Volumenregulation der Parietalzelle

Über die volumenregulatorischen Mechanismen von Zellen gibt es, wie im vorausgegangenen Abschnitt dargelegt, viele Erkenntnisse. Hingegen ist über die Volumenregulation von Parietalzellen noch nicht viel bekannt.

Die apikale Membran von Parietalzellen scheint nur wenig permeabel für Wasser zu sein (143). Hingegen konnte mit Antikörpern der basolateral gelegene Aquaporin-4-Kanal nachgewiesen werden (112,127). Aquaporin 4 knockout Mäuse zeigen keinen signifikanten Unterschied zu normalen Mäusen, bei Vergleich der Morphologie, der Säurestimulationsrate und dem pH im Magen (200). Es wurde daraus geschlossen, dass die basolaterale Aufnahme von Wasser über den Aquaporin 4 Kanal nicht wesentlich für die Säuresekretion der Parietalzelle ist. Wie das Wasser schließlich über die apikale Membran kommt ist zur Zeit noch nicht bekannt.

Dagegen ist schon lange bekannt, dass die apikale Membran der Parietalzelle Transportsysteme für K^+ , H^+ und Cl^- besitzt (208).

Stimulantien der Säuresekretion wie Forskolin und Carbachol führen zu einer raschen Schrumpfung der Zelle mit anschließender Erholung auf den Ausgangswert (176).

Barium, ein unspezifischer K^+ Kanal Inhibitor, hingegen führt zu einer Zellschwellung, mit Erholung auf den Ausgangswert, was so gedeutet wird, dass bariumsensitive basolaterale K^+ Kanäle auch in der ruhenden Zelle offen sind.

Parietalzellen können also sowohl nach Zellschwellung als auch nach Zellschrumpfung ihr Ausgangsvolumen wieder herstellen (176).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Na^+/H^+ -Austauscher, der erstmals 1976 von Murer et al. in Vesikeln der Bürstensaummembran der Niere nachgewiesen (129) wurde, wesentlich an der RVI beteiligt ist (176). Er spielt außerdem eine zentrale Rolle im pH-, Volumen-, Salz- und Wasserhaushalt von

Zellen. Der Na^+/H^+ -Austauscher arbeitet elektroneutral und tauscht Na^+ gegen H^+ im Verhältnis 1:1 aus.

Neben NHE1 (108) wurden weitere Isoformen kloniert und mit NHE2 (49), NHE3 (25), NHE4 (132), NHE5 (6) und NHE6 (131) bezeichnet. Vier der sechs teilweise oder vollständig klonierten NHE-Isoformen werden im Gastrointestinaltrakt exprimiert. Im Kaninchenmagen sind nur die Isoformen NHE1, NHE2 und NHE4 anzutreffen (6).

Als Hemmstoffe der unterschiedlichen NHE-Isoformen werden HOE642 (Cariporid) und Dimethylamilorid verwendet (6).

Der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter, der durch Bumetanid gehemmt werden kann, scheint dagegen, weder zur Schrumpfung noch zur RVI einen wesentlichen Beitrag zu leisten (5,176).

1.4 Experimentelles Modell

Seit vielen Jahren werden die regulatorischen Mechanismen im Rahmen der Säuresekretion und der Volumenregulation von Parietalzellen beforscht. Dabei kamen eine Vielzahl experimenteller Modelle zur Anwendung. Beschrieben wurden Versuche am Froschmagen (63,83,98), an intakter Schleimhaut (97,133), an enzymatisch isolierten (11,36,40,41,116,146) oder handdissezierten Magendrüsen (194), an optisch isolierten Zellen (135), frisch isolierte Zellen (118,128) und an Membranvesikeln (101).

Chew und Mitarbeiter stellten 1989 ein Modell zur Kultivierung von Parietalzellen aus dem Kaninchenmagen vor (38,43). Eine Hochdruckperfusion in situ erleichterte es, die Schleimhaut von der Magenwand abzutrennen. Danach wurde sie mechanisch zerkleinert und zu Einzelzellen verdaut. Durch Gegenstromelutration und eine anschließende Dichtegradientenzentrifugation konnten die Parietalzellen nun auf 90-95% Reinheit angereichert werden. Die Kultivierung gelang durch Verwendung einer speziellen Matrix, dem Matrigel[®], auf dem sich die Zellen anhefteten. Die Zellen konnten bis zu einer Woche in Kultur gehalten werden, reagierten auf histaminerge, cholinerge und gastrinerge Stimulation und enthielten immunoreaktive H⁺/K⁺-ATPase (43).

Die Parietalzellkultur eignet sich hervorragend für eine Reihe verschiedener Messtechniken. Beispielsweise kann die sekretorische Aktivität indirekt über die Aufnahme der schwachen Base ¹⁴C-Aminopyrin gemessen werden (11,44). Weiterhin sind mikrofluorometrische Messungen des intrazellulären pH (130) und konfokale Messung von Volumenänderungen (15,173) gut etablierte Vorgehensweisen.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Parietalzell-Primärkultur Veränderungen der pH-, Ionen- und Volumenhomöostase im Rahmen der Säuresekretion untersucht. Die Parietalzelle ist, wie oben dargelegt, einzigartig in Bezug auf die Fähigkeit, hochkonzentrierte Salzsäure zu sezernieren. Bei diesem Vorgang spielen verschiedene, sowohl apikal als auch basolateral gelegene Transportsystem eine bedeutende Rolle.

Konkret wurden folgende Fragen untersucht:

- Welche Rolle spielen K^+ und Cl^- Kanäle bei der Säuresekretion der Parietalzelle?
- Welche Bedeutung haben K^+ und Cl^- Leitfähigkeit für die Zellschrumpfung im Rahmen der Säuresekretion?
- Welche Bedeutung hat die Protonenpumpe für die Zellschrumpfung bei Stimulation der Säuresekretion?
- Welche Unterformen des Na^+/H^+ -Austauscher sind an der regulatorischen Volumenzunahme der Parietalzelle nach Säurestimulation beteiligt?
- Wie verhält sich der intrazelluläre pH bei K^+ und Cl^- Kanalinhibition vor und nach Säurestimulation?

Zusammenfassend gesagt, wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, welche Rolle apikale und basolateral gelegene Cl^- und K^+ Kanäle bei der Volumen- und pH-Regulation spielen, sowie welchen Einfluss die Protonenpumpe und die verschiedenen Unterformen des Na^+/H^+ -Austauscher bei der Volumenregulation haben. Es wurde versucht, mit Hilfe einer Parietalzell-Primärkultur und Volumenmessungen mittels konfokaler Mikroskopie hierüber Aufschluss zu erhalten.

2 Material und Methodik

2.1 Materialien

Die folgenden Tabellen enthalten die verwendeten Chemikalien und Geräte, deren im Text verwendeten Abkürzungen und ihre Bezugsquellen. Alle Chemikalien waren, soweit nicht anders vermerkt, vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

2.1.1 Flüssigchemikalien

| Substanz | Abkürzung | Bezugsquelle |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------|
| ¹⁴ C-Aminopyrin | ¹⁴ C-AP | Amersham |
| Dimethyl-Sulfoxid 100% | DMSO | Sigma |
| Ethanol 100 % | | Apotheke |
| Ethanol 70 % | | Apotheke |
| t-Octylphenoxypolyethoxyethanol | Triton X-100 | Sigma |
| Wasserstoffperoxid | H ₂ O ₂ | Merck |

2.1.2 Feststoffe

| Substanz | Abkürzung | Bezugsquelle |
|---|---------------------------------|--------------|
| 2'-7'-bis-Carboxyethyl-(18,54)Carboxyfluorescein-Azetoxymethylester | BCECF | Sigma |
| 3-(cyanomethyl)-2-methyl-8-(phenylmethoxy)imidazol[1,2a]-pyridine | SCH28080 | Schering |
| 4-Isopropyl-3-Methylsulfonylbenzoyl-Guanidin Methansulfonat | HOE642 (Cariporid) | Hoechst |
| 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate | NPPB | Sigma |
| bovines Serumalbumin | BSA | Paesel&Lorei |
| Charybdotoxin | ChTX | Sigma |
| Carbachol | C | Sigma |
| di-Kalium-Hydrogen-Phosphat | K ₂ HPO ₄ | Merck |
| di-Methyl-Amilorid | DMA | Sigma |

MATERIAL UND METHODIK

| | | |
|---|---------------------------------|----------|
| Dithiotreit | DTT | Merck |
| Epidermal Growth Factor | EGF | Sigma |
| Forskolin | F | Sigma |
| Geneticinsulfat | | Sigma |
| Gentamicin 10mg/ml | | Gibco |
| Gluconsäurelacton | | Merck |
| Humanalbumin | | Curasan |
| Hydrocortison | | Sigma |
| Hydroxy-Ethyl-Piperazinyl-Ethan-Sulfonsäure | HEPES | Merck |
| Insulin-Transferrin-Selenit | ITS | Sigma |
| Kalium-Chlorid | KCl | Merck |
| Kalium-di-Hydrogen-Phosphat | KH ₂ PO ₄ | Merck |
| Kalium-Glukonat | K-Glc | Merck |
| Kalzium-Glukonat | Ca-Glc | Merck |
| Kollagenase Worthington Typ CLS II | | Biochrom |
| Magnesiumsulfat | MgSO ₄ | Merck |
| Minimum Essential Medium | MEM | Sigma |
| Natrium-Chlorid | NaCl | Merck |
| Natrium-Glukonat | Na-Glc | Merck |
| Natrium-Pyruvat | | Sigma |
| Nykodenz® | | Nykomed |
| Pronase E | | Merck |
| Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor | STI | Sigma |
| Terg-A-Zyme | | Merck |
| trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-chromane | 293B | Aventis |
| Tris-(Hydroxy-Methyl)-Aminomethan | TRIS | Merck |

2.1.3 Gase

| Substanz | Abkürzung | Bezugsquelle |
|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| 100% Sauerstoff, medizinischer Grad | O ₂ | Mast |
| Carbogen | 5%CO ₂ / 5%O ₂ | Mast |

2.1.4 Fertigarzneimittel

| Substanz | Handelsname | Bezugsquelle |
|---|-------------|--------------|
| 5,6 Dihydro-2(2,6 xylidino) 4 H-1,3-Thiazinhydrochlorid 23,32 mg/ml | Rompun | Bayer |
| Atropinsulfat 0,5 mg/ml | Atropin | Hamelin |
| Heparin-Natrium 25000 IE/ml | Thrombophob | Nordmark |
| Ketaminhydrochlorid 50mg/ml | Ketanest | Parke-Davis |
| Ranitidinhydrochlorid | Sostril | Cascan |

2.1.5 Tiere zur Zellpräparation

Zur Herstellung der Parietalzellkultur wurden männliche New-Zealand White Rabbits mit einem Gewicht von 2,5 kg - 3,5 kg von der Firma Charles River bezogen.

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Typ | Bezugsquelle |
|-----------------|--|--------------|
| Deckgläschen | 18x18 mm | Menzel |
| Deckgläschen | Ø22 mm, rund | Menzel |
| Einmalspritzen | 2,5, 10 und 20 ml | Inject |
| Kanülen | 20 G 1 ¹ / ₂ , 0,9x40 mm | Microlance |
| Kanülen | 20 G 1 ¹ / ₂ , 0,9x70 mm | Terumo |
| Makroplatten | 6 Vertiefungen, Ø35mm | Greiner |
| Objektträger | 76x26 mm | Menzel |
| Pasteurpipetten | 150 und 230 mm | Hirschmann |
| Petrischalen | Ø 35 mm, Plastik, steril | Greiner |
| Pipettenspitzen | 10, 100, 1000 µl | Eppendorf |
| Pipettenspitzen | 5 ml | Roth |

| | | |
|---------------------|-------------------------|-----------|
| Reagenzgläser | Durchsichtig, 12 ml, PS | Greiner |
| Reaktionsgefäß | 1,5 ml, steril | Eppendorf |
| Skalpells | Nr.21 | Feather |
| Sterilfilter | SP20 plus | Sartorius |
| Sterilfilter | Minisart NML 165 34K | Sartorius |
| Zählkammer | MD Kova Raster | Madaus |
| Zentrifugenröhrchen | 50 ml, PP, steril | Falcon |

2.1.7 Geräte

| Gerät | Typ | Hersteller |
|---|-------------------|-------------------------|
| Autoklav | Varioklav 500 E/V | H+P Labortechnik GmbH |
| Digital gesteuerte Pumpe | Digi-Staltic | Cole Parmer Instruments |
| Elutriationssystem | JE-5.0 | Beckmann |
| Elutriationszentrifuge | J6-MC | Beckmann |
| Feinwaage | HT 20 | Mettler |
| Fluoreszenz-Meßsystem, bestehend aus: <ul style="list-style-type: none"> • Photomultiplier • Arc-Lamp • Power Supply • Optical Chopper • Shuter Controller • 2 PCs | Deltascan | PTI |
| Handzähler | | NeoLab |
| Laserscanmikroskop | LSM 410 inverted | Zeiss Jena |
| Scintillation Counter | 1219 Rackbeta | LKB Wallac |
| Magnetrührer | Combimag RCO | IKA |
| Mikroskop | PIM No. 35234 | WPI Inc |
| Mikroskop | Diaphot | Nikon |
| Osmometer | | |
| PH-Meter | pH91, pH96 | WTW |

MATERIAL UND METHODIK

| | | |
|--------------|--------------------|------------|
| Pumpe | Vario-Pumpensystem | Ismatec Sa |
| Rollenpumpen | | Masterflex |
| Sterilbank | | Hereus |
| Zentrifuge | Megafuge | Hereus |
| Zentrifuge | Laborzentrifuge | Hettich |

2.1.8 Stammlösungen

Um die Herstellung der Präparations- und Messpuffer zu rationalisieren, wurden insgesamt drei Stammlösungen verwendet:

- Stammlösung mit den Puffersubstanzen 14 mM HEPES und 7mM TRIS und den beiden Kaliumphosphatsalzen (3 mM KH_2PO_4 und 2 mM K_2HPO_4)
- Stammlösung mit 1.2 mM Kalziumglukonat und 1.2 mM Magnesiumsulfat
- Für die Kalibrationslösung wurde anstelle der ersten Stammlösung eine Lösung mit 14 mM HEPES, 100 mM Kaliumglukonat, 40 mM Kaliumchlorid und die beiden Kaliumphosphatsalze (3 mM KH_2PO_4 und 2 mM K_2HPO_4) verwendet.

2.2 Zellpräparation

Die Parietalzellkultivierung erfolgte nach der von Chew, Ljungstrom, Smolka und Brown beschriebenen Methode (38,43).

2.2.1 Vorbereitung

2.2.1.1 Herstellung der Puffer

Für eine Zellpräparation wurden 3 l Perfusionspuffer und 3 l Präparationspuffer verwendet. Beide Puffer wurden bei Raumtemperatur mit 1M TRIS-Lösung auf pH 7,4 eingestellt und vor Verwendung mindestens 30 Minuten lang mit O₂ begast.

Perfusionspuffer

| | |
|--------|-------|
| 120 mM | NaCl |
| 12 mM | HEPES |
| 8 mM | TRIS |

Präparationspuffer

| | |
|--------|---------------------------------|
| 120 mM | NaCl |
| 14 mM | HEPES |
| 7 mM | TRIS |
| 3 mM | K ₂ HPO ₄ |
| 2 mM | KH ₂ PO ₄ |
| 1,2 mM | Ca-Glukonat |
| 1,2 mM | MgSO ₄ |
| 20 mM | Glucose |

Elutriationspuffer

Für die Herstellung des Elutriationspuffers wurden 2,5 l des Präparationspuffers mit 1 g/l BSA und 0,5 mM DTT versetzt und danach erneut mit 1M TRIS-Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

2.2.1.2 Herstellung der Nykodenz®-Gradienten

| <u>Herstellung der Nykodenz®-Lösung</u> | | <u>Herstellung der Verdünnungs-Lösung</u> | |
|---|--------------|---|---------------|
| H ₂ O | | H ₂ O | |
| Nykodenz (27,6%) | 138 g/500 ml | NaCl (0,75%) | 3,75 g/500 ml |
| TRIS | 5 mM | TRIS | 5 mM |
| KCl | 3 mM | KCl | 3 mM |
| CaNa ₂ EDTA | 0,3 mM | CaNa ₂ EDTA | 0,3 mM |
| MgSO ₄ | 1,2 mM | MgSO ₄ | 1,2 mM |
| DTT | 0,5mM | DTT | 0,5 mM |
| BSA | 10 g/500 ml | BSA | 10 g/500 ml |

Für die Gradientenherstellung wurden 500 ml Nykodenz®-Lösung und 500 ml Verdünnungslösung hergestellt. Die Nykodenz®-Lösung wurde mit 0,1 M TRIS-Lösung auf pH 7,4 eingestellt, wobei etwa 20 ml benötigt wurden. Höher konzentrierte TRIS-Lösungen sollten nicht verwendet werden, da sie zu einer falschen Enddichte führen. Die Verdünnungs-Lösung wurde mit 1 M TRIS-Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

Für eine Gradientenherstellung wurden die gleichen Mengen an Nykodenz®-Lösung und Verdünnungslösung benötigt.

| Herstellung der drei Verdünnungen | Dichte (g/cm ³ , 25°C) |
|--|-----------------------------------|
| 2:1-Lösung (2 Teile Nykodenz®-Lösung, 1 Teil Verdünnungs-Lösung) | 1,098 |
| 1:1-Lösung (1 Teil Nykodenz®-Lösung, 1 Teil Verdünnungs-Lösung) | 1,075 |
| 1:2-Lösung (1 Teil Nykodenz®-Lösung, 2 Teile Verdünnungs-Lösung) | 1,050 |

Die verschiedenen Verdünnungs-Lösungen wurden anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen durch einen Sterilfilter mit der Porengröße 0,2 µm filtriert und bei -20°C aufbewahrt.

Für eine Präparation wurden in sechs sterilen Reagenzgläsern unter der Sterilbank jeweils 2 ml 2:1, 3ml 1:1 und 2ml 1:2 Lösung vorsichtig übereinander geschichtet. Die fertig geschichteten Gradienten wurden bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.1.3 Matrigel®

Für die Herstellung der Matrigel®-Lösung, welche tiefgefroren bei -18° gelagert werden muss, wurden 10 ml Matrigel® im Kühlschrank aufgetaut. Das aufgetaute Matrigel® wurde, auf Eis, unter der Sterilbank mit 60 ml eiskaltem, sterilem Wasser 1:7 verdünnt, anschließend gemischt und in kleine Portionen bei -18°C eingefroren.

2.2.1.4 Kulturschälchen

35 mm Kulturschälchen wurden gemeinsam mit einem runden 22 mm Deckglas sterilisiert. Die Matrigel®-Lösung wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut. Auf die Deckgläschen wurden in der Sterilbank jeweils 50 µM der 1:7 verdünnten Matrigel®-Lösung möglichst großflächig aufgetragen. Der Matrigel®-Fleck auf den Deckgläschen trocknete vor Gebrauch der Kulturschälchen, bei halbgeöffnetem Deckel, unter der Sterilbank ein. Für die Aminopyrinaufnahme Versuche wurden Kulturplatten mit 6 Vertiefungen ohne Deckglas mit einem Matrigel®-Fleck versehen.

2.2.1.5 Medium

Für die Herstellung des Grundmediums wurde bicarbonatfreies DMEM/HAF F-12 1:1 Medium aus Pulver angerührt. Der pH wurde bei 37°C mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Das Medium wurde dann durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert, mit 0,5 Vol.% 20%igem Humanalbumin versetzt und im Kühlschrank gelagert.

Herstellung der Supplementlösungen

- Hydrocortison:** 1 mg Hydrocortison wurde 10^{-5} M in 27.6 ml sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert, in 1 ml-Portionen aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.
- IST:** Die Mischung aus 25 mg Insulin, 25 mg Transferrin und 25 μg Selenit wurde in 5 ml sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert und in 100 μl Portionen bei -20°C eingefroren.
- EGF:** 100 μg EGF wurden in 2 ml sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert und in 100 μl Portionen bei -20°C eingefroren.
- Geneticin:** 10 mg Geneticin wurden abgewogen, in 2 ml Wasser gelöst, sterilfiltriert und als 100 μl Portionen bei -20°C eingefroren.
- Novobiocin:** 100 mg wurden abgewogen, in 2 ml Wasser gelöst, sterilfiltriert und in 100 μl Portionen bei -20°C eingefroren.

Herstellung des Kompletmediums

Zur Herstellung des Kompletmediums wurde am Kulturtag zu 100 ml Grundmedium folgendes hinzugegeben:

| | |
|-------------------|----------------------|
| 100 μl | Gentamicin-Lösung |
| 100 μl | EGF-Lösung |
| 100 μl | IST-Lösung |
| 100 μl | Novobiocin-Lösung |
| 100 μl | Geneticin-Lösung |
| 10 μl | Hydrocortison-Lösung |

2.2.1.6 Elutriatorpflege

Unmittelbar vor der Elutriation wurde der Elutriator montiert und der Rotor und das Schlauchsystem mit 6% H₂O₂ über eine halbe Stunde sterilisiert. Anschließend wurde mit 1 l Millipore-Wasser gespült. Die tatsächliche Flussrate der Masterflex-Rollenpumpe beim Fluss durch den laufenden Elutriator wurde bei 100 ml/min mittels eines Standzylinders kontrolliert und die Pumpe gegebenenfalls abgeglichen.

Nach Gebrauch wurde der Elutriator inklusive des Schlauchsystems kurz mit Millipore-Wasser gespült und dann mit hitzeaktiviertem Terg-A-Zyme gefüllt und für eine halbe Stunde so belassen. Danach wurde erneut kurz mit Millipore-Wasser und anschließend mit 70%igem Ethanol gespült, woraufhin man den Elutriator leer laufen ließ und demontierte.

2.2.2 Operation des Kaninchens

Männliche New Zealand White Rabbits (2,5 -3,5 kg) erhielten als Prämedikation eine intramuskuläre Injektion mit einer Kombination aus 0,5 mg Atropin, 1,5 ml Ketamin und 1,1 ml Rompun. Nachdem eine ausreichende Sedierung eingetreten war, wurde eine Ohrvene kanüliert. Es erfolgte die i.v. Injektion von 10000 IE Heparin-Na, um bei der späteren in-situ-Perfusion einer Thrombembolie in die Magengefäße mit daraus folgender ungenügender Perfusion vorzubeugen. Dann wurde mittels i.v.-Applikation einer größeren, verdünnten Menge der oben genannten Kombination, eine tiefe Narkose erzeugt. Während der Operation wurden der Kornealreflex und die Bauchdecken-Abwehrspannung beobachtet und bei Bedarf die Narkose vertieft.

Das Abdomen wurde in der Mittellinie eröffnet und der gesamte Dick- und Dünndarm nach rechts aus dem Abdomen verlagert. Anschließend wurde die Aorta kaudal der Nierenarterien über eine Strecke von etwa 2 cm aus dem Retroperitoneum gelöst. Nach Beendigung der Präparation wurde das Tier durch eine Überdosis der beschriebenen Narkotikakombination getötet. Die Aorta wurde ligiert. Unmittelbar proximal der Ligatur wurde über eine kleine Inzision eine 14G Verweilkanüle eingelegt und fixiert. Die den Darm

versorgenden Gefäße im Mesenterium wurden abgebunden und der kraniale Abfluss der Perfusionslösung supradiaphragmal durch eine Klemme über Aorta und Vena cava verhindert. Mit dieser Anordnung wurden nun der Magen, die Milz und die Leber unter möglichst hohem Druck mit etwa 2 l Perfusionspuffer perfundiert, wobei ein Abblassen der Magenschleimhaut und der übrigen perfundierten Organe zu erkennen war. Anschließend wurde die Leber mehrfach eingeschnitten, um Blutreste aus dem Gefäßsystem auszuspülen. Großes und kleines Netz wurden vom Magen getrennt und Ösophagus und Pylorus abgesetzt.

Nach Eröffnung des Magens entlang der großen Krümmung wurde die Mukosa zunächst unter fließendem Wasser grob von Schleim und Futterresten gereinigt und anschließend mit Kompressen und Puffer vollkommen gesäubert. Die Magenschleimhaut wurde daraufhin stumpf von der darunterliegenden Lamina muscularis mucosae abgeschabt, mit zwei Skalpellern zerkleinert und in 50 ml Präparationspuffer aufgenommen.

2.2.3 Zelltrennung

2.2.3.1 Enzymatische Verdauung

Nach der Präparation ließ man die Schleimhautstücke absinken, und verwarf den überstehenden Puffer, so dass circa 20 ml Puffer und die Schleimhautstücke blieben. Diese wurden erneut mit frischem, vorgewärmtem Präparationspuffer auf 50 ml aufgefüllt und in ein doppelwandiges, auf 37°C beheiztes Inkubationsgefäß umgefüllt. Der pH-Wert wurde unter ständiger Begasung mit O₂ und unter ständigem Rühren mit 1 M TRIS-Lösung auf den pH 7,4 eingestellt. Nach Zugabe von 50 mg BSA und 25 mg Pronase wurden die Schleimhautstücke bei ständiger pH-Kontrolle 20 Minuten verdaut, in vier Fraktionen aufgeteilt, mit Präparationspuffer aufgefüllt und danach bei 173 g (1000 rpm) 5 Minuten abzentrifugiert.

Im zweiten Verdauungsschritt wurden die Schleimhautstücke in 50 ml Präparationspuffer suspendiert und zusammen mit 7200 Units Kollagenase und

20 mg STI in das Inkubationsgefäß gegeben. Auch dieser Verdauungsschritt erfolgte unter Konstanthaltung des pH-Wertes auf 7,4 und unter ständiger Begasung mit O₂. Die Verdauung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle bis zum weitgehenden Zerfall zu Einzelzellen, was zwischen 10 und 16 Minuten in Anspruch nahm. Die Zellsuspension wurde rasch durch ein grobes Sieb und durch ein Sieb mit der Porengröße 200 µm gegeben. Zur Verminderung der Enzymaktivität wurde die Suspension mit Präparationspuffer auf 200 ml aufgefüllt, in 4 Fraktionen aufgeteilt und erneut bei 173g (1000 rpm) für 5 Minuten zentrifugiert. Die Fraktionen wurden nachfolgend jeweils in 50 ml Elutriationspuffer mit zusätzlich 1 g/100 ml BSA resuspendiert.

2.2.3.2 Zelltrennung durch Gegenstromzentrifugation

Durch den Elutriationsvorgang werden Zellen nach Größe und Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt. Die Gegenstromelutriation erfolgte bei einer konstanten Rotorgeschwindigkeit von 1780 rpm. Vorbereitend wurden das gesamte Schlauchsystem, sowie die Kammer mit Elutriationspuffer gefüllt und entlüftet. Wenn der Rotor die Zielgeschwindigkeit erreicht hatte, wurden der Druck im System und das Fördervolumen der Pumpe bei verschiedenen Pumpgeschwindigkeiten überprüft. Bei einer Pumpgeschwindigkeit von 7 ml/min wurden die Zellen in die im Rotor befindliche Kammer gespült und ordneten sich dort entsprechend ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit und je nach Puffergegenstrom an. Bei konstanter Flussrate stand die durch Zentrifugalkraft bedingte Sedimentation der Zellen mit dem Puffergegenstrom im Gleichgewicht. Wurde die Pumpengeschwindigkeit erhöht, so wurden unterschiedliche Zellfraktionen, hauptsächlich in der Reihenfolge ihrer Größe, aus der Kammer elutriert.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden für jede Fraktion durchgeführt. Kleinere Zellen wie Schleimzellen und Bakterienzellen wurden von den Parietalzellen durch Abnahme einer 50 ml Fraktion bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 ml/min und einer 100 ml Fraktion bei 35 ml/min getrennt. Danach wurden die Parietalzellen bei 70 ml/min in zwei sterile Falcon-Tubes abgenommen. Der Rotor wurde gestoppt, um größere Zellkonglomerate am Boden der Kammer zu

entfernen, und nachfolgend wieder gestartet. Währenddessen wurde die nächste Zellfraktion, wie oben beschrieben für die Elutriation vorbereitet.

2.2.3.3 Nykodenz®-Zentrifugation

Da ab diesem Punkt eine gewisse Abtrennung der vorher vorhandenen Mikroorganismen angenommen wurde, erfolgten sämtliche nun folgende Schritte unter der Sterilbank und in steriler Arbeitsweise, um einer Kontamination entgegenzuwirken.

Die durch die Elutriation gewonnenen Zellsuspensionen wurden bei 600 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert und anschließend in 30 ml Elutriationspuffer mit 1 g/100 ml BSA suspendiert und langsam mit einer sterilen 10 ml Pipette auf die vorbereiteten Nykodenz®-Gradienten geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 835g (entspricht bei der o.g. Laborzentrifuge 2200 rpm) über 8 Minuten. Der Rotor wurde ungebremst zum Stillstand gebracht, um eine Vermischung der Banden durch zu abruptes Abbremsen zu verhindern. Von den drei Hauptbanden, die sich nach der Zentrifugation abgrenzen ließen, bestand die oberste Bande hauptsächlich aus Schleimzellen und Zelldetritus und die (mittlere) Bande darunter im wesentlichen aus Parietalzellen. Diese Bande wurde mittels einer Spritze mit einer aufgesetzten 0,4 mm Kanüle abgenommen und zusammen mit Kompletmedium auf 50 ml aufgefüllt und 5 min bei 600 rpm abzentrifugiert. Zur Abschätzung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen erneut in 20 ml Kompletmedium resuspendiert und eine Zählkammer beschickt. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 600 rpm über 5min.

2.2.4 Zellzählung

Da die Aussaat zu vieler oder zu weniger Zellen das Kulturergebnis ungünstig beeinflussen, wurde die Zellzahl bei jeder Präparation mit einer Zählkammer ermittelt. Unter der Kenntnis des Volumens über einem Eckquadrat der Zählkammer, wurde nun, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die Gesamtzellzahl für die aktuelle Präparation ermittelt.

2.2.5 Beurteilung der Reinheit der einzelnen Zellfraktionen

Bei jeder Präparation erfolgte eine lichtmikroskopisch orientierende Beurteilung der Reinheit der Parietalzellfraktion. Mikroskopische Kontrollen erfolgten während der Verdauung, beim Auszählen, nach dem Bestücken der Kulturschälchen und jeden Tag nach der Präparation.

2.2.6 Kultivierung

Die vorbereiteten Kulturschälchen wurden mit 1,5 ml Komplettmedium bestückt. Es erwies sich als günstig, in jedes Kulturschälchen $2.5 \cdot 10^6$ – $3 \cdot 10^6$ Zellen in 50 μ l Medium zu setzen. Die Zellen wurden in der errechneten Mediumsmenge suspendiert und wölkchenförmig, über den aufgebrauchten Matrigel[®]-Fleck auf den Deckgläsern in den Kulturschälchen aufgebracht. Den Zellen wurden 30 Minuten Zeit gelassen um abzusinken, und um auf dem Matrigel[®]-Fleck festzuwachsen. Danach wurden die Kulturschälchen vorsichtig von der Flowbank in den Brutschrank gehoben. Die Kultivierung erfolgte in einer befeuchteten Raumluf-Atmosphäre mit leichtem Überdruck bei 37°C.

2.2.7 Mediumswechsel

Das Medium wurde jeden Tag erneuert. Hierzu wurden die Kulturschälchen leicht geneigt, gleichzeitig der Deckel abgenommen, und das alte Medium mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgesaugt. Nachfolgend wurden 1,5 ml frisches Komplettmedium in die Schälchen pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Tropfen nicht direkt auf den Parietalzelleck fielen. Über die gesamte Kulturdauer hin wurden lichtmikroskopische Kontrollen hinsichtlich Zellzahl, Überwucherung mit Fibroblasten und Kontamination mit Mikroorganismen vorgenommen. Starkes Wachstum von Bakterien und Pilzen wurde durch Verfärbung des pH-Indikators im Medium und Trübwerden des Mediums sichtbar.

2.3 Verwendete Lösungen, Inhibitoren und Stimulantien

Die folgenden Lösungen, Inhibitoren und Stimulantien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, für alle Versuche in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt und bei Bedarf nur noch verdünnt.

2.3.1 Lösungen

Alle verwendeten Messpuffer enthielten die folgenden Substanzen:

| | |
|--------|---------------------------------|
| 14 mM | HEPES |
| 7 mM | TRIS |
| 3 mM | K ₂ HPO ₄ |
| 2 mM | KH ₂ PO ₄ |
| 1,2 mM | Ca ²⁺ -Glukonat |
| 1,2 mM | MgSO ₄ |

Zum Anrühren der Messlösungen wurden zwei 10:1 konzentrierte Stammlösungen verwendet, von denen die eine HEPES/TRIS und die Kaliumphosphatsalze, die andere das Kalziumglukonat und das Magnesiumsulfat enthielten (siehe oben).

Für die Kalibrationslösung wurde anstelle der ersten Stammlösung eine Lösung mit 14 mM HEPES, 100 mM Kaliumglukonat, 40 mM Kaliumchlorid und die beiden Kaliumphosphatsalze (3 mM KH₂PO₄ bzw. 2 mM K₂HPO₄) verwendet.

Zusätzlich enthielten die entsprechenden Lösungen:

NaCl Puffer (HEPES Puffer)

| | |
|--------|---------|
| 120 mM | NaCl |
| 20 mM | Glucose |

NaCl Puffer mit 40 mM Ammoniumchlorid

| | |
|-------|--------------------|
| 80 mM | NaCl |
| 40 mM | NH ₄ Cl |
| 20 mM | Glucose |

Cl⁻ freie Lösung

| | |
|--------|---------|
| 120 mM | Na-Glc |
| 20 mM | Glucose |

Na⁺ freie Lösung

| | |
|--------|---------|
| 130 mM | TMA-Cl |
| 20 mM | Glucose |

Na⁺ und Cl⁻ freie Lösung

| | |
|--------|-------------------|
| 130 mM | TMA-OH |
| 130 mM | Gluconsäurelacton |
| 20 mM | Glucose |

NaCl Puffer mit 5% CO₂/HCO₃⁻

| | |
|--------|---------------------------------|
| 100 mM | NaCl |
| 20 mM | NaHCO ₃ ⁻ |
| 20 mM | Glucose |

NaCl Puffer mit 5% CO₂/HCO₃⁻ und 40 mM Ammoniumchlorid

| | |
|-------|---------------------------------|
| 60 mM | NaCl |
| 20 mM | NaHCO ₃ ⁻ |
| 40 mM | NH ₄ Cl |
| 20 mM | Glucose |

Cl⁻ freie Lösung mit 5% CO₂/HCO₃⁻

| | |
|--------|---------------------------------|
| 100 mM | Na-Glc |
| 20 mM | NaHCO ₃ ⁻ |
| 20 mM | Glucose |

Na⁺ freie Lösung mit 5% CO₂/HCO₃⁻

| | |
|--------|--------------------------------------|
| 110 mM | TMA-Cl |
| 20 mM | Cholin-HCO ₃ ⁻ |
| 20 mM | Glucose |

Na⁺ und Cl⁻ freie Lösung mit 5% CO₂/HCO₃⁻

| | |
|--------|--------------------------------------|
| 110 mM | TMA-OH |
| 110 mM | Gluconsäurelacton |
| 20 mM | Cholin-HCO ₃ ⁻ |
| 20 mM | Glucose |

Kalibrationspuffer

| | |
|--------|---------|
| 100 mM | K-Glc |
| 40 mM | KCl |
| 20 mM | Glucose |

Alle Lösungen wurden immer entsprechend ihrer Pufferung nach dem Anrühren mit O₂ bzw. CO₂ begast und auf 37°C erwärmt. Der pH wurde auf den physiologischen Wert 7.4 eingestellt und die Osmolarität geprüft (Zielwert: 290-310 mosm).

Zum Kalibrationspuffer wurden unmittelbar vor der Messung 10 μM Nigericin (2000:1 konzentriert in 99% Ethanol) zugegeben. Nigericin zerstört die Zellmembran, so dass der Zelle die Fähigkeit genommen wird, den pH zu regulieren. Es kann so zum Zwecke der Kalibration ein pH von außen aufgezwungen werden. In diesem Fall wurde das mit einem pH-Wert von 6.6 und 7.4 realisiert.

2.3.2 Stimulantien und Inhibitoren

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Form von Stammlösungen, 1000:1 bezogen auf die Endkonzentration, angerührt und sofern möglich, bei -18°C gelagert. Ansonsten erfolgte die Zubereitung der Suspension unmittelbar vor Versuchsbeginn.

| Substanz | Messkonzentrationen (Mol/l) | Lösungsmittel |
|-----------|---|------------------|
| 293B | $1 \cdot 10^{-6}$ - $100 \cdot 10^{-6}$ | DMSO |
| Carbachol | $1 \cdot 10^{-4}$ | H ₂ O |
| ChTX | $50 \cdot 10^{-9}$ | H ₂ O |
| DMA | $500 \cdot 10^{-3}$ | DMSO |
| Forskolin | $1 \cdot 10^{-5}$ | DMSO |
| HOE642 | $1 \cdot 10^{-6}$ - $50 \cdot 10^{-6}$ | H ₂ O |
| NPPB | $3 \cdot 10^{-3}$ - $300 \cdot 10^{-3}$ | DMSO |
| Omeprazol | $1 \cdot 10^{-5}$ | H ₂ O |
| Ranitidin | $1 \cdot 10^{-4}$ | H ₂ O |
| SCH28080 | $1 \cdot 10^{-5}$ | DMSO |

2.4 Messung der Säuresekretion

Beim Versuch der direkten Messung der Säuresekretion in kultivierten Parietalzellen stößt man auf das Problem, dass die Zellen keine Monolayer ausbilden und es somit nicht möglich ist, basolaterale und apikale Transportaktivitäten zu trennen. Zudem muss damit gerechnet werden, dass die Zellen, wohl wegen des fehlenden Kontakts zu Nachbarzellen, ihre apikale Membran internalisieren, und dass deswegen die produzierte Säure in intrazellulären Vakuolen angesammelt wird. Da ohnehin pro apikal sezernierten HCl Molekül basolateral ein HCO_3^- abgegeben würde, käme es nicht zu einer Azidifizierung des Mediums, die als Maß für die Säuresekretion dienen könnte.

Berglinde und Mitarbeiter gelang es eine indirekte Methode zu entwickeln, die gute Ergebnisse liefert (13). Sie beruht darauf, dass Aminopyrin, eine schwache Base mit einem pH von 5, nach Zugabe zum Medium in die Zellen diffundieren kann, jedoch nach Protonierung nicht in der Lage ist, die sauren Kompartimente zu verlassen. Somit kann die intrazelluläre Akkumulation von radioaktiv markiertem ^{14}C -Aminopyrin nach Absaugen des Mediums mit einem β -Counter gemessen werden. Dabei ist die Anzahl der protonierten ^{14}C ein Maß für die Säuresekretion.

2.4.1 Verwendete Lösungen und Stimulantien

Das für den ^{14}C -Aminopyrin-Assay verwendete Grundmedium enthält:

| | |
|---------|--------------------------|
| 120 mM | NaCl |
| 14 mM | HEPES |
| 7 mM | TRIS |
| 3 mM | KH_2PO_4 |
| 2 mM | K_2HPO_4 |
| 1.2 mM | MgSO_4 |
| 1.2 mM | Ca-Gluconat |
| 20 mM | Glucose |
| 1 mM | Na-Pyruvat |
| 10 mg/l | Phenolrot |

Zum Medium wurde am Versuchstag 2 g/l BSA zugegeben. Ein Teil des entstandenen Komplettmediums wurde mit 1.85 kBq ^{14}C -Aminopyrin versetzt.

Alle Inhibitoren und Stimulantien wurden so angerührt, dass sie bei Anwendung 1:100 zu verdünnen waren.

2.4.2 Versuchsablauf

Für den Aminopyrin-Uptake wurden Parietalzellen verwendet, die in Makroplatten mit 6 Vertiefungen ohne Deckgläschen auf Matrigel[®] kultiviert worden waren.

2.4.2.1 Präinkubation

Das Medium wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt, die Kulturen zweimal mit je 1 ml Komplettmedium gewaschen. Den entsprechenden Kulturschälchen wurde Omeprazol bzw. Ranitidin hinzugefügt. Die Makroplatten wurden mit Komplettmedium für eine Stunde zurück in den Brutschrank gestellt. Das Medium wurde erneut abgesaugt und diesmal durch ^{14}C -Aminopyrin-haltiges Komplettmedium ersetzt. In die entsprechenden Schälchen wurde erneut Omeprazol bzw. Ranitidin und diesmal zusätzlich die Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen gegeben.

2.4.2.2 Stimulation

Nach 5 Minuten erfolgte die Stimulation mit je einem der zwei Agonisten, Carbachol oder Forskolin. Für die Zeit der Stimulation wurden die Kulturen erneut in den Brutschrank gestellt. Als Zeitraum für die Stimulation wurden 45 Minuten gewählt.

2.4.2.3 Lyse der Zellen und Radioaktivitätsmessung

Das ^{14}C -Aminopyrin-haltige Komplettmedium wurde abgesaugt und verworfen. Die Kulturen wurden zweimal mit NRM gewaschen und anschließend leer gelassen. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 ml 3%igem Triton X-100 pro Schälchen eine Stunde lang lysiert und dabei kontinuierlich geschüttelt. Danach wurde aus jedem Schälchen 500 μl Flüssigkeit entnommen und in ein Szintillations-Röhrchen gegeben. Jeweils 4 ml Szintillationsflüssigkeit wurden dazupipettiert und dann gevortext. Die Zählung erfolgte in einem β -Counter.

2.5 Messung des Zellvolumens und der Volumenänderung

2.5.1 Färbung

Die Färbung- und Waschschrte erfolgten in CO₂ gepufferter Lösung. Das Medium wurde aus dem ausgewählten Kulturschälchen abgesaugt und durch 1 ml Puffer ersetzt. Nun wurde 1 µl der 3 mM Calcein/AM-Stammlösung dazupipettiert und mit einer 1000 µl-Pipette gut vermengt. Danach wurde das Kulturschälchen für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Das Calcein-haltige Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 1 ml Standard-CO₂-Lösung gewaschen und erneut für 30 Minuten inkubiert. Dieser Waschschrte wurde ins Protokoll aufgenommen, weil er sich positiv auf die Stabilität des Anfangsvolumens auswirkt.

2.5.2 Messung

2.5.2.1 Messkammer

Die Messvorrichtung bestand aus einer selbstgefertigten, kreisrunden Kammer mit einer Öffnung in der Mitte einem Bohrloch unten innen für den Zulauf und einem Bohrloch innen oben für den Ablauf. Dies stellte das eigentlichen Perfussionssystem dar. Der Durchmesser der Kammer betrug 30 mm, die Höhe 8 mm. In der Mitte befand sich eine zentrale Bohrung mit einem Durchmesser von 8 mm.

2.5.2.2 Montage der Messkammer

Das Deckgläschen wurde mit Hilfe einer Kanüle sorgfältig aus dem Kulturschälchen gehoben und auf der Rückseite sowie am Rand mit einem fusselfreien Tuch von Puffer gereinigt. Nun wurde die Kammer am Rand mit Silikon-Fett bestrichen und das Deckgläschen vorsichtig von unten dagegen gepresst, so dass keine Luftbläschen mehr zwischen Kammer und Deckgläschen zu sehen waren. Nach Anbringen des Deckgläschens an die Messkammer wurde die Messvorrichtung auf dem beheizten Stativ eines invertierten Laserscanmikroskopes, Modell LSM 410 inverted (Carl-Zeiss, Oberkochen, Deutschland) befestigt. Es wurden dann die Zu- und

Ablaufverbindungen angeschlossen, und mit der konstanten Perfusion begonnen. Das 40fach-Objektiv (40x/1.3 NA, Wasser) wurde gewählt, und die Lichtquelle in die optimale Position gebracht. Die Temperatur aller Lösungen wurden sowohl in den Vorratsgefäßen, als auch auf dem Weg zur Messkammer und in der Kammer selbst auf 37°C konstant gehalten, um das Messergebnis nicht durch Temperatursprünge zu verfälschen (120). Die vorgewärmten und ständig begasten Lösungen wurden mit einem Umschalter, der den raschen Pufferwechsel ohne Unterbrechung des Flusses ermöglichte, an die Kammer angeschlossen.

2.5.2.3 Auswahl der zu messenden Zellen

Es wurde eine Gruppe von nur 2-3 Zellen lichtmikroskopisch ausgewählt, um die Zellen möglichst groß auf dem Bildschirm darzustellen und um die intrazellulären Strukturen besser voneinander abgrenzen zu können. Es wurde darauf geachtet, dass es sich mikromorphologisch um Parietalzellen handelte, und dass die Zellen Calcein aufgenommen hatten. Dann wurde der Lichtweg vom Okular des Mikroskopes auf den Photomultiplier umgeschaltet.

2.5.2.4 Messung des Fluoreszenzsignals

Die Zellen wurden mit dem Licht eines Argon Lasers der Wellenlänge 488 nm exzitert. Das von einer einzelnen ausgewählten Zellgruppe emittierte Licht wurde nach Durchlaufen eines Filters (Carl Zeiss, LP 515), was zu einer 1000fachen Abschwächung führte, und einer Pinhole von 20 von einem Photomultiplier aufgenommen. Die Hintergrundfluoreszenz wurde wiederholt gemessen und für vernachlässigbar befunden.

Es wurden Abtastungen in der z-Achse, mit einer Schichtdicke von 1 µm durch die Mitte der 2-3 ausgewählten Parietalzellen durchgeführt. Gemessen wurde dabei, die Calcein-Konzentrations-Änderung über die Zeit in einem vorher definierten Areal. Es wurde später aus einer Abnahme der Calcein-Konzentration bei konstanter Fläche auf eine Zellvolumenzunahme und aus einer Zunahme der Calcein-Konzentration bei konstanter Fläche auf eine Zellvolumenabnahme, geschlossen.

Die Zellen wurden jeweils 8 Sekunden abgetastet. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Abtastungen betrug 10 Sekunden. Insgesamt wurde jeweils ein Minimum von 120 Bildern gemacht. Die entstehenden Bilder wurden auf einem Datenträger gesichert. Mit Hilfe einer geeigneten Software wurde die Calcein-Konzentrations-Änderung graphisch ausgewertet und linear dargestellt.

2.6 Messung des intrazellulären pH und der pH-Änderung

Die Messung des intrazellulären pH erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF. Nach Zugabe von BCECF-Acetomethylester zu den Zellen diffundiert dieser ins Zellinnere und wird dort durch intrazelluläre Esterasen gespalten, wodurch der eigentliche Farbstoff BCECF frei wird (185).

2.6.1 Färbung

Die Färbung- und Waschschrte erfolgten je nach Versuchsansatz in CO₂ oder O₂ gepufferter Lösung. Das Medium wurde aus dem ausgewählten Kulturschälchen abgesaugt und durch 1 ml Puffer ersetzt. Nun wurde 1 µl der 5 mM BCECF/AM-Stammlösung dazupipettiert und mit einer 1000 µl-Pipette gut vermengt. Danach wurde das Kulturschälchen für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Der veresterte Farbstoff kann aufgrund seiner Lipophilie die Zellmembran permeieren, wird intrazellulär von zelleigenen Esterasen gespalten und kann die Zelle nun bei intakter Membran nicht wieder verlassen. Daher kann die Qualität der Anfärbung als ein Maß für die Vitalität der Zellen angesehen werden. Das BCECF-haltige Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 1 ml der entsprechenden Standard-Lösung gewaschen und erneut für 30 Minuten inkubiert.

2.6.2 Messung

2.6.2.1 Messkammer

Die Messkammer war aus oberflächenbehandeltem Edelstahl gefertigt. Insgesamt bestand sie aus fünf Teilen; einer verschraubbaren Kammer, einem Dichtungsring, einem Dichtungsgummi und dem eigentlichen Perfussionssystem. Der Durchmesser der Kammer betrug 35 mm, die Höhe 7 mm. In der Mitte befand sich eine zentrale Bohrung mit einem Durchmesser von 5 mm.

2.6.2.2 Montage der Kammer

Das Deckgläschen wurde mit Hilfe einer Kanüle sorgfältig aus dem Kulturschälchen gehoben und auf der Rückseite sowie am Rand mit einem

fusselfreien Tuch von Puffer gereinigt. Die Messkammer wurde nun folgendermaßen montiert: auf den unteren Teil der verschraubbaren Kammer wurde der Dichtungsring aufgelegt. Obenauf folgte das Deckgläschen mit dem Dichtungsgummi und dem Perfusionssystem. Die Kammer wurde dann fest verschraubt und auf dem beheizten Stativ eines invertierten Fluoreszenzmikroskops (Nikon Diaphot-TMD) befestigt. Nun wurden die Zu- und Ablaufverbindungen angeschlossen und mit der Perfusion mit konstanten 1,5 ml/min begonnen. Das 40fach-Objektiv wurde gewählt und die obenliegende Lichtquelle in die optimale Position gebracht. Die Temperatur aller Lösungen wurden sowohl in den Vorratsgefäßen, als auch auf dem Weg zur Messkammer und in der Kammer selbst auf 37°C konstant gehalten, um das Messergebnis nicht durch Temperatursprünge zu verfälschen (120). Die vorgewärmten und ständig begasten Lösungen wurden mit einem Umschalter, der den raschen Pufferwechsel ohne Unterbrechung des Flusses ermöglichte, an die Kammer angeschlossen.

2.6.2.3 Auswahl der zu messenden Zellen

Es wurde eine Gruppe von 6-8 Zellen ausgewählt, um der pH-Heterogenität der Einzelzellen Rechnung zu tragen (105). Es wurde darauf geachtet, dass es sich mikromorphologisch um Parietalzellen handelte, und dass die Zellen BCECF aufgenommen hatten. Dann wurde der Lichtweg vom Okular des Mikroskopes auf den Photomultiplier umgeschaltet. Dort durch das Okular des Photomultipliers das Messfeld mittels seitlicher Blenden derart bestimmt, dass der zellfreie Bereich minimal war. Die am Photomultiplier anliegende Spannung wurde konstant bei -900 mV gehalten. Schon jetzt wurde die Lichtemission der ausgewählten Zellen kontrolliert, wobei sich für den pH-unabhängigen Teil Werte um die 10^5 counts/Sekunde einstellten. Auch über das Verhältnis der beiden emittierten Anteile ließ sich eine grobe Abschätzung für den späteren Ausgangs-pH_i treffen, wobei sich Werte zwischen 3 und 4 später als günstig für die Kalibration erwiesen.

2.6.2.4 Messung des Fluoreszenzsignals

Die Zellen wurden abwechselnd mit 440 ± 10 nm und 490 ± 10 nm mit einer Frequenz von 100/s exzitert. Das von einer einzelnen ausgewählten Zellgruppe emittierte Licht wurde nach Durchlaufen eines 510 nm dichroischen Spiegels und eines 530 nm Filters und einer anpassbaren Blende von einem Photomultiplier aufgenommen. Das nach Exzitation mit 440 nm emittierte Signal erweist sich als weitgehend pH-unabhängig, wohingegen das nach Exzitation mit 490 nm pH-abhängig ist. Das Verhältnis dieser beiden Emissionswerte stellte im interessierenden pH-Bereich eine gute Näherung für den tatsächlichen pH dar. Die Datenaufnahme (1 Ratio-Wert pro Sekunde) und die Datenverarbeitung wurde durch die Software der Herstellerfirma (Photon Technologies Inc., Wedel, Deutschland) vorgenommen. Der Exzitations-Shutter wurde durch ein selbstgeschriebenes Programm gesteuert, das den Wechsel zwischen kontinuierlicher und intermittierender Belichtung während des Experimentes erlaubte. Am Ende jedes Versuches wurde die 440/490-Ratio in pH_i -Werte umgerechnet, nachdem der pH_i dem pH_o mittels der „high- K^+ -Nigericin“-Methode angeglichen worden war (33). Die Hintergrundfluoreszenz wurde wiederholt gemessen und für vernachlässigbar befunden.

2.6.2.5 Bestimmung der intrinsischen Pufferkapazität

Die totale intrazelluläre Pufferkapazität setzt sich zusammen aus der intrinsischen Pufferkapazität (β_i) und der Pufferkapazität des intrazellulären HCO_3^- . β_i wurde nach der Beschreibung von Roos und Boron (153) sowie Boyarski (23,24) mittels der NH_4 -Pulstechnik als $\beta_i = \Delta[\text{NH}_4^+]_i / \Delta\text{pH}_i$ von Georg Lamprecht aus unserer Arbeitsgruppe bestimmt, wobei $\Delta[\text{NH}_4^+]_i$ für die Änderung der intrazellulären NH_4^+ -Konzentration nach plötzlicher Zugabe von extrazellulärem NH_3 steht und ΔpH_i für die entsprechende pH_i -Änderung. $[\text{NH}_4^+]_i$ wurde berechnet als $[\text{NH}_4^+]_i = [\text{NH}_3]_i \times 10^{9,21 - \text{pH}_i}$, unter der Annahme, dass für NH_3 ein momentaner Konzentrationsausgleich über die Zellmembran stattfindet und dass der pK_a von NH_4^+ intra- und extrazellulär derselbe ist. Die Berechnung des durch NH_4Cl -Zugabe erreichten ΔpH_i erfolgte durch Mittelung aller pH_i -Werte während der dem NH_4Cl -verursachten pH_i -Anstieg unmittelbar vorangehenden

100 Sekunden, sowie aller pH_i -Werte während der 100 Sekunden, die direkt auf den höchsten NH_4Cl -induzierten pH_i -Wert folgten. Dies erreichten Werte wurden subtrahiert. Eine Pufferkurve mit einem β_i von 70 mM/pH-Einheit bei einem pH_i von 6.6, von 38 mM/pH-Einheit bei 7.0 und von 21 mM/pH-Einheit bei 7.4 wurde erstellt und für die Berechnung der Protonenfluxe bei den entsprechenden pH-Werten verwendet. Die Kurve ähnelt den in vielen anderen Zelltypen gemessenen und ist in Abb. 3 dargestellt.

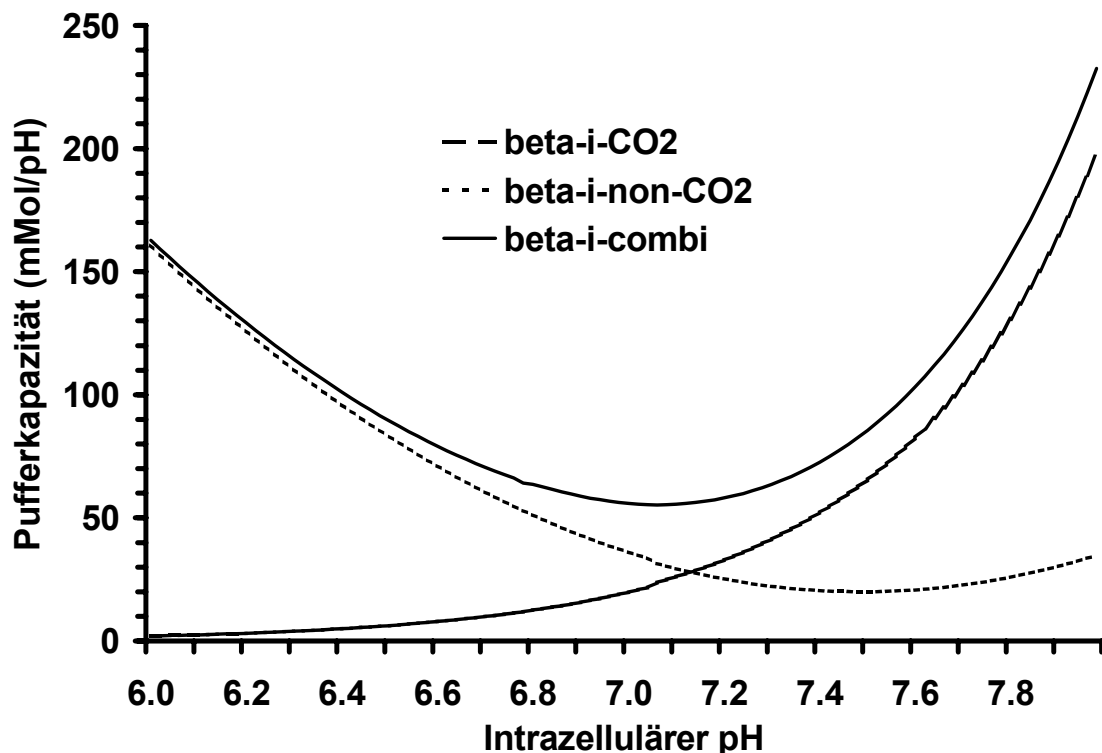


Abb. 3: Pufferkurve zur Berechnung der Fluxraten in Parietalzellen. Freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. G. Lamprecht.

2.7 Auswertung der Messdaten und Statistik

2.7.1 Verarbeitung der Rohdaten des Laserscanmikroskopes

Die Bilder, die das Laserscanmikroskop über die Zeit im Photomultiplier gewann, wurden im TIF-Format auf einem mobilen Datenträger gespeichert und mit Hilfe der Software Scion Image Beta 4.02 Win (Maryland, U.S.A.) in die Calcein-Konzentration in Prozent (ausgehend von 100%) umgerechnet. Es wurden dabei mehrere intrazelluläre Volumenanteile ausgewählt, statistisch gemittelt, und die Dichte der Calceinkonzentration über die Zeit graphisch dargestellt. Dabei galt die Änderung der Calcein-Konzentration über die Zeit als Änderung des Zellvolumens. Relative Zunahme der intrazytoplasmatischen Calcein-Konzentration entspricht dabei einer Zellschrumpfung, relative Abnahme einer Zellschwellung.

2.7.2 Verarbeitung der Rohdaten des Fluoreszenzmikroskopese

Die im Photomultiplier gemessenen Intensitäten wurden über eine Schnittstellenkarte direkt an den Computer übermittelt und von diesem weiter aufbereitet. Die mit der „high-K⁺-Nigericin“-Methode gewonnenen Ratio-Werte wurden mit Hilfe der Herstellersoftware zur Kalibration der übrigen Messwerte herangezogen. Die von der PTI-Software aufgenommenen Rohdaten für die pH-Verlaufskurven wurden als ASCII (American Standard Code for Information Interchange)-File abgespeichert.

2.7.3 Weiterbearbeitung und Zusammenfassung der Messdaten

Sowohl die Daten der Volumenmessungen, die über Scion Image gewonnen wurden, als auch die Daten aus der PTI-Software, wurden mit Hilfe von selbstgefertigten Makros nach Microsoft[®] Excel[®] (Microsoft[®] Corporation) importiert und dort graphisch weiterverarbeitet. Abb. 4. zeigt beispielhaft die Rohdaten eines Versuches aus der Bestimmung des intrazellulären pH. Daraufhin wurden jeweils die Versuche einer Gruppe, ebenfalls mit Hilfe selbstgefertigter Makros, interpoliert, um ein gleichförmiges Zeitprotokoll zu erhalten, und mit Angabe von Mittelwert und Standardfehler grafisch dargestellt.

Im Verlauf der pH-Messungen zeigte sich, dass es durch den gesteuerten Shutter weitestgehend gelang, das Photobleaching zu reduzieren.

Um dem Problem des Photobleachings bei den Volumen-Messungen beizukommen, wurde am Anfang jedes Messtages und zwischen den Versuchen immer wieder eine Bleachkurve, das heißt der Verlauf der Calcein-Konzentrations-Änderung über die Zeit ohne äußere Eingriffe, aufgenommen, gemittelt und jeweils von den Daten aus den Versuchen, die am gleichen Versuchstag gewonnen wurden, subtrahiert. Es zeigte sich, dass das Photobleaching bei einem Zeitraum von 20 Minuten im Bereich von $10 \pm 3\%$ lag. Dies konnte auch als ein Maß für die Reinheit der Zellen betrachtet werden, da kontaminierte Zellen eine deutlich erhöhtes Photobleaching, womöglich aufgrund einer für das Calcein permeablen Zellmembran zeigten und somit zum Abbruch des Versuches führten.

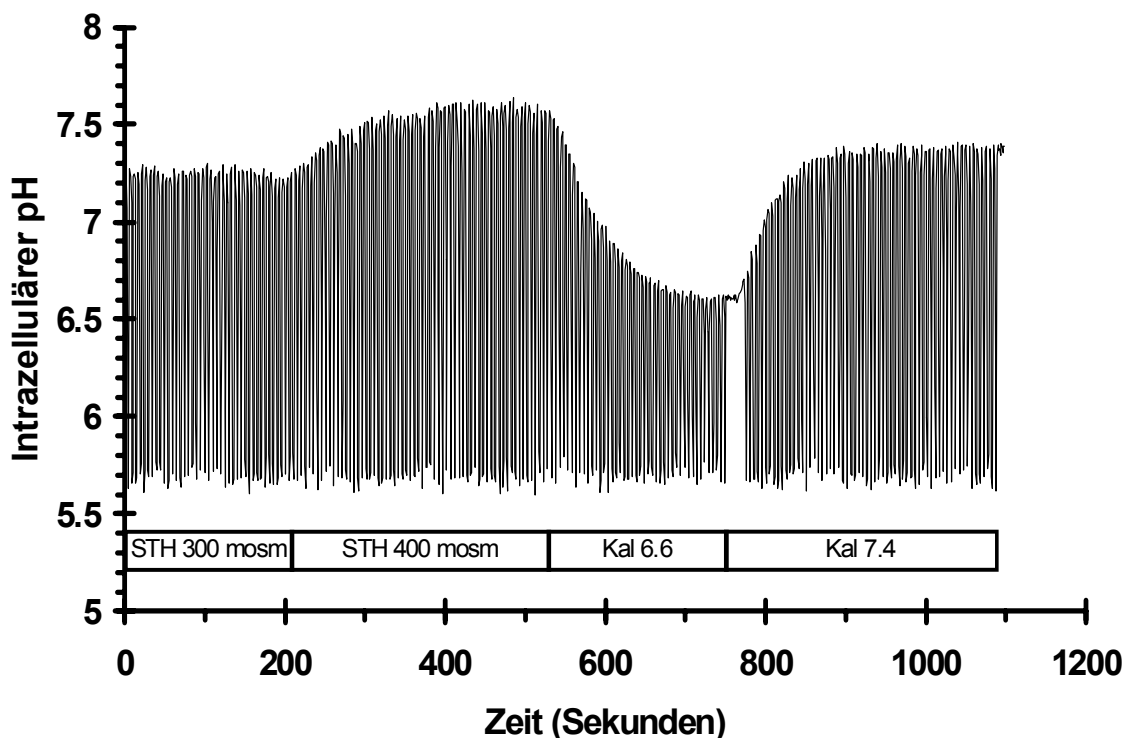


Abb. 4: Beispielkurve: pH_i -Verlauf eines Versuches, bei dem die Osmolarität von physiologischen 300 mosm auf 400 mosm gehoben wurde. Gezeigt sind die Daten, wie sie nach erfolgter Kalibration von der PTI-Software ausgegeben wurden.

2.7.4 Berechnung des Protonenfluxes

Die Kurvensteigung wurden mittels einer linearen Regressionsanalyse nach der

Formel
$$\frac{n - (\sum xy)(\sum x)(\sum y)}{n(\sum (x^2)) - (\sum x)^2}$$
 als [dpH/s] an individuellen nicht-interpolierten Volumen- und pH-Kurven während der ersten Minute des Stimulationsvorganges bestimmt. Zur Berechnung der Calcein-Konzentrationsänderungen bzw. der Protonenfluxe wurde das Anfangsvolumen bzw. der Start-pH_i durch Mittelung der gewonnenen Werte während der letzten Sekunden vor Änderung des Puffers, in welchen ein konstanter Wert vorlag, berechnet und zur Bestimmung der Pufferkapazität herangezogen. Mit Hilfe dieser beiden Werte wurde dann nach $J(H^+) = (dpH_i/dt) \times \beta_i$ die Calcein-Konzentrationsänderung [Pixel%/Sekunde] und der Protonenflux [mmol/min] berechnet.

2.7.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung kam der Student's t-Test zur Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde p=0,05 gewählt. Die Anzahl n wurde als Anzahl der Versuche je Gruppe definiert. Sie betrug bei allen Versuchen 5-9.

3 Ergebnisse

Es wird zunächst auf die Technik der Parietalzellkultivierung und die daraus resultierenden Ergebnisse näher eingegangen. Es folgen dann die Ergebnisse aus Messung der Säuresekretion und die Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von K^+ und Cl^- für die Zellschrumpfung bei Stimulation der Säuresekretion.

3.1 Parietalzellkultur

3.1.1 Parietalzellisolierung

Mittels Gegenstromzentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation gelang es, die in der durch enzymatischen Verdau erhaltenen Mukosazellsuspension enthaltenen Parietalzellen auf $95\pm 2\%$ anzureichern. Es zeigte sich, dass die Reinheit der Kultur von der genauen Durchführung dieser Schritte abhängig war.

3.1.1.1 Enzymatische Verdauung

Um einen größtmöglichen Reinheitsgrad der Parietalzellen zu erreichen waren auch die anfänglichen Schritte der Zellisolierung von erheblicher Bedeutung. Da das Zeitprotokoll für die Pronaseverdauung konstant gehalten wurde, lieferte die, in der Präparation gewonnene Mukosazellsuspension, nicht jedesmal die gleiche Anzahl an Drüsenschläuchen. Dieses war vermutlich auf die Variabilität der Zellen und die Güte der Präparation zurückzuführen. Deswegen war vor allem die sich anschließende Kollagenaseverdauung von immenser Wichtigkeit für die Reinheit der entstehenden Parietalzellkultur. Als Endpunkt der Kollagenaseverdauung wurde der weitgehende Zerfall der Drüsenschläuche zu Einzelzellen angesehen. Da dieser Zerfall nicht homogen und momentan erfolgte, spielte es eine große Rolle, ob noch mehr Drüsenschläuche oder schon hauptsächlich Einzelzellen vorhanden waren. Kürzere Verdauungszeiten führten zu Zellkonglomeraten in der Elutriationskammer und somit zu einer schlechteren Ausbeute. Zu lange Verdauung führte zu einer schlechteren Anheftung in den Kulturschälchen. Daher wurde es für höchst wichtig befunden, den Verdauungszustand fortlaufend mikroskopisch zu kontrollieren und die

Verdauung zum richtigen Zeitpunkt durch Dilution mit Präparationspuffer und nachfolgendes Zentrifugieren abzurechnen.

3.1.1.2 Gegenstromzentrifugation

Was die Elutriation betraf, so stellte sich heraus, dass eine zu lange Elutriation zu einer deutlich gesteigerten Konglomeratneigung führte. Theoretisch sollte sich eine längere Elutriation positiv auf die Zellreinheit auswirken, praktisch zeigte sich jedoch erstens eine schwächere Ausbeute an Parietalzellen und zweitens paradoxerweise eine herabgesetzte Auftrennung durch entstehende Schleimzellquartette, die auch durch den folgenden Nycodenz[®]-Schritt nicht abzutrennen waren.

3.1.1.3 Dichtegradientenzentrifugation

Es zeigte sich, dass ein sorgfältiges Auflegen der Gradienten von großer Bedeutung für die Abgrenzbarkeit der Banden und somit auch für die Entnahme der Parietalzellen war. Unscharfe Banden führten zu einer verminderten Anreicherung und Reinheit der Parietalzellkultur.

3.1.2 Parietalzellkultur

Das Zellkulturmodell, an dem die im folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt wurden, beinhaltete die Kultivierung von terminal differenzierten Zellen. Die Absterberate betrug annähernd 10% pro Tag. Anfänglich war mit Problemen wie geringer Anheftung, Überwucherung der Kultur mit Fibroblasten oder Kontamination mit Mikroorganismen zu kämpfen. Dies machte eine ständige Optimierung der Kultivierungsmethode erforderlich. Was die Anheftung anging, so war die Reinheit der Parietalzellen ein maßgeblicher Faktor, und jegliche Art kontaminierender Zellen führte zu einer schlechteren Anheftung. Die darauf folgenden Versuche waren insofern beeinträchtigt, als dass keine in Gruppen beieinanderliegenden, eindeutig identifizierbaren Parietalzellen mehr zu finden waren. Es wurde deswegen größter Wert auf eine saubere Trennung gelegt.

Die Kontamination mit Mikroorganismen ist bei der Kultivierung von Magenzellen schon deshalb ein wichtiger Aspekt, weil sich im Magen der

Kaninchen außerordentlich viele Bakterien und Pilze befinden, zumal die Tiere Koprophagen sind. Insofern war der erste Schritt zur Freihaltung der Kultur von Mikroorganismen die äußerst sorgfältige Säuberung des Magens nach Entnahme. Bei allen folgenden Schritten wurde stets auf sauberes Arbeiten geachtet. Der Arbeitsschritt, ab dem der Trennungsvorgang als steril betrachtet wurde, war die Stapelung der elutrierten, in frischem hochkonzentriertem BSA-Puffer resuspendierten Parietalzellen auf die steril filtrierten Nykodenz[®]-Gradienten. Zusätzlich ins Protokoll aufgenommene Zentrifugations- und Resuspensionsschritte trugen merklich zur Keimreduktion bei. Initial wurde dem Kulturmedium eine Dreierkombination an Antibiotika nämlich Gentamicin, Geneticin und Novobiocin zugesetzt, was die Infektionsrate ebenfalls verringerte. Andere Kombinationen unter anderem mit Penicillin und Streptomycin brachten keine Verbesserung, so dass diese Antibiotika nicht ins Protokoll aufgenommen wurden.

3.1.3 Validierung der Kultur

Um die Kultur zu validieren wurde die Fähigkeit zur Säuresekretion nach Stimulation durch verschiedene Agonisten als Parameter der Kulturgüte herangezogen. Dabei zeigte sich eine aufgehobene Stimulierbarkeit bei Überwucherung mit Mikroorganismen. Es wurden an jedem Tag der Datenerhebungen Kontrollen zur Validierung gemessen und mit anderen Versuchstagen verglichen. Aufgrund der traumatisierenden Folgen der Präparation, wie Andau der Membranproteine, wurde darauf geachtet, dass zwischen Präparation und Datenerhebung mindesten 24 Stunden lagen um selektiv mit denjenigen Zellen arbeiten zu können, die diese Zeit vital in Kultur blieben.

3.2 Messung der Säuresekretion in stimulierten Parietalzellen

3.2.1 Bedeutung der Stimulierbarkeit der Säuresekretion

Die Säuresekretion stellt eine wichtige physiologische Funktion der Parietalzellen dar. Von größtem Interesse ist, dass die in Kultur genommenen Parietalzellen diese Fähigkeit initial besitzen und auch über einige Tage hinweg behalten.

3.2.2 Kontrollgruppen

Als Kontrollen wurden zwei Gruppen von Parietalzellkulturen verwendet. In einer wurde die sekretorische Aktivität der Parietalzellen vollständig durch Inkubation mit Omeprazol blockiert, um Messaktivität durch an der Matrix haftendes, unvollständig ausgewaschenes ^{14}C -AP zu quantifizieren. Die andere Gruppe wurde mit Ranitidin behandelt, um die Wirkung von endogen sezerniertem Histamin zu blockieren. Im Unterschied zur Omeprazol-Gruppe ist hier die H^+/K^+ -ATPase aktiv und die entsprechend behandelten Zellen zeigten eine basale Säuresekretion, auf welche die nach Stimulation erhaltenen Werte bezogen wurden.

3.2.3 Stimulation mit verschiedenen Substanzen

Zur Stimulation wurden Carbachol, welches an M_3 -Rezeptoren an der Parietalzelle bindet, und Forskolin als Aktivator der Adenylatzyklase verwendet. Von allen Gruppen wurde nun der durch Inkubation mit Omeprazol erhaltene Wert subtrahiert. Die Steigerung der Säuresekretion durch Stimulation wurde relativ zur Ranitidin-Kontrolle ausgedrückt. 10^{-4} M Carbachol stimulierte die ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahme 2.4 ± 0.1 fach und 10^{-5} M Forskolin 3.9 ± 0.1 fach. Der Unterschied der ^{14}C -Aminopyrin-Aufnahmewerte zwischen Kontrollen die mit bzw. ohne Ranitidin behandelt wurden war nicht signifikant, was darauf hinweist, dass keine nennenswerte Kontamination der Kultur mit histaminfreisetzenden Zellen vorlag. In Abb. 5 sind die relativen Steigerungsraten der ^{14}C -Aminopyrinaufnahme bei Stimulation mit Carbachol und Forskolin grafisch dargestellt.

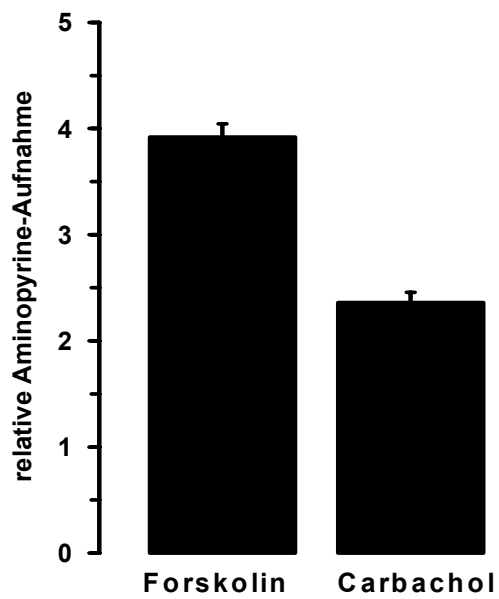


Abb. 5: Quantifizierung der Säuresekretion mittels der ^{14}C -Aminopyrinaufnahmetechnik. Die Säuresekretion wird relativ zur Ranitidin-Kontrolle ausgedrückt.

3.2.4 Inhibition von K^+ und Cl^- Kanälen

Um die Bedeutung von K^+ und Cl^- Leitfähigkeit, bei der durch Forskolin und Carbachol induzierten Steigerung der Säuresekretion zu untersuchen, wurde die K^+ Kanalblocker 293B und ChTX sowie der Cl^- Kanalblocker NPPB eingesetzt.

3.2.4.1 K^+ Kanal

Wie bereits gezeigt, kann die vitale Parietalzelle sowohl über den cAMP- als auch über den Ca^{2+} -abhängigen Weg zur Säurestimulation angeregt werden. Bei Blockierung des vermutlich apikal gelegenen, cAMP-regulierten K^+ Kanals durch 293B konnte die Säuresekretion erheblich vermindert werden. Wie Abb. 6 zeigt konnte die Säuresekretion unter Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin und unter Verwendung von 1 μ M 293B um $8.4\pm 3\%$, mit 10 μ M 293B um $64.5\pm 1\%$ und mit 100 μ M 293B um $93.4\pm 1\%$ gehemmt werden. Ähnlich verhielt es sich bei Stimulation mit 10^{-4} M Carbachol, das über den Ca^{2+} -abhängigen Weg wirkt. Hier konnten durch 1 μ M 293B $16.1\pm 2\%$, durch 10 μ M 293B $83.1\pm 1\%$ und durch 100 μ M 293B $91.9\pm 1\%$ der Säuresekretion blockiert werden. Im gleichen Versuchsansatz blockierte 50 nM ChTX die Stimulation mit 10^{-4} M Carbachol um $46.2\pm 1\%$. Auf die Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin hatte das Charybdotoxin in dieser Konzentration keinen Einfluss (Abb. 7).

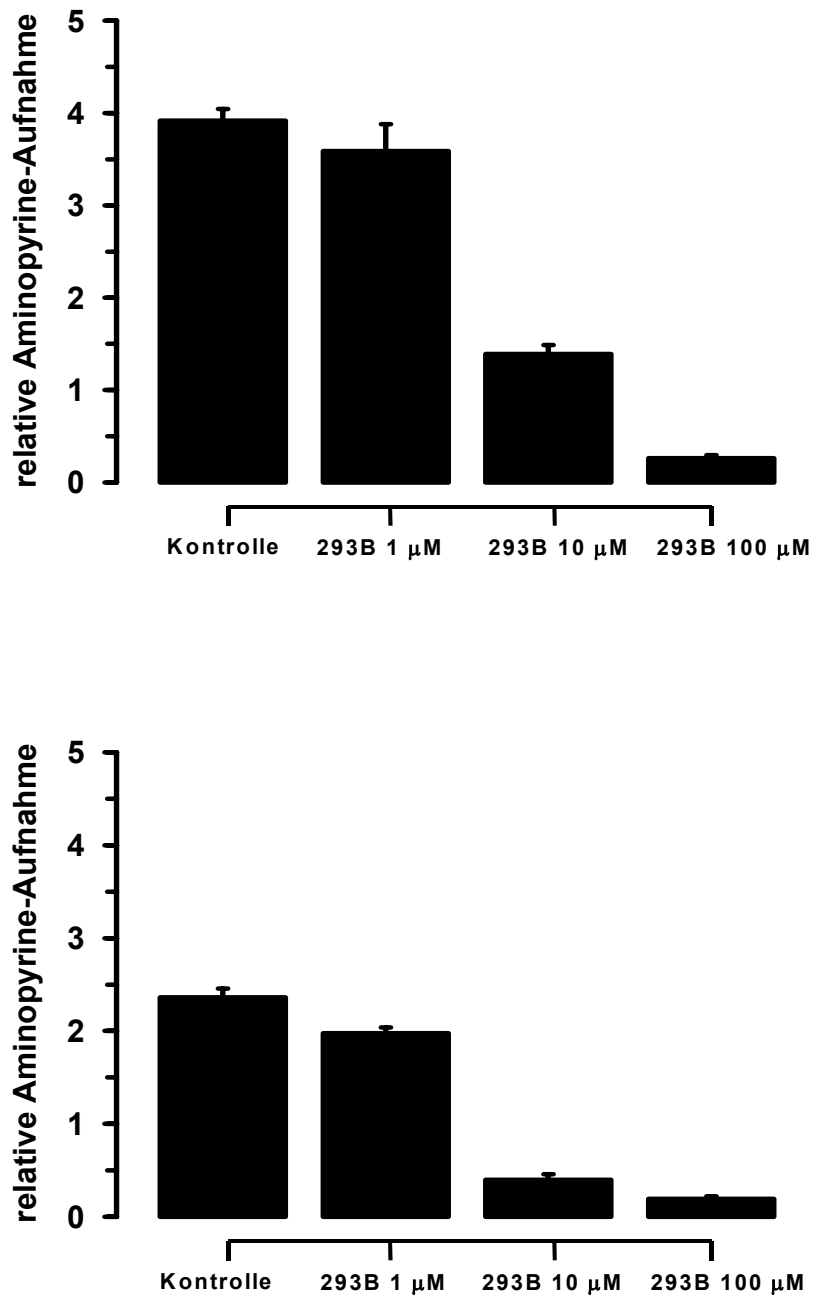


Abb. 6: Effekt bei Einsatz von unterschiedlichen Konzentrationen des wahrscheinlich apikal gelegenen KvLQT1 K^+ Kanalblockers 293B auf die Säuresekretion, unter Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin (oben) und 10^{-4} M Carbachol (unten).

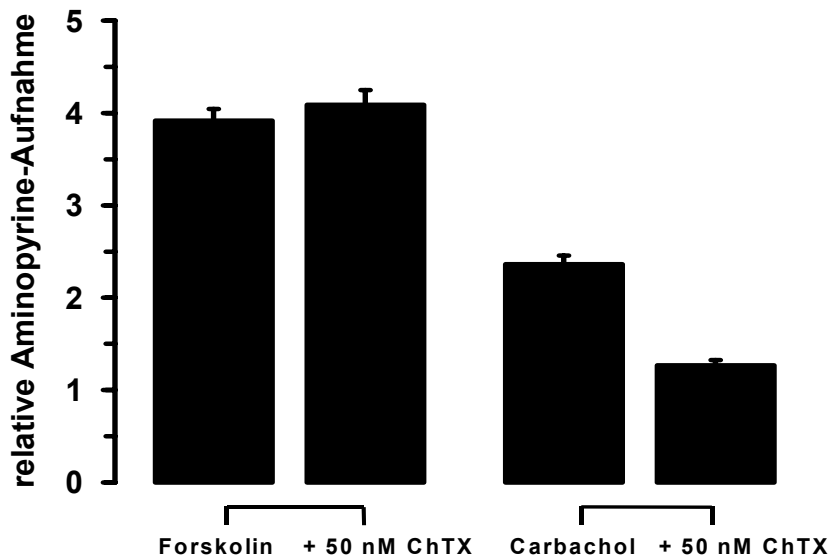


Abb. 7: Stimulation der Säuresekretion mit 10^{-5} M Forskolin (links) und 10^{-4} M Carbachol (rechts) in Anwesenheit des Ca^{+} -abhängigen K^{+} Kanalblockers ChTX.

3.2.4.2 Cl^{-} Kanal

Um die konzentrationsabhängige Wirkstärke des Cl^{-} Kanalblockers NPPB unter Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin und mit 10^{-4} M Carbachol auf die Säuresekretion zu untersuchen, wurde ein Ansatz mit 3, 30 und 300 μM NPPB gewählt. Es zeigte sich, dass nur die Konzentration von 300 μM NPPB in der Lage war, die Säuresekretion fast vollständig aufzuheben. 3 μM NPPB hemmten die Säuresekretion unter Stimulation mit Forskolin um $11.0 \pm 2\%$, bei 30 μM NPPB waren es $35.5 \pm 2\%$. Bei Stimulation mit Carbachol wurde unter Verwendung von 3 μM NPPB $2.5 \pm 2\%$, bei 30 μM NPPB $16.1 \pm 2\%$ der Säuresekretion gehemmt. Erst bei 300 μM NPPB wurde bei Forskolinstimulation $86.2 \pm 0.1\%$ und bei Carbacholstimulation $91.5 \pm 0.1\%$ der Säuresekretion gehemmt. Dies ist in Abb. 8 graphisch dargestellt.

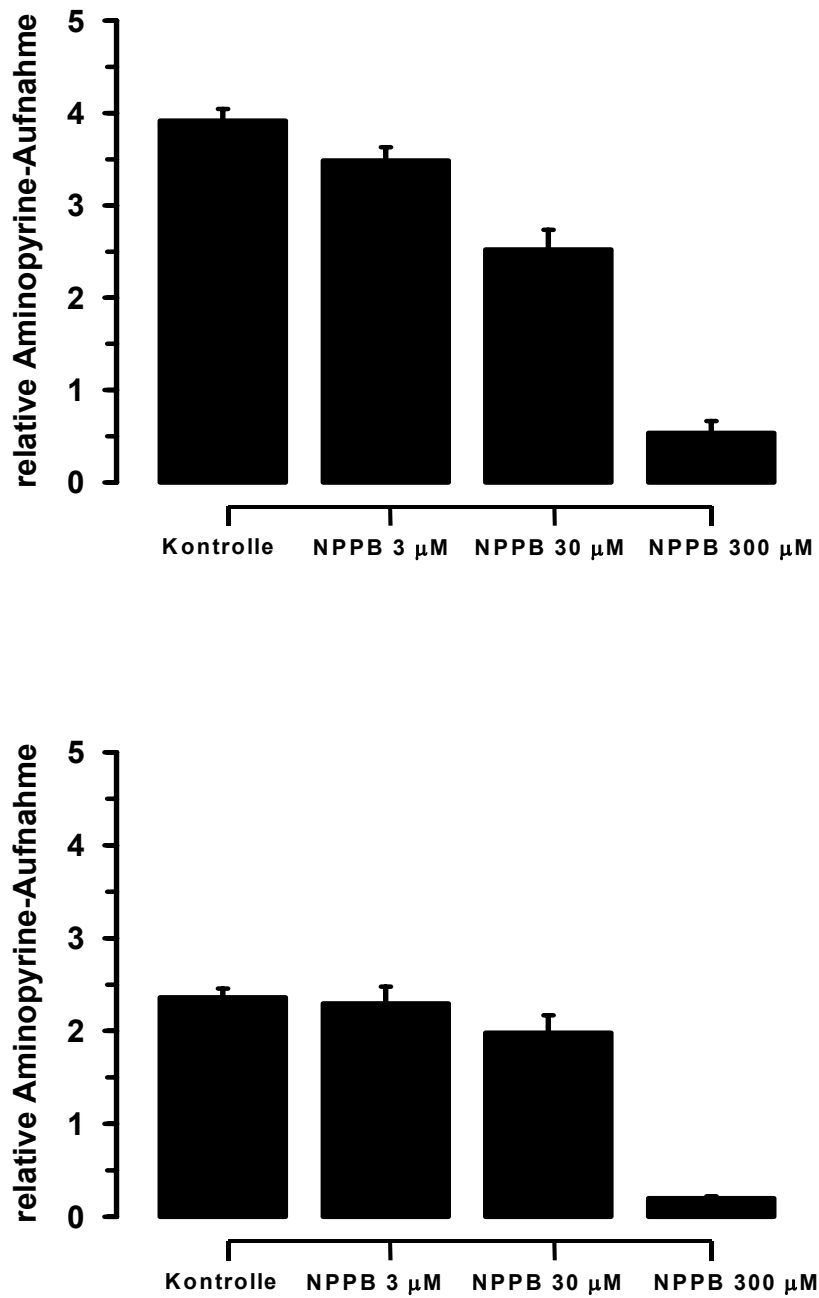


Abb. 8: Grafische Darstellung der Säuresekretion bei Blockierung des Chloridkanals mit unterschiedlichen Konzentrationen NPPB unter Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin (oben) und 10^{-4} M Carbachol (unten).

3.3 Messung des Zellvolumens in stimulierten Parietalzellen

3.3.1 Kontrollgruppe

Beobachtet man die Volumenveränderung von Parietalzellen bei Stimulation der Säuresekretion mit Forskolin und Carbachol, so findet man eine rasche Zellschrumpfung gefolgt von einer Volumenerholung, wie sie in Abb. 9 dargestellt ist. In Zahlen betrug die maximale Schrumpfung unter Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin $15\pm 7\%$, bei Stimulation mit 10^{-4} M Carbachol $9\pm 5\%$. Die Volumenerholung wird zu einem erheblichen Teil durch Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^+$ -Austauschers bewerkstelligt. Was zur initialen Schrumpfung führt ist unbekannt.

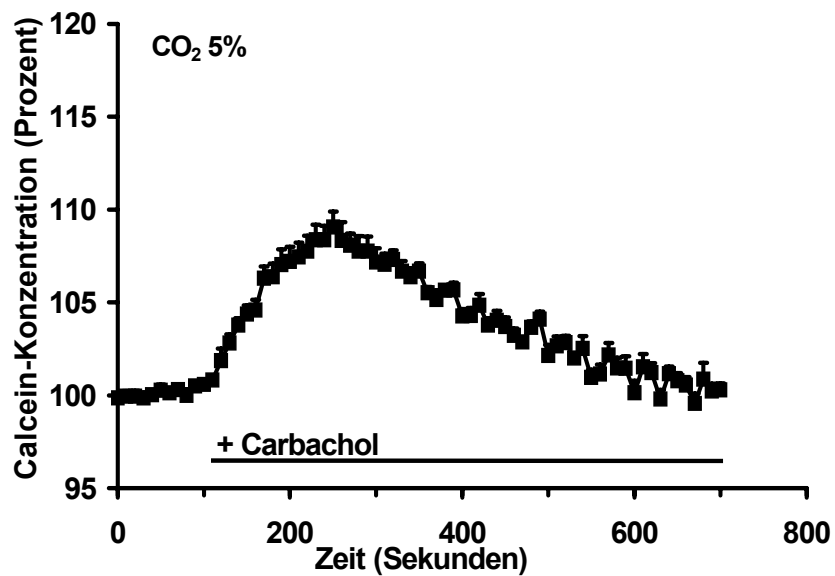
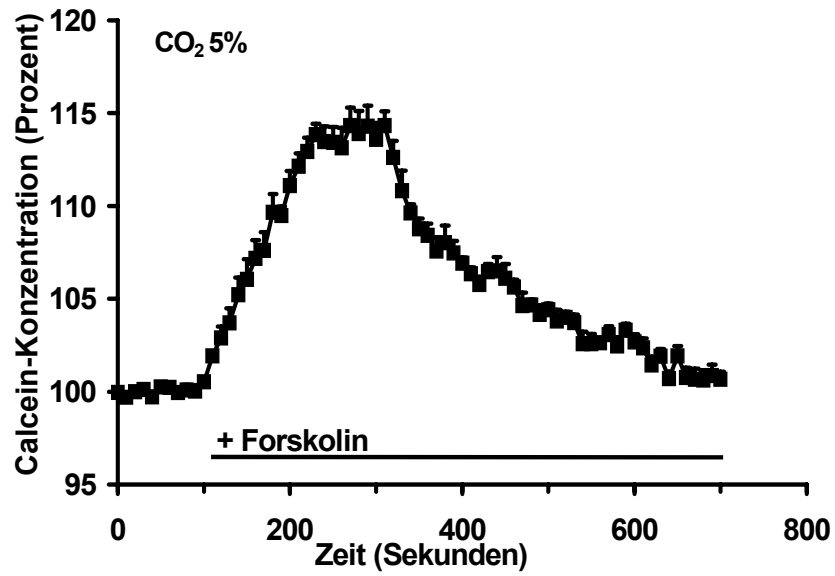


Abb. 9: Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin und 10^{-4} M Carbachol. In beiden Fällen war eine Zellschrumpfung gefolgt von einer Erholung bis auf den Ausgangswert zu beobachten.

3.3.2 Bedeutung von K^+ und Cl^- Leitfähigkeit für die Zellschrumpfung

Um zu untersuchen, ob eine Aktivierung von K^+ und Cl^- Kanäle mit KCl und Wasserverlust die Zellschrumpfung bewirken, wurde die Volumenänderung, bei Blockierung von K^+ und Cl^- Kanälen mit 293B, ChTX und NPPB durch konfokale Messung bestimmt.

3.3.2.1 K^+ Kanal

Bei Blockierung des KvLQT1 K^+ Kanals mit 293B, konnte unter den Konzentrationen 10 μ M und 100 μ M weder eine Schwellung noch eine Schrumpfung der Zelle beobachtet werden. Hingegen konnte die Schrumpfung unter Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin um $61\pm 5\%$ bzw. $69\pm 8\%$ verringert werden (Abb. 10a); unter Stimulation mit 10^{-4} M Carbachol um $44\pm 4\%$ bzw. um $44\pm 9\%$ (Abb. 10b). Anders verhält es sich mit dem K^+ Kanalblocker ChTX. 50 nM ChTX führten weder zu einer Schwellung noch Schrumpfung der Zelle, hatten keinen Einfluss auf die Schrumpfung nach Forskolin-Stimulation und blockierten $77\pm 6\%$ der Carbachol-induzierten Schrumpfung (Abb. 10c). In Abb. 10d sind die Daten noch einmal graphisch zusammengefasst.

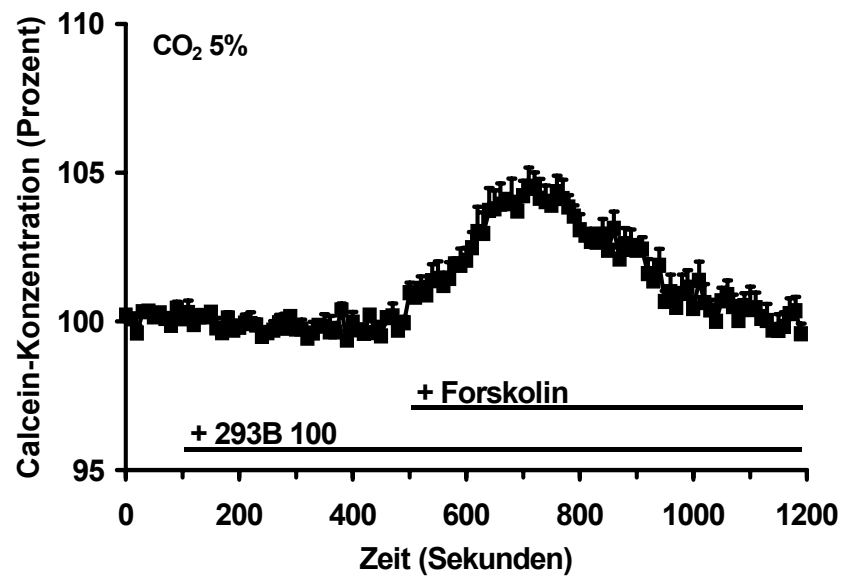
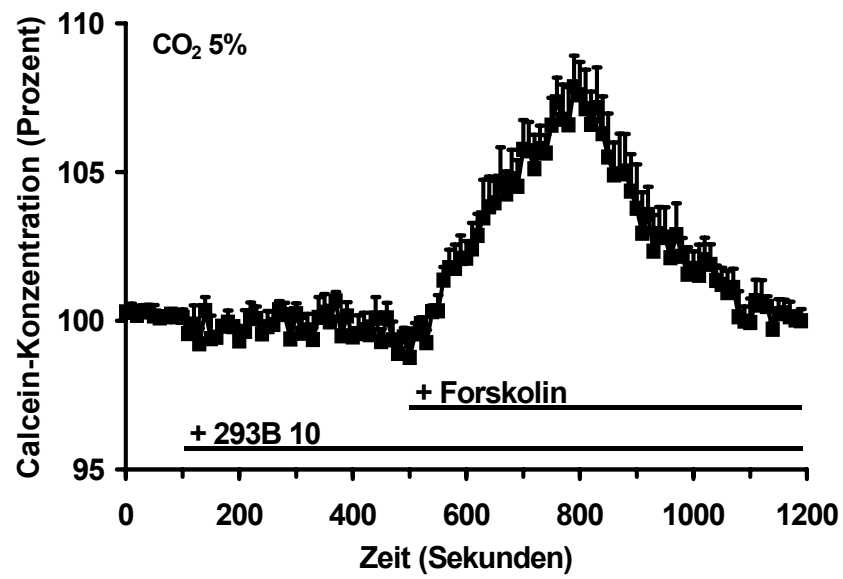


Abb. 10a: Effekt auf die Volumenregulation bei Blockierung von K^+ Kanälen mit 293B und Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin.

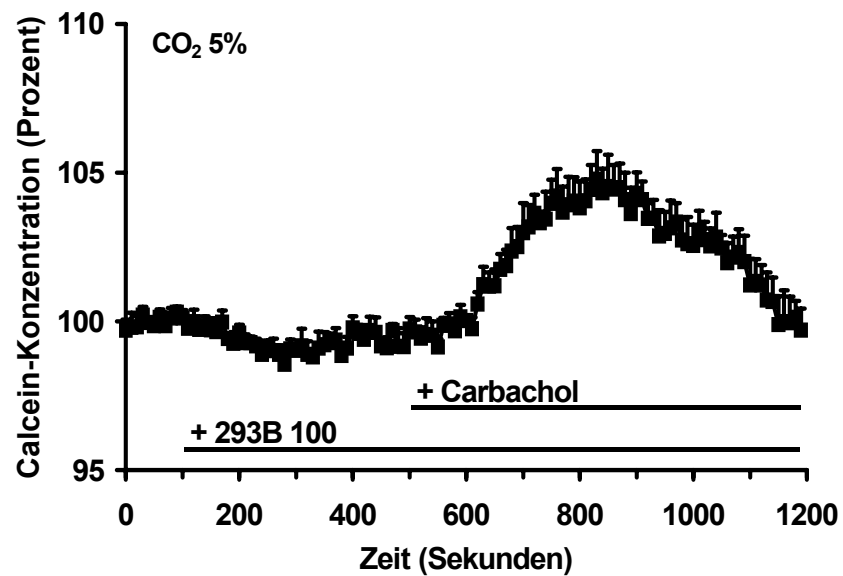
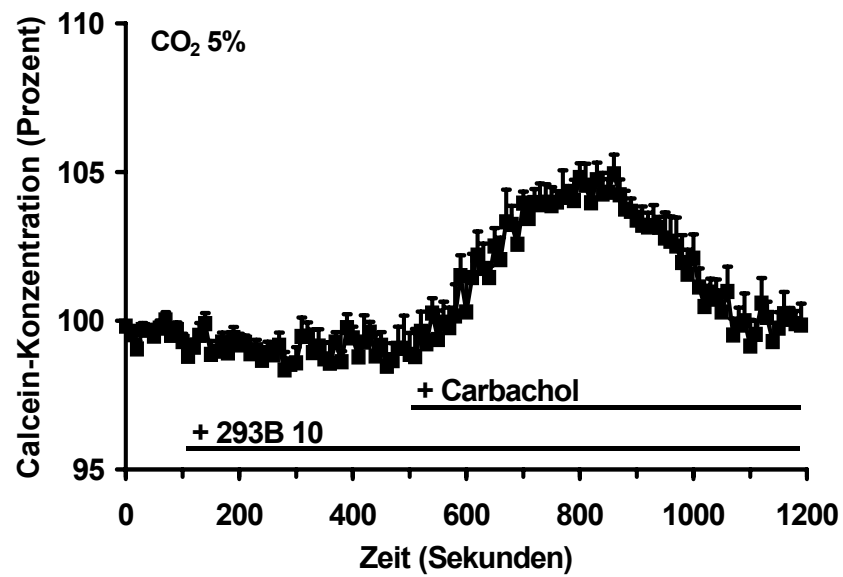


Abb. 10b: Effekt auf die Volumenregulation bei Blockierung von K^+ Kanälen mit 293B und Stimulation mit 10^{-4} M Carbachol.

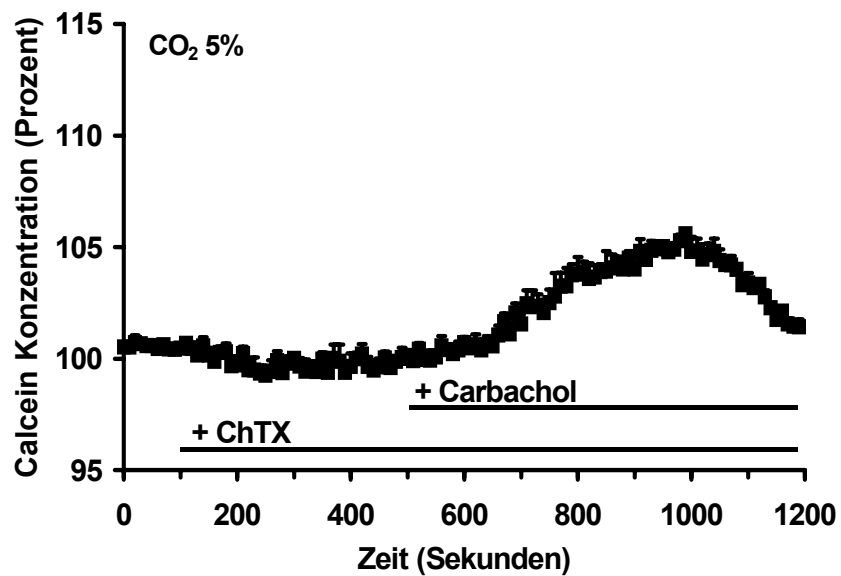
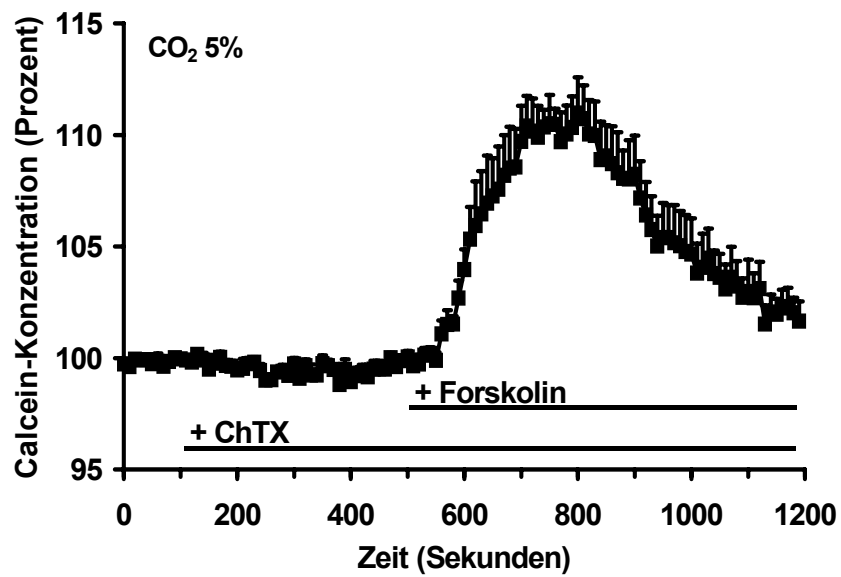


Abb. 10c: Effekt auf die Volumenregulation bei Blockierung von K^+ Kanälen mit ChTX und Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin (oben) und 10^{-4} M Carbachol (unten).

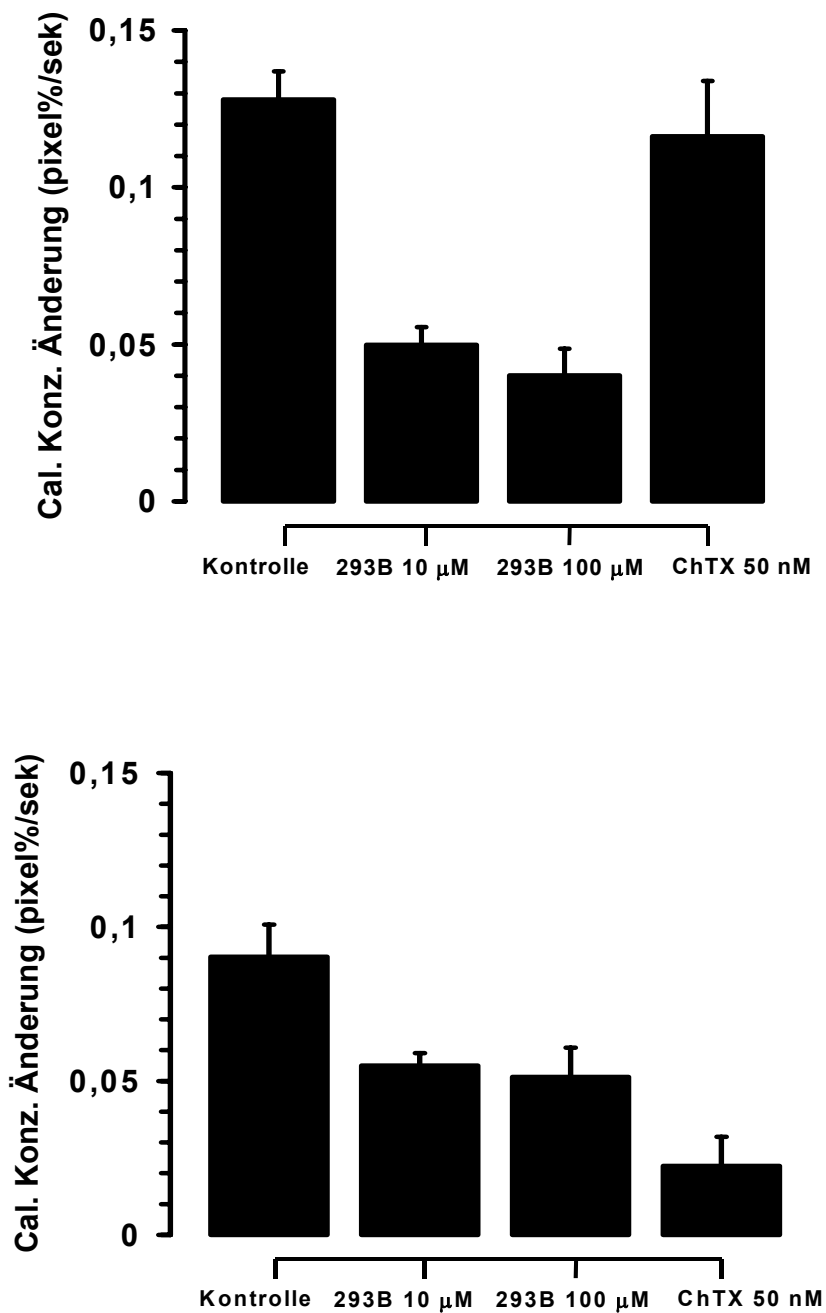


Abb. 10d: Dargestellt sind die Änderungsraten der Calcein-Konzentration, die den Einfluss der K^+ Kanalblockade auf den initialen Schrumpfungsvorgang unter Säurestimulation zeigen. Oben sind die Ergebnisse bei Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin, unten bei Stimulation mit 10^{-4} M Carbachol dargestellt.

3.3.2.2 Cl⁻ Kanal

Um zu zeigen, dass auch Cl⁻ Kanäle an der initialen Schrumpfung unter Säurestimulation beteiligt sind, wurden Messungen mit dem Cl⁻ Kanalblocker NPPB durchgeführt. Es wurde dieselbe Hemmkonzentration gewählt, die bei den Aminopyrinaufnahme-Versuchen in der Lage war, die Stimulation der Säure fast vollständig aufzuheben, nämlich 300 μ M. Es zeigte sich, dass Blockierung der vermutlich apikal gelegenen Cl⁻ Kanäle zu einer erheblichen Verminderung der Schrumpfung unter Stimulation führte. Im Falle des 10⁻⁵ M Forskolin waren es 92 \pm 2%. 300 μ M NPPB inhibierte die carbacholinduzierte Schrumpfung um 98 \pm 1% (Abb. 11a). Die alleinige Applikation von NPPB verursacht weder eine Zellschrumpfung noch eine Zellschwellung (Abb. 11b).

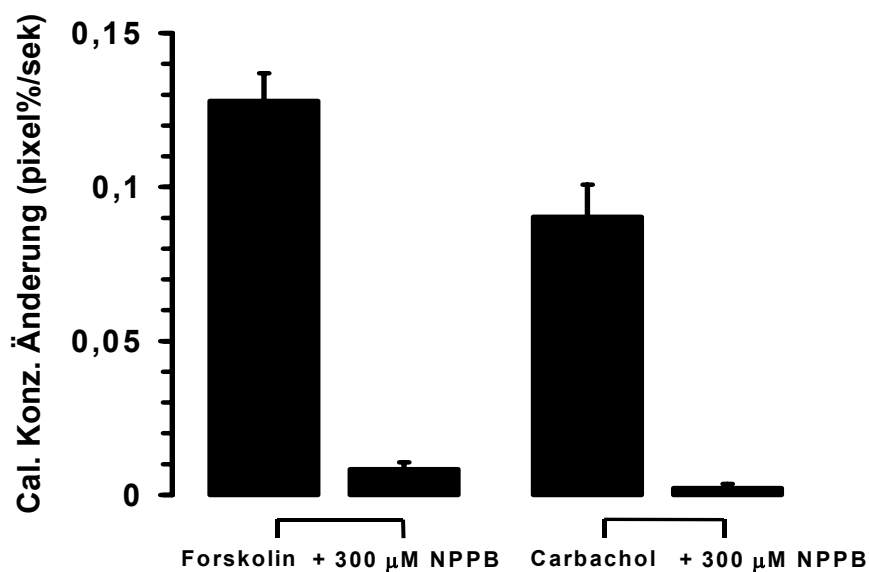


Abb. 11a: Calcein-Konzentrations-Änderung bei der Inhibition der Forskolin- und Carbachol-induzierte Zellschrumpfung mit 300 μ M NPPB.

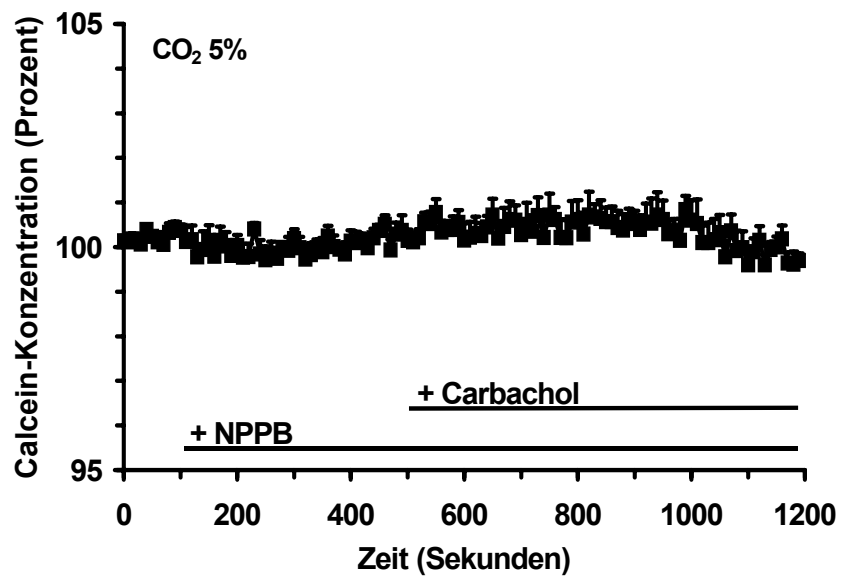
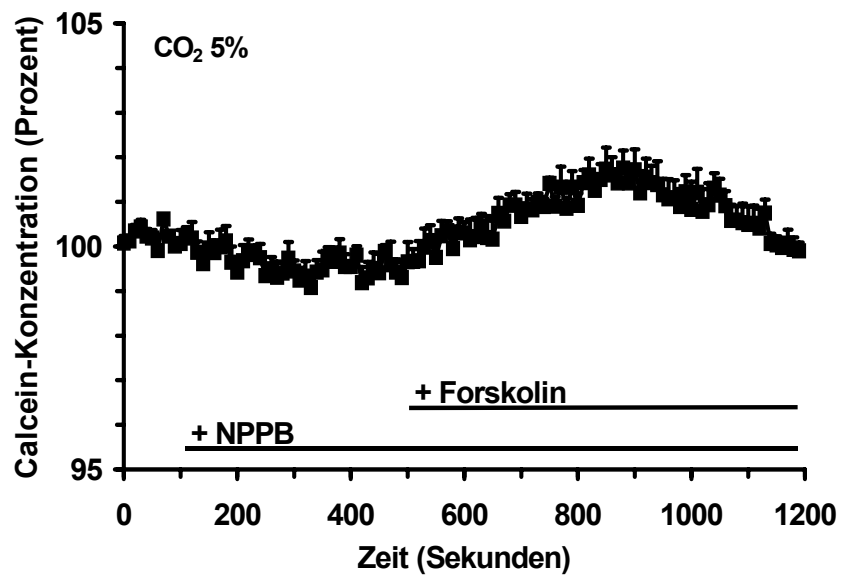


Abb. 11b: Effekt von NPPB 300 μ M auf die Forskolin- und Carbachol-induzierte Zellschrumpfung.

3.3.3 Bedeutung der Protonenpumpe für die Zellschrumpfung

Die Tätigkeit der H^+/K^+ -ATPase führt zu Sekretion von Protonen über die kanalikuläre Membran der Parietalzelle, somit kann man vermuten, dass sie an der Volumenregulation beteiligt ist. Um dies zu bestätigen wurden Parietalzellen $10 \mu\text{M}$ SCH28080, einem Inhibitor der H^+/K^+ -ATPase, ausgesetzt. SCH28080 war in der Lage, $41 \pm 3\%$ der Forskolin-assoziierten und $55 \pm 4\%$ der Carbachol-assoziierten Schrumpfung unter Säurestimulation zu blockieren. Die maximale Zellschrumpfung zeigte bei Forskolin-Stimulation eine Änderung des maximalen Volumens um $77 \pm 4\%$, bei Carbachol-Stimulation um $63 \pm 3\%$ (Abb. 12a). Die Alleinige Zugabe des H^+/K^+ -ATPase-Inhibitors führte weder zur Schrumpfung noch zur Schwellung der Zelle. Interessanterweise konnte die Schrumpfung durch Hemmung der H^+/K^+ -ATPase nicht vollständig aufgehoben werden (Abb. 12b).

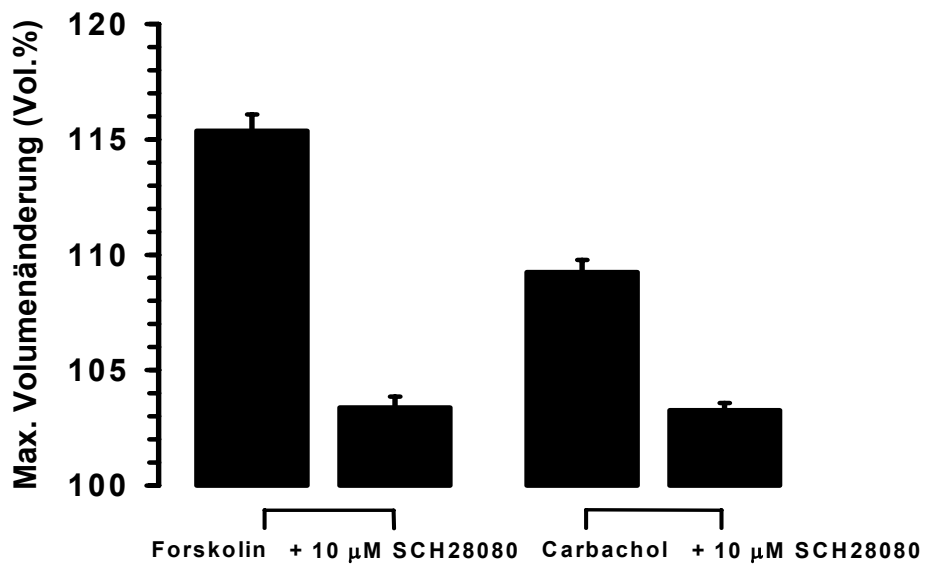
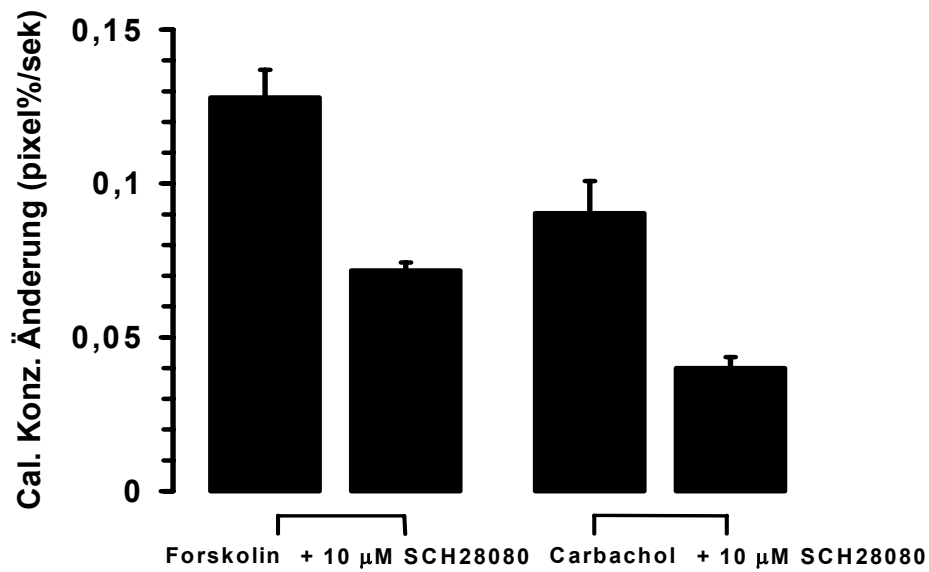


Abb. 12a: Calcein-Konzentrations-Änderung (oben) und maximale Volumenänderung (unten) bei der Inhibition der Forskolin- und Carbachol-induzierte Zellschrumpfung mit SCH28080.

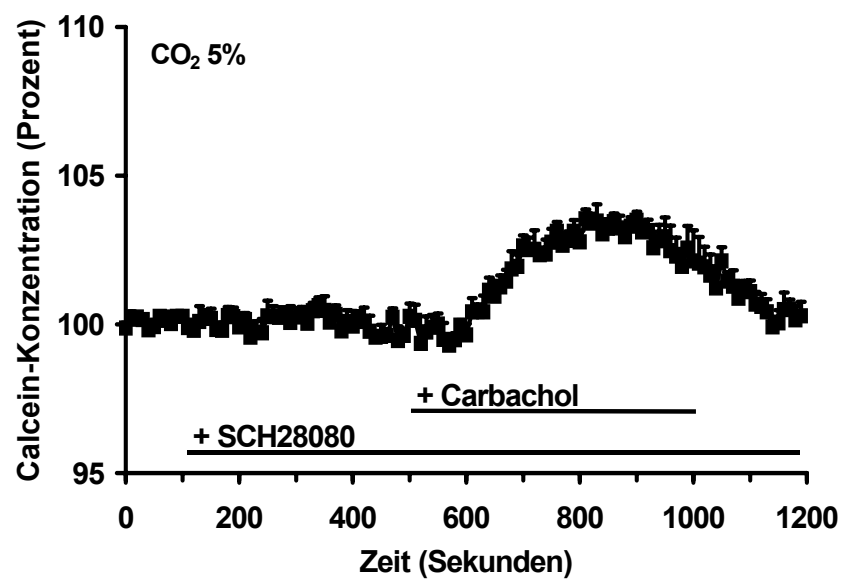
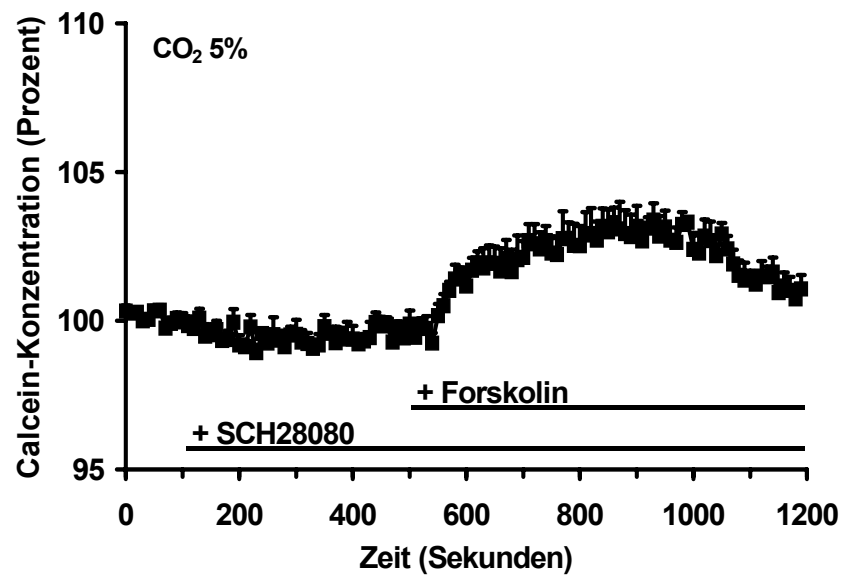


Abb. 12b: Die H^+/K^+ -ATPase ist wesentlich an der Volumenregulation bei Säurestimulation beteiligt.

3.3.4 Bedeutung der NHE-Isoformen für die Volumenerholung

Die Volumenerholung nach Stimulation der Säuresekretion wird zu einem erheblichen Teil durch Aktivierung des Na^+/H^+ Austauschs und des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauschs bewerkstelligt. Inwieweit die beiden Unterformen NHE1 und NHE4 daran beteiligt sind, ist unbekannt. Deshalb wurde der Effekt des NHE-spezifischen Inhibitors HOE642 auf die Agonisten-vermittelte Na^+/H^+ -Austauscheraktivierung getestet. Für $1 \mu\text{M}$ HOE642 konnte gezeigt werden, dass es in dieser Konzentration NHE1 vollständig inhibiert. Es zeigt sich, dass die Volumenerholung nach Stimulation der Säuresekretion mit 10^{-5} M Forskolin um $61 \pm 5\%$, die Volumenerholung nach Stimulation mit 10^{-4} M Carbachol sogar um $67 \pm 3\%$ blockiert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass $500 \mu\text{M}$ DMA alle im Magenepithel exprimierten Isoformen des Na^+/H^+ -Austauschers blockiert. $500 \mu\text{M}$ DMA inhibierte die Volumenerholung nach Forskolinstimulation um $84 \pm 2\%$, die Volumenerholung nach Carbacholstimulation um $81 \pm 2\%$. Weder $1 \mu\text{M}$ HOE642 noch $500 \mu\text{M}$ DMA hatten Einfluss auf die Zelle, was Schrumpfung oder Schwellung ohne Säurestimulation anbelangte (Abb 13a-c).

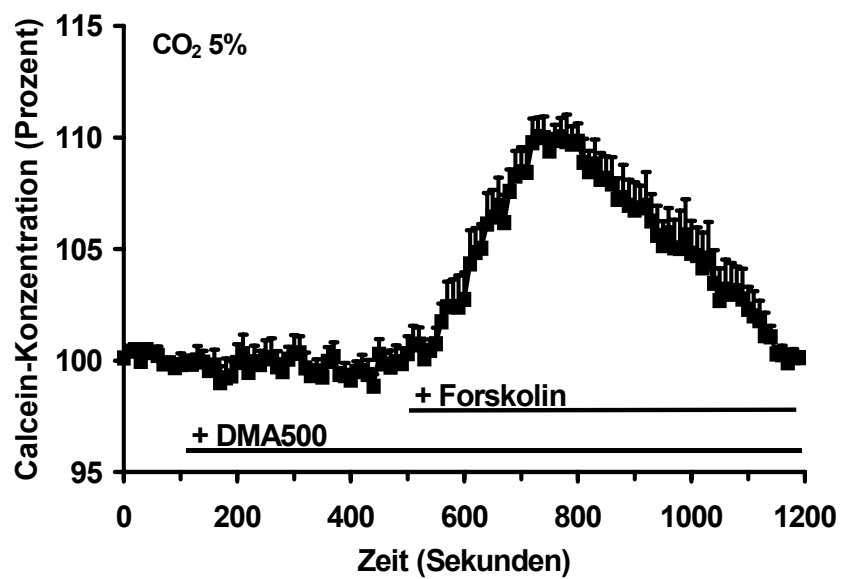
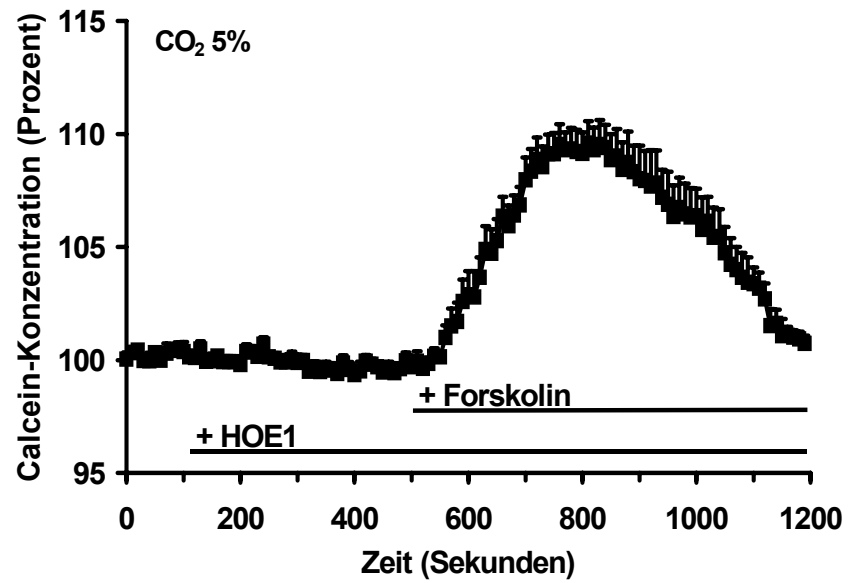


Abb. 13a: Regulation der RVI durch die NHE1 und NHE4 Isoform des Na⁺/H⁺ Austauschers bei Stimulation der Säuresekretion mit 10⁻⁵ M Forskolin.

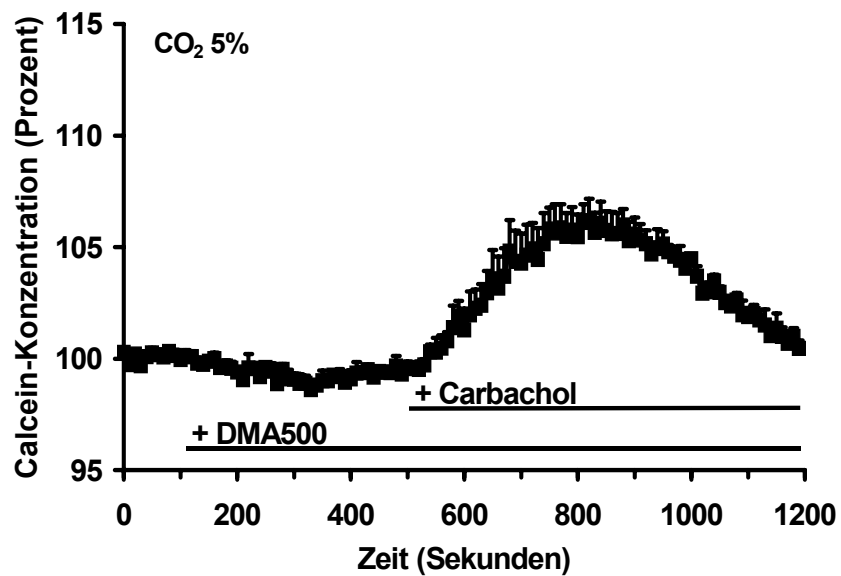
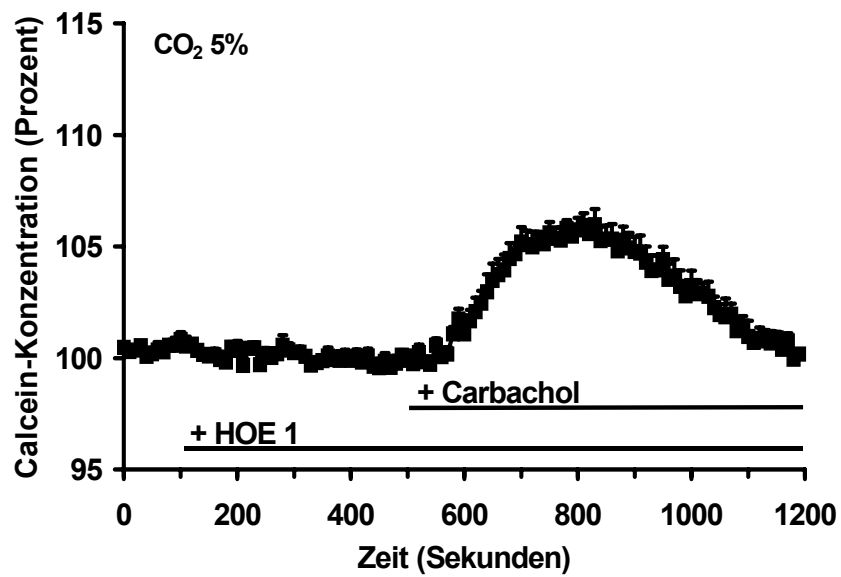


Abb. 13b: Regulation der RVI durch die NHE1 und NHE4 Isoform des Na⁺/H⁺ Austauschers bei Stimulation der Säuresekretion mit 10⁻⁴ M Carbachol.

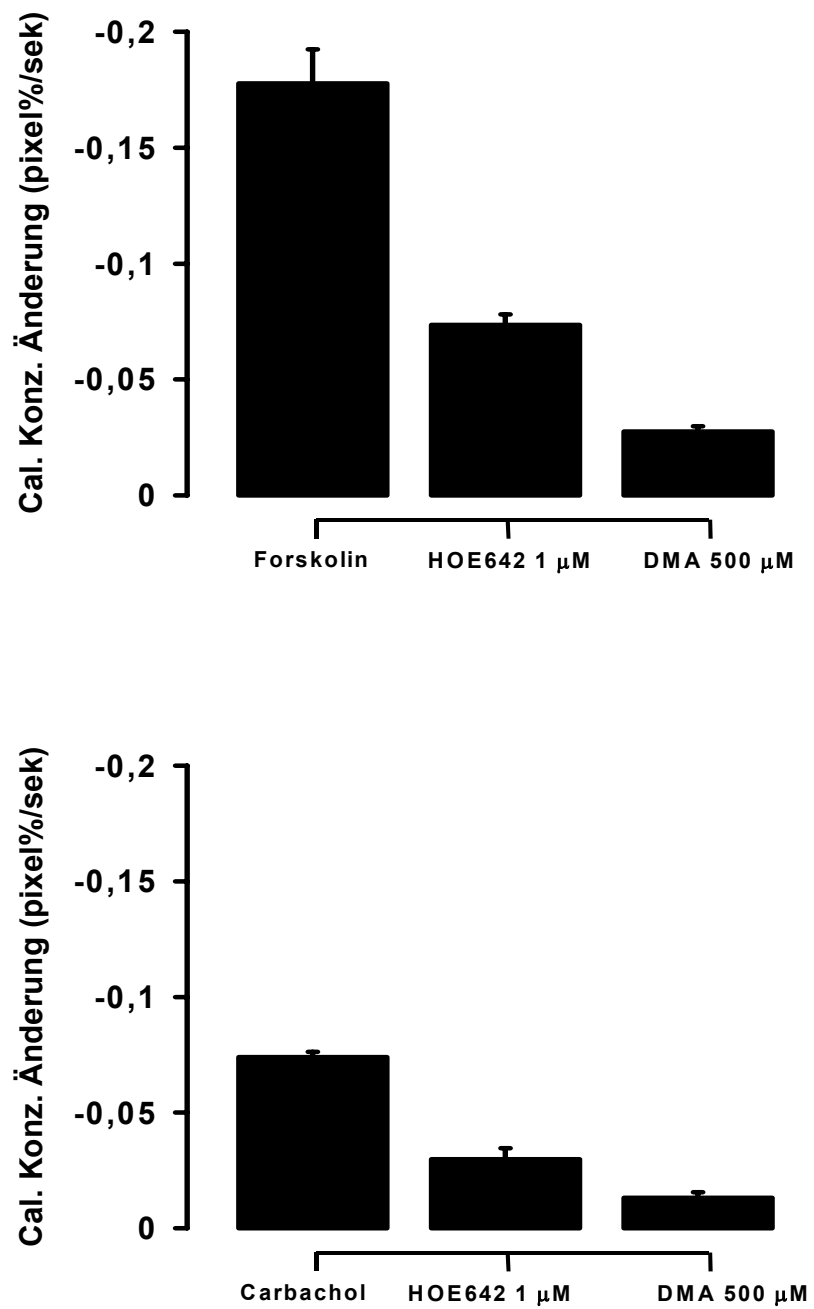


Abb. 13c: Regulation der RVI durch die NHE1 und NHE4 Isoform des Na⁺/H⁺ Austauschers.

3.4 Messung des intrazellulären pH in stimulierten Parietalzellen

3.4.1 Ausschlusskriterien bei Versuchsbeginn

Um zu gewährleisten, dass die ausgewählte Zellgruppe aus intakten Zellen bestand und um eine reproduzierbare Messung zu ermöglichen, wurde darauf geachtet, dass der intrazelluläre pH während einer Vorlaufzeit von 3 Minuten konstant blieb. Dies war bei ca. 5% der ausgewählten Zellgruppen nicht der Fall, was zu einem sofortigen Abbruch der Messung und der Auswahl einer neuen Zellgruppe führte. Bei allen anderen Versuchen war die initiale pH-Abweichung so geringfügig, dass sie auf dem Monitor nicht ausgemacht werden konnte. In der Tat betrug diese Abweichung, bei der späteren Auswertung weniger als 0,01 pH-Einheiten. Eine weitere Voraussetzung war eine initiales Verhältnis der emittierten Wellenlängen von ca. 2.5 bis 4.0, was aufgrund von vorhergehenden Kalibrationen einem sinnvollen, also mit dem Leben der Zellen zu vereinbarenden, Anfangs-pH entsprach. Bei der Mehrzahl der Versuche war der Ausgangs-pH stabil. Außerdem waren die selten vorkommenden Abweichungen deutlich und es zeigten sich auch im weiteren Versuchsablauf Auffälligkeiten, so dass die entsprechenden Versuche leicht von Anfang an ausgeschlossen werden konnten.

3.4.2 Verhalten des intrazellulären pH bei K^+ und Cl^- Kanalblockade

Zum Ausschluss eines systematischen Fehlers bei den Volumenmessungen am Laserscanmikroskop durch pH-Effekte der Inhibitoren, wurde die pH-Änderung unter Inhibition mit den K^+ Kanalblockern 293B und ChTX und dem Cl^- Kanalinhibitor NPPB bestimmt. Um den physiologischen Gegebenheiten Rechnung zu tragen wurden die folgenden Experiment in Anwesenheit von 5% CO_2/HCO_3^- durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Kaliumkanalblocker 293B und ChTX keinen Einfluss auf den intrazellulären pH hatten. Auch unter anschließender Stimulation mit 10^{-5} M Forskolin und mit 10^{-4} M Carbachol konnten keine Veränderungen des intrazellulären pHs festgestellt werden. Es wurden zusätzlich zu den pH_i -Veränderungen der initiale Protonenflux bestimmt, da er auch die intrazelluläre Pufferkapazität berücksichtigt. Die

Berechnung der Fluxraten waren in keinem Fall von Null verschieden. Bei Verwendung des Chloridkanalblockers NPPB zeigte sich sofort nach Zugabe ein stufenförmiger Abfall des Fluoreszenzsignals. Am ehesten handelt es sich um eine Wechselwirkung mit dem Farbstoff BCECF. Nach diesem Effekt war auch bei NPPB bei Stimulation der Säuresekretion kein von Null verschiedene Änderung des pH_i bzw. des Protonenfluxes festzustellen (Abb.14a-d).

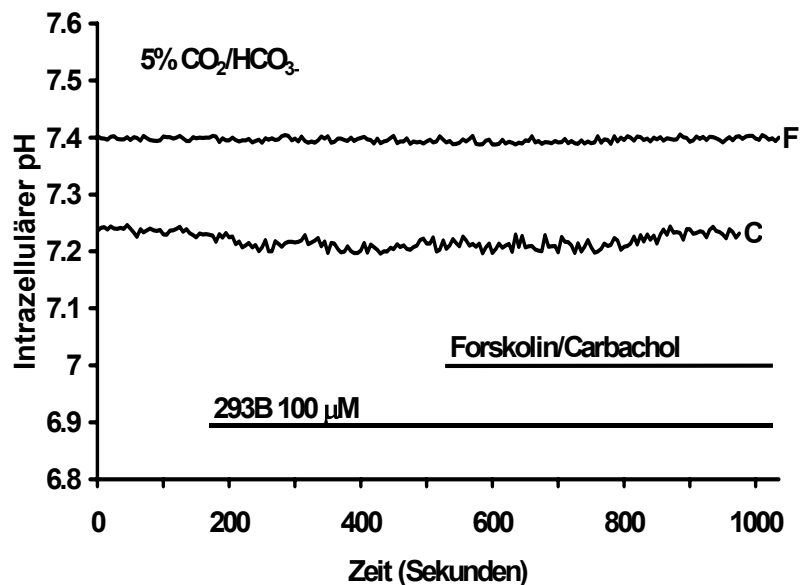
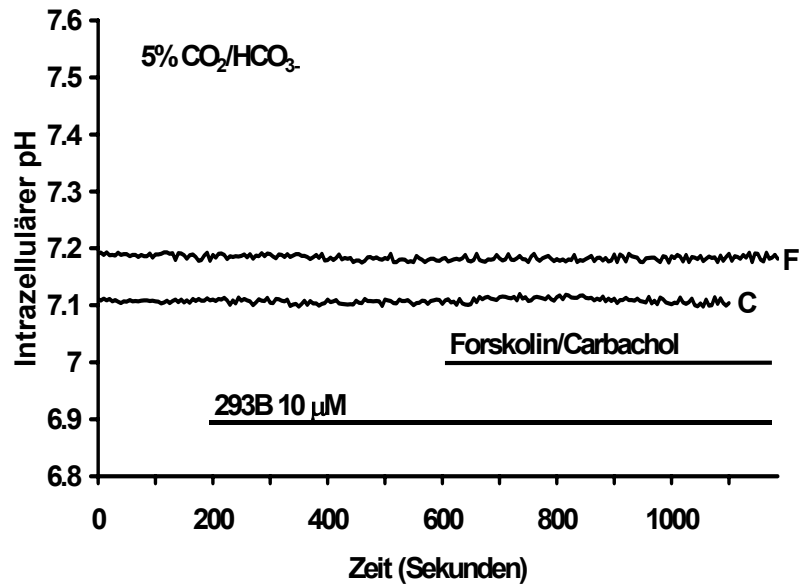


Abb. 14a/b: pH_i -Verlauf bei Stimulation der Säuresekretion mit 10^{-5} M Forskolin (F) und 10^{-4} M Carbachol (C). Inhibition mit $10 \mu\text{M}$ 293B (a) und $100 \mu\text{M}$ 293B (b).

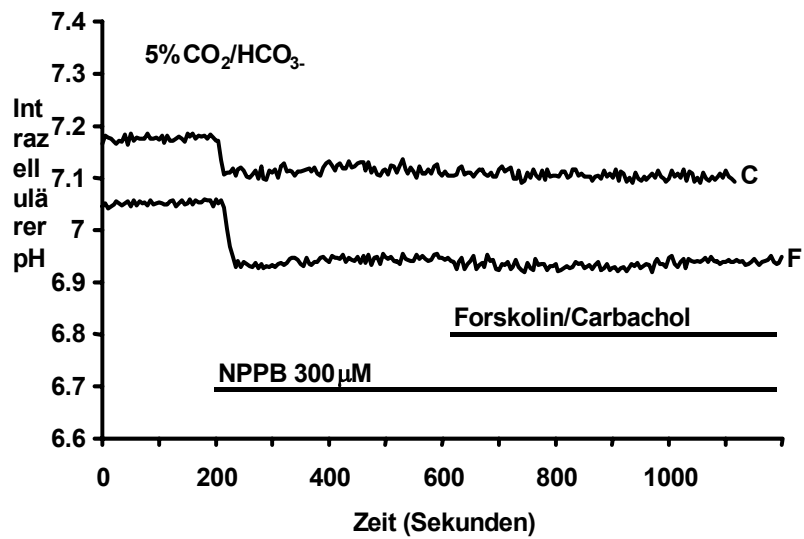
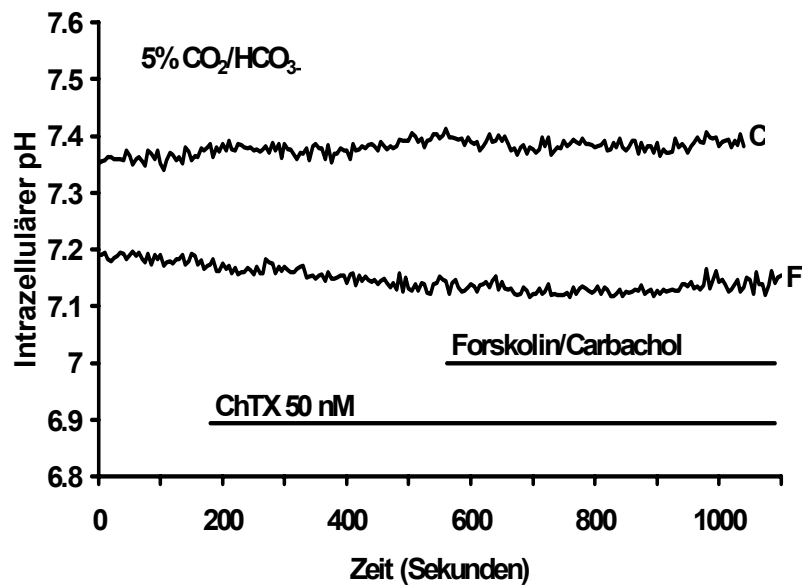


Abb. 14c/d: pH_i -Verlauf bei Stimulation der Säuresekretion mit 10^{-5} M Forskolin (F) und 10^{-4} M Carbachol (C). Inhibition mit 50 nM ChTX (c) und 300 μ M NPPB (d).

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden sind die errechneten relativen Aminopyrinaufnahmen, die Calcein-Änderungsgeschwindigkeiten und die Protonenfluxraten tabellarisch dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde im Vergleich zur Kontrolle errechnet. NS bedeutet nicht signifikant. Für alle Versuch gilt ein n= 5-9.

3.5.1 Aminopyrinaufnahme

| Verwendete Substanz | Relative Aminopyrinaufnahme | Signifikanzniveau |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Stimulation mit Forskolin | 3.918± 0.126 | |
| +1 µM 293B | 3.589± 0.289 | NS |
| +10 µM 293B | 1.392± 0.099 | p<0.001 |
| +100 µM 293B | 0.264± 0.030 | p<0.001 |
| + 50 nM ChTX | 4.089± 0.160 | NS |
| +3 µM NPPB | 3.485± 0.146 | NS |
| +30 µM NPPB | 2.524± 0.211 | p<0.001 |
| +300 µM NPPB | 0.536± 0.127 | p<0.001 |
| Stimulation mit Carbachol | 2.362± 0.095 | |
| +1 µM 293B | 1.977± 0.176 | NS |
| +10 µM 293B | 0.398± 0.062 | p<0.001 |
| +100 µM 293B | 0.192± 0.028 | p<0.001 |
| + 50 nM ChTX | 1.268± 0.056 | p<0.001 |
| +3 µM NPPB | 2.297± 0.182 | NS |
| +30 µM NPPB | 1.983± 0.187 | NS |
| +300 µM NPPB | 0.203± 0.017 | p<0.001 |

3.5.2 Calcein-Konzentrationsänderung

| Verwendete Substanz | Cal. Konz. Änderung (pixel%/sek) | Signifikanzniveau |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| Stimulation mit Forskolin | 0.128± 0.009 | |
| +10 µM 293B | 0.050± 0.006 | p<0.001 |
| +100 µM 293B | 0.040± 0.009 | p<0.001 |
| + 50 nM ChTX | 0.116± 0.018 | NS |
| +300 µM NPPB | 0.008± 0.002 | p<0.001 |
| +10 µM SCH28080 | 0.072± 0.003 | p<0.001 |
| Stimulation mit Forskolin | -0.178± 0.015 | |
| +1 µM HOE642 | -0.073± 0.005 | p<0.001 |
| +500 µM DMA | -0.028± 0.002 | p<0.001 |
| Stimulation mit Carbachol | 0.090± 0.010 | |
| +10 µM 293B | 0.055± 0.004 | p<0.05 |
| +100 µM 293B | 0.051± 0.009 | NS |
| + 50 nM ChTX | 0.022± 0.006 | p<0.001 |
| +300 µM NPPB | 0.002± 0.001 | p<0.001 |
| +10 µM SCH28080 | 0.036± 0.004 | p<0.001 |
| Stimulation mit Carbachol | -0.074± 0.009 | |
| +1 µM HOE642 | -0.030± 0.004 | p<0.05 |
| +500 µM DMA | -0.013± 0.002 | p<0.001 |

3.5.3 Protonenflux

Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bei Darstellung des intrazellulären pH, weswegen zusätzlich der initiale Protonenflux bestimmt wurde. Auch dieser zeigte im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit die verschiedenen in Kaninchenparietalzellen vorkommenden Cl^- und K^+ Kanäle an der Volumen-Regulation im Rahmen der Säuresekretion beteiligt sind und welche Bedeutung der Protonenpumpe und den verschiedenen Unterformen des Na^+/H^+ -Austauschers bei der Volumenregulation zukommt.

4.1 Diskussion des Versuchmodells

Die Untersuchungen der Ionenkanäle und Ionentransportprozesse im Magenepithel wurden an einer Reihe von verschiedenen Versuchsmodellen untersucht. Es gab Experimente mit dem Gesamtepithel (169), mit Drüenschläuchen (134), mit isolierten Zellen (128) und mit Membranvesikeln (101).

4.1.1 Isolierte Zellen und Membranvesikel

Bei Modellen, die durch eine traumatisierende Präparation gewonnenes Material unmittelbar verwenden, wie dies bei frisch isolierten Zellen und Membranvesikeln der Fall ist, ist zu bedenken, dass sich die Verdauungsschritte nachteilig auf die Integrität der Membranproteine auswirken. Dadurch können Untersuchungen an Ionentransportern und Ionenkanälen negativ beeinflusst werden. Weiterhin haben frisch isolierte Zellen kaum die Möglichkeit, während der Präparation zerstörte Proteine in der kurzen Zeit bis Versuchsbeginn neu zu synthetisieren. Man weiß inzwischen, dass das Zytoskelett bei vielen Vorgängen der Signaltransduktion eine Rolle spielt, und muss daher je nach Fragestellung prüfen, ob ein zytoskelettfreies System, wie Vesikel, oder eines, bei dem die Intaktheit des Zytoskeletts bezweifelt werden muss, wie frisch isolierte Zellen, geeignet ist. Dies gilt vor allem für die Untersuchung von Effekten, bei denen ein enger Zusammenhang zum Zytoskelett und zur Volumenregulation besteht (102).

4.1.2 Magenepithel, Drüsenschläuche, handdissezierte Magendrüsen

Versuchsmodelle, bei denen die Zellen in ihrem natürlichen Verband bleiben, stellen das intakte Magenepithel (97), isolierte Drüsenschläuche (13) und handdissezierte Magendrüsen (194) dar. Ein klarer Vorteil derartiger Modelle ist die Tatsache, dass der epitheliale Charakter gewahrt wird, indem apikale und basolaterale Membran, ebenso der Kontakt zu Nachbarzellen und das Zytoskelett, erhalten bleiben. Will man sich ausschließlich auf einen bestimmten Zelltyp konzentrieren, so kann es jedoch schwierig sein, das Messsignal anderer Zellarten abzutrennen. Weiterhin muss damit gerechnet werden, dass benachbarte Zellen, z.B. ECL-Zellen, Einfluss auf die zu untersuchenden Parameter nehmen. Ein sehr gutes, wenn auch präparatorisch aufwendiges Modell stellen die handdissezierten Magendrüse dar (194).

4.1.3 Primärkultur von Parietalzellen aus dem Kaninchenmagen

Bei der vorliegenden Arbeit kam die Parietalzellkultur nach Chew et al. zur Anwendung (38,43). Die Parietalzellkultivierung fand im wesentlichen nach der von C. Chew beschriebenen Methode statt. Entscheidende Punkte sind hierbei der Erhalt einer möglichst reinen Parietalzellfraktion und die Vermeidung von mikrobiellen Kontaminationen. Dabei scheinen die Verdauung und die beiden Zentrifugationsschritte ganz entscheidende Parameter zu sein.

4.1.3.1 Abtrennung der Parietalzellen

Mittels der von Chew et al. beschriebenen Methode gelang es, eine Parietalzellreinheit von $95\pm 2\%$ zu erreichen (Kap. 3.1.1). Dies ist wichtig, um nicht zu viele Fibroblasten mitzukultivieren, da die Kultur dadurch nach kurzer Zeit überwuchert wird und sich die Zellen von der Unterlage ablösen. Essenziell für die Zellreinheit und die Kulturgüte ist auch die Verdauungszeit, die durch mikroskopische Kontrolle bei jeder Präparation individuell bestimmt wurde. Zu kurze Zeit führte dazu, dass unverdaute Drüsenschläuche beim Sieben verloren gingen. Wurde zu lange verdaut, so bildeten sich einerseits Zellkonglomerate, die zu großen Verlusten bei der Gegenstromzentrifugation führten und zum Teil mit in die Kultur gelangten, da ihre Größe derjenigen der Parietalzellen entspricht. Andererseits wurden die Zellen offensichtlich durch

Membranandau so stark geschädigt, dass sie nicht auf der Matrix anhefteten. Weiterhin stellte sich heraus, dass es praktikabler und der Zellreinheit zuträglich war, im Unterschied zur Originalbeschreibung (43) die Gegenstromzentrifugation vor den Gradientenschritt zu stellen.

4.1.3.2 Vermeidung von Kontaminationen mit Mikroorganismen

Erster wichtiger Schritt auf dem Weg zur maximal möglichen Keimreduktion war die gründliche manuelle Reinigung des Magens nach Entnahme. Wurden sichtbare Schmutzpartikel mit in die weiteren Präparationsschritte genommen, so hatte man es zu einem späteren Zeitpunkt mit einer großen, nicht beherrschbaren Anzahl an Mikroorganismen zu tun. Im Gegensatz zur Originalbeschreibung (43) wurde zunächst die Elutration, dann die Nykodenz[®]-Zentrifugation durchgeführt, da hierdurch auch die Sterilität besser zu kontrollieren war. Bei der Elutration und der gesamten Kultivierung wurde darauf geachtet, dass Millipore[®] Wasser mit einem Widerstandswert von mindestens 18 M Ω verwendet wurde, da sich die Wasserqualität als besonders wichtiger Punkt bei der Vermeidung von Kontaminationen herausgestellt hatte (38).

Nach dem Gegenstromzentrifugationsschritt wurde eine weitgehende Keimfreiheit angenommen, und die Folgeschritte fanden unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank statt.

4.1.3.3 Beurteilung des gewählten Versuchsmodells

Stellt man im Vergleich zu den anderen Versuchsmodellen Vor- und Nachteile zusammen, so ergeben sich zunächst folgende Einschränkungen:

- Primärkulturen von Parietalzellen bilden keine Monolayer aus, so dass die direkte Messung der Säureproduktion nicht möglich ist. Die Säuresekretion lässt sich jedoch indirekt mit der Aminopyrine-Aufnahme messen, was verlässliche und stabile Ergebnisse liefert (12).
- Es wurde vermutet, die membranäre und zytoskeletale Polarisierung sei in kultivierten Parietalzellen vollständig aufgehoben; dem widersprechen allerdings die Ergebnisse von Saccomani et al (156).
- Da es sich um eine Primärkultur ausdifferenzierter Zellen handelt, die nicht mehr teilungsfähig sind, geht täglich ein gewisser Anteil der Parietalzellen zugrunde.

Die klaren Vorteile sind:

- Nach dem sicherlich traumatisierenden und möglicherweise zellschädigenden Isolierungsvorgang haben die kultivierten Zellen die Möglichkeit, zum Ruhezustand zurückzukehren.
- Die Viabilität der Zellen ist verbessert, da nur Zellen gemessen werden die sich freiwillig an der Matrix anheften.
- Im Unterschied zu kultivierten Zellen lassen sich längerfristige Versuche durchführen.
- Die Zellen sind leicht im Mikroskop zu untersuchen, da sie einzeln und überlagerungsfrei vorliegen.
- Die Verwendung adhärenter Primärzellen ermöglichen den leichten und schnellen Wechsel von Lösungen während der Experimente (169).
- Im Vergleich zu transformierten Zelllinien sind Primärkulturen phänotypisch stabil.

Im Vergleich stellt die Parietalzell-Primärkultur somit ein geeignetes Modell dar, um das hier interessierende Thema zu bearbeiten. Sie ermöglicht eine gute Abtrennung der relevanten Zellen, eine Stabilisierung der regulatorischen Charakteristika durch Kultivierung, die Messung der Säuresekretion unter verschiedenen Bedingungen und das mikrofluorimetrische Verfolgen von Veränderungen des Volumens und des intrazellulären pH in Echtzeit.

4.1.4 Optimierung der Methoden

Probleme bei mikrofluorometrischen Messungen mit BCECF und Calcein stellen die Phototoxizität des Lichtes bzw. des Lasers und das Photobleaching des Farbstoffes dar. Das Licht, das zur Exzitation verwendet wird, schädigt die Zellen entweder direkt oder über die Bildung freier Radikale. Photobleaching bedeutet Ausbleichen des Farbstoffes durch zu lange Belichtung oder zu große Lichtintensität.

Um diesen Effekten entgegenzuwirken wurde am LSM-Messplatz das Licht des Argon-Lasers (488 nm) um das 1000fache abgeschwächt. Es galt eine Optimum für die Zeit des Messvorgangs und der Zeit zwischen zwei Messintervallen zu finden. Als optimal stellte sich eine Messzeit von acht Sekunden und ein Intervall von zehn Sekunden heraus.

Der x-z-Scan wurde dem x-y-Scan vorgezogen. Es ist davon auszugehen, dass die Zelle, welche ja auf dem Deckgläschen am Matrigel anhaftet sich bei Schrumpfungs- beziehungsweise Schwellungsprozessen mehr in der x-y-Richtung, also in Richtung zum Objektiv hin, bewegt, und es so bei dem x-y-Scan zu einer kompletten Schnittebenenverlagerung kommen kann. Dies ist beim x-z-Scan aufgrund der Lage der Ebene nicht der Fall.

Am Fluoreszenz-Messplatz wurden ebenfalls mehrere Maßnahmen getroffen, um Negativeffekte zu minimieren. Zum einen wurde die Lichtintensität durch einen Graufilter abgeschwächt, und stattdessen im höheren Spannungsbereich des Photomultipliers gearbeitet. Weiterhin wurde der Shutter des Meßsystems mittels eines von Dr. G. Lamprecht aus unserer Arbeitsgruppe geschriebenen

DISKUSSION

Programmes gesteuert, so dass flexible Belichtungszeiten und Belichtungsintervalle möglich waren.

Durch Optimierung der Versuchsprotokolle und Modifikation der obigen Parameter gelang eine deutliche Reduzierung der Lichtenergie und somit der unerwünschten Effekte.

4.2 Messung der Säuresekretion

Zunächst wurde die Säuresekretion vor und nach Stimulation mit den Agonisten Forskolin und Carbachol mittels der Aminopyrin-Aufnahme quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass Forskolin ein stärkerer Agonist der Säuresekretion als Carbachol ist (Kap. 3.2.3, Abb. 5). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit denen anderer Arbeitsgruppen (5,43). Auch die relative Aufnahmesteigerung im Vergleich zur Kontrolle ist in diesen Versuchen vergleichbar mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (43). Dies ist ein Hinweis darauf, dass es gelungen ist, intakte stimulierbare Zellen zu kultivieren.

4.2.1 Untersuchung der an der Säuresekretion beteiligten K^+ Kanäle

Seit längerer Zeit weiß man, dass das mit der H^+/K^+ -ATPase aufgenommene K^+ wieder über die apikale Membran abgegeben wird, um die Säuresekretion aufrecht zu erhalten (191,206).

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass K^+ Kanäle an der Säuresekretion beteiligt sind. Durch 293B steht ein spezifische Hemmstoff des KCNQ1 zu Verfügung (16,110,210), der sowohl über den cAMP-abhängigen als auch den Ca^{2+} -abhängigen Weg aktiviert wird (18,73,202). Es wurde gezeigt, dass die Konzentrationen $10\mu M$ und $100\mu M$ 293B deutlich in der Lage sind die Säuresekretion, sowohl bei Stimulation der Säuresekretion mit Forskolin als auch mit Carbachol, zu vermindern. Mit der Konzentration $1\mu M$ 293B konnte die Säuresekretion mit beiden Agonisten der Säuresekretion statistisch nicht signifikant inhibiert werden (Kap. 3.2.4.1, Abb 6).

Für 293B Konzentrationen unter $20\mu M$ gilt, dass es alleinig den KCNQ1 inhibiert, hingegen blockiert es in Konzentrationen über $20\mu M$ noch zusätzlich andere Kaliumkanäle (21,178,210).

4.2.1.1 Stimulation mit Forskolin und Inhibition mit 293B

Bei Inhibition der Forskolin-stimulierten Säuresekretion mit den beiden unterschiedlichen Konzentrationen $10\mu M$ und $100\mu M$ 293B zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied (Kap. 3.2.4.1, Abb 6). So scheint zusätzlich

zum KCNQ1 auch noch mindestens einer, wenn nicht mehrere, K^+ Kanäle an der cAMP-abhängigen Säuresekretion beteiligt zu sein.

Die Arbeitsgruppe von Hagen et al. (80) lokalisierten zusätzlich zu dem von Grahammer et al. (73) apikal lokalisiertem KCNQ1 zwei weitere apikale K^+ Kanäle in der Parietalzelle, die für die Säuresekretion und deren Regulation verantwortlich zu sein scheinen. Es handelt sich um den Kir4.1 und den Kir5.1. Womöglich sind dies die beiden K^+ Kanäle, die von 293B in der $100\mu\text{M}$ Konzentration gehemmt und durch cAMP stimuliert werden. Bekannt ist, dass diese beiden K^+ Kanäle an der intrazellulären pH-Regulation beteiligt sind (142), und dass sie gegenseitig ihre Sensitivität, in Bezug auf die Regulation des intrazellulären pH, erhöhen (209,213).

Es kommen aber auch die K^+ Kanäle in Frage, von denen bekannt ist, dass sie von 293B in der $100\mu\text{M}$ Konzentration gehemmt werden (21,178,210). Sie wurden allerdings noch nicht in der Parietalzelle lokalisiert. Auch lassen sich andere Mechanismen, die durch die intrazelluläre cAMP-Erhöhung aktiviert werden, nicht ausschließen.

4.2.1.2 Stimulation mit Carbachol und Inhibition mit 293B

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Stimulation der Säuresekretion durch Carbachol kein wesentlicher Unterschied zwischen der $10\mu\text{M}$ und der $100\mu\text{M}$ Konzentrationen des Hemmstoffs 293B besteht (Kap. 3.2.4.1, Abb. 6). Da 293B in der niedrigeren Konzentration spezifisch nur den KCNQ1 inhibieren soll, die beiden Konzentrationen sich allerdings nicht signifikant unterscheiden, legen die gefundenen Daten nahe, dass es sich bei dem inhibierten K^+ Kanal um den KCNQ1 handelt und dass er womöglich der einzige Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanal der Parietalzelle ist, der sich durch 293B inhibieren lässt. Dass der KCNQ1 Ca^{2+} -abhängig ist konnte bereits gezeigt werden (18,73).

4.2.1.3 Beteiligung basolateraler K^+ Kanäle

ChTX ist ein K^+ Kanalblocker, der wahrscheinlich basolateral gelegene, Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanäle hemmt (9). Es handelt sich bei den K^+ Kanälen, die sich durch Charybdotoxin blockieren lassen, nicht um dieselben, die durch 293B

inhibiert werden können (54). Es gibt keinen Hinweis darauf, dass ChTX-sensitive K^+ Kanäle apikal gelegen sind.

In den durchgeführten Versuchen zeigen die basolateralen K^+ Kanäle eine statistisch signifikante Inhibition der durch Carbachol (dieses wirkt ja über den Ca^{2+} -abhängigen Weg) stimulierten Säuresekretion durch ChTX (Kap. 3.2.4.1, Abb. 7) Dies steht im Einklang, mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (107). Basolaterale Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanäle sind an der Säuresekretion beteiligt (99).

Andere Arbeitsgruppen postulieren basolaterale cAMP-abhängige K^+ Kanäle, die an der Säuresekretion beteiligt sind (196). Der KCNQ1 scheint einer davon zu sein. (54,147,188,189,202,206)

4.2.2 Untersuchung der an der Säuresekretion beteiligten Cl^- Kanäle

Dass ein apikaler Cl^- Kanal an der Säuresekretion beteiligt sein muss, ist schon lange bekannt (53,56,115,140). Dass er die H^+/K^+ -ATPase zu regulieren scheint, wird schon lange vermutet (84). Es konnte lange kein Cl^- Kanal dafür verantwortlich gemacht werden. Erst in jüngster Zeit wird ein Cl^- Kanal aus der CIC-Familie mit dem apikalen Cl^- Kanal, der für die Abgabe des Cl^- ins Lumen und die Regulation der H^+/K^+ -ATPase verantwortlich ist, in Verbindung gebracht. Es handelt sich um den CIC-2.

Der CIC-2 konnte aus mehreren Spezies darunter Ratte, Kaninchen und den Menschen kloniert werden (47,90,117,184). Er wird aufgrund seiner Eigenschaften, nämlich Spannungsabhängigkeit (93,136), Aktivierung durch niederen extrazytosolischen pH (52,117,168,172,177) und Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (117,172,183), vermutet, dass es sich um diesen speziellen apikalen Cl^- Kanal, handelt. Eben diese Eigenschaften müssen für den apikalen Cl^- Kanal gefordert werden.

Malinowska et al. konnten den CIC-2 in der apikalen Membran der Parietalzelle, nicht in der basolateralen Membran, lokalisieren (171).

Die hier durchgeführten Versuche zeigen, dass Blockierung von Cl^- Kanälen mit NPPB, welches CIC-2-Kanäle inhibiert (7,68,72,78,162), zu einer Reduktion der

DISKUSSION

Säuresekretion führt. Dabei zeigte vor allem die 300 μM Konzentration an NPPB (Kap. 3.2.4.2, Abb. 8), wie es auch viele andere Arbeitsgruppen verwenden, deutlich signifikante Ergebnisse.

Dies bestätigt die Theorie, dass Cl^- Kanäle an der Säuresekretion beteiligt sind.

Was weiterhin unklar bleibt, ist, ob es sich um apikale oder basolaterale Cl^- Kanäle handelt, da für NPPB nicht bewiesen ist, dass es spezifisch den CIC-2 inhibiert. Es kommen natürlich auch andere Cl^- Kanäle, die man noch nicht näher kennt oder unspezifische Effekt durch das NPPB in Frage, die zum heutigen Zeitpunkt noch nicht bekannt sind. Diese Frage könnte durch einen spezifischen CIC-2 Cl^- Kanalblocker geklärt werden.

4.3 Messung des Zellvolumens

Aus Vorversuchen von Sonnentag et al. (1976), ist bekannt, dass Parietalzellen bei Stimulation der Säuresekretion eine rasche Schrumpfung der Zelle mit anschließender Erholung auf den Ausgangswert (RVI) zeigen. Dabei ist Forskolin ein stärkerer Agonist der Säuresekretion und führt zu einer deutlicheren Schrumpfung als Carbachol. Diese Versuche waren gut reproduzierbar (Kap. 3.3.1, Abb. 9), was darauf hindeutet, dass die Methode stabile reproduzierbare Daten liefert und dass die Zellen erfolgreich in Kultur genommen werden konnten.

Thorsten Sonnentag interessierte sich vor allem für die Mechanismen des RVI unter genauerer Betrachtung des Na^+/H^+ -Austauschers. Es war weiterhin unklar welche Mechanismen für die initiale Schrumpfung der Parietalzelle verantwortlich sind. Dieser Frage wurde hier nachgegangen und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass K^+ und Cl^- Kanäle dafür verantwortlich sein könnten.

4.3.1 Beteiligung von K^+ Kanälen an der initialen Zellschrumpfung

Um Einflüsse der K^+ Kanalblocker 293B und ChTX auf die unstimulierte Zelle auszuschließen, beziehungsweise um zu beweisen, dass die K^+ Kanäle erst bei der Stimulation der Säuresekretion aktiviert werden, wurde die unstimulierte Zelle mit den beiden Inhibitoren vorinkubiert, bevor die Säuresekretion mit den beiden Agonisten Forskolin und Carbachol stimuliert wurde.

Es zeigte sich tatsächlich, dass sowohl 293B, der Inhibitor des KCNQ1 , als auch ChTX, ein Blocker Ca^{2+} -abhängiger K^+ Kanäle, keinen signifikanten Einfluss auf das Volumen von unstimulierten Parietalzellen haben (Kap. 3.3.2.1, Abb. 10a-c). Das lässt auf eine stimulations-abhängige Aktivierung der 293B- und ChTX-sensitiven K^+ Kanäle schließen.

DISKUSSION

In Vorversuchen mit Barium, einem unspezifischen Inhibitor von K^+ Kanälen, zeigte sich eine Zellschwellung der unstimulierten Parietalzelle. Dies zeigt, dass es sich hierbei um konstitutionell geöffnete K^+ Kanäle handelt (176).

Wie im Ergebnissteil dargestellt, kommt es bei der Blockierung von 293B- und ChTX-sensitiven K^+ Kanälen bei der Säurestimulation mit Forskolin und Carbachol tatsächlich zu einer Inhibition der initialen Schrumpfungsgeschwindigkeit (Kap. 3.3.2.1, Abb. 10a-c). Dabei zeigt sich, sowohl bei Stimulation mit Forskolin als auch mit Carbachol, kein signifikanter Unterschied zwischen der 10 μ M und der 100 μ M 293B-Konzentration. Dies lässt darauf schließen, dass der KCNQ1 voraussichtlich alleinig an der stimulationsassoziierten Zellschrumpfung der Parietalzelle beteiligt ist. Voraussetzung ist, dass die niedere Konzentration 293B spezifisch für diesen K^+ Kanal ist und nicht etwa für andere K^+ Kanäle, die sich durch die höhere 293B-Konzentration blockieren lassen (21,178,210). Außerdem ist damit gezeigt, dass der KCNQ1 sowohl cAMP- als auch Ca^{2+} -abhängig ist. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (18,22,73,202). Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass sich der KCNQ1 mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit sowohl apikal als auch basolateral findet (73,196).

Für Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanäle konnte gezeigt werden, dass auch sie an der initialen Schrumpfung der Parietalzelle beteiligt sind. Charybdotoxin blockiert, wie erwartet, nur die durch Carbachol stimulierte Sekretion der Säure zu einem erheblichen Anteil (Kap. 3.3.2.1, Abb. 10c). Es muss vermutet werden, dass es sich um basolaterale K^+ Kanäle handelt, da sich bisher keine Ca^{2+} -abhängigen, ChTX-sensitiven K^+ Kanäle in der apikalen Membran finden ließen, wohl aber in der basolateralen (125,161,180,188).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der 293B-sensitive K^+ Kanal KCNQ1, der sowohl cAMP- als auch Ca^{2+} -abhängig aktiviert wird und apikal wie basolateral vorkommt, an der initialen Schrumpfung der Parietalzelle beteiligt

ist. Desweiteren sind wohl auch basolaterale K^+ Kanäle, die Ca^{2+} -abhängig und ChTX-sensitiv sind, an dieser Schrumpfung beteiligt (Kap. 3.3.2.1, Abb. 10d). Im übrigen folgt die Hemmung der initialen Schrumpfung nach Säurestimulation dem gleichen Muster wie die Hemmung der Säuresekretion (Kap. 3.2.4.1, Abb. 6 und Abb. 7).

Sekretion von K^+ in die sekretorischen Kanälchen ist ein Regulationsmechanismus der stimulationsassoziierten Zellschrumpfung in kultivierten Parietalzellen.

4.3.2 Beteiligung von Cl^- Kanälen an der initialen Zellschrumpfung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Hemmung von Cl^- Kanälen durch NPPB zu einer erheblichen Einschränkung der Säuresekretionsrate führt (Kap. 3.2.4.2, Abb. 8). Dies ist insofern sehr erklärlich, als dass apikale Abgabe von Cl^- , vermutlich über den CIC-2, eine Voraussetzung für die Säuresekretion ist (53,56,115,140,171). Diese Daten legen nahe, dass die Sekretion von Cl^- in die sekretorischen Kanälchen ebenfalls ein Regulationsmechanismus der stimulationsassoziierten Zellschrumpfung in kultivierten Parietalzellen sein könnte.

Tatsächlich war NPPB in der Lage die Zellschrumpfung bei Säurestimulation durch Forskolin und Carbachol nahezu vollständig aufzuheben (Kap. 3.3.3.2, Abb. 11a,b). Es lässt sich dadurch zeigen, dass Cl^- elementar für die Zellschrumpfung der kultivierten Parietalzelle ist.

Die Lokalisation des CIC-2 in der apikalen Membran der Parietalzelle (171), sein Einfluss auf die Protonenpumpe, sowie die Möglichkeit, ihn mit NPPB zu inhibieren, legt die Vermutung nahe, dass es sich um diesen Kanal aus der CIC-Familie handelt.

Sekretion von Cl^- in die sekretorischen Kanälchen ist ein Regulationsmechanismus der stimulationsassoziierten Zellschrumpfung in kultivierten Parietalzellen.

4.3.3 Einfluss der H^+/K^+ -ATPase auf die initiale Zellschrumpfung

Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass apikale K^+ Kanäle und apikale Cl^- Kanäle an der initialen Schrumpfung bei Stimulation der Säuresekretion beteiligt sind, und diese eng mit der H^+/K^+ -ATPase verknüpft sind, wurde ein Zusammenhang mit der Protonenpumpe geprüft.

SCH28080, ein potenter Inhibitor der H^+/K^+ -ATPase (3,124,198), reduzierte die initiale Zellschrumpfungsgeschwindigkeit nach Säurestimulation statistisch signifikant (Kap. 3.3.3, Abb. 12a,b). Dass die Protonenpumpe an Schrumpfungsprozessen im Rahmen des RVD beteiligt ist, ist bekannt (170); nun ist klar, dass sie auch an der initialen Schrumpfung, ausgelöst durch Säuresekretion, beteiligt ist.

Es wurde bewusst nicht Omeprazol, ebenfalls ein Hemmstoff der Protonenpumpe, gewählt, da es in vorrausgegangenen Versuchen nicht erklärbare, fluoreszenzmikroskopisch gemessene pH-Phänomene gezeigt hatte (5). Dieser pH-Effekt kann sich negativ, auf die Auswertung der Volumenmessungen auswirken. Es kann nicht mehr zwischen morphologischen Änderungen der Zelle aufgrund der pH-Änderung beziehungsweise der Volumenänderung differenziert werden.

Es scheint, dass das volumenregulierende apikale System, bestehend aus K^+ Kanal, Cl^- Kanal und H^+/K^+ -ATPase wesentlich für die Volumenregulation, genauer die initiale Schrumpfung nach Säurestimulation, verantwortlich ist. Wahrscheinlich ist das Zusammenspiel dieser drei Komponenten, genauso wie bei der Säuresekretion, verantwortlich für die richtige Regulierung des Volumens.

4.3.4 Übersicht über den initialen Schrumpfungsprozess

In den meisten Zellsystemen sind K^+ Kanäle und Anionenkanäle an den Schrumpfungsprozessen beteiligt. Diese Anionenkanäle scheinen in den meisten Zellen unselektiv und daher für Cl^- und für HCO_3^- (103), sowie für

organische Ionen und neutrale organische Osmolyte durchgängig zu sein (34,96).

Es wurden schon einige K^+ Kanäle gefunden, die an der Zellschrumpfung beteiligt sind. Dazu gehört zum Beispiel der Kv1.3 (60), der Kv1.5 (64) und der KCNE1 (30). Für die Parietalzelle konnte dies noch für keinen speziellen K^+ Kanal nachgewiesen werden.

Es konnte hier gezeigt werden, dass apikale Kaliumkanäle an der initialen Schrumpfung der Parietalzelle bei Stimulation der Säuresekretion beteiligt sind (Kap. 3.3.2.1, Abb. 10a-d). Aufgrund der Spezifität von $10 \mu\text{M}$ 293B kann man sagen, dass es sich wohl um den KCNQ1 handelt, der von Grahammer et al. in der apikalen Membran lokalisiert wurde (73). Bei Stimulation der Säuresekretion laufen in der Parietalzelle viele Prozesse gleichzeitig ab (siehe Einleitung). Wesentlich ist die apikale Abgabe von Protonen durch die H^+/K^+ -ATPase. Das K^+ , das in die Zelle aufgenommen wird, muss wieder apikal über die Membran abgegeben werden, um diesen Vorgang aufrechtzuerhalten. Blockierung entweder der Protonenpumpe (Kap. 3.3.3, Abb. 12a,b) oder des KCNQ1 (Kap. 3.3.2.1, Abb. 10a,b) führt zu einer deutlichen Reduktion der Schrumpfungsgeschwindigkeit. Dies bedeutet, dass beide Mechanismen an der Volumenregulation der Parietalzelle beteiligt sind.

Die volumenregulierenden Cl^- Kanäle verschiedener Zellen beinhalten, wie bereits in der Einleitung angedeutet, den CIC-2 Kanal (76,87,88,184), BRI-VDAC (59), $I_{Cl_{in}}$ (77) und das P-Glycoprotein (150).

Der einzige molekular identifizierte apikale Cl^- Kanal der Parietalzelle ist der CIC-2 (171). Er lässt sich durch NPPB wirkungsvoll inhibieren (Kap. 3.3.2.2, Abb. 11a,b) und scheint wesentlich, vermutlich über Wechselwirkungen mit der Protonenpumpe und eventuell auch mit dem KCNQ1, die initiale säuresekretions-assoziierte Zellschrumpfung zu beeinflussen.

Dass die H^+/K^+ -ATPase im Magen durch Schwellung der Zellen stimuliert (170) wird ist seit längerem bekannt. Durch die hier durchgeführten Experimente ist

jetzt auch gezeigt worden, dass sie wesentlich zur Regulation des Volumens von Parietalzellen beiträgt (Kap. 3.3.2.2, Abb. 11a,b). Die H^+/K^+ -ATPase führt, wenn sie stimuliert wird, zur Schrumpfung der Parietalzelle. Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch Einbeziehung des ClC-2 und des KCNQ1 und womöglich ganz anderer, heute noch unbekannter Mechanismen.

Aktivierung unselektiver Kationenkanäle im Rahmen der Volumenregulation, führt zu Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ Kanäle (46,182).

Vermutlich sind die ChTX-sensitiven K^+ Kanäle, die für die Volumenregulation (Schrumpfung) nach Stimulation mit Carbachol in der Parietalzelle verantwortlich gemacht werden können, daran beteiligt (Kap. 3.3.2.1, Abb. 10c).

4.3.5 Der Na^+/H^+ -Austauscher und seine Bedeutung an der RVI

Anlass zu diesen Versuchen war, dass Sonntag et al. eine Beteiligung des Na^+/H^+ -Austauschers bei der RVI in der Parietalzelle nach Stimulation der Säuresekretion zeigen konnte (176). Dort konnte gezeigt werden, dass bei Säurestimulation über das cAMP-abhängige System der NHE4 und bei Stimulation über den Ca^{2+} -abhängigen Weg der NHE1 aktiviert wird. Dies entspricht im wesentlichen der NHE-Beteiligung an der pH-Regulation (5). Die Tatsache, dass bei Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers der intrazelluläre pH nicht ansteigt, spricht für eine gleichzeitige Aktivierung eines Cl^-/HCO_3^- -Austauschers, vermutlich der AE2 Isoform, die ebenfalls in der Parietalzelle vorkommt. Der NKCC scheint keine Rolle bei der RVI zu spielen (176). Hier erfolgte nun die Untersuchung auch der anderen NHE-Isoformen.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente zeigen, dass bei Stimulation der Säuresekretion über das cAMP-abhängige System mit Forskolin die RVI zu einem großen Teil von der durch 1 μ M HOE642 gehemmten NHE1-Isoform und der durch 500 μ M DMA gehemmten NHE4-Isoform des Na^+/H^+ -Austauschers getragen wird (Kap. 3.3.4, Abb. 13a,c). Dies entspricht den Vorergebnissen von Sonntag et al., der allerdings nur mit 500 μ M DMA alle NHE-Isoformen in der Parietalzelle inhibiert hatte und deswegen keine Aussage

zur NHE1 Isoform machen konnte. Auch wenn die NHE4 eine wesentliche Rolle bei der RVI spielt, so ist der Hauptteil durch NHE1 vermittelt. Die Ergebnisse entsprechen auch der Aktivierung der unterschiedlichen NHE-Isoformen bei Änderung der Osmolarität und Messung des intrazellulären pH (155).

Bei Stimulation über den Ca^{2+} -abhängigen Weg durch Carbachol wird vor allem die NHE1 Isoform aktiviert und nur noch zu einem verhältnismäßig geringen Prozentsatz die NHE4 Isoform (Kap. 3.3.4, Abb. 13b,c). Darauf hatten die bereits vorbekannten Daten hingedeutet (5,176).

Es gibt keine Hinweise dafür, dass die NHE2 Isoform der Parietalzelle an der RVI beteiligt sein könnte.

Offen bleibt noch die Frage der Mechanismen, die für die Restliche, nicht durch den Na^+/H^+ -Austauscher vermittelte, RVI zuständig sind. Es kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht, nachdem der NKCC bereits ausgeschlossen wurde (176). Unter diesen Möglichkeiten befindet sich der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC1, der in Parietalzellen exprimiert und durch niederen intrazellulären pH aktiviert wird (154), unspezifische Kationenkanäle oder die Na^+/K^+ -ATPase sowie weitere noch unbekannt Mechanismen.

4.4 Messung des intrazellulären pH

Messungen des intrazellulären pH mit den K⁺ Kanalinhibitoren 293B und ChTX und mit dem Cl⁻ Kanalinhibitor NPPB wurden durchgeführt, um auszuschließen, dass sekundär, womöglich durch intrazelluläre pH Veränderungen, andere Transportmechanismen oder Kanäle aktiviert werden und deswegen die Volumenmessungen fehlgedeutet werden könnten. Sowohl bei Vorinkubation mit den Inhibitoren, als auch bei Stimulation der Säuresekretion mit Forskolin und Carbachol wurden keine signifikanten Veränderungen des intrazellulären pH festgestellt (Kap. 3.4.2, Abb. 14a,b).

Lediglich bei Zugabe von NPPB wurde ein rascher pH Abfall registriert (Kap. 3.4.2, Abb. 14b), der aber aufgrund seines extrem raschen Auftretens nicht physiologisch sein kann und am ehesten einer Wechselwirkung mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF entspricht. Bei den Volumenmessungen fanden sich keine derartigen Veränderungen.

4.5 Kurzer Ausblick

Hier soll kurz aufgezeigt werden, was, zur näheren Klärung der teilweise oben angesprochenen Probleme beitragen könnte.

- Lokalisation anderer K^+ und Cl^- Kanäle in der Parietalzelle, sowie Einsatz spezifischer Inhibitoren.
- Bedeutung der Kir4.1 und des Kir5.1 für die Säuresekretion und die Volumenregulation in der Parietalzelle.
- Aufzeigen der Mechanismen, die für die Restaktivität nach Blockierung des Na^+/H^+ -Austauschers für die RVI verantwortlich sind

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Im Rahmen des Säuresekretionsvorganges der Parietalzelle spielen außer der H^+/K^+ -ATPase noch zahlreiche weitere Ionentransportprozesse eine bedeutende Rolle. In früheren Arbeiten zu diesem Thema findet man Hinweise dafür, dass K^+ Kanäle und Cl^- Kanäle an der Säuresekretion und an der Regulation der Protonenpumpe beteiligt sein müssen. Kürzlich konnten als K^+ Kanal der KCNQ1, der Kir4.1 und Kir5.1 und als Cl^- Kanal der ClC-2 in der Parietalzelle lokalisiert werden. Zumindest der KCNQ1 und der Kir 4.1 finden sich wahrscheinlich in der apikalen Membran. K^+ Kanäle und Cl^- Kanäle wurden in einigen Arbeitsgruppen mit der Volumenregulation der Parietalzelle in Verbindung gebracht. Bisher gab es jedoch keine handfesten Beweise für ihre Beteiligung. Auch die Beteiligung der Protonenpumpe und des Na^+/H^+ -Austauschers an der Volumenregulation der Parietalzelle waren noch weitestgehend unklar.

Die beiden Agonisten Carbachol und Forskolin wurden verwendet, um die Säuresekretion zu stimulieren. Es zeigte sich, dass beide Agonisten potente Stimulantien der Säuresekretion sind, wobei Forskolin der stärkere Agonist ist. Der Blocker des KCNQ1 293B war in der Lage die Säuresekretion fast vollständig zu blockieren. Der KCNQ1 scheint über den cAMP-abhängigen und über den Ca^{2+} -abhängigen Weg aktiviert werden zu können. Womöglich sind weitere cAMP-abhängige K^+ Kanäle, beispielsweise der Kir4.1 und der Kir5.1, an der Säuresekretion beteiligt. Auch ChTX-sensitive K^+ Kanäle sind an der Säuresekretion beteiligt. Cl^- Kanäle, wahrscheinlich der ClC-2, die sich durch NPPB fast vollständig blockieren ließen, sind wesentliche Voraussetzung für die Säuresekretion und für das Entstehen von HCl im Lumen.

Um die Beteiligung dieser Kanäle, der Protonenpumpe und des Na^+/H^+ -Austauschers an der Volumenregulation zu untersuchen, wurden Versuche mit Hilfe eines Laserscanmikroskopes und der Parietalzell-Primärkultur durchgeführt. Es zeigte sich, dass K^+ Kanäle und Cl^- Kanäle, sowie Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanäle, wesentlich an der initialen Schrumpfung nach

Stimulation der Säuresekretion der Parietalzelle beteiligt sind. Da 10 μM 293B als spezifisch für den KCNQ1 gilt, kann man wohl davon ausgehen, dass diesem K^+ Kanal eine besondere Bedeutung bei der Volumenregulation der Parietalzelle bei Stimulation der Säuresekretion zukommt.

Cl^- Kanäle sind ebenfalls an der säurestimulations-assoziierten Schrumpfung der Parietalzelle beteiligt. Dem CIC-2 wird eine bedeutende Rolle dabei zu gemessen.

Inhibition der H^+/K^+ -ATPase durch SCH28080 führte zu einer weitgehenden aber nicht vollständigen Hemmung der initialen Schrumpfung, so dass es möglicherweise zum Teil auch zu einer direkten Stimulation der untersuchten Leitfähigkeiten kommt.

An der RVI in der Parietalzelle sind vor allem der NHE1 und der NHE4 beteiligt. Dabei scheint auf den NHE1 der größere Anteil zu entfallen.

Literaturverzeichnis

1. Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., und Goldstein, S. A. 1999
MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia.
Cell 97[2], 175-187
2. Abuladze, N., Lee, I., Newman, D., Hwang, J., Boorer, K., Pushkin, A., und Kurtz, I. 1998
Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter.
J.Biol.Chem. 273[28], 17689-17695
3. Agnew, B. J., Duman, J. G., Watson, C. L., Coling, D. E., und Forte, J. G. 1999
Cytological transformations associated with parietal cell stimulation: critical steps in the activation cascade.
J.Cell Sci. 112 (Pt 16), 2639-2646
4. Bachmann, A., Quast, U., und Russ, U. 2001
Chromanol 293B, a blocker of the slow delayed rectifier K⁺ current (IKs), inhibits the CFTR Cl⁻ current.
Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 363[6], 590-596
5. Bachmann, O., Sonnentag, T., Siegel, W. K., Lamprecht, G., Weichert, A., Gregor, M., und Seidler, U. 1998
Different acid secretagogues activate different Na⁺/H⁺ exchanger isoforms in rabbit parietal cells.
Am.J.Physiol 275[5 Pt 1], G1085-G1093
6. Baird, N. R., Orlowski, J., Szabo, E. Z., Zaun, H. C., Schultheis, P. J., Menon, A. G., und Shull, G. E. 1999
Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain.
J.Biol.Chem. 274[7], 4377-4382
7. Banderali, U., Brochiero, E., Lindenthal, S., Raschi, C., Bogliolo, S., und Ehrenfeld, J. 1999
Control of apical membrane chloride permeability in the renal A6 cell line by nucleotides.
J.Physiol 519 Pt 3, 737-751

LITERATURVERZEICHNIS

8. Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., und Romey, G. 1996
K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current.
Nature 384[6604], 78-80
9. Baro, I., Roch, B., Hongre, A. S., und Escande, D. 1994
Concomitant activation of Cl⁻ and K⁺ currents by secretory stimulation in human epithelial cells.
J.Physiol 478 Pt 3, 469-482
10. Bergh, C., Kelley, S. J., und Dunham, P. B. 1990
K-Cl cotransport in LK sheep erythrocytes: kinetics of stimulation by cell swelling.
J.Membr.Biol. 117[2], 177-188
11. Berglindh, T., Dibona, D. R., Ito, S., und Sachs, G. 1980
Probes of parietal cell function.
Am.J.Physiol 238[3], G165-G176
12. Berglindh, T., Helander, H. F., und Obrink, K. J. 1976
Effects of secretagogues on oxygen consumption, aminopyrine accumulation and morphology in isolated gastric glands.
Acta Physiol.Scand. 97, 401-414
13. Berglindh, T. und Obrink, K. J. 1976
A method for preparing isolated glands from the rabbit gastric mucosa.
Acta Physiol.Scand. 96, 150-159
14. Bianchini, L. und Poussegur, J. 1994
Molecular structure and regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers.
J.Exp.Biol. 196, 337-345
15. Blatter, L. A. 1999
Cell volume measurements by fluorescence confocal microscopy: theoretical and practical aspects.
Methods Enzymol. 307, 274-295
16. Bleich, M., Briel, M., Busch, A. E., Lang, H. J., Gerlach, U., Gogelein, H., Greger, R., und Kunzelmann, K. 1997
KVLQT channels are inhibited by the K⁺ channel blocker 293B.
Pflugers Arch. 434[4], 499-501

17. Bleich, M., Riedemann, N., Warth, R., Kerstan, D., Leipziger, J., Hor, M., Driessche, W. V., und Greger, R. 1996
Ca²⁺ regulated K⁺ and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells.
Pflugers Arch. 432[6], 1011-1022
18. Bleich, M. und Warth, R. 2000
The very small-conductance K⁺ channel KvLQT1 and epithelial function.
Pflugers Arch. 440[2], 202-206
19. Bonanno, J. A. 1991
K(+)-H⁺ exchange, a fundamental cell acidifier in corneal epithelium.
Am.J.Physiol 260[3 Pt 1], C618-C625
20. Bookstein, C., Musch, M. W., DePaoli, A., Xie, Y., Rabenau, K., Villereal, M., Rao, M. C., und Chang, E. B. 1996
Characterization of the rat Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus.
Am.J.Physiol 271[5 Pt 1], C1629-C1638
21. Bosch, R. F., Gaspo, R., Busch, A. E., Lang, H. J., Li, G. R., und Nattel, S. 1998
Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K⁺ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes.
Cardiovasc.Res. 38[2], 441-450
22. Boucherot, A., Schreiber, R., und Kunzelmann, K. 2001
Regulation and properties of kcnq1 (kvlqt1) and impact of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.
J.Membr.Biol. 182[1], 39-47
23. Boyarsky, G., Ganz, M. B., Sterzel, R. B., und Boron, W. F. 1988
pH regulation in single glomerular mesangial cells. I. Acid extrusion in absence and presence of HCO₃⁻.
Am.J Physiol. 255[6 Pt 1], C844-C856
24. Boyarsky, G., Ganz, M. B., Sterzel, R. B., und Boron, W. F. 1988
pH regulation in single glomerular mesangial cells. II. Na⁺-dependent and -independent Cl⁻-HCO₃⁻ exchangers.
Am.J Physiol. 255[6 Pt 1], C857-C869
25. Brant, S. R., Yun, C. H., Donowitz, M., und Tse, C. M. 1995
Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/N⁺ exchanger isoform, NHE3.
Am.J.Physiol 269[1 Pt 1], C198-C206

LITERATURVERZEICHNIS

26. Brown, G. C. 1991
Total cell protein concentration as an evolutionary constraint on the metabolic control distribution in cells.
J.Theor.Biol. 153[2], 195-203
27. Brown, M. R. und Chew, C. S. 1989
Carbachol-induced protein phosphorylation in parietal cells: regulation by $[Ca^{2+}]_i$.
Am.J.Physiol 257[1 Pt 1], G99-110
28. Busch, A. E., Busch, G. L., Ford, E., Suessbrich, H., Lang, H. J., Greger, R., Kunzelmann, K., Attali, B., und Stuhmer, W. 1997
The role of the Isk protein in the specific pharmacological properties of the IKs channel complex.
Br.J.Pharmacol. 122[2], 187-189
29. Busch, A. E., Suessbrich, H., Waldegger, S., Sailer, E., Greger, R., Lang, H., Lang, F., Gibson, K. J., und Maylie, J. G. 1996
Inhibition of IKs in guinea pig cardiac myocytes and guinea pig Isk channels by the chromanol 293B.
Pflugers Arch. 432[6], 1094-1096
30. Busch, A. E., Varnum, M., Adelman, J. P., und North, R. A. 1992
Hypotonic solution increases the slowly activating potassium current Isk expressed in xenopus oocytes.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 184[2], 804-810
31. Cabado, A. G., Vieytes, M. R., und Botana, L. M. 1994
Effect of ion composition on the changes in membrane potential induced with several stimuli in rat mast cells.
J.Cell Physiol 158[2], 309-316
32. Chabannes, D., Barhanin, J., und Escande, D. 2001
Mice disrupted for the kvlqt1 potassium channel regulator isk gene accumulate mature t cells.
Cell Immunol. 209[1], 1-9
33. Chaillet, J. R. und Boron, W. F. 1985
Intracellular calibration of a pH-sensitive dye in isolated, perfused salamander proximal tubules.
J.Gen.Physiol 86[6], 765-794
34. Chan, H. C., Fu, W. O., Chung, Y. W., Huang, S. J., Chan, P. S., und Wong, P. Y. 1994
Swelling-induced anion and cation conductances in human epididymal cells.
J.Physiol 478 Pt 3, 449-460

35. Chan, H. C. und Nelson, D. J. 1992
Chloride-dependent cation conductance activated during cellular shrinkage.
Science 257[5070], 669-671
36. Chew, C. S. 1983
Forskolin stimulation of acid and pepsinogen secretion in isolated gastric glands.
Am.J.Physiol 245[5 Pt 1], C371-C380
37. Chew, C. S. 1986
Cholecystokinin, carbachol, gastrin, histamine, and forskolin increase $[Ca^{2+}]_i$ in gastric glands.
Am.J.Physiol 250[6 Pt 1], G814-G823
38. Chew, C. S. 1994
Parietal cell culture: new models and directions.
Annu.Rev.Physiol 56, 445-461
39. Chew, C. S. und Brown, M. R. 1987
Histamine increases phosphorylation of 27- and 40-kDa parietal cell proteins.
Am.J.Physiol 253[6 Pt 1], G823-G829
40. Chew, C. S. und Hersey, S. J. 1982
Gastrin stimulation of isolated gastric glands.
Am.J.Physiol 242[5], G504-G512
41. Chew, C. S., Hersey, S. J., Sachs, G., und Berglindh, T. 1980
Histamine responsiveness of isolated gastric glands.
Am.J.Physiol 238[4], G312-G320
42. Chew, C. S. und Ljungstrom, M. 1990
HCl secretion and $[Ca^{2+}]_i$ in cultured parietal cells.
J.Intern.Med.Suppl 732, 9-15
43. Chew, C. S., Ljungstrom, M., Smolka, A., und Brown, M. R. 1989
Primary culture of secretagogue-responsive parietal cells from rabbit gastric mucosa.
Am.J.Physiol 256[1 Pt 1], G254-G263
44. Chew, C. S., Nakamura, K., und Petropoulos, A. C. 1994
Multiple actions of epidermal growth factor and TGF-alpha on rabbit gastric parietal cell function.
Am.J.Physiol 267[5 Pt 1], G818-G826

LITERATURVERZEICHNIS

45. Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G., und Barhanin, J. 1997
Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias.
EMBO J. 16[17], 5472-5479
46. Christensen, O. 1987
Mediation of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through stretch-activated channels.
Nature 330[6143], 66-68
47. Cid, L. P., Montrose-Rafizadeh, C., Smith, D. I., Guggino, W. B., und Cutting, G. R. 1995
Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (ClC-2) cDNA widely expressed in human tissues.
Hum.Mol.Genet. 4[3], 407-413
48. Colclasure, G. C. und Parker, J. C. 1992
Cytosolic protein concentration is the primary volume signal for swelling-induced [K-Cl] cotransport in dog red cells.
J.Gen.Physiol 100[1], 1-10
49. Collins, J. F., Honda, T., Knobel, S., Bulus, N. M., Conary, J., DuBois, R., und Ghishan, F. K. 1993
Molecular cloning, sequencing, tissue distribution, and functional expression of a Na⁺/H⁺ exchanger (NHE-2).
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90[9], 3938-3942
50. Connolly, D. L., Shanahan, C. M., und Weissberg, P. L. 1996
Water channels in health and disease.
Lancet 347[8996], 210-212
51. Cornet, M., Delpire, E., und Gilles, R. 1988
Relations between cell volume control, microfilaments and microtubules networks in T2 and PC12 cultured cells.
J.Physiol (Paris) 83[1], 43-49
52. Cuppoletti, J., Baker, A. M., und Malinowska, D. H. 1993
Cl⁻ channels of the gastric parietal cell that are active at low pH.
Am.J.Physiol 264[6 Pt 1], C1609-C1618
53. Cuppoletti, J. und Sachs, G. 1984
Regulation of gastric acid secretion via modulation of a chloride conductance.
J.Biol.Chem. 259[23], 14952-14959

54. Cuthbert, A. W., Hickman, M. E., Thorn, P., und MacVinish, L. J. 1999
Activation of Ca(2+)- and cAMP-sensitive K(+) channels in murine colonic epithelia by 1-ethyl-2-benzimidazolone.
Am.J.Physiol 277[1 Pt 1], C111-C120
55. Debellis, L., Curci, S., und Fromter, E. 1990
Effect of histamine on the basolateral K+ conductance of frog stomach oxyntic cells and surface epithelial cells.
Am.J.Physiol 258[4 Pt 1], G631-G636
56. Demarest, J. R., Loo, D. D., und Sachs, G. 1989
Activation of apical chloride channels in the gastric oxyntic cell.
Science 245[4916], 402-404
57. Demaurex, N. und Grinstein, S. 1994
Na+/H+ antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation.
J.Exp.Biol. 196, 389-404
58. Demolombe, S., Franco, D., de Boer, P., Kuperschmidt, S., Roden, D., Pereon, Y., Jarry, A., Moorman, A. F., und Escande, D. 2001
Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia.
Am.J.Physiol Cell Physiol 280[2], C359-C372
59. Dermietzel, R., Hwang, T. K., Buettner, R., Hofer, A., Dotzler, E., Kremer, M., Deutzmann, R., Thinnes, F. P., Fishman, G. I., Spray, D. C., und . 1994
Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 91[2], 499-503
60. Deutsch, C. und Chen, L. Q. 1993
Heterologous expression of specific K+ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90[21], 10036-10040
61. Dibona, D. R., Ito, S., Berglindh, T., und Sachs, G. 1979
Cellular site of gastric acid secretion.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 76[12], 6689-6693
62. Ecke, D., Bleich, M., Schwartz, B., Fraser, G., und Greger, R. 1996
The ion conductances of colonic crypts from dexamethasone-treated rats.
Pflugers Arch. 431[3], 419-426

63. Ekblad, E. B. 1980
Increase of intracellular pH in secreting frog gastric mucosa.
Biochim.Biophys.Acta 632[3], 375-385
64. Felipe, A., Snyders, D. J., Deal, K. K., und Tamkun, M. M. 1993
Influence of cloned voltage-gated K⁺ channel expression on
alanine transport, Rb⁺ uptake, and cell volume.
Am.J.Physiol 265[5 Pt 1], C1230-C1238
65. Forte, J. G., Hanzel, D. K., Okamoto, C., Chow, D., und Urushidani, T.
1990
Membrane and protein recycling associated with gastric HCl
secretion.
J.Intern.Med.Suppl 732, 17-26
66. Freeman, C. J., Bookchin, R. M., Ortiz, O. E., und Lew, V. L. 1987
K-permeabilized human red cells lose an alkaline, hypertonic fluid
containing excess K over diffusible anions.
J.Membr.Biol. 96[3], 235-241
67. Freeman, L. C., Lippold, J. J., und Mitchell, K. E. 2000
Glycosylation influences gating and pH sensitivity of I(sK).
J.Membr.Biol. 177[1], 65-79
68. Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., und Hiraoka, M. 1998
Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus*
oocytes and its contribution to volume regulation.
Am.J.Physiol 274[2 Pt 1], C500-C512
69. Garcia-Romeu, F., Borgese, F., Guizouarn, H., Fievet, B., und Motais, R.
1996
A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume
regulation.
Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand) 42[7], 985-994
70. Garner, M. M. und Burg, M. B. 1994
Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to
hypertonicity.
Am.J.Physiol 266[4 Pt 1], C877-C892
71. Geck, P. und Pfeiffer, B. 1985
Na⁺ + K⁺ + 2Cl⁻ cotransport in animal cells--its role in volume
regulation.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 456, 166-182
72. Geibel, J. P., Singh, S., Rajendran, V. M., und Binder, H. J. 2000
HCO₃⁻ secretion in the rat colonic crypt is closely linked to Cl⁻
secretion.
Gastroenterology 118[1], 101-107

73. Grahammer, F., Herling, A. W., Lang, H. J., Schmitt-Graff, A., Wittekindt, O. H., Nitschke, R., Bleich, M., Barhanin, J., und Warth, R. 2001
The cardiac k(+) channel kcnq1 is essential for gastric acid secretion.
Gastroenterology 120[6], 1363-1371
74. Greger, R., Bleich, M., Riedemann, N., Van Driessche, W., Ecke, D., und Warth, R. 1997
The role of K⁺ channels in colonic Cl⁻ secretion.
Comp Biochem.Physiol A Physiol 118[2], 271-275
75. Grinstein, S., Clarke, C. A., und Rothstein, A. 1983
Activation of Na⁺/H⁺ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification.
J.Gen.Physiol 82[5], 619-638
76. Grunder, S., Thiemann, A., Pusch, M., und Jentsch, T. J. 1992
Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume.
Nature 360[6406], 759-762
77. Gschwentner, M., Nagl, U. O., Schmarda, A., Woll, E., Ritter, M., Waitz, W., Deetjen, P., und Paulmichl, M. 1994
Structure-function relation of a cloned epithelial chloride channel.
Ren Physiol Biochem. 17[3-4], 148-152
78. Gyomory, K., Yeger, H., Ackerley, C., Garami, E., und Bear, C. E. 2000
Expression of the chloride channel ClC-2 in the murine small intestine epithelium.
Am.J.Physiol Cell Physiol 279[6], C1787-C1794
79. Hagen, S. J., Wu, H., und Morrison, S. W. 2000
NH₄Cl inhibition of acid secretion: possible involvement of an apical K⁺ channel in bullfrog oxyntic cells.
Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 279[2], G400-G410
80. Hagen, S. J. und Yang, D. X. 2001
Identification of inwardly rectifying K⁺-channels at the apical surface of rat parietal cells: implications for the regulation of gastric acid secretion.
81. Hamada, E., Nakajima, T., Ota, S., Terano, A., Omata, M., Nakade, S., Mikoshiba, K., und Kurachi, Y. 1993
Activation of Ca²⁺-dependent K⁺ current by acetylcholine and histamine in a human gastric epithelial cell line.
J.Gen.Physiol 102[4], 667-692

LITERATURVERZEICHNIS

82. Hazama, A. und Okada, Y. 1988
Ca²⁺ sensitivity of volume-regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells.
J.Physiol 402, 687-702
83. Hersey, S. J. 1979
Intracellular pH measurements in gastric mucosa.
Am.J.Physiol 237[1], E82-E89
84. Hersey, S. J. und Sachs, G. 1995
Gastric acid secretion.
Physiol Rev. 75[1], 155-189
85. Hoffmann, E. K. und Dunham, P. B. 1995
Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation.
Int.Rev.Cytol. 161, 173-262
86. Hoffmann, E. K., Sjöholm, C., und Simonsen, L. O. 1983
Na⁺, Cl⁻ cotransport in Ehrlich ascites tumor cells activated during volume regulation (regulatory volume increase).
J.Membr.Biol. 76[3], 269-280
87. Jentsch, T. J. 1994
Molecular physiology of anion channels.
Curr.Opin.Cell Biol. 6[4], 600-606
88. Jentsch, T. J. 1996
Chloride channels: a molecular perspective.
Curr.Opin.Neurobiol. 6[3], 303-310
89. Jiang, L., Chernova, M. N., und Alper, S. L. 1997
Secondary regulatory volume increase conferred on *Xenopus* oocytes by expression of AE2 anion exchanger.
Am.J.Physiol 272[1 Pt 1], C191-C202
90. Jordt, S. E. und Jentsch, T. J. 1997
Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel.
EMBO J. 16[7], 1582-1592
91. Jørgensen, N. K., Christensen, S., Harbak, H., Brown, A. M., Lambert, I. H., Hoffmann, E. K., und Simonsen, L. O. 1997
On the role of calcium in the regulatory volume decrease (RVD) response in Ehrlich mouse ascites tumor cells.
J.Membr.Biol. 157[3], 281-299
92. Kaczmarek, L. K. und Blumenthal, E. M. 1997
Properties and regulation of the mink potassium channel protein.
Physiol Rev. 77[3], 627-641

93. Kajita, H., Omori, K., und Matsuda, H. 2000
The chloride channel ClC-2 contributes to the inwardly rectifying Cl⁻ conductance in cultured porcine choroid plexus epithelial cells.
J.Physiol 523 Pt 2, 313-324
94. Kapus, A., Grinstein, S., Wasan, S., Kandasamy, R., und Orlowski, J. 1994
Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation.
J.Biol.Chem. 269[38], 23544-23552
95. Karam, S. M. und Forte, J. G. 1994
Inhibiting gastric H⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase activity by omeprazole promotes degeneration and production of parietal cells.
Am.J.Physiol 266[4 Pt 1], G745-G758
96. Kirk, K., Ellory, J. C., und Young, J. D. 1992
Transport of organic substrates via a volume-activated channel.
J.Biol.Chem. 267[33], 23475-23478
97. Kiviluoto, T., Mustonen, H., Salo, J., und Kivilaakso, E. 1995
Regulation of intracellular pH in isolated Necturus gastric mucosa during short-term exposure to luminal acid.
Gastroenterology 108[4], 999-1004
98. Komatsu, H., Mieno, H., Tamaki, K., Inoue, M., Kajiyama, G., und Seyama, I. 1996
Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by Mg²⁺ and ATP in frog oxyntic cells.
Pflugers Arch. 431[4], 494-503
99. Kotera, T., Hashimoto, A., Ueda, S., und Okada, Y. 1991
Whole-cell K⁺ current activation in response to voltages and carbachol in gastric parietal cells isolated from guinea pig.
J.Membr.Biol. 124[1], 43-52
100. Kunzelmann, K., Bleich, M., Warth, R., Levy-Holzman, R., Garty, H., und Schreiber, R. 2001
Expression and function of colonic epithelial KvLQT1 K⁺ channels.
Clin.Exp.Pharmacol.Physiol 28[1-2], 79-83
101. Lamprecht, G., Seidler, U., und Classen, M. 1993
Intracellular pH-regulating ion transport mechanisms in parietal cell basolateral membrane vesicles.
Am.J.Physiol 265[5 Pt 1], G903-G910

LITERATURVERZEICHNIS

102. Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., und Häussinger, D. 1998
Functional significance of cell volume regulatory mechanisms.
Physiol Rev. 78[1], 247-306
103. Lang, F. und Paulmichl, M. 1995
Properties and regulation of ion channels in MDCK cells.
Kidney Int. 48[4], 1200-1205
104. Lauf, P. K. und Adragna, N. C. 2000
K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism.
Cell Physiol Biochem. 10[5-6], 341-354
105. Lee, A. H. und Tannock, I. F. 1998
Heterogeneity of intracellular pH and of mechanisms that regulate intracellular pH in populations of cultured cells.
Cancer Res. 58[9], 1901-1908
106. Lee, M. P., Ravenel, J. D., Hu, R. J., Lustig, L. R., Tomaselli, G., Berger, R. D., Brandenburg, S. A., Litzzi, T. J., Bunton, T. E., Limb, C., Francis, H., Gorelikow, M., Gu, H., Washington, K., Argani, P., Goldenring, J. R., Coffey, R. J., und Feinberg, A. P. 2000
Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice.
J.Clin.Invest 106[12], 1447-1455
107. Li, Q., Jungmann, V., Kiyatkin, A., und Low, P. S. 1996
Prostaglandin E2 stimulates a Ca²⁺-dependent K⁺ channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability.
J.Biol.Chem. 271[31], 18651-18656
108. Lifton, R. P., Sardet, C., Pouyssegur, J., und Lalouel, J. M. 1990
Cloning of the human genomic amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiporter gene, identification of genetic polymorphisms, and localization on the genetic map of chromosome 1p.
Genomics 7[1], 131-135
109. Livne, A. und Hoffmann, E. K. 1990
Cytoplasmic acidification and activation of Na⁺/H⁺ exchange during regulatory volume decrease in Ehrlich ascites tumor cells.
J.Membr.Biol. 114[2], 153-157
110. Lohrmann, E., Burhoff, I., Nitschke, R. B., Lang, H. J., Mania, D., Englert, H. C., Hropot, M., Warth, R., Rohm, W., Bleich, M., und . 1995
A new class of inhibitors of cAMP-mediated Cl⁻ secretion in rabbit colon, acting by the reduction of cAMP-activated K⁺ conductance.
Pflugers Arch. 429[4], 517-530

111. Loussouarn, G., Charpentier, F., Mohammad-Panah, R., Kunzelmann, K., Baro, I., und Escande, D. 1997
KvLQT1 potassium channel but not IsK is the molecular target for trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl- chromane.
Mol.Pharmacol. 52[6], 1131-1136
112. Ma, T. und Verkman, A. S. 1999
Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology.
J.Physiol 517 (Pt 2), 317-326
113. MacVinish, L. J., Hickman, M. E., Mufti, D. A., Durrington, H. J., und Cuthbert, A. W. 1998
Importance of basolateral K⁺ conductance in maintaining Cl⁻ secretion in murine nasal and colonic epithelia.
J.Physiol 510 (Pt 1), 237-247
114. Mairbaur, H. und Hoffman, J. F. 1992
Internal magnesium, 2,3-diphosphoglycerate, and the regulation of the steady-state volume of human red blood cells by the Na/K/2Cl cotransport system.
J.Gen.Physiol 99[5], 721-746
115. Malinowska, D. H. 1990
Cl⁻ channel blockers inhibit acid secretion in rabbit parietal cells.
Am.J.Physiol 259[4 Pt 1], G536-G543
116. Malinowska, D. H., Cuppoletti, J., und Sachs, G. 1983
Cl⁻ requirement of acid secretion in isolated gastric glands.
Am.J.Physiol 245[4], G573-G581
117. Malinowska, D. H., Kupert, E. Y., Bahinski, A., Sherry, A. M., und Cuppoletti, J. 1995
Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl⁻ channel.
Am.J.Physiol 268[1 Pt 1], C191-C200
118. Malinowska, D. H., Sachs, G., und Cuppoletti, J. 1988
Gastric H⁺ secretion: histamine (cAMP-mediated) activation of protein phosphorylation.
Biochim.Biophys.Acta 972[1], 95-109
119. Mall, M., Bleich, M., Sch, r. M., hr, K., Seydewitz, H. H., Brandis, M., Greger, R., und Kunzelmann, K. 1998
Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP.
Am.J.Physiol 275[6 Pt 1], G1274-G1281

LITERATURVERZEICHNIS

120. Marjanovic, M., Elliott, A. C., und Dawson, M. J. 1998
The temperature dependence of intracellular pH in isolated frog skeletal muscle: lessons concerning the Na(+)-H⁺ exchanger.
J Membr Biol 161[3], 215-225
121. McDonald, T. V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M. B., Wang, K. W., Goldstein, S. A., und Fishman, G. I. 1997
A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr).
Nature 388[6639], 289-292
122. McNamara, B., Winter, D. C., Cuffe, J. E., O'Sullivan, G. C., und Harvey, B. J. 1999
Basolateral K⁺ channel involvement in forskolin-activated chloride secretion in human colon.
J.Physiol 519 Pt 1, 251-260
123. Melman, Y. F., Domenech, A., de la, L. S., und McDonald, T. V. 2001
Structural determinants of KvLQT1 control by the KCNE family of proteins.
J.Biol.Chem. 276[9], 6439-6444
124. Mendlein, J. und Sachs, G. 1990
Interaction of a K(+)-competitive inhibitor, a substituted imidazo[1,2a] pyridine, with the phospho- and dephosphoenzyme forms of H⁺, K(+)-ATPase.
J.Biol.Chem. 265[9], 5030-5036
125. Mieno, H. und Kajiyama, G. 1991
Electrical characteristics of inward-rectifying K⁺ channels in isolated bullfrog oxyntic cells.
Am.J.Physiol 261[2 Pt 1], G206-G212
126. Minton, A. P., Colclasure, G. C., und Parker, J. C. 1992
Model for the role of macromolecular crowding in regulation of cellular volume.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89[21], 10504-10506
127. Misaka, T., Abe, K., Iwabuchi, K., Kusakabe, Y., Ichinose, M., Miki, K., Emori, Y., und Arai, S. 1996
A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in.
FEBS Lett. 381[3], 208-212
128. Muallem, S., Burnham, C., Blissard, D., Berglinde, T., und Sachs, G. 1985
Electrolyte transport across the basolateral membrane of the parietal cells.
J.Biol.Chem. 260[11], 6641-6653

129. Murer, H., Hopfer, U., und Kinne, R. 1998
Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. 1976.
J.Am.Soc.Nephrol. 9[1], 143-150
130. Negulescu, P. A. und Machen, T. E. 1990
Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes.
Methods Enzymol. 192, 38-81
131. Orłowski, J. und Grinstein, S. 1997
Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells.
J.Biol.Chem. 272[36], 22373-22376
132. Orłowski, J., Kandasamy, R. A., und Shull, G. E. 1992
Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins.
J.Biol.Chem. 267[13], 9331-9339
133. Paimela, H., Kiviluoto, T., Mustonen, H., und Kivilaakso, E. 1992
Intracellular pH in isolated Necturus duodenal mucosa exposed to luminal acid.
Gastroenterology 102[3], 862-867
134. Paradiso, A. M., Negulescu, P. A., und Machen, T. E. 1986
Na⁺-H⁺ and Cl⁻-OH⁻(HCO₃⁻) exchange in gastric glands.
Am.J.Physiol 250[4 Pt 1], G524-G534
135. Paradiso, A. M., Townsley, M. C., Wenzl, E., und Machen, T. E. 1989
Regulation of intracellular pH in resting and in stimulated parietal cells.
Am.J.Physiol 257[3 Pt 1], C554-C561
136. Park, K., Arreola, J., Begenisich, T., und Melvin, J. E. 1998
Comparison of voltage-activated Cl⁻ channels in rat parotid acinar cells with ClC-2 in a mammalian expression system.
J.Membr.Biol. 163[2], 87-95
137. Park, K., Begenisich, T., und Melvin, J. E. 2001
Protein kinase a activation phosphorylates the rat clc-2 cl⁻ channel but does not change activity.
J.Membr.Biol. 182[1], 31-37
138. Parker, J. C. 1978
Sodium and calcium movements in dog red blood cells.
J.Gen.Physiol 71[1], 1-17

LITERATURVERZEICHNIS

139. Parker, J. C., McManus, T. J., Starke, L. C., und Gitelman, H. J. 1990
Coordinated regulation of Na/H exchange and [K-Cl] cotransport
in dog red cells.
J.Gen.Physiol 96[6], 1141-1152
140. Perez, A., Blissard, D., Sachs, G., und Hersey, S. J. 1989
Evidence for a chloride conductance in secretory membrane of
parietal cells.
Am.J.Physiol 256[2 Pt 1], G299-G305
141. Perry, P. B. und O'Neill, W. C. 1993
Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume
regulation via K-Cl cotransport and K channels.
Am.J.Physiol 265[3 Pt 1], C763-C769
142. Pessia, M., Imbrici, P., D'Adamo, M. C., Salvatore, L., und Tucker, S. J.
2001
Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels
and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1.
J.Physiol 532[Pt 2], 359-367
143. Priver, N. A., Rabon, E. C., und Zeidel, M. L. 1993
Apical membrane of the gastric parietal cell: water, proton, and
nonelectrolyte permeabilities.
Biochemistry 32[10], 2459-2468
144. Pusch, M., Ferrera, L., und Friedrich, T. 2001
Two open states and rate-limiting gating steps revealed by
intracellular Na⁺ block of human KCNQ1 and KCNQ1/KCNE1 K⁺
channels.
J.Physiol 533[Pt 1], 135-143
145. Pusch, M., Magrassi, R., Wollnik, B., und Conti, F. 1998
Activation and inactivation of homomeric KvLQT1 potassium
channels.
Biophys.J. 75[2], 785-792
146. Rabon, E., Cuppoletti, J., Malinowska, D., Smolka, A., Helander, H. F.,
Mendlein, J., und Sachs, G. 1983
Proton secretion by the gastric parietal cell.
J.Exp.Biol. 106, 119-133
147. Reenstra, W. W. und Forte, J. G. 1990
Characterization of K⁺ and Cl⁻ conductances in apical membrane
vesicles from stimulated rabbit oxyntic cells.
Am.J.Physiol 259[5 Pt 1], G850-G858

148. Ribeiro, R., Heinke, B., und Diener, M. 2001
Cell volume-induced changes in K transport across the rat colon.
Acta Physiol Scand. 171[4], 445-458
149. Robertson, M. A. und Foskett, J. K. 1994
Na⁺ transport pathways in secretory acinar cells: membrane cross talk mediated by [Cl⁻]_i.
Am.J.Physiol 267[1 Pt 1], C146-C156
150. Roepe, P. D., Weisburg, J. H., Luz, J. G., Hoffman, M. M., und Wei, L. Y. 1994
Novel Cl⁻-dependent intracellular pH regulation in murine MDR 1 transfectants and potential implications.
Biochemistry 33[36], 11008-11015
151. Roman, R. M., Smith, R. L., Feranchak, A. P., Clayton, G. H., Doctor, R. B., und Fitz, J. G. 2001
ClC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis.
Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 280[3], G344-G353
152. Romey, G., Attali, B., Chouabe, C., Abitbol, I., Guillemare, E., Barhanin, J., und Lazdunski, M. 1997
Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity.
J.Biol.Chem. 272[27], 16713-16716
153. Roos, A. und Boron, W. F. 1981
Intracellular pH.
Physiol.Rev. 61, 296-434
154. Rossmann, H., Bachmann, O., Vieillard-Baron, D., Gregor, M., und Seidler, U. 1999
Na⁺/HCO₃⁻ Cotransport and Expression of NBC1 and NBC2 in Rabbit Gastric Parietal and Mucous Cells.
Gastroenterology 116[6], 1389-1398
155. Rossmann, H., Sonnentag, T., Heinzmann, A., Seidler, B., Bachmann, O., Vieillard-Baron, D., Gregor, M., und Seidler, U. 2001
Differential expression and regulation of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoforms in rabbit parietal and mucous cells.
Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 281[2], G447-G458
156. Saccomani, G., Psarras, C. G., Smith, P. R., Kirk, K. L., und Shoemaker, R. L. 1991
Histamine-induced chloride channels in apical membrane of isolated rabbit parietal cells.
Am.J Physiol. 260[5 Pt 1], C1000-C1011

LITERATURVERZEICHNIS

157. Sachs, G. 1986
The parietal cell as a therapeutic target.
Scand.J.Gastroenterol.Suppl 118, 1-10
158. Sachs, G., Carlsson, E., Lindberg, P., und Wallmark, B. 1988
Gastric H,K-ATPase as therapeutic target.
Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 28, 269-284
159. Sachs, G., Munson, K., Hall, K., und Hersey, S. J. 1990
Gastric H⁺,K⁽⁺⁾-ATPase as a therapeutic target in peptic ulcer disease.
Dig.Dis.Sci. 35[12], 1537-1544
160. Sackin, H. 1995
Stretch-activated ion channels.
Kidney Int. 48[4], 1134-1147
161. Sakai, H., Okada, Y., Morii, M., und Takeguchi, N. 1989
Anion and cation channels in the basolateral membrane of rabbit parietal cells.
Pflugers Arch. 414[2], 185-192
162. Sakai, H., Okada, Y., Morii, M., und Takeguchi, N. 1992
Arachidonic acid and prostaglandin E₂ activate small-conductance Cl⁻ channels in the basolateral membrane of rabbit parietal cells.
J.Physiol 448, 293-306
163. Sandvik, A. K., Marvik, R., Dimaline, R., und Waldum, H. L. 1998
Carbachol stimulation of gastric acid secretion and its effects on the parietal cell.
Br.J.Pharmacol. 124[1], 69-74
164. Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., und Keating, M. T. 1996
Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel.
Nature 384[6604], 80-83
165. Scarff, K. L., Judd, L. M., Toh, B. H., Gleeson, P. A., und Van Driel, I. R. 1999
Gastric H⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-adenosine triphosphatase beta subunit is required for normal function, development, and membrane structure of mouse parietal cells.
Gastroenterology 117[3], 605-618
166. Schettino, T. und Trischitta, F. 1989
Transport properties of the basolateral membrane of the oxyntic cells in frog fundic gastric mucosa.
Pflugers Arch. 414[4], 469-476

167. Schroeder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R., und Jentsch, T. J. 2000
A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3.
Nature 403[6766], 196-199
168. Schwiebert, E. M., Cid-Soto, L. P., Stafford, D., Carter, M., Blaisdell, C. J., Zeitlin, P. L., Guggino, W. B., und Cutting, G. R. 1998
Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95[7], 3879-3884
169. Seidler, U., Stumpf, P., und Classen, M. 1995
Interstitial buffer capacity influences Na⁺/H⁺ exchange kinetics and oxyntic cell pH_i in intact frog gastric mucosa.
Am.J.Physiol 268[3 Pt 1], G496-G504
170. Sernka, T. J. 1990
Direct hyposmotic stimulation of gastric acid secretion.
Membr.Biochem. 9[1], 1-7
171. Sherry, A. M., Malinowska, D. H., Morris, R. E., Ciruolo, G. M., und Cuppoletti, J. 2001
Localization of ClC-2 Cl⁻ channels in rabbit gastric mucosa.
Am.J.Physiol Cell Physiol 280[6], C1599-C1606
172. Sherry, A. M., Stroffekova, K., Knapp, L. M., Kupert, E. Y., Cuppoletti, J., und Malinowska, D. H. 1997
Characterization of the human pH- and PKA-activated ClC-2G(2 alpha) Cl⁻ channel.
Am.J.Physiol 273[2 Pt 1], C384-C393
173. Sieck, G. C., Mantilla, C. B., und Prakash, Y. S. 1999
Volume measurements in confocal microscopy.
Methods Enzymol. 307, 296-315
174. Siemer, C. und Gogelein, H. 1993
Effects of forskolin on crypt cells of rat distal colon. Activation of nonselective cation channels in the crypt base and of a chloride conductance pathway in other parts of the crypt.
Pflugers Arch. 424[3-4], 321-328
175. Smolka, A., Helander, H. F., und Sachs, G. 1983
Monoclonal antibodies against gastric H⁺ + K⁺ ATPase.
Am.J.Physiol 245[4], G589-G596

LITERATURVERZEICHNIS

176. Sonnentag, T., Siegel, W. K., Bachmann, O., Rossmann, H., Mack, A., Wagner, H. J., Gregor, M., und Seidler, U. 2000
Agonist-induced cytoplasmic volume changes in cultured rabbit parietal cells.
Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 279[1], G40-G48
177. Stroffekova, K., Kupert, E. Y., Malinowska, D. H., und Cuppoletti, J. 1998
Identification of the pH sensor and activation by chemical modification of the ClC-2G Cl⁻ channel.
Am.J.Physiol 275[4 Pt 1], C1113-C1123
178. Suessbrich, H., Bleich, M., Ecke, D., Rizzo, M., Waldegger, S., Lang, F., Szabo, I., Lang, H. J., Kunzelmann, K., Greger, R., und Busch, A. E. 1996
Specific blockade of slowly activating I(sK) channels by chromanols -- impact on the role of I(sK) channels in epithelia.
FEBS Lett. 396[2-3], 271-275
179. Summers, J. C., Trais, L., Lajvardi, R., Hergan, D., Buechler, R., Chang, H., Pena-Rasgado, C., und Rasgado-Flores, H. 1997
Role of concentration and size of intracellular macromolecules in cell volume regulation.
Am.J.Physiol 273[2 Pt 1], C360-C370
180. Supplisson, S., Loo, D. D., und Sachs, G. 1991
Diversity of K⁺ channels in the basolateral membrane of resting Necturus oxyntic cells.
J.Membr.Biol. 123[3], 209-221
181. Takumi, T., Ohkubo, H., und Nakanishi, S. 1988
Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current.
Science 242[4881], 1042-1045
182. Taniguchi, J. und Guggino, W. B. 1989
Membrane stretch: a physiological stimulator of Ca²⁺-activated K⁺ channels in thick ascending limb.
Am.J.Physiol 257[3 Pt 2], F347-F352
183. Tewari, K. P., Malinowska, D. H., Sherry, A. M., und Cuppoletti, J. 2000
PKA and arachidonic acid activation of human recombinant ClC-2 chloride channels.
Am.J.Physiol Cell Physiol 279[1], C40-C50
184. Thiemann, A., Grunder, S., Pusch, M., und Jentsch, T. J. 1992
A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells.
Nature 356[6364], 57-60

185. Thomas, J. A., Buchsbaum, R. N., Zimniak, A., und Racker, E. 1979
Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells
utilizing spectroscopic probes generated in situ.
Biochemistry 18[11], 2210-2218
186. Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M., und Barhanin, J. 2000
KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac
KCNQ1 potassium channel.
EMBO J. 19[23], 6326-6330
187. Tse, M., Levine, S., Yun, C., Brant, S., Counillon, L. T., Pouyssegur, J.,
und Donowitz, M. 1993
Structure/function studies of the epithelial isoforms of the
mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family.
J.Membr.Biol. 135[2], 93-108
188. Ueda, S., Loo, D. D., und Sachs, G. 1987
Regulation of K⁺ channels in the basolateral membrane of
Necturus oxyntic cells.
J.Membr.Biol. 97[1], 31-41
189. Ueda, S. und Okada, Y. 1989
Acid secretagogues induce Ca²⁺ mobilization coupled to K⁺
conductance activation in rat parietal cells in tissue culture.
Biochim.Biophys.Acta 1012[3], 254-260
190. Unsold, B., Kerst, G., Brousos, H., Hubner, M., Schreiber, R., Nitschke,
R., Greger, R., und Bleich, M. 2000
KCNE1 reverses the response of the human K⁺ channel KCNQ1
to cytosolic pH changes and alters its pharmacology and
sensitivity to temperature.
Pflugers Arch. 441[2-3], 368-378
191. Urushidani, T. und Forte, J. G. 1997
Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal
cell.
J.Membr.Biol. 159[2], 99-111
192. Venosa, R. A. 1991
Hypo-osmotic stimulation of active Na⁺ transport in frog muscle:
apparent upregulation of Na⁺ pumps.
J.Membr.Biol. 120[2], 97-104
193. Volkl, H., Busch, G. L., Haussinger, D., und Lang, F. 1994
Alkalinization of acidic cellular compartments following cell
swelling.
FEBS Lett. 338[1], 27-30

LITERATURVERZEICHNIS

194. Waisbren, S. J., Geibel, J., Boron, W. F., und Modlin, I. M. 1994
Luminal perfusion of isolated gastric glands.
Am.J.Physiol 266[4 Pt 1], C1013-C1027
195. Wakabayashi, S., Shigekawa, M., und Pouyssegur, J. 1997
Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers.
Physiol Rev. 77[1], 51-74
196. Waldegger, S., Fakler, B., Bleich, M., Barth, P., Hopf, A., Schulte, U.,
Busch, A. E., Aller, S. G., Forrest, J. N., Greger, R., und Lang, F.
1999
Molecular and functional characterization of s-KCNQ1 potassium
channel from rectal gland of *Squalus acanthias*.
Pflugers Arch. 437[2], 298-304
197. Wallmark, B. 1986
Mechanism of action of omeprazole.
Scand.J.Gastroenterol.Suppl 118, 11-17
198. Wallmark, B., Briving, C., Fryklund, J., Munson, K., Jackson, R.,
Mendlein, J., Rabon, E., und Sachs, G. 1987
Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase and acid secretion by SCH
28080, a substituted pyridyl(1,2a)imidazole.
J.Biol.Chem. 262[5], 2077-2084
199. Wallmark, B., Lorentzon, P., und Sachs, G. 1990
The gastric H⁺,K⁽⁺⁾-ATPase.
J.Intern.Med.Suppl 732, 3-8
200. Wang, K. S., Komar, A. R., Ma, T., Filiz, F., McLeroy, J., Hoda, K.,
Verkman, A. S., und Bastidas, J. A. 2000
Gastric acid secretion in aquaporin-4 knockout mice.
Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 279[2], G448-G453
201. Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M.,
VanRaay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., de
Jager, T., Schwartz, P. J., Toubin, J. A., Moss, A. J., Atkinson, D.
L., Landes, G. M., Connors, T. D., und Keating, M. T. 1996
Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1
mutations cause cardiac arrhythmias.
Nat.Genet. 12[1], 17-23
202. Warth, R., Hamm, K., Bleich, M., Kunzelmann, K., von Hahn, T.,
Schreiber, R., Ullrich, E., Mengel, M., Trautmann, N., Kindle, P.,
Schwab, A., und Greger, R. 1999
Molecular and functional characterization of the small Ca⁽²⁺⁾-
regulated K⁺ channel (rSK4) of colonic crypts.
Pflugers Arch. 438[4], 437-444

203. Warth, R., Riedemann, N., Bleich, M., Van Driessche, W., Busch, A. E., und Greger, R. 1996
The cAMP-regulated and 293B-inhibited K⁺ conductance of rat colonic crypt base cells.
Pflugers Arch. 432[1], 81-88
204. Weiss, H. und Lang, F. 1992
Ion channels activated by swelling of Madin Darby canine kidney (MDCK) cells.
J.Membr.Biol. 126[2], 109-114
205. Whalley, D. W., Hool, L. C., Ten Eick, R. E., und Rasmussen, H. H. 1993
Effect of osmotic swelling and shrinkage on Na(+)-K⁺ pump activity in mammalian cardiac myocytes.
Am.J.Physiol 265[5 Pt 1], C1201-C1210
206. Wolosin, J. M. und Forte, J. G. 1983
Kinetic properties of the KCl transport at the secreting apical membrane of the oxyntic cell.
J.Membr.Biol. 71[3], 195-207
207. Wolosin, J. M. und Forte, J. G. 1984
Stimulation of oxyntic cell triggers K⁺ and Cl⁻ conductances in apical H⁺-K⁺-ATPase membrane.
Am.J.Physiol 246[5 Pt 1], C537-C545
208. Wolosin, J. M. und Forte, J. G. 1985
K⁺ and Cl⁻ conductances in the apical membrane from secreting oxyntic cells are concurrently inhibited by divalent cations.
J.Membr.Biol. 83[3], 261-272
209. Xu, H., Cui, N., Yang, Z., Qu, Z., und Jiang, C. 2000
Modulation of kir4.1 and kir5.1 by hypercapnia and intracellular acidosis.
J.Physiol 524 Pt 3, 725-735
210. Yang, I. C., Scherz, M. W., Bahinski, A., Bennett, P. B., und Murray, K. T. 2000
Stereoselective interactions of the enantiomers of chromanol 293B with human voltage-gated potassium channels.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 294[3], 955-962
211. Yang, W. P., Levesque, P. C., Little, W. A., Conder, M. L., Shalaby, F. Y., und Blannar, M. A. 1997
KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94[8], 4017-4021

LITERATURVERZEICHNIS

212. Yang, Y. und Sigworth, F. J. 1998
Single-channel properties of IKs potassium channels.
J.Gen.Physiol 112[6], 665-678
213. Yang, Z., Xu, H., Cui, N., Qu, Z., Chanchevalap, S., Shen, W., und Jiang, C. 2000
Biophysical and molecular mechanisms underlying the modulation of heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channels by CO₂ and pH.
J.Gen.Physiol 116[1], 33-45

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Gregor für die Möglichkeit an seiner Klinik wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Ich danke Frau PD Dr. U. Seidler für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit in Ihrer Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. O. Bachmann für die Einführung in die experimentellen Methoden, sowie für die konstruktive und motivierende Unterstützung und Beratung in allen methodischen und thematischen Aspekten.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. I. Blumenstein für Ihre konstruktive Kritik und Hilfe in vielen Bereichen bedanken.

Frau Dr. H. Rossmann danke ich für Ihre ständige Hilfsbereitschaft und die Abbildung Nr. 2.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. G. Lamprecht für die Überlassung der Pufferkurve für Parietalzellen.

Schließlich gilt mein Dank noch der ganzen hier nicht namentlich erwähnten, Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und den kollegialen Umgang.

Lebenslauf

Name: Alexander Tobias Heinzmann

Geboren: 17.03.1976 in Reutlingen

Eltern: Manfred Heinzmann
Ingrid Heinzmann

Schul Ausbildung

1983-1986: Eduard-Spranger-Grundschule in Reutlingen

1986-1995: Johannes-Kepler-Gymnasium in Reutlingen

Studium

1996-2003: Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

04.09.1998: Ärztliche Vorprüfung

31.08.1999: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

26.03.2002: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08.05.2003: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung