

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

**Untersuchungen zum Mechanismus und zur
Regulation der intestinalen Anionensekretion im
Duodenum des Kaninchens**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Stefanie Spiegel, geb. Christiani

aus Aachen

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Frau Professor Dr. U. Seidler
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Sessler

meinen Eltern gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Jacob P., **Christiani S.**, Rossmann H., Lamprecht G., Vieillard B., Muller R., Gregor M. & Seidler U. (2000): Role of $\text{Na}^+ \text{HCO}_3^-$ -cotransporter NBC1, Na^+/H^+ exchanger NHE1, and carbonic anhydrase in rabbit duodenal bicarbonate secretion. *Gastroenterology*, 119, 406-419

Spiegel S., Phillipper M., Rossmann H., Riederer B., Gregor M. & Seidler U. (2003): Independence of apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -exchange and anion conductance in duodenal HCO_3^- -secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, im Druck

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Schutzmechanismen des Duodenum.....	1
1.1.1	Die duodenale Mukusschicht	1
1.1.2	Die duodenale Bikarbonatsekretion.....	2
1.1.2.1	Allgemeines	2
1.1.2.2	Regulation.....	3
1.2	Transportproteine des Duodenozyten.....	5
1.2.1	Allgemeines	5
1.2.2	Apikal lokalisierte Transportproteine.....	7
1.2.2.1	Apikaler Anionenaustausch.....	7
1.2.2.2	Das CFTR-Protein	10
1.2.2.2.1	Zystische Fibrose.....	10
1.2.2.2.2	Eigenschaften des CFTR-Proteins.....	10
1.2.3	Die Bikarbonat-Bereitstellung durch den Duodenozyten.....	12
1.2.3.1	Der basolateral lokalisierte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter.....	12
1.2.3.2	Die Rolle der Karboanhydrase	13
1.2.3.3	Intestinaler Na^+/H^+ -Austausch	13
1.2.3.4	Basolateral lokalisierter Cl^- -Import	15
1.3	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Chemikalien und Abkürzungen.....	17
2.1.2	Verwendete Geräte	20
2.1.3	Versuchstiere	20
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Das Kurzschlussstromexperiment	21
2.2.2	pH-stat-Titration	22

2.2.3	Aufbau des Ussing-Kammer-Setups	24
2.2.4	Transepitheliale Fluxmessungen	25
2.2.5	Operation des Kaninchens	25
2.2.6	Präparation des Duodenums	26
2.2.7	Verwendete Reagenzien	27
2.2.8	Versuchsschemata	29
2.2.8.1	Allgemeines Vorgehen	29
2.2.8.2	Veränderung der ionalen Zusammensetzung des Perfusats	29
2.2.8.3	Hemmung einzelner Ionentransportmechanismen	30
2.2.8.3.1	Blockade des serosal lokalisierten $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporters (NKCC)	30
2.2.8.3.2	Blockade des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches und des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransports durch DIDS	30
2.2.8.3.3	Hemmung der Karboanhydrase durch Azetazolamid.....	30
2.2.8.3.4	Blockade des zellulären Na^+/H^+ -Austausches	31
2.2.8.3.5	Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase	31
2.2.8.3.6	Hemmung neuronaler Natriumkanäle	32
2.2.8.4	Durchführung der radioaktiven ^3H -Mannitol, ^{36}Cl lorid und ^{22}Na trium-Fluxe	32
2.2.9	Auswertung und Statistik	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Grundprinzipien der Versuchsdurchführung.....	35
3.2	Messungen der Bikarbonatsekretion und des Kurzschlussstromes	36
3.2.1	Verlauf der Bikarbonatsekretion und des Isc nach Stimulation mit 8-Br-cAMP, Bumetanid und Ouabain.....	36
3.2.2	Verlauf von Bikarbonatsekretion und Isc unter luminal Cl^- -freien Bedingungen.....	38
3.2.3	Effekt von luminal appliziertem DIDS [1 mM] auf die Stimulation mit 8-Br-cAMP	40
3.2.4	Verlauf von Bikarbonatsekretion und Isc unter bilateral Cl^- -freien Bedingungen.....	42

3.2.5	Stimulation mit 8-Br-cAMP in bilateraler Abwesenheit von Cl ⁻ -Ionen und luminaler Anwesenheit von DIDS [1 mM]	44
3.2.6	Auswirkungen der Stimulation durch 8-Br-cAMP [1 mM] auf die Bikarbonatsekretion und den Isc in serosaler Anwesenheit von Bumetanid [0,5 mM]	46
3.2.7	Effekt serosaler Abwesenheit von CO ₂ /HCO ₃ ⁻ auf Bikarbonatsekretion und Isc	47
3.2.8	Auswirkung der serosalen Anwesenheit von DIDS [1 mM] auf die 8-Br-cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion und den Isc	48
3.2.9	Effekt von serosal appliziertem DIDS [3 mM] auf die 8-Br-cAMP-medierte Bikarbonatsekretionsantwort und den Isc	50
3.2.10	Hemmung der Karboanhydrase durch Azetazolamid [1 mM]: Auswirkung auf die 8-Br-cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion und den Isc	51
3.2.11	Effekt von serosal appliziertem DIDS [1 mM] und Azetazolamid [1 mM] auf die 8-Br-cAMP-medierte Bikarbonatsekretionsantwort und den Isc	53
3.2.12	Selektive Hemmung des NHE1 durch Hoechst 642 [1 µM]: Auswirkung auf die 8-Br-cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion und den Isc	54
3.2.13	Effekt von Hoechst 642 [1 µM] und DIDS [1 mM] serosal auf die 8-Br-cAMP medierte Bikarbonatsekretionsantwort und den Isc	56
3.2.14	Die 8-Br-cAMP-medierte Bikarbonatsekretionsantwort und der Isc-Verlauf nach serosaler Applikation von DIDS [1 mM], Hoechst 642 [1µM] und DMA [0,5 mM]	57
3.2.15	Effekt von serosal appliziertem Hoechst 642 [1 µM] und bilateral appliziertem Azetazolamid [1 mM] auf die 8-Br-cAMP-medierte Bikarbonatsekretionsantwort und den Isc	58
3.3	Radioaktive Fluxmessungen	59
3.3.1	Bidirektionale ³ H Mannitol Fluxe	60
3.3.1.1	Änderung des transepithelialen duodenalen ³ H-Mannitolfluxes von serosal nach mukosal nach Stimulation mit 8-Br-cAMP [1m M]	60
3.3.1.2	Vergleich der Bikarbonatsekretionsrate und des transepithelialen ³ H- Mannitol-Fluxes unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit 8-Br-cAMP	61

3.3.2	Bidirektionale $^{36}\text{Cl}^-$ -Fluxe	62
3.3.2.1	Effekt von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den duodenalen bidirektionalen $^{36}\text{Cl}^-$ -Flux unter „open-circuit-current“-Bedingungen	63
3.3.2.2	Effekt von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den duodenalen bidirektionalen $^{36}\text{Cl}^-$ -Flux unter „short-circuit-current“-Bedingungen	65
3.3.3	Bidirektionale $^{22}\text{Na}^+$ Fluxe	66
3.3.3.1	Bidirektionaler $^{22}\text{Na}^+$ -Flux unter basalen Bedingungen und unter Einwirkung von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM]	66
4	Diskussion.....	69
4.1	Methode.....	69
4.1.1	Grundsätzliches	69
4.1.2	Mukosapräparation	69
4.1.3	Durchgeführte Messungen an der Ussingkammer.....	70
4.1.3.1	pH-stat-Titration	70
4.1.3.2	Kurzschlussstromexperiment	70
4.1.3.3	Radioaktive Fluxmessungen.....	71
4.2	Durchgeführte Versuche.....	71
4.2.1	Allgemeines.....	71
4.2.2	Funktionelle Differenzierung der elektrogenen und elektroneutralen duodenalen Bikarbonatsekretion	72
4.2.2.1	Kontrollversuch	72
4.2.2.2	Inhibition des apikalen Anionenaustauschers	74
4.2.2.2.1	Das DRA-Protein	74
4.2.2.2.2	Hemmung des apikalen Anionenaustausches durch luminalen Cl^- -Ersatz	75
4.2.2.2.3	Hemmung des apikalen Anionenaustausches durch DIDS.....	77
4.2.2.2.4	Die Rolle einer Leitfähigkeit für Cl^- -Ionen in der basalen und stimulierten Bikarbonatsekretion.....	78

4.2.2.3	Bilaterale Hemmung Cl ⁻ -abhängiger Transportmechanismen	80
4.2.2.4	Blockade des basolateral gelegenen NKCC	82
4.2.2.5	Bidirektionale Fluxstudien für ³ H-Mannitol, ³⁶ Cl ⁻ und ²² Na ⁺ unter Kontrollbedingungen	83
4.2.3	Untersuchung unterschiedlicher Systeme zur duodenalen epithelialen Bikarbonatbereitstellung und deren Regulation	85
4.2.3.1	Versuchsdurchführung in serosaler Abwesenheit von CO ₂ /HCO ₃ ⁻	92
4.2.3.2	Inhibition des basolateral gelegenen Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ -Kotransporters ..	93
4.2.3.3	Hemmung der intrazellulären Karboanhydrase	94
4.2.3.4	Selektive Blockade verschiedener Isoformen des Na ⁺ /H ⁺ - Austauschers	96
5	Zusammenfassung	100
6	Abbildungen und Tabellen	103
7	Literatur	108
8	Danksagung	121
9	Lebenslauf	123

1 Einleitung

1.1 Schutzmechanismen des Duodenums

Die gastroduodenale Mukosa verteidigt sich äußerst effektiv gegen die vielfältigen täglich auf sie einwirkenden exogenen und körpereigenen Noxen wie die Magensäure und das Pepsin. Schon seit rund 200 Jahren erforscht man die Schutzmechanismen, die verhindern, dass sich der Magen und das Duodenum selbst verdauen. Pavlov schlug bereits 1898 vor, dass die luminale Magensäure durch eine alkalisierte Schleimschicht neutralisiert wird. Als weitverbreitete Folge einer Störung der gastroduodenalen Verteidigungsmechanismen ist das Magen- bzw. Duodenalulkus zu nennen, dessen Ätiologie in den vergangenen 25 Jahren Gegenstand intensiver Forschung war. Besonders die letzten Jahre haben durch die Entdeckung der entscheidenden Rolle des *Helicobacter pylori* (103) in der Pathogenese der Ulkuserkrankung großen Erkenntnisgewinn erbracht.

Einige Autoren teilen die duodenale Abwehr gegen schädigende Einflüsse in drei Phasen ein: zum einen in die präepithelialen (alkalinisierte Mukusschicht) und die epithelialen (tight junctions sowie plasmamembranärer Ionentransport), zum anderen in die postepithelialen Faktoren (Mikrozirkulation, Entzündungszellen und nervale Regulation) (6). Auf einige dieser Faktoren soll hier näher eingegangen werden.

1.1.1 Die duodenale Mukusschicht

Eine hochvisköse, zu 95% aus Wasser und zu 3-5% aus charakteristischen Glykoproteinen bestehende Schleimschicht, die auch geringe Mengen an Lipiden, Nukleinsäuren und andere Proteine enthält und von den Becherzellen und Brunner'schen Drüsen hergestellt wird (41), bedeckt die Gesamtoberfläche der intestinalen Mukosa und damit auch das Duodenalepithel, das seinerseits HCO_3^- -Ionen in diese hinein sezerniert. Sie wird auch als „unstirred layer“ oder „strömungsfreie Schicht“ bezeichnet, dient als Gleitschicht für den Nahrungsbrei und stellt zusammen mit dem vom Duodenalepithel sezernierten Bikarbonat eine wirksame Barriere gegen die luminale Säure, Verdauungs-

enzyme und exogenen Noxen dar. Auf diese Weise wird ein pH-Gradient zwischen Epithelzelloberfläche und Magen- bzw. Darmlumen geschaffen (87). Am Duodenum der Ratte ist gezeigt worden, dass sie den Durchtritt von bestimmten Makromolekülen wie zum Beispiel bakteriellen Toxinen (41;79) und auch das Eindringen einer Vielzahl chemischer Substanzen (7) verhindern kann. Sogenannte von den Epithelzellen produzierte „Kleeblatt-Peptide“ scheinen an der Stabilität der Mukusschicht maßgeblich beteiligt zu sein (79). Die Intaktheit dieser Schleimschicht zählt zusammen mit der epithelialen Bikarbonatsekretion zu den wichtigsten Schutzmechanismen des Duodenalepithels. Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente sollten von diesen Mechanismen die duodenale Bikarbonatsekretion näher charakterisieren.

1.1.2 Die duodenale Bikarbonatsekretion

1.1.2.1 Allgemeines

Die Duodenalmukosa wird durch 4 verschiedene Zelltypen repräsentiert: den hochprismatischen Enterozyten, die am apikalen Zellpol durch einen Schlussleistenkomplex fest miteinander verbunden sind, den muzinsezernierenden Becherzellen (die im Duodenum eine nur geringe Dichte aufweisen), den hormonproduzierenden enteroendokrinen Zellen, und den Paneth'schen Körnerzellen, die sowohl bakteriostatische als auch digestive Funktionen ausüben zu scheinen. Die zu Plicae circulares aufgeworfene Dünndarmmukosa besitzt zusätzlich dicht stehende Villi intestinales. An der Basis der Villi oder Zotten münden kurze, schlauchförmige Darmdrüsen, die Krypten. Dementsprechend unterscheidet man im Dünndarm Villus- und Kryptenzellen, wobei ersteren hauptsächlich resorptive und letztgenannten sekretorische Funktionen zugeschrieben werden. Insgesamt bedeutet diese Schleimhutanordnung eine enorme, für die Funktion des Dünndarms erforderliche Oberflächenvergrößerung. In der Submukosa des Duodenums befinden sich die sogenannten „Brunner'schen Drüsen“, die teilweise die Lamina muscularis mucosae durchbrechen und ein muzin- und bikarbonatreiches, alkalisches Sekret ins Lumen abgeben (35). Sie liegen proximal in höherer Dichte als distal vor und wurden in früheren Arbeiten oft alleine für die Bikarbonatsekretion im Duodenum verantwortlich gemacht, unter anderem deshalb, weil im proximalen Duodenum in mehreren

Arbeiten eine höhere Bikarbonatsekretionsrate als im distalen Duodenum gefunden wurde (71). Diese nach distal hin abnehmende Sekretion weisen jedoch auch Spezies auf, deren Duodenum keine Brunner'schen Drüsen besitzt (39). Ainsworth et al. schließlich konnten beweisen, dass die duodenale Bikarbonatsekretion von den Oberflächenepithelzellen und nicht von den Epithelien der Brunner'schen Drüsen ausgeht (4).

1.1.2.2 Regulation

Die Regulation der duodenalen Bikarbonatsekretion *in vivo* beinhaltet ein teilweise noch nicht verstandenes komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Neurotransmitter und Hormone (57). Bereits gut untersucht ist die Wirkung einiger Substanzen auf die Bikarbonatsekretion sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, wobei hier auf einige Sachverhalte kurz eingegangen werden soll. Es ist schon seit längerem bekannt, dass sich die elektrogene Bikarbonatsekretion durch cAMP-, cGMP- und Ca^{2+} -abhängige Analoga steigern lässt (59;137). Der second messenger cAMP entsteht durch die Katalyse des Enzyms Adenylatzyklase, welches ein Membranenzym darstellt, das über große G- Proteine mit aktivierenden und inhibierenden Hormonrezeptoren verknüpft ist. Die Steigerung der intestinalen Bikarbonatsekretion durch cAMP- Analoga oder Stimulantien, die zur Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen (wie z.B. Forskolin, VIP, Prostaglandine, Glukagon, Phosphodiesteraseinhibitoren, welche die cAMP-abbauende Phosphodiesterase hemmen, und Sekretin) wurde in mehreren Arbeiten nachgewiesen (7;158). Dieser Signaltransduktionsweg läuft unabhängig von intrazellulärem Ca^{2+} ab (57). Das hitzestabile E.coli Enterotoxin STa und das 1992 von Currie et al (32) im Dünndarm der Ratte beschriebene Peptid Guanylin stimulieren im Dünndarm als endogene Liganden am STa-Rezeptor eine elektrogene Cl^- -Sekretion, ein Vorgang, an dem das „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR)-Protein offenbar beteiligt ist. Der Signaltransduktionsweg beinhaltet die Erhöhung des second messenger cGMP (zyklisches cGMP) durch die an der luminalen Membran des Enterozyten lokalisierte Guanylatzyklase GK-C (48;98). Ebenfalls beschrieben wurde eine durch Guanylin bzw. STa ausgelöste elektrogene Bikarbonatsekretion im Duodenum der Ratte, die wahrscheinlich ebenfalls durch das CFTR-Protein vermittelt wird (28;33;54). Das zyklische GMP aktiviert seinerseits eine cGMP-abhängige Proteinkinase, die in nahezu allen Zellen als PKGI und ausschließlich in den Enterozyten als PKG II vorkommt. Über die-

sen Signaltransduktionsweg kommt es schließlich zur Aktivierung des CFTR Kanals. Carbachol führt ebenfalls zu einer Erhöhung der intestinalen Cl⁻-Sekretion, allerdings über einen Ca²⁺-abhängigen Signaltransduktionsweg (34). Auch die Bikarbonatsekretion im Duodenum des Kaninchens (60) und im Jejunum der Maus (137) wird hierdurch gesteigert. Intrazelluläres Ca²⁺ scheint demnach ein wichtiger Mediator der intestinalen Bikarbonatsekretion zu sein.

Einen weiteren wichtigen Faktor zur Steigerung der duodenalen Bikarbonatsekretion stellt die luminale Ansäuerung dar. Dieser Effekt wurde *in vitro* und *in vivo* an verschiedenen Spezies, der menschlichen eingeschlossen, gezeigt (57). CFTR scheint ebenfalls an der säurestimulierten Bikarbonatsekretion beteiligt zu sein (58).

Zu den inhibitorischen Faktoren, die experimentell in verschiedenen Spezies *in vivo* oder *in vitro* zu einer Verminderung der duodenalen Bikarbonatsekretion führten, zählen unter anderem Anoxie (141;142), Azidose (151), Atropin, Zyklooxygenaseinhibitoren, DIDS, Ethanol, Indometazin und Ouabain (39;57;108). Außerdem wurde bei Patienten mit Duodenalulkus eine verminderte basale und säurestimulierte Bikarbonatsekretion gefunden (73).

Da sie für die vorliegende Arbeit nur von geringer Bedeutung ist, soll hier auf die nervale Regulation nicht näher eingegangen werden, erwähnt sei nur am Rande, dass es in der Literatur viele Hinweise darauf gibt, dass die autonome Innervation durch Sympathikus und Parasympathikus sowie das intrinsische Nervensystem des Darmes eine wichtige Rolle in der duodenalen Bikarbonatsekretion spielen (7;14;42;44;56;61;94;109). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des Nervensystems auf die Bikarbonatsekretion und den Isc durch die Mukosapräparation und die Zugabe von TTX [10⁻⁶ M] weitestgehend ausgeschaltet.

1.2 Transportproteine des Duodenozyten

1.2.1 Allgemeines

Die Erkenntnisse über die molekularen Transportmechanismen in den verschiedenen organspezifischen Epithelien haben in den letzten Jahren einen enormen Zuwachs erfahren. Molekularbiologische Daten zu einzelnen Transportproteinen ermöglichen es, genauere Schlussfolgerungen aus rein funktionellen Daten zu ziehen. Abbildung 1 zeigt ein aktuelles Modell eines duodenalen Enterozyten. Dargestellt sind sowohl in der Membran befindliche Transportproteine als auch stark vereinfachte Schemata bestimmter für die Bikarbonatsekretion relevanter Signaltransduktionswege.

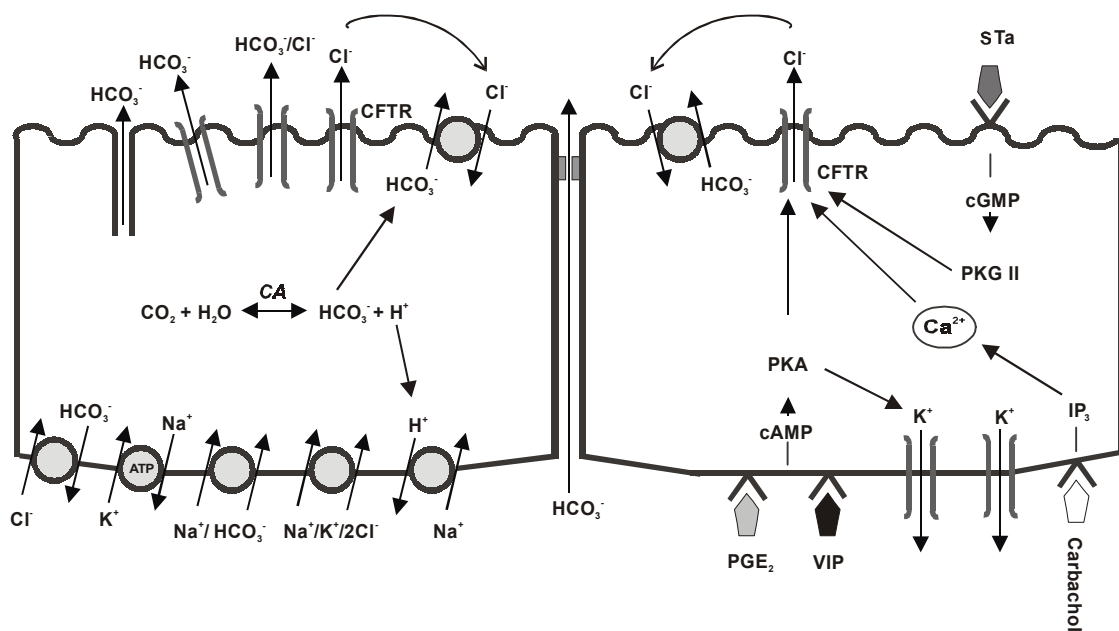


Abbildung 1: Schemazeichnung eines Duodenozyten

Grundsätzlich muss die aktive, über transzelluläre Mechanismen medierte Bikarbonatsekretion von der parazellulären, passiven Diffusion, über die HCO_3^- -Ionen von der Blutseite ins Lumen gelangen, unterschieden werden. Je nach Spezies stehen diese Anteile in einem bestimmten Verhältnis zueinander.

Bereits vor zwanzig Jahren beobachteten Simson et al., die Ussingkammer-Experimente an isolierten Duodenalepithelien des Ochsenfrosches (einer Spezies, deren Duodenum keine Brunner'schen Drüsen besitzt) durchführten, dass die epitheliale Bikarbonatsekretion auf die Erhöhung entweder des CO_2 -Partialdruckes oder der HCO_3^- -Konzentration im serosalen Perfusat mit einem in eine Sättigung mündenden Anstieg reagierte, dieser jedoch unter Anoxie-Bedingungen erheblich geringer ausfiel, was sie auf die Beteiligung aktiver Transportprozesse an der Sekretion schließen ließ. Sie schlugen vor, dass abhängig von der Anwesenheit von HCO_3^- -Ionen im serosalen Perfusat 50-60% des Bikarbonats aktiv sezerniert werden, 30-40% durch passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten ins Lumen gelangen, und die restlichen 10% der zelleigenen HCO_3^- -Produktion, die durch die Karboanhydrase katalysiert wird, entstammen (141). Dass HCO_3^- -Ionen nicht alleine durch passive Diffusion von der Blutseite ins Darmlumen gelangen, zeigten auch Odes et al. 1990 (114). Simson et al. zeigten weiterhin, dass der transzelluläre, also aktive HCO_3^- -Transport im Froschduodenum unter Basalbedingungen elektrogen, von serosal befindlichem Na^+ abhängig, jedoch Cl^- -unabhängig und Ouabain-sensitiv ist (142). Aufgrund der erhobenen Daten schlugen sie zwei Modelle für den duodenalen Bikarbonattransport hinsichtlich der HCO_3^- -Aufnahme und Sekretion vor. Das erste beinhaltet die Aufnahme des HCO_3^- -Ions über einen elektroneutralen, an der basolateralen Zellmembran lokalisierten $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter. Das entlang seines elektrochemischen Gradienten mitaufgenommene Na^+ verlässt die Zelle wieder über die ebenfalls basolateral befindliche Ouabain-sensitive Na^+/K^+ -ATPase, die unter Energieverbrauch gegen den (von extra- nach intrazellulär gerichteten) Na^+ -Gradienten arbeitet. Das HCO_3^- -Ion wird über die apikale Zellmembran elektrogen sezerniert. Im zweiten vorgeschlagenen Modell verlässt das durch die Dissoziation von Wasser entstandene H^+ -Ion über einen basolateral lokalisierten Na^+/H^+ -Austauscher, der über den Na^+ -Gradienten betrieben wird, die Zelle, vereinigt sich im Blut mit dem dort vorhandenen HCO_3^- -Ion, wobei CO_2 entsteht, das seinerseits in die Zelle diffundiert und dort in Anwesenheit der Karboanhydrase wieder zum HCO_3^- -Ion wird. Messungen an Duodenocyten, die 1993 von Isenberg et al. durchgeführt worden waren, ergaben Hinweise auf die entscheidende Rolle dreier Säure-Basen-Transporter in der duodenalen Bikarbonatsekretion (72). Die Autoren definierten einen Amilorid-sensitiven Na^+/H^+ -Austauscher, der Säureäquivalente aus der Zelle befördert (Amilorid hemmt bestimmte

Isoformen aus der Familie der Na^+/H^+ -Austauscher), einen DIDS-sensitiven $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, der basische Äquivalente hinaus transportiert und einen ebenfalls DIDS-sensitiven $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter, der als „base loader“ fungiert, also Basenäquivalente aus dem Blut in die Zelle aufnehmen kann. Da intakte Zellen für die Messungen herangezogen worden waren, konnten die Autoren keine experimentell belegte Aussage hinsichtlich der Lokalisation der funktionell charakterisierten Transportproteine machen, sie schlugen jedoch folgendes Modell vor: Die basolaterale Zellmembran nimmt HCO_3^- -Ionen über den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter auf, zusätzlich diffundiert es in Form von CO_2 frei über die Zellmembran und wird (katalysiert durch die Karboanhydrase) intrazellulär zu HCO_3^- und H^+ umgewandelt. HCO_3^- wird über die apikale Zellmembran sowohl über elektroneutralen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch als auch über eine Anionenleitfähigkeit transportiert. Die anfallenden H^+ -Ionen werden über einen in der basolateralen Zellmembran lokalisierten Na^+/H^+ -Austauscher aus der Zelle hinaus befördert. Diese Daten, die an der Ratte erhoben wurden, konnten später auch am Kaninchen (2) und am Menschen (3) von der gleichen Arbeitsgruppe experimentell nachvollzogen werden, was für einen ähnlichen Mechanismus in allen drei Spezies spricht.

1.2.2 Apikal lokalisierte Transportproteine

1.2.2.1 Apikaler Anionenaustausch

Obwohl im Duodenum von Amphibien im Rahmen von Untersuchungen der Bikarbonatsekretion in der Ussingkammer kein Hinweis auf $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch gefunden worden war (141), mehrten sich, wie bereits im letzten Kapitel beschrieben, wenige Jahre später Hinweise, dass Säugetier-Enterozyten einen apikal lokalisierten Anionenaustauscher, der extrazelluläre Cl^- -Ionen gegen intrazelluläre HCO_3^- -Ionen austauscht, besitzen müssen. Untersuchungen an apikalen Membranvesikeln aus Ratten-Dünndarm ließen Liedtke et al. 1982 vermuten, dass die NaCl -Rückresorption hier über eine Zusammenarbeit eines Na^+/H^+ - und eines $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscherprotein zustande kommt. Der von ihnen funktionell charakterisierte Anionenaustauscher wies eine Hemmbarkeit durch SITS (4-Acetamino-4'-Isothiocyanostilben-2,2'-Disulfonat), einem schon seit Jahrzehnten bekannten Hemmstoff des Anionenaustausches (24), und auch durch Furo-

semid, einem Schleifendiuretikum, das bekanntlich den $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporter hemmt, auf. Außerdem vermuteten sie aufgrund ihrer Ergebnisse eine apikale Leitfähigkeit für Cl^- (99). Brown et al. untersuchten 1989 ebenfalls den Anionenaustausch in apikalen Membranvesikeln aus dem Duodenum der Ratte. Sie fanden ebenfalls eine SITS-sensitive $^{36}\text{Cl}^-$ -Aufnahme, die durch einen pH- und HCO_3^- -Gradienten angetrieben wurde und elektroneutral ablief. Außerdem fanden sie eine SITS-insensitive $^{36}\text{Cl}^-$ -Aufnahme, die durch den Cl^- -Kanal-Blocker DPC gehemmt wurde und schlossen aus diesen Daten auf das Vorhandensein einer apikalen elektrogenen Cl^- -Leitfähigkeit im Duodenum (21). Untersuchungen an apikalen Membranvesikeln aus unterschiedlichen Darmabschnitten verschiedener Spezies bestätigten in späteren Jahren das dortige Vorhandensein eines apikalen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers (25;125).

Inzwischen gilt es als gesichert, dass $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, oft gekoppelt mit der Funktion von Na^+/H^+ -Austauschern, wichtige Funktionen wie zum Beispiel pH_i - und Volumenhomöostase sowie die NaCl -Rückresorption im Dünndarm, Dickdarm (134) und in der Gallenblase (31) ausüben. Das Modell der NaCl -Rückresorption in den genannten Organen beinhaltet den Austausch von extrazellulärem Cl^- gegen intrazelluläres HCO_3^- durch einen in der apikalen Zellmembran befindlichen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, dessen Aktivität an die Funktion eines ebenfalls am apikalen Zellpol lokalisierten Na^+/H^+ -Austauschers, der extrazelluläres Na^+ gegen intrazelluläres H^+ austauscht, gebunden ist (88;89)

Die molekulare Identität der am duodenalen apikalen Anionenaustausch beteiligten Transportproteine ist zur Zeit noch umstritten. Die Genfamilie der Anionenaustauscher AE umfasst bisher drei bekannte Isoformen, den AE1, den AE2 und den AE3. Sie werden in vielen Organen und Zelltypen des Körpers exprimiert, sind stilbenempfindlich, tauschen unter physiologischen Bedingungen Na^+ -unabhängig extrazelluläres Cl^- gegen intrazelluläres HCO_3^- im Verhältnis 1:1 aus und agieren somit elektroneutral. Die Isoform AE1 wurde Mitte der 80er Jahre von Kopito et al. kloniert (96). AE1 wird hauptsächlich in Erythrozyten, wo er in Zusammenarbeit mit der Karboanhydrase die Transportkapazität des Blutes für CO_2 deutlich steigert (152), und in den Organen Milz und Niere exprimiert (97). Der AE2 dagegen wird in vielen epithelialen und nicht-epithelialen Geweben des Organismus gefunden, wo er einerseits eine Art „house-keeping“-Rolle übernimmt und andererseits an unterschiedlichen transepithelialen

Sekretions- und Absorptionsvorgängen beteiligt ist (8). Die Isoform AE3 schließlich wird in erregungsleitenden Geweben wie dem Herzen und dem Gehirn, jedoch auch in geringen Mengen im Intestinum exprimiert (95;97).

Als Kandidat für den apikalen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch im Ileum des Kaninchens wurde der AE2 vorgeschlagen (26). Jedoch findet sich dieses Protein in vielen Geweben in basolateraler Position (9;10;147;148). Alper et al. fanden sehr niedrige AE2-mRNA Expressionslevel in Duodenal- und Ileal-Mukosa der Maus. Weiterhin detektierten sie unter Verwendung eines anti-AE2-Antikörpers eine basolaterale Lokalisation des AE2 im Maus-Intestinum (8). Diese Daten unterstützen die Theorie, dass dem AE2 im Enterozyten lediglich eine „house keeping“-Funktion zukommt, den apikale Anionenaustausch jedoch ein anderes Protein übernimmt.

Im Jahr 1993 identifizierten Schweinfest et al. ein Gen in der menschlichen Kolonmukosa, dessen Expression in Kolonadenomen und -adenokarzinomen herunterreguliert war. Sie nannten es *dra* („down regulated in adenoma“) (136). Inzwischen sind mehrere Arbeiten erschienen, die belegen, dass es sich bei dem Protein DRA um einen membranären Anionenaustauscher handelt, der Sulfat, Oxalat, Chlorid und Bikarbonat transportiert und durch DIDS hemmbar ist (105;106;140). Die autosomal rezessiv vererbte, u.a. in Finnland aufgrund eines Gründereffekts endemisch vorkommende Chlorid-Diarrhoe, die sich durch Cl^- -reiche Stühle bei gleichzeitiger metabolischer Alkalose manifestiert (66;111), wurde auf einen Defekt des enteralen apikalen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers zurückgeführt, da die Patienten im Ileum und Kolon keine apikale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschaktivität aufweisen (67;82). Der dazugehörige Gendefekt konnte auf dem Chromosom 7q31 lokalisiert werden (85). Höglund et al. stellten im Jahre 1996 fest, dass das *dra*-Gen im genannten Abschnitt des Chromosoms 7 liegt (63). In weiteren Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe daraufhin zeigen, dass Mutationen des *dra*-Gens zur genannten angeborenen Chlorid-Diarrhoe führen (62;64). DRA kommt somit als mögliches Transportprotein für den apikal lokalisierten Anionenaustausch im Duodenum in Betracht.

1.2.2.2 Das CFTR-Protein

1.2.2.2.1 Zystische Fibrose

Die zystische Fibrose oder Mukoviszidose stellt die häufigste autosomal rezessiv vererbte Krankheit in der kaukasischen Bevölkerung dar (46). Das 1989 entdeckte *cftr*-Gen, welches für das CFTR-Protein kodiert, befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 (86;126;130) und weist im Falle von CF unterschiedliche Mutationen auf, von denen am häufigsten die Mutation $\Delta F508$ angetroffen wird. Die Krankheit manifestiert sich vor allem im Respirations- und Gastrointestinaltrakt, wobei nur homozygote Genträger erkranken. Die pulmonale Symptomatik beruht auf einer durch den pathologisch zähen Schleim bedingten fortschreitenden Obstruktion der peripheren Atemwege mit der Folge von Atelektasen, Lungenemphysem und der Ansiedelung verschiedener bakterieller Erreger. Der gesamte Gastrointestinaltrakt weist pathologische Veränderungen auf: Als häufige klinische Manifestationen sind beispielsweise das Malabsorptionssyndrom, der Mekoniumileus und das distale Obstruktionssyndrom anzutreffen. Die Obstruktion der kleinen Pankreasgänge mündet meist in eine exokrine Pankreasinsuffizienz. Als weitere durch die Erkrankung in Mitleidenschaft gezogene Organe sind die Leber (135), die Gallenblase (117) und der Urogenitaltrakt zu nennen. Trotz heutzutage üblicher intensiver symptomatischer Therapie besitzen die Patienten eine deutlich verkürzte Lebenserwartung.

1.2.2.2.2 Eigenschaften des CFTR-Proteins

CFTR ist ein Mitglied der ABC-Membrantransporter-Genfamilie, deren Mitglieder meist ATP-getriebene Transportproteine darstellen (5). Im Falle des CFTR-Proteins handelt es sich um das einzige bekannte Kanalprotein dieser Familie. Die das CFTR-Protein bildende Polypeptidkette besteht aus 1480 Aminosäuren und weist zwei gleichartige Hälften auf. Diese bestehen aus jeweils sechs transmembranären Domänen, die das eigentliche Kanalprotein bilden, zwei Nukleotid-bindenden (NBD1 und NBD2) und einer regulatorischen (R-) Domäne, welche die beiden Hälften miteinander verbindet und mehrere Phosphorylierungsstellen für die PKA, die PKC und die Ca^{2+} -Calmodulin-Kinase aufweist (46;93). Der Einzelkanal weist unter Anwesenheit von 150 mmol/l Cl

eine Leitfähigkeit von 8-10pS bei Raumtemperatur auf, besitzt eine lineare Strom-Spannungskurve und die Leitfähigkeitsequenz $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ (104).

Für das CFTR-Protein war anfangs wegen seiner Ähnlichkeit mit dem MDR-Protein, das ebenfalls der Genfamilie der ABC-Membrantransporter angehört, eine mögliche Funktion als ATP-getriebene Pumpe angenommen worden. In der aktuellen Diskussion setzt sich jedoch die Annahme, dass es sich hierbei um einen durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A regulierten Cl^- -Kanal handelt, immer mehr durch (12;53). Es wird angenommen, dass für die Kanalöffnung zum einen die PKA-abhängige Phosphorylierung der R-Domäne und zum anderen die Bindung und anschließende Hydrolyse von ATP an der nukleotidbindenden Domäne NBD1 notwendig ist (93). CFTR kann durch Stilbenderivate wie z.B. DIDS oder SITS nicht gehemmt werden, hingegen stellt 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)Benzoat (NPPB) eine bekannte inhibitorische Substanz dar (28).

Der gesamte Intestinaltrakt weist mit Ausnahme des Magens hohe CFTR-Expressionslevel auf, die im Duodenum am höchsten sind und im Verlauf der einzelnen Darmabschnitte nach distal hin abnehmen (37;126). Die Lokalisation am luminalen Zellpol wurde im Darm mit Hilfe der Immunhistochemie nachgewiesen (30). Die bedeutsame Rolle des CFTR als intestinale apikale Cl^- -Leitfähigkeit wurde bereits in vielen Arbeiten bestätigt (101). Über seine Beteiligung an der intestinalen und besonders an der duodenalen Bikarbonatsekretion wurden einige Arbeiten veröffentlicht. Mehrere Arbeitsgruppen haben den Kanal auf seine HCO_3^- -Leitfähigkeit hin untersucht und diese bestätigt. Die Angaben über das Verhältnis von HCO_3^- zur Cl^- -Durchlässigkeit schwanken je nach Autor zwischen 1:8 (50) bis 1:4 (51;52;70;120). Untersuchungen an trachealen Epithelzellen belegen ebenfalls eine Transportfähigkeit des CFTR-Proteins für HCO_3^- -Ionen (121;144). Seidler et al. haben 1997 anhand von pH-stat-Messungen am Dünndarm von CFTR-knockout-Mäusen und deren gesunden Geschwistern in der Ussingkammer gezeigt, dass ein funktionierendes CFTR-Protein in allen untersuchten Segmenten für eine normal hohe basale Bikarbonatsekretion und für die Agonisten-stimulierte elektrogene Bikarbonatsekretion über die drei Signaltransduktionswege, die cAMP, cGMP und Ca^{2+} als second messenger beinhalten, unabdingbare Voraussetzung ist (137). Ähnliche Ergebnisse erhielten Hogan et al. bei Untersuchungen am Duodenum von CFTR-knockout-Mäusen *in vivo*: Sie fanden ebenfalls eine signifikant ernied-

richtige basale Bikarbonatsekretion und eine fehlende Bikarbonatsekretionssteigerung nach Forskolin- oder Carbachol-Stimulation (59). Davon abweichend zeigten Pratha et al. einen stimulatorischen Effekt von STA und Carbachol für die Bikarbonatsekretion an menschlichem Duodenalbiopsien von CF-Patienten (die in speziellen Ussingkammern gemessen worden waren), während die basale und die db-cAMP-stimulierte Sekretion gegenüber der Kontrolle erniedrigt war (123). In der Literatur gibt es einige Hinweise darauf, dass CFTR an der Regulation verschiedener Ionenkanäle in der Zellmembran beteiligt ist: Es wurde beispielsweise postuliert, dass der auswärts gerichtete Cl⁻-Kanal (ORCC) durch CFTR über eine ATP-Freisetzung gesteuert wird (36;47;59). Weiterhin wurde gezeigt, dass die cAMP-abhängige Aktivierung von CFTR epitheliale Na⁺-Kanäle (EnaC) inhibiert (19;59;78;149). Außerdem scheinen auch ORCC Kanäle permeabel für das HCO₃⁻-Ion zu sein (150).

1.2.3 Die Bikarbonat-Bereitstellung durch den Duodenozyten

1.2.3.1 Der basolateral lokalisierte Na⁺/HCO₃⁻-Kotransporter

Na⁺/HCO₃⁻-Kotransport ist als erstes im proximalen Tubulus der Niere beschrieben worden, wo er in der basolateralen Zellmembran lokalisiert ist und für die elektrogene Rückresorption von Na⁺ und HCO₃⁻ ins Blut verantwortlich ist (18). Was den Gastrointestinaltrakt betrifft, wurde bisher an Duodenozyten des Kaninchens und des Menschen Na⁺/HCO₃⁻-Kotransport funktionell nachgewiesen (2;3;80); eine andere Arbeit hält die basolaterale Aufnahme des HCO₃⁻-Ions über diesen Weg zumindest für sehr wahrscheinlich (72). In der Literatur sind bereits mehrere NBC-Isoformen bekannt. Romero et al klonierten 1997 einen Na⁺/HCO₃⁻-Kotransporter aus der Niere des Salamanders (129). Schnell wurde diese Isoform auch in anderen Spezies nachgewiesen (22;128). Die Klonierung der Isoform NBC2 gelang 1998 aus der menschlichen Retina (74), woraufhin die zuerst entdeckte Isoform die Bezeichnung NBC1 erhielt. Zwei weitere Isoformen wurden im Jahr darauf von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen kloniert, welche die Namen mNBC3 (124) und kNBC3 (11) erhielten. Während NBC1 elektroden transportiert (das Verhältnis Na⁺:HCO₃⁻ beträgt entweder 1:3 oder 1:2), konnte für den kNBC3 mittlerweile gezeigt werden, dass er Na⁺ und HCO₃⁻ im gleichen Verhältnis

transportiert, also elektroneutral arbeitet. Deswegen wird kNBC3 in neueren Arbeiten als NBCn1 bezeichnet. Inzwischen sind aus verschiedenen Geweben und Spezies weitere NBC-Varianten kloniert worden. Da die vielverzweigte Datenlage keine Relevanz für die vorliegende Arbeit besitzt, soll hier nicht näher auf diese Thematik eingegangen werden.

1.2.3.2 Die Rolle der Karboanhydrase

Von den sieben bekannten Isoenzymen der Karboanhydrase CA I bis CA VII spielt im Gastrointestinaltrakt die CA II die bedeutendste Rolle, wo sie in den Epithelzellen für die Katalyse der Reaktion $[\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+]$ zuständig ist und somit neben einem $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransportsystem für die HCO_3^- -Bereitstellung des Duodenozyten in Frage kommt. Azetazolamid gilt bereits ab einer Konzentration von 0,1 mM als potenter Inhibitor der CA (118). Er kam in der vorliegenden Arbeit mit dem Ziel der weiteren Abklärung der Rolle der Karboanhydrase in der duodenalen Bikarbonatbereitstellung zum Einsatz. Im Diskussionsteil (Abschnitt 4.2.3.3) wird auf die Eigenschaften dieses Inhibitors näher eingegangen werden.

1.2.3.3 Intestinaler Na^+/H^+ -Austausch

Zellulärer Na^+/H^+ -Austausch ist bereits vor über zwanzig Jahren an Nieren- und Dünndarmvesikeln nachgewiesen worden (107). Inzwischen ist bekannt, dass dieser Transportmechanismus an vielen zellulären Funktionen wie Regulation des pH_i des Zellvolumens, des Salz- und Wasserhaushaltes, sowie der Zellproliferation und -migration grundlegend beteiligt ist. Auf eine bedeutsame Rolle dieses Transportmechanismus bei der duodenalen Bikarbonatsekretion wiesen Untersuchungen an Duodenozyten des Kaninchens, der Ratte und des Menschen hin (2;3;72). Auf molekularer Ebene stellen Na^+/H^+ -Austauscher Transportproteine dar, die intrazelluläre H^+ gegen extrazelluläre Na^+ -Ionen mit einer 1:1-Stöchiometrie austauschen und damit elektroneutral arbeiten. Die Aktivität wird durch den Abfall des pH_i gesteigert, eine Umkehr der Transportrichtung ist möglich. Bekannt sind bisher die 6 Isoformen: NHE1 bis NHE6, wobei NHE1 bis NHE4 in Epithelzellen exprimiert werden, NHE5 und NHE6 dagegen nicht (29). Für den Gastrointestinaltrakt bedeutsam scheinen die Isoformen NHE1-4 zu sein. Über die funktionelle Bedeutung der genannten Isoformen im Duodenum ist bisher wenig be-

kannt. Untersuchungen an Maus-Duodenozyten, die sich mit der Na^+ -abhängigen Erholung des pH_i befassten, gaben Hinweise darauf, dass die Isoformen NHE1-NHE3 an der duodenalen pH_i -Regulation zumindest in der Maus beteiligt sind (122). Ein großer Teil der intestinalen NaCl -Resorption wird über die gekoppelte Funktion von $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch und Na^+/H^+ -Austausch in der apikalen Membran erreicht, wobei die NHE-Isoformen NHE2 und NHE3 involviert sind (134;138;157).

NHE1 ist in allen untersuchten Säugetierzellen basolateral zu finden und in der Funktion eines sogenannten „house keeping“ Transportproteins unter anderem an der intrazellulären pH - und Volumen-Homöostase beteiligt. NHE1 ist durch das Amilorid-Derivat DMA mit bedeutend höherer Spezifität hemmbar als durch Amilorid selber (29). Neuere kompetitive Inhibitoren sind die Substanzen HOE 694 und HOE 642, wovon letzteres in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ ausschließlich den NHE1 inhibiert (133).

NHE2 wird hauptsächlich in der Niere und im Gastrointestinaltrakt exprimiert (115). In der Literatur werden sowohl (im menschlichen Jejunum, Ileum und Kolon sowie im Jejunum und Ileum des Kaninchens) eine apikale (68) als auch (im Sammelrohr der Niere der Maus) eine basolaterale Lokalisation (146) diskutiert. Auch NHE2 ist durch Amilorid, DMA und Hoechst 642 konzentrationsabhängig hemmbar. Über seine Funktion ist wenig bekannt, eine Arbeit zeigt jedoch, dass sich NHE2 in solchermaßen transfizierten ursprünglich NHE-defizienten Zellen an der Volumen- und pH_i -Regulation beteiligt (84). Experimente, die an NHE2-knockout-Mäusen durchgeführt wurden, gaben Hinweise darauf, dass NHE2 für eine normale Funktion von Parietalzellen notwendig zu sein scheint, so wurde an einem NHE2-knock-out-Mausmodell eine reduzierte Anzahl von Parietalzellen im Magen beobachtet (138).

NHE3 wurde von Brant et al kloniert (20). Die Arbeitsgruppe fand diese Isoform in Niere, Magen, Jejunum, Ileum und Colon ascendens, jedoch nicht im Duodenum und Colon descendens des Kaninchens (159;160). Praetorius et al. wiesen jedoch im Jahr 2000 mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot NHE3-mRNA auch im Mäuseduodenum nach (122). Sowohl im proximalen Tubulus der Niere des Kaninchens (15) als auch im Ileum und Kolon der Ratte (16) wurde eine apikale Lokalisation des Transporters nachgewiesen. Auch hier besteht eine konzentrationsabhängige Hemmbarkeit durch Amilorid und DMA. NHE3-knockout-Mäuse weisen eine schwere intestinale Absorptionsstö-

zung begleitet von Diarrhöen und eine mäßige Hochregulation von DRA im Kolon auf (105).

NHE 4 wurde im Magen, Dünndarm, Kolon, Niere, Gehirn und einigen weiteren Organen nachgewiesen, über seine Funktion ist nicht viel bekannt. Immunhistochemische Untersuchungen sprechen eher für eine Lokalisation in der basolateralen Zellmembran (119). NHE4 ist Amilorid-insensitiv, lässt sich in transfizierten Fibroblasten jedoch durch das Amilorid-Derivat DMA [0,5 mM] hemmen (17).

1.2.3.4 Basolateral lokalisierter Cl⁻-Import

Die zelluläre Aufnahme von Cl⁻-Ionen ist für die intestinale Bikarbonatbereitstellung und -sekretion von großer Bedeutung, da der Transport dieser beiden Ionen oft direkt oder indirekt gekoppelt vonstatten geht. Der Na⁺K⁺2Cl⁻-Kotransporter (NKCC) gehört zur Familie der Kation-gekoppelten Cl⁻-Kotransporter und spielt eine ganz entscheidende Rolle in unterschiedlichsten epithelialen Absorptions- und Sekretionsvorgängen (138). Bis heute sind zwei Isoformen des Transportproteins bekannt geworden: NKCC1 und NKCC2. Cl⁻-absorbierende Zellen zeigen eine Lokalisation des NKCC2 in ihrer apikalen Membran, NKCC1 hingegen findet sich in der basolateralen Membran Cl⁻-sezernierender Zellen, worunter die Darmepithelien fallen. Der Transport ist elektro-neutral: die Stöchiometrie beträgt 1:1:2. Das Schleifendiuretikum Bumetanid hemmt den NKCC1 konzentrationsabhängig und reversibel mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von ca. 10⁻⁷ M (132). In dieser Arbeit sollte die funktionelle Bedeutung dieses Transportmechanismus bei der duodenalen Bikarbonatsekretion näher eingegrenzt werden, jedoch lag der Schwerpunkt der Arbeit auf der Charakterisierung der bereits oben aufgeführten Transportproteine.

Am Rande sei noch erwähnt, dass sich auf der basolateralen Zellmembran des Duodenozyten ebenfalls ein Anionenaustauscher befindet, der Cl⁻ im Austausch gegen HCO₃⁻ in die Zelle einschleust und stilbenempfindlich ist. Er ist im Dünndarm bereits vor längerer Zeit funktionell charakterisiert worden (90;116;156). Vor kurzem konnten Petra Jacob und Manuela Nader aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass auch im Duodenum des Kaninchens basolateraler Anionenaustausch stattfindet. Dieser Transportmechanismus weist die funktionellen Eigenschaften eines AE2 auf und spielt im Duodenum des Kaninchens wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle (79;131).

1.3 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen und die Regulation der Bikarbonatsekretion im Duodenum des Kaninchens unter basalen und stimulierten Bedingungen näher zu charakterisieren. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welche am apikalen Zellpol befindlichen elektroneutral oder elektrogen arbeitenden Transportmechanismen sind an der basalen und stimulierten Bikarbonatsekretion im Duodenum des Kaninchens beteiligt und in welcher Beziehung stehen sie zueinander?
2. Welche basolateral befindlichen zellulären Transportmechanismen sind in die Bikarbonatbereitstellung durch den Duodenozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen involviert? Spielt auch die intrazelluläre Generierung von Bikarbonat eine Rolle? Inwieweit können sich diese Mechanismen gegenseitig beeinflussen?

Zur Klärung dieser Fragen wurde proximales Duodenum des Kaninchens von Serosa- und Muskelschichten freipräpariert und die Bikarbonatsekretion und der Kurzschlussstrom in der Ussingkammer unter Einsatz geeigneter stimulatorischer und inhibitorischer Substanzen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Abkürzungen

In Tabelle 1 sind in alphabetischer Reihenfolge die in den Experimenten angewandten chemischen Substanzen sowie deren Bezugsquellen und ihre in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen enthalten. Alle Substanzen sind von analytischer Reinheit bzw. dem höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

*Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, deren Abkürzung und jeweilige Bezugsquelle; bei den mit * gekennzeichneten Substanzen ist unter „Abkürzung“ der Handelsname angegeben.*

Reagenz	gelöst in	Abkürzung	Bezugsquelle
Agarose Type III High EEO	KCl [3M] bzw. KNO ₃ [3 M]	Agarose	Sigma
(3-[Aminosulfonyl]-5-[butylamino]-4-phenoxybenzoic acid)	DMSO	Bumetanid	Sigma
Atropinsulfat	H ₂ O		Sigma
Azetazolamid	H ₂ O		Sigma
Bariumhydroxid-Octahydrat	H ₂ O	Ba(OH) ₂ x H ₂ O	Merck
8-Bromoadenosin- 3'-5'-zyklisches Monophosphat	H ₂ O	8-Br-cAMP	Sigma
³⁶ Chlorid	HCl 0.1M	³⁶ Cl ⁻	Amersham

(4 β ,20[22]-Cardenolid-1 β ,3 β ,5 α ,11 α ,14,19-hexol-3[6-deoxy- α -L-mannopyranosyl])	DMSO	Ouabain	Sigma
D(+)-Glukose	H ₂ O	Dextrose	Merck
5,6-Dihydro-2-(2,6-Xylidino)-4H-1,3-Thiazin*		Rompun®	Bayer
4,4'-Diisothiocyanostilben-2',2'-Disulfonsäure	H ₂ O	DIDS	Sigma
Dimethyl-Sulfoxyd		DMSO	Sigma
5- (N,N-Dimethyl-) Amilorid	H ₂ O	DMA	Sigma
4-Isopropyl-3-methylsulfonyl-Benzoylguanidinmethan-Sulfonat	H ₂ O	HOE 642	Aventis Pharma
Hydroxy-Ethyl-Piperazinyl-Ethan-Sulfonsäure	H ₂ O	HEPES	Roth
(1-[p-Chlorobenzoyl]-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid)	Na ₂ HPO ₄	Indomethazin	Sigma
Kaliumchlorid	H ₂ O	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	H ₂ O	KH ₂ PO ₄	Merck
Kaliumglukonat	H ₂ O	K-Glc	Merck
Kaliumnitrat	H ₂ O	KNO ₃	Roth
Kalziumchloriddihydrat	H ₂ O	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck
Ketamin*		Ketanest®	Parke-Davis

Kalziumglukonat	H ₂ O	C ₁₂ H ₂₂ CaO ₁₄ xH ₂ O	Merck
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	H ₂ O	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck
Mannitol			Merck
³ H-Mannitol	Ethanol	³ H-Mannitol	NEN DuPont
²² Natrium	NaCl	²² Na ⁺	Amersham
Natriumhydrogenkarbonat	H ₂ O	NaHCO ₃	Merck
Natriumchlorid	H ₂ O	NaCl	Merck
Natriumglukonat	H ₂ O	Na-Glc	Merck
Natriumpyruvat	NaCl 0.9%	Pyruvat	Sigma
Natriumziträt	H ₂ O	NaCitrat	Merck
Natronlauge	H ₂ O	NaOH	Merck
100% Sauerstoff	100% O ₂		Linde
95% Sauerstoff/ 5%Kohlendioxid	95% O ₂ / 5%CO ₂	Carbogen	AGA Gas GmbH
Salzsäure	H ₂ O	HCl	Merck
Schwefelsäure	H ₂ O	H ₂ SO ₄	Merck
Quicksafe A Liquid Szin- tillator			Zinsser-Analytik
Tetrodotoxin	NaCitrat 10 mM	TTX	Sigma

2.1.2 Verwendete Geräte

Tabelle 2: Auflistung der für die durchgeführten Experimente verwendeten Geräte. Als standardisiert geltende Geräte sind nicht enthalten.

Gerät	Hersteller
Autobürette	Radiometer Copenhagen
Betacounter	Wallac 1409
DVC-1000 Dual Voltage Clamp	World Precision Instruments
Preamplifier	World Precision Instruments
Stereomikroskop	World Precision Instruments
Lichtquelle	World Precision Instruments
pH-Meter mit pH-Glaselektrode	Radiometer Copenhagen
Titration	Radiometer Copenhagen
Wärmeumwälzpumpe	Haake
Osmometer	Roebbing

2.1.3 Versuchstiere

Für sämtliche Versuche werden männliche Kaninchen der Rasse „New Zealand White Rabbit“ mit einem Gewicht von 2500 bis 3000 Gramm verwendet, die unter Standardbedingungen bezüglich der Raumtemperatur (21-22°C), eines Hell-Dunkelzyklus von je 12 Stunden, des Futters und der Käfiggröße gehalten worden sind. Die Tiere werden erst nach einer Eingewöhnungsphase von mindestens 24 Stunden nach Ankunft für die Versuche herangezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Das Kurzschlussstromexperiment

Der dänische Physiologe Hans Peter Ussing etablierte in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts das nach ihm benannte Kurzschlussstromexperiment an Froschhautepithelien (153). Der Versuchsaufbau erlaubt es, experimentell die Formen des aktiven epithelialen Ionentransportes von denen des passiven abzugrenzen. Wenn alle äußeren Gradienten für passiven Ionentransport ausgeschaltet werden, kann der danach verbleibende messbare Transport nur noch primärer, sekundärer oder tertiärer Natur sein.

Das interessierende Epithelstück wird in eine Polyacrylkammer eingespannt, die es somit in 2 Kompartimente teilt. Auf beiden Seiten werden nun identische Volumina isosmolarer Elektrolytlösung in zwei 15 ml fassende Reservoirs eingefüllt, somit sind sowohl der hydrostatische Druckgradient als auch der Konzentrationsgradient ausgeschaltet.

Auch der elektrische Gradient für passive Ionenbewegungen kann beseitigt werden. Folgende Überlegungen sind hierfür wichtig: Unter der Vielzahl der aktiven epithelialen Ionentransportmechanismen sind einige elektrogen, das heißt, sie erzeugen gemäß dem Ohmschen Gesetz eine sich über das Epithel einstellende Potentialdifferenz bzw. Spannung. Ein Beispiel hierfür ist der Na^+ Glukose-Kotransport. Die einseitige Bewegung von Kationen in die eine Richtung muss entweder den passiven Mittransport von Anionen in die gleiche Richtung und/oder von Kationen in die Gegenrichtung zur Folge haben. Der spezielle Ussingkammer-Aufbau (siehe Abbildung 1) erlaubt es nun, von außen einen Strom auf das Epithel zu applizieren, der entgegengesetzt gerichtet und genau so eingeregelt wird, dass er gleich groß ist wie der durch den aktiven Transport erzeugte Strom. Der elektrische Gradient ist somit ausgeschaltet. Dieser sogenannte Kurzschlussstrom (short circuit current oder I_{sc}) stellt ein Maß für den aktiven Ionentransport dar.

Man kann an der Ussingkammer auch noch einen zweiten Messmodus, den des "open circuit current", schaffen, der im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit mit einer einzigen Ausnahme (siehe Abschnitt 3.3.2.3) zur Anwendung kommt. Unter physiologischen Bedingungen stellt sich über das Epithel spontan eine charakteristische Potentialdifferenz ein, die in diesem Modus nicht ausgeglichen, sondern nur gemessen wird. Der

transepitheliale elektrische Gradient bleibt also erhalten. Eine in einem bestimmten zeitlichen Intervall erfolgende epithelferne Applikation eines geeigneten Stromstoßes führt zur Änderung der Potentialdifferenz $\Delta PD (= \Delta U)$. Dies ermöglicht die Berechnung des epithelialen Widerstandes mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes:

$$R = \Delta U / I \quad (1)$$

Demnach ergibt sich für den durch Ionenbewegung am Epithel verursachten Strom (I_c):

$$I_c = U / R \quad (2)$$

Da das Duodenalepithel durch seine gut durchlässigen tight junctions ein so genanntes „leaky epithelium“ darstellt, kann man es als annähernd kurzgeschlossen betrachten. Hierbei gilt :

$$I_c \approx I_{sc} \quad (3)$$

Im vorliegenden Versuchsaufbau wird die Potentialdifferenz (PD) über zwei epithelnah angebrachte Elektroden (3M KCl-Agar- bzw. in den Cl⁻-freien Versuchen 3M KNO₃-Agar-Brücken) kontinuierlich aufgezeichnet und mit Hilfe eines voltage clamp Gerätes alle 300 Sekunden ein Stromstoß von 40 $\mu A/cm^2$ über die beiden epithelfernen Elektroden appliziert. Mit Hilfe der Formeln 1 und 2 wird der I_c bzw. I_{sc} , der ein Maß für die elektrogene Nettosekretion von Anionen und Resorption von Kationen darstellt, ausgerechnet.

2.2.2 pH-stat-Titration

Die Messung der duodenalen Bikarbonatsekretion ($J_{HCO_3^-}$) erfolgt mit der hierfür geeigneten Methode der pH-stat-Titration, deren Prinzip auf der kontinuierlichen Gegentitration der ins Lumen sezernierten Basen-Äquivalente mittels einer starken Säure beruht und somit der Aufrechterhaltung eines bestimmten pH-Wertes dient.

Die zwei in Abbildung 2 dargestellten jeweils 15 ml fassenden Reservoirs, die einzeln begast werden können, sind für die Perfusion der das Epithel enthaltenden Kammer verantwortlich. Die physiologische Temperatur von 37° C wird mittels einer Wärme-

umwälzpumpe, die das erwärmte Wasser durch ein die beiden Reservoirs zusätzliches ummantelndes Hohlraumsystem pumpt, erreicht.

Die Nährlösung auf der serosalen Seite wird mit Carbogen, die ungepufferte physiologische NaCl-Lösung (0,9%) der mukosalen bzw. luminalen Seite mit 100% O₂ begast.

Die gepufferte serosale Lösung weist einen pH-Wert von $7,4 \pm 0,03$ bei 37°C auf, der pH-Wert von 7,4 des luminalen Perfusates wird durch eine den gesamten Versuch bestehende pH-stat-Titration aufrechterhalten. Somit wird ein pH-Gefälle zwischen den beiden Seiten und ein steigend unphysiologischer pH-Wert vermieden.

Das vom Duodenum kontinuierlich sezernierte Bikarbonat wird mit einer starken Säure, vertreten durch HCl beziehungsweise H₂SO₄, titriert. Es ist nun möglich, die Menge an verbrauchter Säure mit der Bikarbonatsekretion gleichzusetzen, da das Reaktionsgleichgewicht der Reaktion $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \uparrow$ überwiegend auf der rechten Seite liegt. Bei den Cl⁻-freien Versuchen wird HCl durch H₂SO₄ ersetzt und die Bikarbonatsekretion entsprechend der zweiwertigen Säure ermittelt. Die Stärke der Säure wird so eingestellt, dass ein optimaler Kompromiss zwischen Genauigkeit der Bikarbonatsekretionsmessung und möglichst geringer Volumenbelastung des luminalen Kompartiments zustande kommt, im vorliegenden Fall wird eine Konzentration von 20 mmol/l gewählt. Die verbrauchte Menge an titrierter Säure wird durch ein spezielles Computerprogramm registriert, über eine Zeiteinheit von 5 min gemittelt und in der Einheit $\mu\text{mol}/(\text{h} \times \text{cm}^2)$ ausgegeben.

2.2.3 Aufbau des Ussing-Kammer-Setups

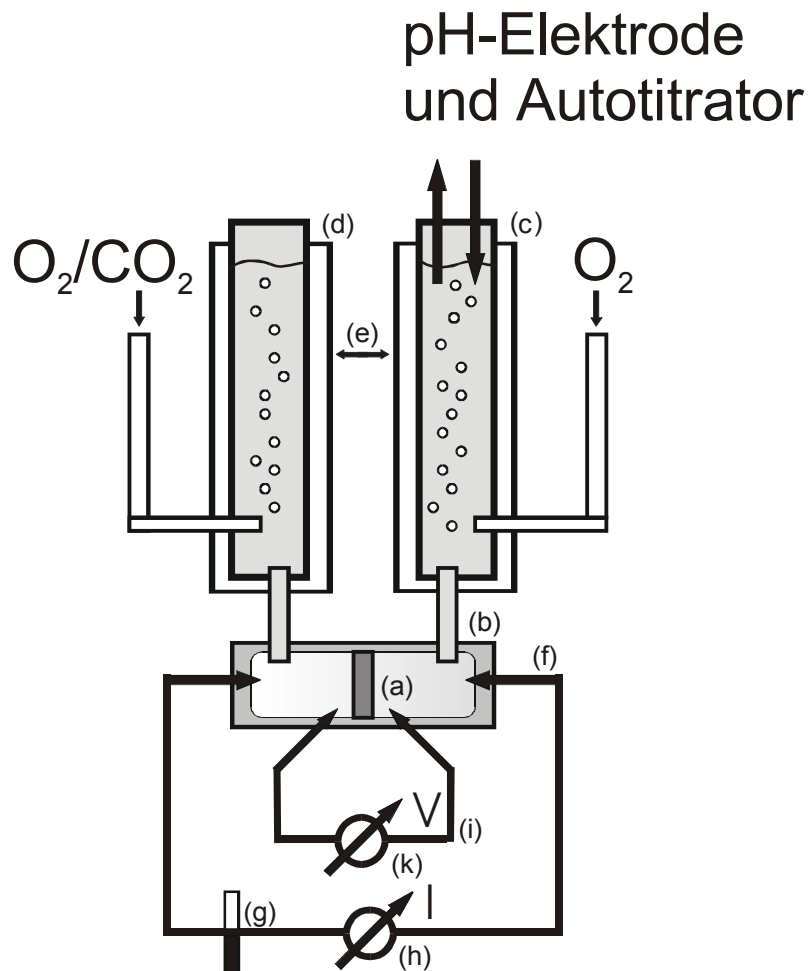


Abbildung 2: Ussingkammer-Setup

Das Epithel (a) wird in eine Polyacryl­kammer (b) mit einer Fläche von $0,636 \text{ cm}^2$ eingespannt. Im luminalen Kompartiment (c) erfolgt die pH-stat-Titration mit Hilfe einer pH-Elektrode, einer Autobürette und eines Titrators. Die Begasung erfolgt hier mit 100% igem O_2 . Die Lösung im serosalen Kompartiment (d) wird mit Carbogen begast. Beide Kompartimente sind zusätzlich durch ein Wasserreservoir (e) ummantelt, durch das Wasser mit einer Temperatur von 37°C zirkuliert.

Dargestellt sind die beiden epithelfernen Elektroden (f) mit Stromquelle (g) und Am­pèremeter (h), weiterhin die beiden epithelnahen Elektroden (i) mit Voltmeter (k), die der Messung der Potentialdifferenz dienen.

2.2.4 Transepitheliale Fluxmessungen

Ionen bewegen sich durch passive Diffusion und durch primär, sekundär und tertiär aktive Transportprozesse der Zelle sowohl von serosal nach mukosal als auch in umgekehrter Richtung. Da der I_{sc} nur die Summe der Ionenbewegungen über das Epithel widerspiegelt und somit nur allgemeine Aussagen zulässt, kann man die Bewegungen bestimmter Ionenarten mit Hilfe geeigneter Nuklide messen. Im vorliegenden Fall werden das Cl^- -Isotop $^{36}Cl^-$ und das Na^+ -Isotop $^{22}Na^+$ als Tracer zur Aufklärung der Rolle des Cl^- beziehungsweise Na^+ verwendet, wobei der Netto Cl^- - bzw. Na^+ -Flux die Summe sämtlicher Bewegungen des jeweiligen Ions über das Epithel, seien sie passiv, aktiv, elektrogen oder elektroneutral, darstellt. Um die Veränderung der parazellulären Permeabilität unter bestimmten Versuchsbedingungen zu messen, wird der 3H -markierte Zucker Mannitol, der von der Zelle nicht verstoffwechselt werden kann, verwendet.

2.2.5 Operation des Kaninchens

Die Prämedikation des Kaninchens wird mittels einer intramuskulären Injektion von 0,5 mg/kg Atropin, 100 mg/kg Ketamin und 8 mg/kg Rompun erreicht. Darauf folgend wird eine Ohrvene des Tieres kanüliert und die Narkose mit einem Ketamin/Rompun-Gemisch in 0,9%iger NaCl-Lösung weitergeführt. Nach ausreichender Narkotisierung des Tieres wird das Abdomen entlang der Linea alba eröffnet, das Duodenum aufgesucht und stumpf vom Mesenterium abpräpariert. Der Darm wird am Pylorus des Magens und 6cm weiter distal durchtrennt. Das so gewonnene Stück, das dem proximalen Duodenum entspricht, wird entnommen. Die Tötung des Tieres erfolgt unmittelbar darauf mittels einer Überdosis des genannten Ketamin/Rompun-Gemisches. Das entnommene Darmstück wird sofort mit eiskalter voroxygenierter und zuvor mit Indometazin [50 μM] versetzter Ringer-Lösung mehrfach zwecks Entfernung von Chymusresten durchspült. Bis zur Präparation des Gewebes, die sich sofort an diese Prozedur anschließt, wird das Duodenum in der beschriebenen Ringer-Lösung aufbewahrt. Die Temperatur von 4°C hindert Proteasen vorerst an der Zersetzung des Gewebes und durch den Sauerstoffgehalt der Lösung wird die zwangsläufig eintretenden Ischämie des

Gewebes vermindert. Der Indometazinzusatz führt zu einer Hemmung der endogenen Prostaglandinsynthese. Prostaglandine führen zu einer Steigerung der Cl^- - und HCO_3^- -Sekretion im Dünndarm, was das Versuchsergebnis verfälschen könnte.

2.2.6 Präparation des Duodenums

Unmittelbar hinter dem Bulbus duodeni wird ein 4 cm langes Stück abgeschnitten und noch einmal in zwei Stücke von 2 cm geteilt, die jeweils für einen Versuch herangezogen werden. Der Rest des Duodenums wird verworfen.

Das Darmstück wird nun entlang des Mesenterialansatzes mit einer Schere in Längsrichtung eröffnet und die mukosale Seite noch einmal mehrfach mit der oben beschriebenen eiskalten Ringer-Lösung abgespült.

Als Präparationsvorrichtung dient eine Kunststoffschale, die bis auf halbe Höhe mit Paraffin ausgegossen ist und in der Seite Löcher zwecks der Anbringung von fünf Glasfaserkabeln aufweist, die wiederum von einer Lichtquelle ausgehen. Die Paraffinoberfläche besitzt eine Vertiefung, über die das Darmstück mit Hilfe von Stecknadeln straff mit der serosalen Seite nach oben gerichtet aufgespannt wird; dies verhindert ein Druckschädigung der empfindlichen Mukosa. Die Präparation findet in frischer voroxygenierter eiskalter und zuvor mit Indometazin [$50 \mu\text{M}$] versetzten Ringer-Lösung statt. Unter einem Stereomikroskop wird nun die Tunica serosa und die Tunica muscularis, Stratum longitudinale und circulare in dieser Reihenfolge mit Hilfe einer spitzen Pinzette abpräpariert. Auch die Tela submucosa wird vorsichtig so weit wie möglich abgetragen, bis die Zottenstruktur der Tunica mucosa deutlich erkennbar ist. Daraufhin kann das präparierte Darmstück zwischen den beiden Hälften der in Abbildung 2(a) dargestellten Plexigaskammer aufgespannt werden; diese Kammer wird nun in die Haltevorrichtung des Ussingkammeraufbaus eingespannt, jeweils mit den beiden Perfusionskammern und den Elektroden verbunden und der Versuch unmittelbar daraufhin gestartet.

2.2.7 Verwendete Reagenzien

Die Lösungen und Puffer werden mit Hilfe von deionisiertem und zusätzlich durch eine Milli-Q-Plus Filtrieranlage (Millipore) gereinigtem Wasser hergestellt. Die Zubereitung der Lösungen erfolgt entweder am Versuchstag oder an dessen Vorabend. Die Osmolarität (Sollwert 308 mosm/l) und der pH-Wert (Sollwert $7,4 \pm 0,03$) werden überprüft und die Lösungen bei 4°C aufbewahrt. Tabelle 3 gibt die Ionenzusammensetzung und die Osmolarität im einzelnen wieder.

Tabelle 3: Ionale Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Ion/ Substanz [mmol/l]	Modifizierte Krebs Rin- ger (serosale Nährlösung)	0.9%ige NaCl Lö- sung lumi- nal	Cl-freie Lösung lu- minal	Cl-freie Lö- sung serosal	Ringer- Lösung	HCO₃⁻-freie Lösung se- rosal (HE- PES)
Na ⁺	140	154	154	140	145,5	140
K ⁺	4,5			4,5	4	4,5
Ca ²⁺	2			2	3	2
Mg ²⁺	1,3			1,3		1,3
Cl ⁻	115	154			155,5	123
Glukonat			154	115		
SO ₄ ²⁻	1,3			1,3		1,3
HCO ₃ ⁻	22			22		
HEPES						24
HPO ₄ ²⁻	1,5			1,5		1,5
Dextrose	10,4			10,4		10,4
Mannitol	*	*				
Indo- metazin	0,03			0,03		0,03
Pyruvat	10			10		
Theo- retische Osmolari- tät	308 (*310)	308 (*310)	308	308	308	308

**Zusatz von 2mmol/l Mannitol bilateral bei der Fluxbestimmung für ³H-Mannitol zur Vermeidung eines Konzentrationsgradienten für Mannitol*

2.2.8 Versuchsschemata

2.2.8.1 Allgemeines Vorgehen

Kurz nach dem Einspannen des zu messenden Gewebestückes in die Ussingkammer werden Tetrodotoxin [10^{-6} M] zwecks Hemmung schneller Na^+ -Kanäle verbliebener Neurone des Plexus submucosus, Indometazin [30 μM] zur Verhinderung endogener Prostaglandinsynthese und NaPyruvat [10mM], das die sekretorische Leistung der Epithelzellen fördern soll, in das serosale Perfusat appliziert. Mit der Applikation der eigentlichen Testsubstanzen wird stets mindestens 10 Minuten nach Erreichen stabiler Basalparameter betreffend der PD, des Isc und der Bikarbonatsekretion begonnen. Um hydrostatische und osmotische Druckdifferenzen und dadurch entstehende Störfaktoren zu vermeiden, werden alle Substanzen in einem Volumen von maximal 1% des entsprechenden Perfusat-Volumens zugesetzt und, wenn es die chemischen Eigenschaften bezüglich der Hydrophilie der Substanz zulassen, in Aqua bidest. gelöst. Wenn sich die entsprechende Substanz nur in DMSO lösen lässt, wird nur 0,1% des Perfusat-Volumens appliziert, da DMSO seinerseits die elektrischen Verhältnisse an der Zellmembran verändern kann und in möglichst geringer Konzentration verwendet werden muss. Alle angegebenen Substanzkonzentrationen stellen die Endkonzentrationen am Epithel dar.

2.2.8.2 Veränderung der ionalen Zusammensetzung des Perfusats

Durch die Entfernung bestimmter Ionenarten aus dem luminalen und/oder serosalen Kompartiment lassen sich verschiedene Transportmechanismen wie zum Beispiel Ionenaustausch, Kotransport oder auch auf Konzentrationsgradienten beruhende Prozesse hemmen (siehe Tabelle 3).

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Variationen durchgeführt: die Entfernung des Cl^- -Ions aus dem luminalen Perfusat zwecks Hemmung des apikalen Anionenaustauschers wird durch den Ersatz der 0,9%igen NaCl-Lösung durch eine isoosmolare Natriumglukonat-Lösung erreicht, im serosalen Kompartiment durch den Ersatz der Cl^- -haltigen durch entsprechende das Glukonat-Ion enthaltende Verbindungen. Zusätzlich werden die Elektroden mit Hilfe von Kaliumnitrat [3 M] hergestellt und der Titrant HCl durch H_2SO_4 ersetzt. Die Entfernung des Bikarbonat-Ions aus dem serosalen Perfusat

wird durch den isoosmolaren Ersatz des NaHCO_3 durch HEPES-Puffer und einer Begasung durch 100% O_2 anstelle von Carbogen erreicht und erlaubt somit eine Aussage über die Bedeutung der serosalen Bikarbonat-Aufnahmemechanismen für dessen Sekretion.

2.2.8.3 Hemmung einzelner Ionentransportmechanismen

2.2.8.3.1 Blockade des serosal lokalisierten $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporters (NKCC)

Das Schleifendiuretikum Bumetanid hemmt in einer Konzentration von 0,5 mM selektiv die beiden Isoformen des NKCC (NKCC1 und NKCC2). Von funktioneller Bedeutung im Dünndarm ist die Isoform NKCC1, die basolateral exprimiert wird. Durch den Einsatz von Bumetanid wird ein wichtiger Teil der zellulären Cl^- -Aufnahme gehemmt.

2.2.8.3.2 Blockade des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches und des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransports durch DIDS

Serosal appliziert hemmt DIDS konzentrationsabhängig den an dieser Stelle lokalisierten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher sowie den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter, die jeweils unterschiedliche Empfindlichkeit auf die Substanz aufweisen. Die apikale Applikation von DIDS führt zur Hemmung des hier befindlichen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers. In der vorliegenden Arbeit wird DIDS in einem einzelnen Versuchansatz in einer Konzentration von 3 mM, in allen anderen in einer Konzentration von 1 mM verwendet. Hierdurch wird eine nähere Charakterisierung der funktionellen Bedeutung dieser Transportmechanismen für die HCO_3^- -Sekretion und -Aufnahme möglich.

2.2.8.3.3 Hemmung der Karboanhydrase durch Azetazolamid

Eine Blockade des sich in den Enterozyten befindlichen Enzyms Karboanhydrase II, das die Gleichgewichtseinstellung der Reaktion $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ beschleunigt, wird zu 99,9% durch Applikation von Azetazolamid ab einer Konzentration von 0,5 mM erreicht. Da die intrazelluläre Bikarbonatherstellung dadurch faktisch zum

Erliegen kommt, lassen sich hier differenziertere Aussagen über verschiedene Wege der Bikarbonatgewinnung der Zelle ableiten.

2.2.8.3.4 Blockade des zellulären Na^+/H^+ -Austausches

Die Mitglieder der Genfamilie der Na^+/H^+ -Austauscher lassen sich durch geeignete Pharmaka in bestimmten Konzentrationen selektiv hemmen. Das Phenylacetylguanidin-Derivat Hoechst 642 hemmt in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ selektiv den NHE1 und in einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ zusätzlich den NHE2 (133); die Substanz wird in der vorliegenden Arbeit in der erstgenannten Konzentration eingesetzt.

Das Amilorid-Derivat DMA hemmt ab einer Konzentration von $0,5 \text{ mM}$ sämtliche Isoformen NHE1-NHE4 (17;110).

2.2.8.3.5 Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase

Das Herzglykosid Strophantin (Ouabain) in einer Konzentration von $0,5 \text{ mM}$ (serosal appliziert) hemmt selektiv und irreversibel die sich auf der Innenseite der serosalen Zellmembran befindliche Na^+/K^+ -aktivierbare ATPase, indem es an die in den extrazellulären Raum ragende α -Untereinheit dieses Enzyms bindet (45). Die Na^+/K^+ -ATPase, die nach dem Prinzip des primär aktiven Transportes, also unter Energieverbrauch, arbeitet, ist hauptverantwortlich für die Erhaltung eines stabilen Membranpotentials und Zellvolumens. Ihre uneingeschränkte Funktion bildet die Grundlage aller sekundär und tertiär aktiven zellulären Transportprozesse. Die Blockade der Na^+/K^+ -ATPase führt zum Erliegen sämtlicher aktiver Ionen-transport-Mechanismen und zum Abfall sämtlicher Messparameter. Somit ist dies ein geeignetes Mittel, über den Anteil der aus aktivem Transport hervorgehenden Bikarbonatsekretion eine Aussage zu treffen, im Folgenden wird auch von „Ouabain-sensitiver Bikarbonatsekretion“ gesprochen. Ouabain [$0,5 \text{ mM}$] wird in der vorliegenden Arbeit am Ende jedes durchgeführten Versuches serosal appliziert.

2.2.8.3.6 Hemmung neuronaler Natriumkanäle

Nach dem Einspannen der präparierten Epithelien in die Ussingkammer wird bei jedem Versuch serosal Tetrodotoxin in einer Konzentration von $6\mu\text{M}$ appliziert. Tetrodotoxin ist das Gift des Kugelfisches und hemmt in dieser Konzentration schnelle Na^+ -Kanäle neuronaler Zellen. Dadurch werden die Neuronen des durch die Präparation nicht vollständig entfernten Plexus submucosus ausgeschaltet, deren Signale PD- und Isc-Schwankungen verursachen können.

2.2.8.4 Durchführung der radioaktiven ^3H -Mannitol, ^{36}Cl und ^{22}Na -Fluxe

Die Durchführung der radioaktiven Fluxbestimmungen erfolgt am oben beschriebenen Ussingkammer-Aufbau, wobei im Falle der $^{36}\text{Cl}^-$ - und ^3H -Mannitol-Fluxe eine Abschirmung aus Plexiglas gegen die β -Strahlung und bei der Durchführung der ^{22}Na -Fluxe als Schutz gegen die hierbei zusätzlich zur β -Strahlung auftretende γ -Strahlung eine Bleiabschirmung verwendet wird.

Zur Kontrolle wird vor der Zugabe der Aktivität bilateral eine Leerabnahme durchgeführt. Die Zugabe von jeweils 74 kBq/ml des entsprechenden Isotops entweder in das lumenale oder serosale Kompartiment erfolgt nach Erreichen stabiler elektrophysiologischer Parameter und konstanter Bikarbonatsekretionsraten. Kurz vor der Zugabe des Isotops $^{36}\text{Cl}^-$, das in $0,1\text{ M HCl}$ vorliegt, werden beide Perfusionskammern abgeklemmt und der pH-Wert der jeweiligen Perfusionsflüssigkeit, die mit der Aktivität versetzt worden ist, mit Hilfe von NaOH [154 mM] auf $\text{pH } 7,4\pm 0,03$ korrigiert. Beim Versuchsschema „DIDS mukosal“ wird die Substanz DIDS [1 mM] nach Erreichen der oben genannten stabilen Parameter und 10 min vor der Aktivitätszugabe luminal appliziert. Die erste Abnahme erfolgt nach einer Äquilibrierungszeit von 30 min ab Zugabe der Aktivität, wobei bilateral jeweils drei mal $100\mu\text{l}$ entnommen und in 5 ml fassende Szintillationsgefäße überführt werden. Die entnommenen Volumina werden nicht ersetzt. Die folgenden Abnahmen finden in gleicher Weise wie die Erstabnahme im 15-min-Takt statt. Dabei werden die Parameter Isc und Bikarbonatsekretion fortlaufend aufgezeichnet.

In die Szintillationsgefäße werden jeweils 5 ml Szintillationscocktail gegeben, der Inhalt gründlich mittels Vortexer durchmischt und die Gefäße am nächsten Tag zur Ra-

dioaktivitätsmessung in einen β -Counter überführt, wo bei einem $^{36}\text{Cl}^-$, ^3H - bzw. $^{22}\text{Na}^+$ -Fenster bei 5-320 eV bei 5 min Messzeit die Counts der jeweils 3 Proben pro Abnahme und Kompartiment bestimmt werden. Die Berechnung des Fluxes für $^{36}\text{Cl}^-$ von serosal nach mukosal ($J^{36}\text{Cl}_{\text{se}\rightarrow\text{mu}}$), für $^{22}\text{Na}^+$ ($J^{22}\text{Na}_{\text{se}\rightarrow\text{mu}}$) und für ^3H -Mannitol ($J^3\text{H Mannitol}_{\text{se}\rightarrow\text{mu}}$) ergibt sich über die folgende Formel:

$$J^{36}\text{Cl}_{\text{se}\rightarrow\text{mu}} = \frac{\Delta\text{cts} (t_1 - t_0) \times c_m}{\text{cts}_h \times \Delta t \times A \times V_p}$$

Δcts Differenzcounts von jeweils zwei aufeinanderfolgenden Abnahmen

$t_1 - t_0$ Abnahmeintervall, wobei t_1 immer der Zeitpunkt der zweiten der beiden interessierenden Abnahmen ist

c_m Konzentration des kalten (nichtmarkierten) Ions

Δt Abnahmeintervall [h]

A Epithelfläche

cts_h Counts der heißen Seite zum Zeitpunkt t_0 [counts per minute]

V_p Probenvolumen

2.2.9 Auswertung und Statistik

Die Ergebnisse werden, falls nicht anders angegeben, als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt, n ist die Anzahl der untersuchten Proben (Epithelstücke), pro Tier werden maximal zwei Stücke des proximalen Duodenums verwendet und parallel gemessen. Die letzten 10 min vor Zugabe der ersten Substanz gemessenen Werte werden gemittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Sekretions- und Fluxraten wird der Isc von der Einheit $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ mit Hilfe des Faktors 0,03744 auf $\mu\text{Eq}/(\text{cm}^2 \times \text{h})$ umgerechnet (1 μA entspricht dem Netto-Flux von 10,4 pmol/s eines univalenten Ions).

Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mit Hilfe der Software MicrocalTM OriginTM 5.0 und Microsoft® Excel 97 SR-2.

Die statistische Signifikanz wird mithilfe des Einstichproben-t-Tests berechnet. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,01$, wobei ein zweiseitiger Test durchgeführt wird.

3 Ergebnisse

3.1 Grundprinzipien der Versuchsdurchführung

Da es zur Erhöhung des Ischämietoleranz und zur Verminderung von Autolyse wichtig war, das Gewebe nach Entnahme und während der Präparation auf 4°C herunter zu kühlen und der in die Ussingkammer eingespannte Darm anderen Perfusionslösungen, die eine Temperatur von 37°C aufwiesen, ausgesetzt war, wurde dem Gewebstück vor Beginn des eigentlichen Versuches in der Ussingkammer eine Regenerationszeit von 30 min zugestanden. Im Verlauf dieses Zeitabschnittes sollten die in Tabelle 4 aufgelisteten Parameter eine Stabilität erreicht haben, auf deren Grundlage mit der Durchführung des eigentlichen Versuchsschemas begonnen werden konnte. Gewebe, die nach dieser Zeit keine adäquaten Messparameter aufwiesen, wurden nicht zum Versuch herangezogen. Der in Kapitel 2 beschriebene Ussingkammeraufbau erlaubt sowohl die Bestimmung elektrophysiologischer Parameter als auch die Bikarbonatsekretionsmessung mittels der pH-stat-Methode. Tabelle 4 zeigt die in dieser Arbeit am Duodenum des Kaninchens erhobenen Daten, im Vergleich dazu sind Werte für die Ratte (54) und die Maus (137) aufgelistet.

Tabelle 4: Basalparameter des Duodenums verschiedener Spezies, Daten an der Ussingkammer erhoben.

Spezies	Ratte	Maus	Kaninchen
Bikarbonatsekretion ($J_{\text{HCO}_3^-}$) [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]:	1,25 ± 0,05	1,12 ± 0,11	3,75 ± 0,12
Kurzschlussstrom (I_{sc}) [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]:	1,9 ± 0,04	1,76 ± 0,52	1,08 ± 0,16

Im Folgenden werden in den Abbildungen 3 bis 17 die epitheliale Bikarbonatsekretion $J_{\text{HCO}_3^-}$ [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$] und der Kurzschlussstrom I_{sc} [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$] dargestellt, Abbildungen 18 bis 22 zeigen die bilateralen Fluxraten [$\mu\text{mol} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$] für die jeweils angegebenen Ionen. Testsubstanzen wurden immer nach Erreichen eines stabilen Plateaus der Messparameter appliziert. Die Endkonzentration am Epithel der zugegebenen Testsubstanzen ist für jeden Versuch angegeben. Die Substanzen 8-Br-cAMP, Bumetanid, DMA, Hoechst 642, Natriumpyruvat, Ouabain und Tetrodotoxin wurden grundsätzlich basolateral appliziert. Im Falle des Azetazolamid wurde 15 min nach der bilateralen Applikation luminal ein Mediumwechsel vorgenommen; DIDS wurde je nach Fragestellung basolateral oder luminal appliziert, was in den gezeigten Versuchen jeweils angegeben ist.

3.2 Messungen der Bikarbonatsekretion und des Kurzschlussstromes

3.2.1 Verlauf der Bikarbonatsekretion und des I_{sc} nach Stimulation mit 8-Br-cAMP, Bumetanid und Ouabain

Die im folgenden Abschnitt dargestellte Versuchsreihe diente als Kontrolle, auf die sich alle späteren Abwandlungen des Versuchsschemas beziehen. Näher untersucht werden sollte durch diese Versuchskonstellation, wie das Epithel hinsichtlich der Veränderungen seiner Bikarbonatsekretionsraten und einer Kurzschlussstromabweichung auf Stimulation durch 8-Br-cAMP und damit auf cAMP-abhängige Agonisten reagieren würde.

Um die Rolle des basolateral lokalisierten $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporters (NKCC), der offenbar einen erheblichen Anteil an der Cl^- -Aufnahme der Enterozyten hat, funktionell näher zu charakterisieren, wurde 30 Minuten nach Applikation von 8-Br-cAMP das Schleifendiuretikum Bumetanid, das beide Isoformen des NKCC (NKCC1 und 2) inhibiert, serosal in einer Konzentration von 0,5 mM zugesetzt.

Das Herzglykosid Ouabain, das die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase hemmt und somit zu einem Erliegen sämtlicher aktiver Transportvorgänge an der Zellmembran führt, wurde in der Kontrolle wie auch in allen gezeigten Versuchen grundsätzlich 15

min nach Bumetanid-Gabe in einer Konzentration von 0,5 mM ins serosale Perfusat gegeben, um anhand des dadurch erreichten Abfalles der Messparameter Bikarbonatsekretion und Isc zum einen die Vitalität des Gewebes zu beurteilen und zum anderen zwischen aktiver und passiver Bikarbonatsekretion zu differenzieren, wobei davon ausgegangen wurde, dass die nach Erreichen eines neuen Plateaus verbleibende Bikarbonatsekretion hauptsächlich auf passiver Diffusion von HCO_3^- -Ionen entlang des bestehenden HCO_3^- -Konzentrationsgradienten von serosal nach mukosal beruhen muss. In den Kurven angegeben ist jeweils die tatsächlich titrierte bzw. gemessene Menge an Bikarbonat, die auf die Fläche der Messkammer ($0,636 \text{ cm}^2$) und die Zeiteinheit (1 h) umgerechnet wurde.

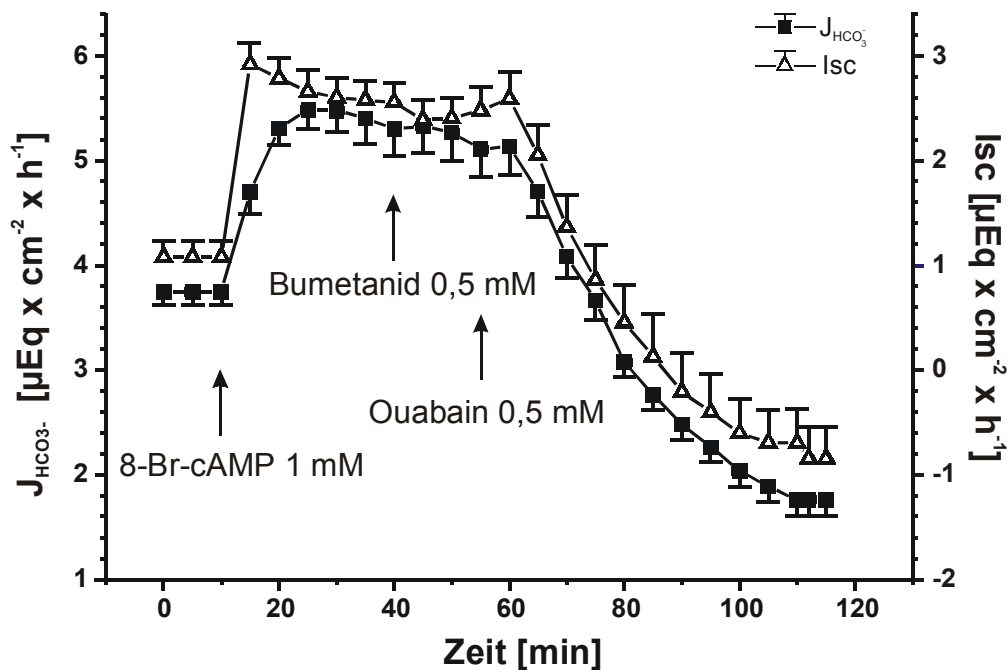


Abbildung 3: Reaktion des Duodenalepithels auf Stimulation mit 8-Br-cAMP [1 mM] (serosal appliziert) hinsichtlich der Bikarbonatsekretions- (■) und der Isc-Veränderung (Δ), nach 40 min Bumetanid-Applikation [0,5 mM] (serosal appliziert) und nach 55 min Zugabe von Ouabain [0,5 mM] (serosal appliziert); n=14.

Die basale Bikarbonatsekretionsrate des Duodenalepithels betrug unter den beschriebenen Versuchsbedingungen im Mittel $3,75 \pm 0,12$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. Der Isc wies einen Basalwert von $1,08 \pm 0,16$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ auf. Auf die Zugabe von 8-Br-cAMP [1 mM] ins serosale Perfusat reagierte das Epithel in den ersten 15 min mit einer signifikanten mittleren Bikarbonatsekretionssteigerung von $\Delta 1,74 \pm 0,15$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$; der Isc stieg ebenfalls signifikant an, wobei ein Peakwert von $2,92 \pm 0,2$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ erreicht wurde. Nach Erreichen eines neuen Plateaus der Bikarbonatsekretion mit einem mittleren Wert von $5,31 \pm 0,26$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ wurde serosal Bumetanid in einer Konzentration von 0,5 mM zugegeben. Die Bikarbonatsekretion wurde hierdurch nicht signifikant beeinflusst, der Isc wies einen leichten initialen, jedoch nicht anhaltenden Abfall auf. Die Zugabe von Ouabain bewirkte innerhalb von 60 min stets einen Abfall der Bikarbonatsekretion auf ein Plateau, das sich auf Werte einpendelte, die im Mittel noch 43% des Basalwertes betragen. Der Isc fiel nach der Ouabain-Applikation auf Werte unter dem Nullniveau, um sich auf ein Plateau von $-22,38 \pm 8,08$ SEM $\mu\text{A} \times \text{cm}^{-2}$ oder $0,84 \pm 0,3$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ einzustellen. Dass der Isc am Schluss negative Werte aufwies, bedeutet, dass sich die Ladungsverhältnisse im Vergleich zum Zustand bei Versuchsbeginn an den beiden Seiten des Epithels umgedreht hatten.

3.2.2 Verlauf von Bikarbonatsekretion und Isc unter luminal Cl⁻-freien Bedingungen

Mit Hilfe des Ersatzes der luminalen NaCl-Lösung durch Na⁺Glukonat sollte die Reaktion des Gewebes auf 8-Br-cAMP, Bumetanid und Ouabain unter Cl⁻-freien Bedingungen an der epithelialen Mukosa überprüft werden. Hierbei werden alle am luminalen Zellpol befindlichen Cl⁻-abhängigen Ionentransportmechanismen, seien sie aktiver oder passiver Natur, annähernd geblockt, so dass man anhand dieser Versuchskonstellation verschiedene Aussagen über die Cl⁻-unabhängige Bikarbonatsekretion und des Anteiles dieser Transportmechanismen am Kurzschlussstromverlauf treffen kann.

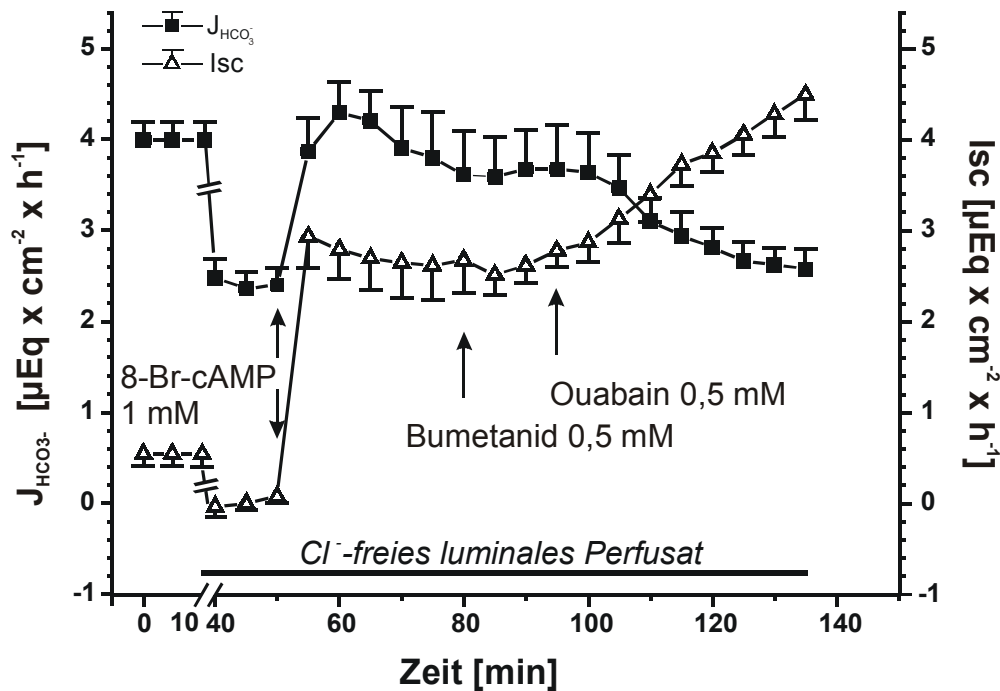


Abbildung 4: Reaktion des Duodenalepithels hinsichtlich der Bikarbonatsekretion (■) und des Kurzschlussstromverlaufes (Δ) auf verschiedene Stimulantien unter luminal Cl^- -freien Bedingungen. Zugabe von 8-Br-cAMP [1 mM] serosal 50 min nach Erreichen stabiler Messparameter bzw. 40 min nach Umstellen des luminalen Perfusats auf eine Cl^- -freie Lösung. Bumetanid wurde wie unter Kontrollbedingungen 30 min nach Zugabe von 8-Br-cAMP in einer Konzentration von 0,5 mM serosal zugegeben, und nach weiteren 15 Minuten Wartezeit Ouabain [0,5 mM] serosal appliziert; $n=5$.

Wie bereits oben erwähnt, führt der Ersatz der sonst luminal verwendeten NaCl-Lösung durch NaGlukonat zum Erliegen dort befindlicher Cl^- -abhängiger Transportprozesse. Nach dem Austausch des luminalen Perfusates war zuerst eine initial gesteigerte Bikarbonatsekretionsrate zu verzeichnen (nicht gezeigt), kurz darauf erfolgte ein starker Abfall der Sekretionsraten um durchschnittlich 60%, um sich auf ein neues Plateau von durchschnittlich $2.41 \pm 0.18 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ einzustellen. Der Kurzschlussstrom fiel unmittelbar nach Austausch der Lösungen bis knapp unter das Nullniveau, um sich dort auf einem neuen Plateau zu stabilisieren.

Die Zugabe von 8-Br-cAMP verursachte in den ersten 10 min einen Anstieg der Bikarbonatsekretion von $\Delta 1,9 \pm 0,24$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ auf einen Peak von $4,35 \pm 0,4$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. Der Anstieg war damit gegenüber dem im Kontrollversuch gemessenen leicht erhöht. Danach stellte sich die Sekretion auf ein neues Plateau ein. Der Kurzschlussstrom reagierte auf die 8-Br-cAMP Gabe mit einem sofort erfolgenden Anstieg auf einen Peak $3,02 \pm 0,34$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. Ein ähnlicher Peakwert war auch im Kontrollversuch aufgetreten, allerdings von einem deutlich höheren Plateau aus, so dass der Nettoanstieg in diesem Versuch deutlich höher ausfiel. Die Applikation von Bumetanid führte zu einem leichten Anstieg der Bikarbonatsekretion, der jedoch nicht signifikant war. Der Kurzschlussstrom reagierte hierbei mit einem leichten Abfall, begann aber bereits im Mittel nach 5 Minuten wieder zu steigen. Die Applikation von Ouabain führte zu einem kontinuierlichen Abfall der Bikarbonatsekretion, die sich auch hier nach 40 Minuten Wartezeit auf ein Plateau von durchschnittlich $2,58 \pm 0,22$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ einstellte, woraufhin der Versuch beendet wurde. Der Isc stieg weiterhin kontinuierlich an und stellte sich auch nicht auf ein Plateau ein, bedingt war dies wahrscheinlich durch den hohen Cl^- -Gradienten von serosal nach mukosal und die dadurch bedingte Triebkraft für die sich nur serosal befindlichen Cl^- -Ionen.

3.2.3 Effekt von luminal appliziertem DIDS [1 mM] auf die Stimulation mit 8-Br-cAMP

Das Stilbenderivat DIDS hemmt konzentrationsabhängig unterschiedliche epitheliale Ionentransportmechanismen wie z.B. Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport und den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch. In den im folgenden dargestellten Versuchen wurde DIDS in einer Konzentration von 1 mM, in der es offenbar zu einer annähernd vollständigen Hemmung des apikal lokalisierten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers kommt, luminal appliziert, wobei das durch diese Substanz angesäuerte Perfusat erst wieder mit dem Epithel in Berührung kam, nachdem der pH-Wert erneut auf $7,4 \pm 0,03$ eingestellt worden war.

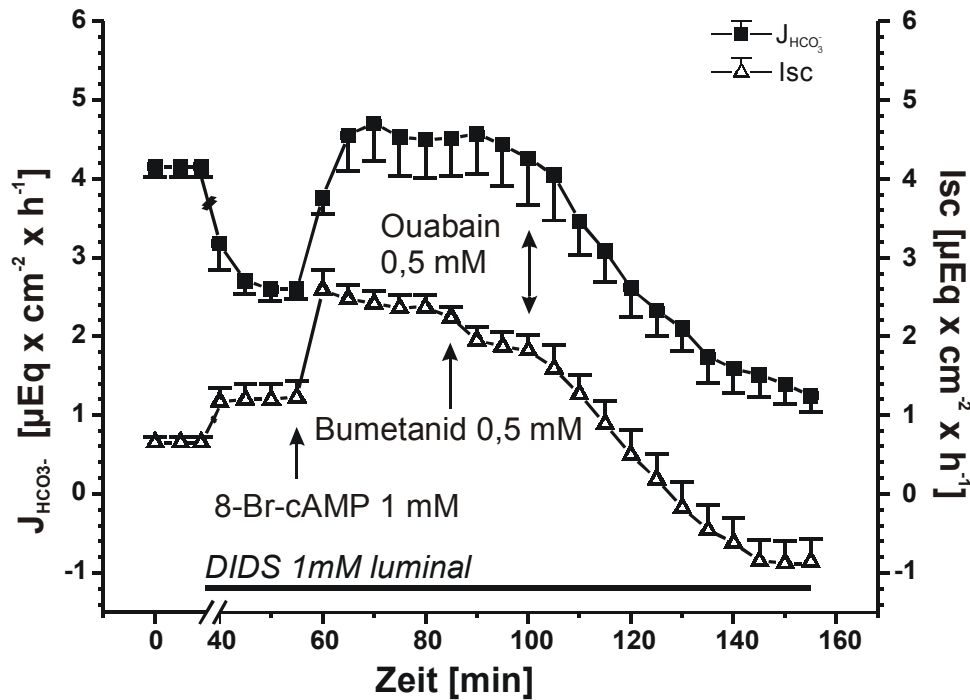


Abbildung 5: Bikarbonatsekretion (■) und I_{sc} (Δ) in Anwesenheit von DIDS [1 mM] (appliziert nach 10 min stabil gemessenen Basalparametern) im luminalen Perfusat. Applikation der übrigen Substanzen wie in den vorangegangenen Versuchen ($n=6$).

Nach Erreichen stabiler Basalparameter wurde DIDS [1 mM] ins luminal Perfusat gegeben, worauf die Bikarbonatsekretion absank, um sich auf ein neues Plateau einzustellen, das noch ca. 60% der ursprünglichen Sekretionsrate betrug. Im Falle des I_{sc} ließ sich ein Anstieg verzeichnen, auch er erreichte ein neues Plateau. Stimulation mit 8-Br-cAMP ergab eine Bikarbonatsekretionssteigerung von $\Delta 2,12 \pm 0,49 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ auf $4,71 \pm 0,48 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ in den ersten 15 min, analog zum vorangegangenen Versuch (siehe Abbildung 4) war diese Steigerung auch hier im Vergleich zur Kontrolle sogar etwas erhöht.

Der 8-Br-cAMP-medierte I_{sc} -Anstieg fiel sowohl zur Kontrolle als auch zum Versuch, bei dem unter luminal Cl^- -freien Bedingungen gearbeitet worden war, geringer aus. Zieht man jedoch im vorliegenden Versuch den initialen Basalwert vom Peakwert nach 8-Br-cAMP Stimulation ab, so erhält man eine Differenz, die dem stimulierten Anstieg

des Isc unter Kontrollbedingungen sehr ähnlich ist (hier: 1,94 SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$; Kontrolle: 1,84 SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$).

Nach Applikation von Bumetanid [0,5 mM] basolateral fielen die beiden Messparameter ab; der Abfall war jedoch zu leicht ausgeprägt, um ihn sinnvoll interpretieren zu können. Dass nach der Zugabe von Ouabain [0,5 mM] ins basolaterale Perfusat sowohl die Bikarbonatsekretion als auch der Isc stark abfielen, um sich letztendlich auf ein Plateau einzupendeln, zeigt, dass die gemessenen Transportvorgänge aktiver Natur waren.

3.2.4 Verlauf von Bikarbonatsekretion und Isc unter bilateral Cl⁻-freien Bedingungen

Bei der im folgenden gezeigten Versuchsreihe wurde bilateral unter Cl⁻-freien Bedingungen gearbeitet. Auf der basolateralen Seite wurde die in Kapitel 1, Tabelle 3 aufgeführte Cl⁻-freie Lösung verwendet, das luminale Perfusat bestand analog zur Versuchsreihe in 3.2.2 aus NaGlukonat [154 mM]. Die Agarosebrücken der Elektroden waren hierfür mit Kaliumnitrat [3 M] statt Kaliumchlorid [3 M] hergestellt worden, um die Konzentration der Cl⁻-Ionen während des Versuches im System möglichst gering zu halten.

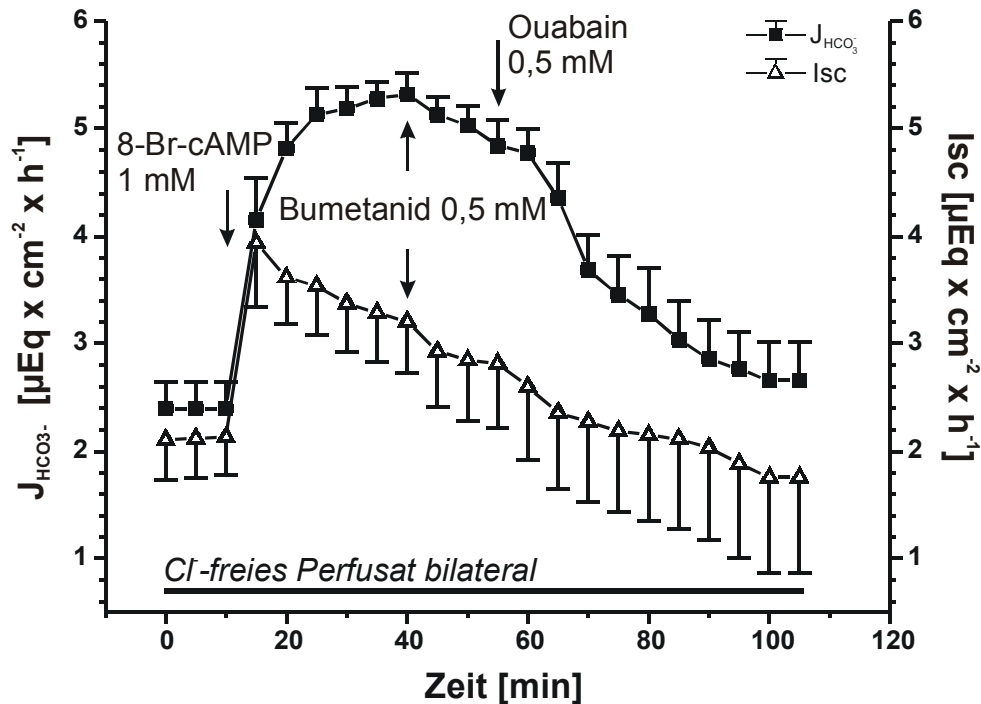


Abbildung 6: Duodenale Bikarbonatsekretion (\blacksquare) und Isc (\triangle) unter bilateral Cl-freien Bedingungen. Die beiden Cl-freien Perfusionslösungen (basolateral und luminal) wurden von Versuchsbeginn an verwendet. Die Stimulantien wurden entsprechend dem bereits beschriebenen Versuchsschema der Kontrolle appliziert; $n=5$.

Da im Rahmen dieses Versuchsschema bereits von Versuchsbeginn an unter bilateral Cl-freien Bedingungen gearbeitet wurde, fielen die Basalparameter für die Bikarbonatsekretion und den Kurzschlussstrom von Anfang an unterschiedlich zur Kontrolle aus.

Zu Versuchsbeginn pendelte sich die Bikarbonatsekretion auf einen Basalwert von $2,4 \pm 0,25$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ ein, der gemessene Isc betrug im Mittel $2,1 \pm 0,37$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. Die Sekretionsrate für Bikarbonat war also niedriger als unter Kontrollbedingungen, der Kurzschlussstrom fiel in diesem Fall jedoch höher aus.

Nach der üblichen Stimulation mit 8-Br-cAMP [1 mM] basolateral 10 Minuten nach Erreichen stabiler Basalparameter war eine Bikarbonatsekretionssteigerung auf $5,32 \pm 0,17$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{h}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$ zu verzeichnen, die insgesamt langsamer vonstatten ging als unter Kontrollbedingungen und noch 30 min nach Stimulation anhielt. Der Kurzschlussstrom stieg ebenfalls an: der Peak lag bei $4,08 \pm 0,8$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$.

Sowohl die Bikarbonatsekretion als auch der Isc fielen auf die Applikation von Bumetanid und Ouabain unter dem auch in den vorhergegangenen Versuchen verwendeten

Versuchsschema hin kontinuierlich ab. Nach 100 Minuten wurde der Versuch beendet, weder Bikarbonatsekretion noch Isc hatten nach dieser Zeit ein Plateau erreicht, was hier auch nicht angestrebt worden war.

3.2.5 Stimulation mit 8-Br-cAMP in bilateraler Abwesenheit von Cl⁻-Ionen und luminaler Anwesenheit von DIDS [1 mM]

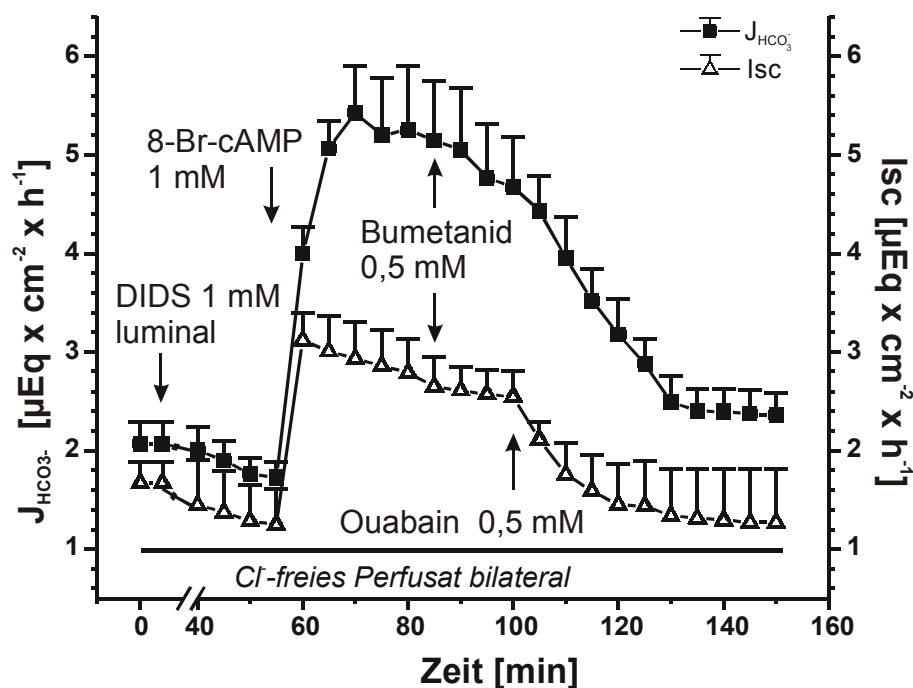


Abbildung 7: Verlauf der Bikarbonatsekretion (\blacksquare) und des Kurzschlussstromes (Δ) unter bilateral Cl⁻-freien Bedingungen. Nach Erreichen stabiler Basalparameter Applikation von DIDS [1 mM] ins luminale Perfusat. Stimulation mit 8-Br-cAMP [1 mM] 10 min nach Einstellung eines neuen Plateaus (45 min nach Applikation von DIDS). Stimulation mit Bumetanid [0,5 mM] 85 min und Ouabain [0,5 mM] 100 min nach Versuchsbeginn; n=4.

Die annähernde Abwesenheit von Cl⁻-Ionen sowohl in der basolateralen als auch in der luminalen Badlösung hatte folgende Auswirkungen auf das Epithel: Wie schon im vo-

rangehend gezeigten Versuch (siehe Abbildung 6) war die basale Bikarbonatsekretion stark vermindert und auch der gemessene Kurzschlussstrom zeigte dem vorangegangenen Versuch ähnliche Werte. Die luminale Applikation von DIDS [1 mM] ließ sowohl die Bikarbonatsekretion als auch den Kurzschlussstrom noch einmal abfallen, die sich beide auf einem neuen Plateau einpendelten. Dieser Abfall war jedoch nicht signifikant ($p=0,22$ für $J_{\text{HCO}_3^-}$ und $p=0,46$ für ΔIsc). Er lässt sich mit der Annahme einer Restaktivität von Cl^- -abhängigen Transportmechanismen, insbesondere der des apikal lokalisierten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauschers, die auf Gabe von DIDS erloschen sein muss, vereinbaren. Die Bikarbonatsekretionssteigerung, die auf die Gabe von 8-Br-cAMP erfolgte, fiel zwar circa doppelt so hoch aus wie in der Kontrolle (vergleiche Abbildung 3), der maximal erreichte Absolutwert war jedoch mit $5,42 \pm 0,48 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ beinahe identisch mit dem Peakwert nach Stimulation mit 8-Br-cAMP unter Kontrollbedingungen. Der Isc-Anstieg nach Stimulation wies mit $\Delta 1,87 \pm 0,35 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Auf die Gabe von Bumetanid fielen sowohl Bikarbonatsekretion als auch Isc ab; da jedoch kurz darauf Ouabain zugegeben wurde, lässt sich über das Ausmaß dieses Abfalls keine sichere Aussage machen. Auf Gabe von Ouabain fiel sowohl die Bikarbonatsekretion als auch der Isc stark ab, um sich in den letzten 20 min des Versuches auf einem neuen Plateau einzupendeln.

Die verschiedenen Ansätze, den apikal lokalisierten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch zu hemmen, haben in jedem Fall zu dem Ergebnis geführt, dass die durch cAMP-abhängige Analoga stimulierte Bikarbonatsekretion im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinträchtigt, wenn nicht sogar gesteigert war. Dass die Sekretionsantworten zum großen Teil aktiver Natur waren, zeigt der in jedem Versuch beobachtete Abfall der Sekretionsraten nach der Applikation von Ouabain.

Inwieweit der basolateral lokalisierte $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ Kotransporter (NKCC) in den apikalen Transport von Bikarbonat und Chlorid involviert ist, lässt sich aus den dargestellten Versuchen nicht sicher ableiten. Um der Frage nach seiner (direkte oder indirekte) Beteiligung zumindest an der Bikarbonatsekretion nachzukommen, wurde im folgenden Versuchsansatz der NKCC-Hemmstoff Bumetanid vor der Stimulation mit 8-Br-cAMP zugegeben.

3.2.6 Auswirkungen der Stimulation durch 8-Br-cAMP [1 mM] auf die Bikarbonatsekretion und den Isc in serosaler Anwesenheit von Bumetanid [0,5 mM]

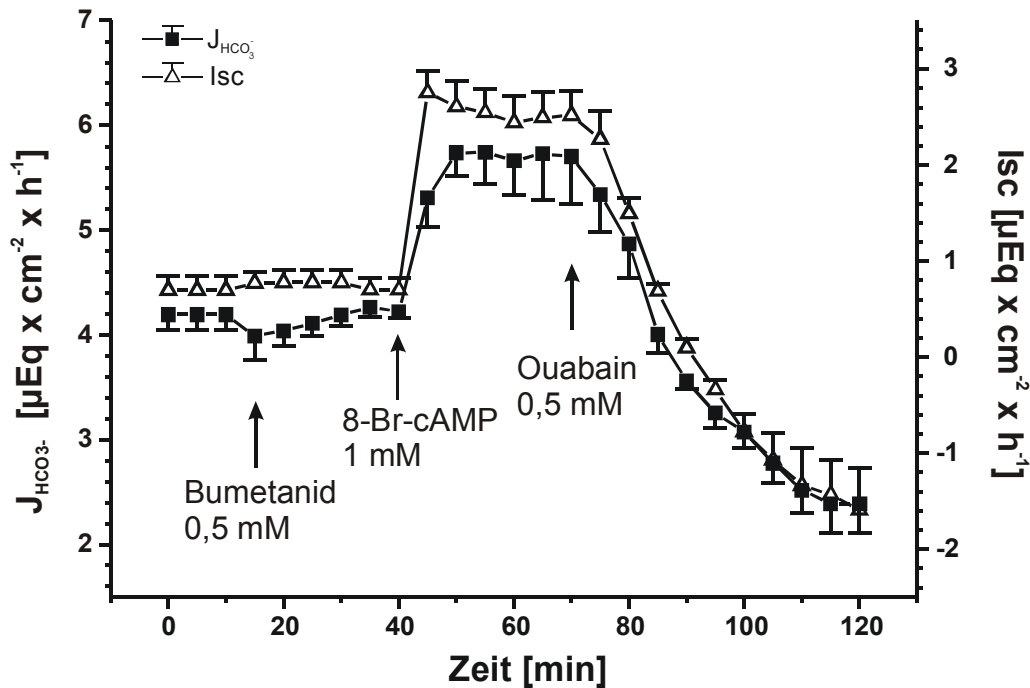


Abbildung 8: Effekt von 8-Br-cAMP [1 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf die Bikarbonatsekretion (■) und den Isc (Δ) in Anwesenheit von Bumetanid [0,5 mM] im basolateralen Perfusat; n=6.

Durch die Blockierung des basolateral gelegenen NKCC durch Bumetanid [0,5 mM] sollte die funktionelle Rolle dieses Transportproteins in Hinblick auf die basale und die stimulierte Bikarbonatsekretion untersucht werden. Nach der Bumetanid-Applikation fiel die HCO_3^- -Basalrate leicht ab, um sich nach einiger Zeit wieder auf ihrem Ausgangsniveau einzupendeln, wobei der Abfall nicht signifikant war ($p=0,18$); der Isc veränderte sich nicht. Die Stimulation mit 8-Br-cAMP bewirkte einen etwas geringeren Anstieg der Bikarbonatsekretion als unter Kontrollbedingungen, der Anstieg des Isc war beinahe identisch zur Kontrolle.

Um die bis hier hin erhobenen Daten zum apikalen Ionentransport des Duodenozyten besser interpretieren zu können, wurden nun Versuche durchgeführt, welche die duodenalen Aufnahmemechanismen für Bikarbonat und ihre Bedeutung für die Bikarbonatsekretion funktionell näher charakterisieren sollten.

3.2.7 Effekt serosaler Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ auf Bikarbonatsekretion und Isc

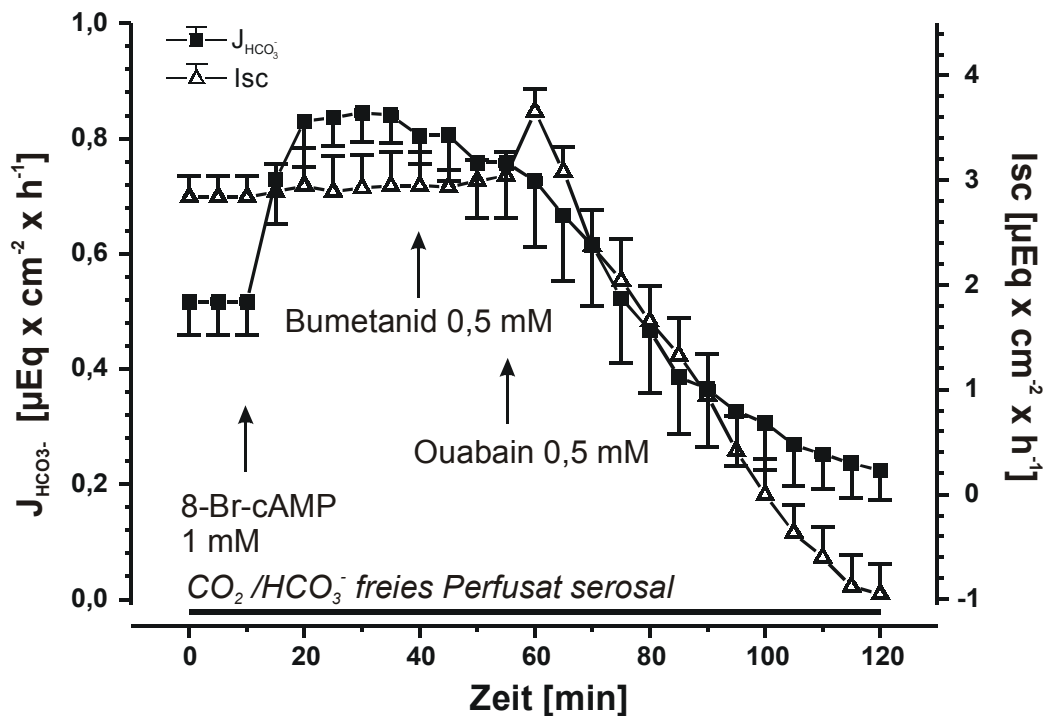


Abbildung 9: Verlauf von Bikarbonatsekretion (\blacksquare) und Isc (Δ) unter serosal $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ freien Bedingungen. Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] 10 min nach Erreichen stabiler Basalparameter. Zugabe von Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] nach weiteren 30 bzw. 45 min; $n=5$.

Das Entfernen von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ aus dem serosalen Perfusat bewirkte eine auf ca. 90% reduzierte basale Bikarbonatsekretionsrate, die Antwort auf den 8-Br-cAMP Stimulus

betrug nur noch ca. 20% der unter Kontrollbedingungen gemessenen. Der Isc wies im Basalzustand mit $2,84 \pm 0,2 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Werte auf, jedoch ließ sich durch Stimulation mit 8-Br-cAMP nur ein minimaler Anstieg provozieren. Auf Bumetanid-Applikation reagierte die Bikarbonatsekretion mit einem leichten Abfall; der Isc veränderte sich nicht nennenswert; die Zugabe von Ouabain führte zum bereits bekannten Abfall der beiden gemessenen Parameter.

3.2.8 Auswirkung der serosalen Anwesenheit von DIDS [1 mM] auf die 8-Br-cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion und den Isc

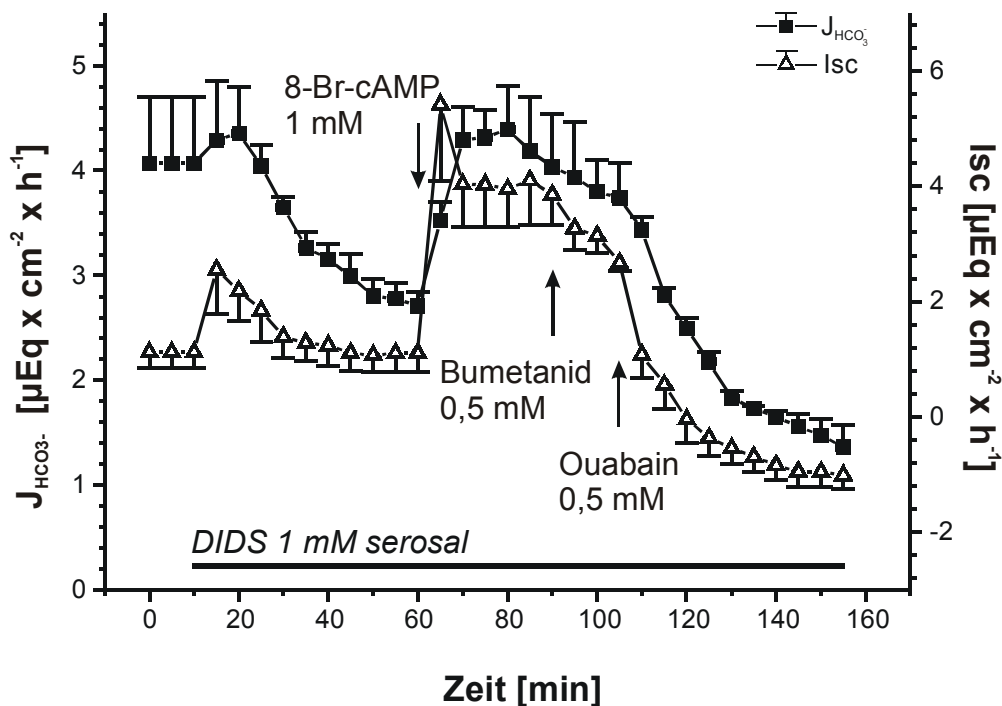


Abbildung 10: 8-Br-cAMP stimulierte Bikarbonatsekretion (\blacksquare) und Isc (\triangle) in Anwesenheit von DIDS [1 mM] im basolateralen Perfusat; anschließende Applikation von Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM]; $n=3$.

DIDS [1 mM] basolateral appliziert bewirkte initial einen Anstieg sowohl der Bikarbonatsekretion als auch des Isc, die daraufhin jedoch beide abfielen, um sich auf einem Plateau einzupendeln, das im Falle der Bikarbonatsekretion mit über 30% Reduktion deutlich unter dem Niveau der Basalsekretion lag; der Isc hatte ca. 30 min nach DIDS-Applikation Werte im Bereich des ursprünglichen Zustandes erreicht. Die 8-Br-cAMP-induzierte maximale Bikarbonatsekretionssteigerung von $1,81 \pm 0,49 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ lag im Bereich des Anstiegs unter Kontrollbedingungen (vergleiche Abbildung 3); trotz der Blockierung eines wichtigen Weges der Bikarbonataufnahme war das Gewebe offenbar immer noch in der Lage, mit einer (im Vergleich zur Kontrolle) uneingeschränkten Sekretionssteigerung für Bikarbonat zu reagieren. Der starke Abfall der beiden gemessenen Parameter nach der Applikation von Ouabain belegt, dass auch hier eine aktive Sekretionsleistung des Duodenalepithels vorgelegen haben muss. Dass die Werte bereits auf die Gabe von Bumetanid hin anfangen abzufallen, liegt wahrscheinlich daran, dass die Applikation der Substanz in den Zeitbereich fiel, in dem die cAMP-induzierte Aktivierung bereits nachließ; der Abfall des Isc wurde bereits im Kontrollversuch beobachtet und hängt wahrscheinlich mit den durch die Hemmung des NKCC veränderten Konzentrationsverhältnissen für Cl^- , das einen maßgeblichen Einfluss auf den Isc hat, zusammen.

3.2.9 Effekt von serosal appliziertem DIDS [3 mM] auf die 8-Br-cAMP-medierte Bikarbonatsekretionsantwort und den Isc

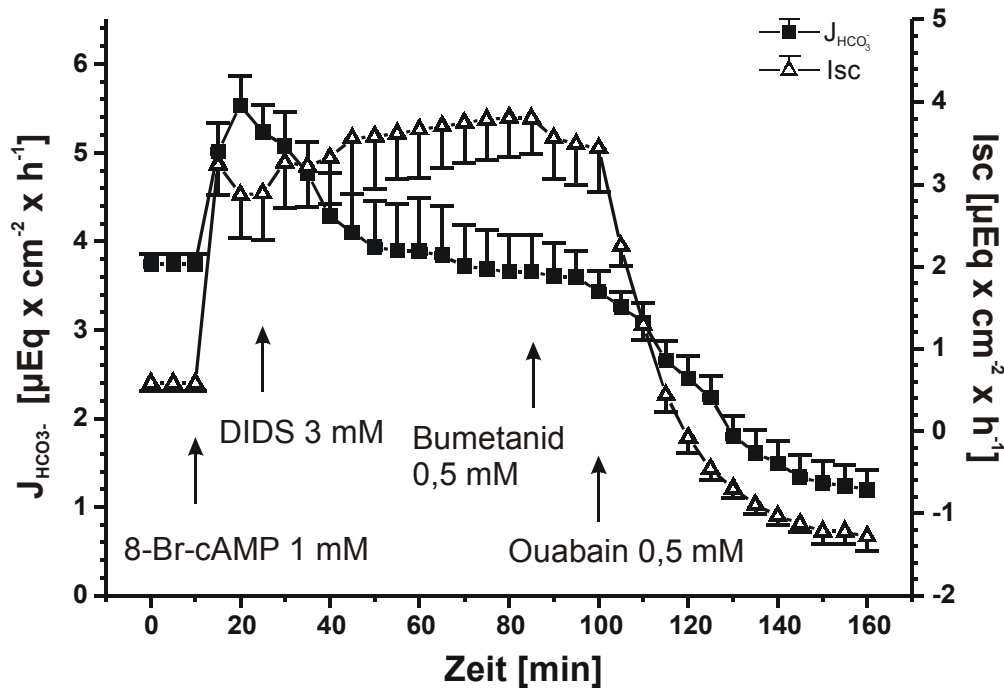


Abbildung 11: Stimulation des Duodenalepithels mit 8-Br-cAMP und darauffolgende serosale Applikation von DIDS [3 mM]. Vor Zugabe von Bumetanid 1h Wartezeit. Ouabain-Applikation nach weiteren 15 min. Verlauf von Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ); n=4.

Die basale Bikarbonatsekretionsrate betrug, da zunächst gleiche Bedingungen wie im Kontrollversuch herrschten, erwartungsgemäß $3,74 \pm 0,12 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. Auf die 8-Br-cAMP Stimulation reagierte das Gewebe in den ersten 15 min mit einer mittleren Bikarbonatsekretionssteigerung von $\Delta 1,79 \pm 0,29 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. Die Zugabe von DIDS [3mM] ins serosale Perfusat ergab eine Abnahme der Bikarbonatsekretion, die sich auf einem neuen Plateau einpendelte, das in den letzten 15 min vor Bumetanid-Applikation durchschnittlich $3,67 \pm 0,42 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ betrug, also deutlich über den Werten lag, welche die Versuchsreihe ergeben hatte, bei der DIDS [1 mM]

vor der 8-Br-cAMP Gabe appliziert worden war (siehe Abbildung 10). Der Isc reagierte auf die serosale Gabe von DIDS [3 mM] mit einem Anstieg, der auch schon bei der Applikation dieser Substanz vor Stimulation beobachtet worden war (siehe Abbildung 10), dort allerdings in einem kürzeren Zeitabschnitt erfolgend. Die Bumetanid-Gabe führte zu keiner Veränderung hinsichtlich der Bikarbonatsekretion, jedoch kam es zu einem leichten Absinken des Kurzschlussstromes. Nach Ouabain-Applikation sanken beide Messparameter ab; nach ca. 1 h hatten sie sich auf ein neues Plateau eingependelt, wobei die erreichten Werte mit den in Abbildung 10 gezeigten vergleichbar waren.

3.2.10 Hemmung der Karboanhydrase durch Azetazolamid [1 mM]: Auswirkung auf die 8-Br-cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion und den Isc

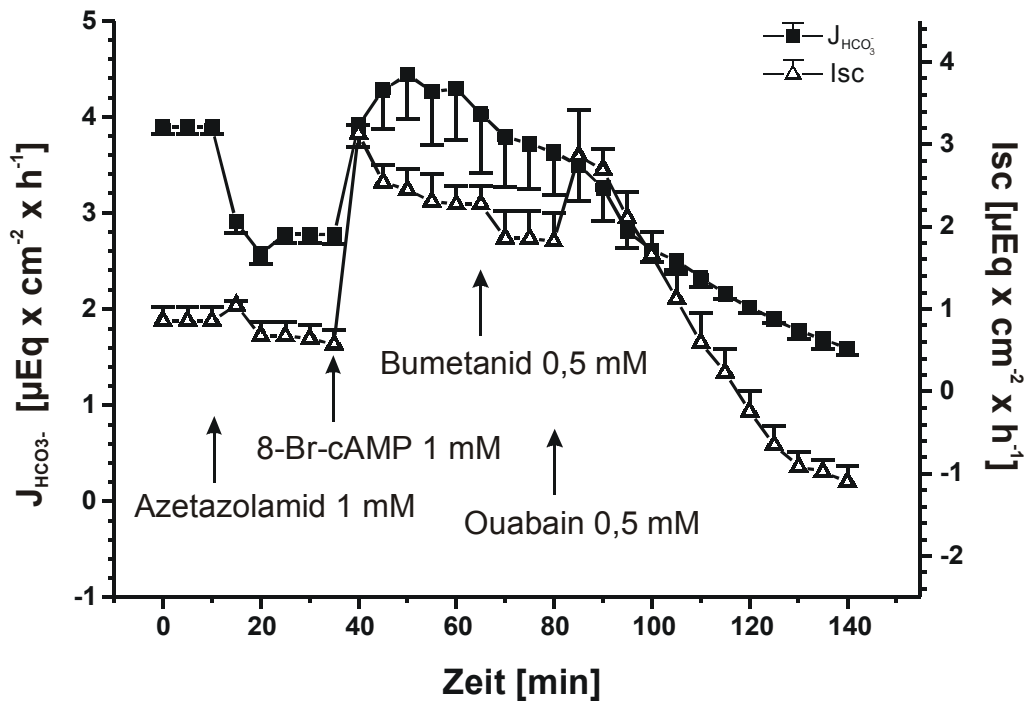


Abbildung 12: Effekt von bilateral appliziertem Azetazolamid [1 mM] auf die 8-Br-cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ). Applikation von 8-Br-cAMP, Bumetanid und Ouabain im selben zeitlichen Schema wie in den vorangegangenen Versuchen. Mediumswechsel luminal 15 min nach Azetazolamid- Applikation; n=3.

Die Azetazolamid-vermittelte Hemmung der zellulären Karboanhydrase führt zum Erliegen der intrazellulären Generierung von HCO_3^- -Ionen. Nach der bilateralen Applikation von Azetazolamid wurde eine Reduktion der basalen Bikarbonatsekretion beobachtet, die nach Erreichen eines neuen Plateaus nach 35 min noch ungefähr 65% der ursprünglichen Sekretionsrate betrug. Der Isc sank hierbei geringfügig ab. Die 8-Br-cAMP-medierte Bikarbonatsekretionssteigerung war mit $1,67 \pm 0,36 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ vergleichbar mit dem Anstieg unter Kontrollbedingungen. Die Bumetanid-Gabe hatte keine nennenswerte Auswirkung auf die Bikarbonatsekretion, der Isc sank jedoch geringfügig ab. Nach Ouabain-Gabe sank der Isc nach einer initialen Steigerung gegen den Nullpunkt, die Bikarbonatsekretion erreichte ebenfalls Werte, die deutlich unter dem nach der Azetazolamid- Inkubation erreichten Plateau lagen. Das Absinken beider Parameter weist darauf hin, dass das Epithel auch nach Azetazolamid- Applikation aktive Ionentransportprozesse unterhielt.

3.2.11 Effekt von serosal appliziertem DIDS [1 mM] und Azetazolamid [1 mM] auf die 8-Br-cAMP-medierte Bikarbonatsekretionsantwort und den Isc

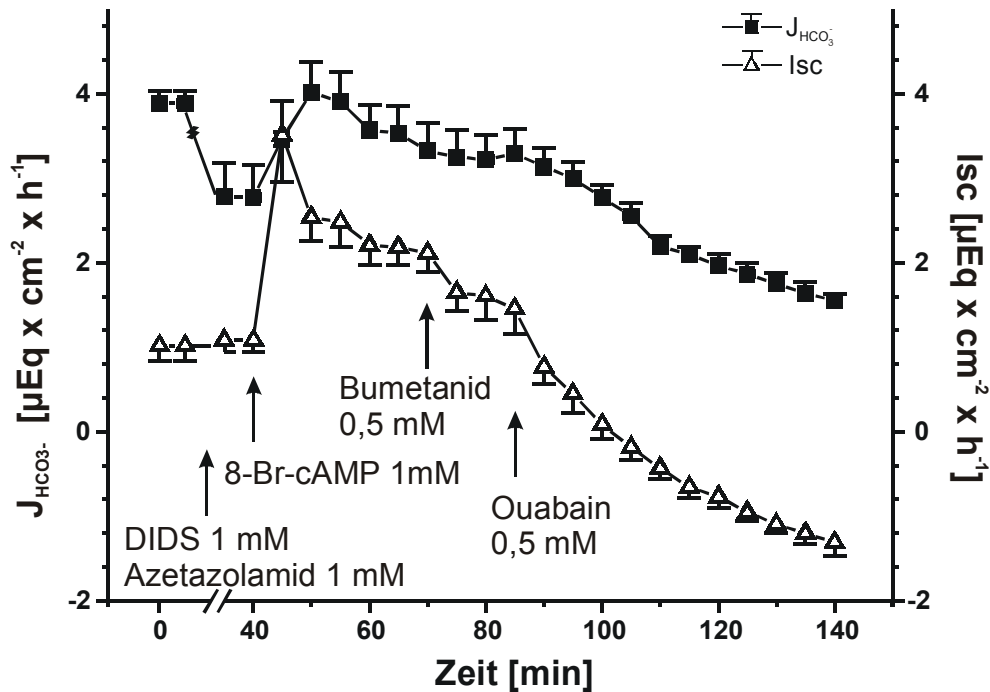


Abbildung 13: Effekt der serosalen Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den Verlauf von Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ) unter Einwirkung von serosal appliziertem DIDS [1 mM] und bilateral appliziertem Azetazolamid [1 mM]. Mediumswechsel luminal 15 min nach Azetazolamid- und DIDS-Applikation. Achse ist von 10 bis 35 min unterbrochen; n=4.

Durch die gleichzeitige Applikation von DIDS und Azetazolamid wurden sowohl der basolateral lokalisierte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport als auch die Karboanhydrase und damit die zwei Hauptwege der zellulären HCO_3^- Bereitstellung blockiert. Auf die Stimulation mit 8-Br-cAMP [1 mM] ließ sich eine im Vergleich zur Kontrolle stark reduzierte als auch in ihrer Dauer verkürzte Bikarbonatsekretionsantwort beobachten, die in den ersten 10 min nach Stimulation bereits ihren Peakwert erreicht hatte; die Steigerung betrug

im Mittel $\Delta 1,24 \pm 0,18$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ und damit nur noch ca. 70% des unter Kontrollbedingungen gemessenen Anstiegs. Die Bumetanid-Applikation bewirkte ein Absinken des Kurzschlussstromes, die Bikarbonatsekretion war dadurch nicht beeinflussbar. Ouabain schließlich hatte ein Absinken beider gemessenen Parameter zur Folge, was ein Hinweis darauf ist, dass auch nach der Inkubation mit den Substanzen DIDS und Azetazolamid zusammen immer noch eine aktive Sekretion stattfand.

3.2.12 Selektive Hemmung des NHE1 durch Hoechst 642 [1 μM]: Auswirkung auf die 8-Br-cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion und den Isc

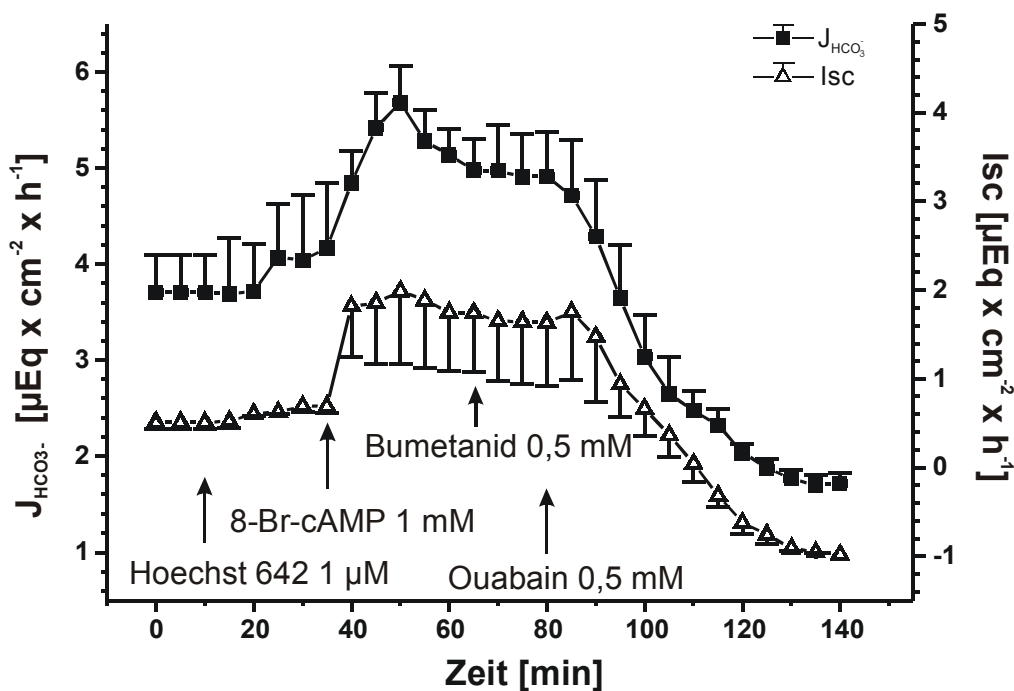


Abbildung 14: Effekt von serosal appliziertem Hoechst 642 [1 μM] auf die 8-Br-cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion (\blacksquare) und Isc (\triangle). Applikation von 8-Br-cAMP, Bumetanid und Ouabain nach dem bereits beschriebenen Schema; $n=3$.

Hoechst 642 gilt in einer Konzentration von 1 μM als selektiver Hemmstoff der basolateral lokalisierten Isoform NHE1 aus der Genfamilie der Na^+/H^+ -Austauscher. Im Gegensatz zur Wirkung von DIDS [1 mM] serosal und Azetazolamid [1 mM] bilateral hatte die Applikation von Hoechst 642 [1 μM] im vorliegenden Versuchsansatz keine Hemmung der basalen Bikarbonatsekretion zur Folge, der leichte Anstieg ist nicht signifikant. In den ersten 15 min nach 8-Br-cAMP-Applikation erreichte die Sekretionsantwort von $\Delta 1,52 \pm 0,29 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ beinahe den Anstieg, der unter Kontrollbedingungen gemessen worden war. Die Isc-Antwort auf den 8-Br-cAMP-Stimulus fiel mit einem Anstieg von $\Delta 1,36 \pm 0,82 \text{ SEM } \mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ im Vergleich zur Kontrolle geringer aus. Die Bumetanid-Applikation hatte weder auf die Bikarbonatsekretion noch auf den Isc eine erkennbare Auswirkung. Nach der Gabe von Ouabain fielen die beiden Messparameter in gewohnter Weise ab, demzufolge hatte auch in diesem Versuch vorher eine aktive Sekretion stattgefunden.

Trotz der Hemmung des NHE1 war das Epithel offenbar in der Lage, sowohl eine uneingeschränkte basale als auch stimulierte Bikarbonatsekretionsrate zu unterhalten. Die Hemmung eines wichtigen Weges der H^+ -Extrusion beeinträchtigt auch gleichzeitig die Karboanhydrasereaktion, da die anfallenden sauren Valenzen schlechter aus der Zelle transportiert werden können, was jedoch offenbar voll kompensiert wurde.

3.2.13 Effekt von Hoechst 642 [1 μM] und DIDS [1 mM] serosal auf die 8-Br-cAMP medierte Bikarbonatsekretionsantwort und den Isc

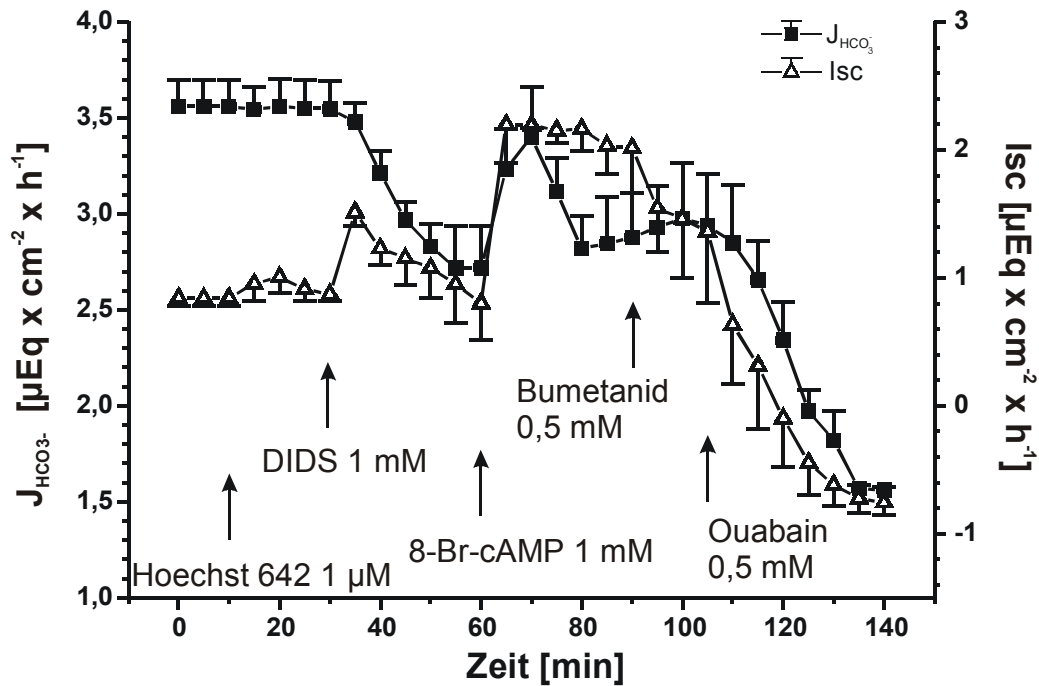


Abbildung 15: Effekt der serosalen Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den Verlauf von Bikarbonatsekretion (\blacksquare) und Isc (\triangle) unter serosaler Einwirkung von Hoechst [1 μM] und DIDS [1 mM] ($n=4$).

Die serosale Applikation von Hoechst 642 [1 μM] führte, wie bereits im vorangegangenen Versuch beobachtet, zu keiner signifikanten Veränderung der Basalsekretion. Nach der serosalen Applikation von DIDS [1 mM] war ein starker Abfall der Bikarbonatsekretionsrate zu verzeichnen, der sich in vergleichbarer Weise auch schon in dem in Abbildung 10 dargestellten Versuch gezeigt hatte. Die 8-Br-cAMP-Applikation 60 min nach Versuchsbeginn ergab eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Bikarbonatsekretionsantwort von $\Delta 0,68 \pm 0,08$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$, dies entspricht einer Verminderung um ca. 60%. Die Bumetanid-Gabe führte zu einem Abfall des Isc, jedoch nicht der Bikarbonatsekretionsrate. Nach Applikation von Ouabain fielen die beiden Parameter Bikarbonatsekretion und Isc stark ab, um sich ab ca. 130 min nach Versuchs-

beginn auf einem neuen Plateau einzupendeln, was für die vorhandene Fähigkeit der untersuchten Epithelien, unter den beschriebenen Bedingungen eine aktive Sekretionsleistung zu erbringen, spricht.

3.2.14 Die 8-Br-cAMP-medierte Bikarbonatsekretionsantwort und der Isc-Verlauf nach serosaler Applikation von DIDS [1 mM], Hoechst 642 [1 μ M] und DMA [0,5 mM]

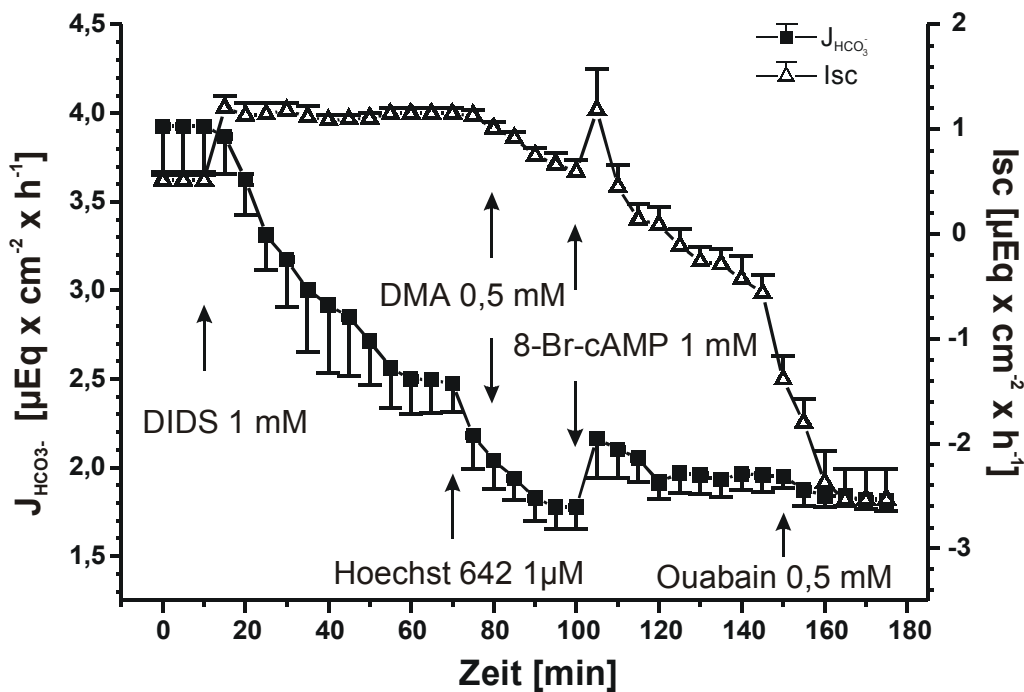


Abbildung 16: Zeitverlauf der Bikarbonatsekretion (\blacksquare) und des Isc (\triangle) unter der serosalen Einwirkung von nacheinander appliziertem DIDS [1 mM], Hoechst 642 [1 μ M] und DMA [0,5 mM], anschließend serosale Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] und Ouabain [0,5 mM]; $n=4$.

Durch die serosale Applikation von DIDS [1 mM] und Hoechst 642 [1 μ M] wurde, wie bereits oben beschrieben, der basolateral lokalisierte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter und die

Isoform NHE1 (entspricht ca. 80% der Hemmung des basolateral lokalisierten Na^+/H^+ -Austausches) gehemmt. In diesem Versuchsschema wurde zusätzlich DMA, ein in der eingesetzten Konzentration von 0,5 mM unspezifischer Hemmstoff sämtlicher im Dünndarm funktionell bedeutsamer Isoformen des Na^+/H^+ -Austauschers, serosal appliziert. Nach Erreichen eines neuen Plateaus zeigte die Bikarbonatsekretion ähnliche Werte, die schließlich bei Versuchsende (nach Ouabain-Gabe) gemessen wurden, das heißt, dass die aktive Basalsekretion zum Erliegen gekommen war. Die 8-Br-cAMP-stimulierte Sekretionsantwort lag im Bereich der in serosaler Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ gemessenen Antwort (siehe Abbildung 9) und auch der stimulationsbedingte Anstieg des Isc zeigte sich, verglichen mit dem unter Kontrollbedingungen gemessenen, deutlich vermindert.

3.2.15 Effekt von serosal appliziertem Hoechst 642 [1 μM] und bilateral appliziertem Azetazolamid [1 mM] auf die 8-Br-cAMP-medierte Bikarbonatsekretionsantwort und den Isc

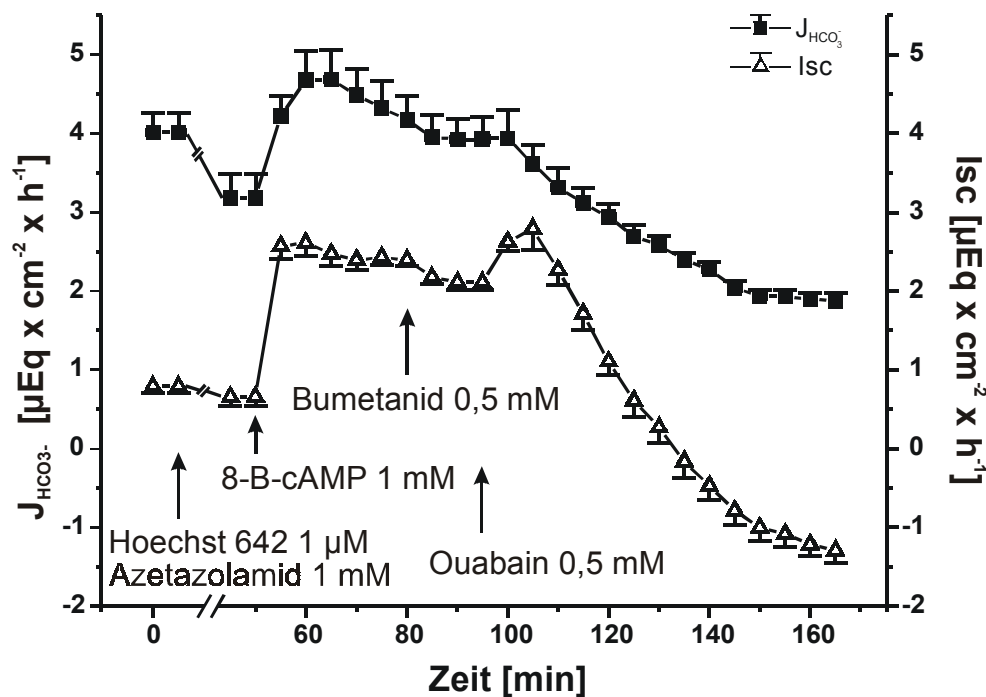


Abbildung 17: Effekt der serosalen Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] , Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den Verlauf von Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ) unter der Einwirkung von serosal appliziertem Hoechst [1 μM] und bilateral appliziertem Azetazolamid [1 mM]. Mediumswechsel luminal 15 min nach Applikation von Hoechst 642 und Azetazolamid; n=4.

Mit Hilfe dieses Versuchansatzes sollte untersucht werden, ob das gleichzeitige Einwirken von serosal appliziertem Hoechst 642 [1 μM] und bilateral appliziertem Azetazolamid [1 mM] einen additiven Effekt hervorrufen würde und eventuell eine stärkere Hemmung der 8-Br-cAMP-induzierten Bikarbonatsekretionsantwort (verglichen mit der Antwort unter der alleinigen Einwirkung der jeweiligen Einzelsubstanz) zur Folge hätte. Die mittlere Sekretionssteigerung auf den 8-Br-cAMP-Stimulus betrug $\Delta 1,5 \pm 0,11$ SEM $\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$, war damit vergleichbar mit den Sekretionssteigerungen, die nach alleiniger Applikation von Azetazolamid (siehe Abbildung 12) und Hoechst 642 (siehe Abbildung 14) jeweils erreicht worden waren, und lag nur geringfügig unter dem entsprechenden mittleren Anstieg unter Kontrollbedingungen.

Da im vorliegenden Versuchsansatz zwei verschiedene Systeme, nämlich sowohl die Karboanhydrase selber als auch der wichtigste Eliminationsweg der dadurch anfallenden Protonen, gehemmt wurden, die 8-Br-cAMP-induzierte Sekretionsantwort im Vergleich zur alleinigen Applikation der jeweiligen Substanzen jedoch nicht nennenswert schwächer wurde, liegt der Schluss nahe, dass die intrazelluläre Generierung von HCO_3^- mittels der Karboanhydrase eng an den basolateral lokalisierten Na^+/H^+ -Austausch gekoppelt ist.

3.3 Radioaktive Fluxmessungen

Wie bereits oben erwähnt, stellt die gemessene Veränderung des Kurzschlussstromes immer nur die Summe aller elektrischen Vorgänge am Epithel dar. Eine Aussage über die Einzelrolle von Kationen oder Anionen lässt sich nur schwer treffen. Eine Möglichkeit, das Verhalten unterschiedlicher Ionenarten in der Ussingkammer näher zu beschreiben, ist die Durchführung von Fluxmessungen mit Hilfe radioaktiver Isotope des

jeweils interessierenden Ions. In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche mit den Isotopen ^3H , $^{36}\text{Cl}^-$ und $^{22}\text{Na}^+$ durchgeführt. Alle Versuche wurden, mit einer Ausnahme, analog zur angewandten Methode in Kapitel 3.2 im „open-circuit-current“-Modus und unter pH-stat-Titration durchgeführt; die Bikarbonatsekretion und der Isc wurden dabei fortlaufend aufgezeichnet.

3.3.1 Bidirektionale ^3H Mannitol Fluxe

Jeder epitheliale Zellverband weist einen, je nach Gewebe unterschiedlich ausgeprägten, parazellulären Shunt auf. Das Mannitol-Molekül kann von der Zelle nicht verstoffwechselt werden und verbleibt somit im Extrazellulärraum. Um den parazellulären Ionentransport näher zu charakterisieren, wurde der bidirektionale ^3H -Mannitol-Flux am Duodenalepithel in der Ussingkammer unter bestimmten Voraussetzungen bestimmt.

3.3.1.1 Änderung des transepithelialen duodenalen ^3H -Mannitolfluxes von serosal nach mukosal nach Stimulation mit 8-Br-cAMP [1m M]

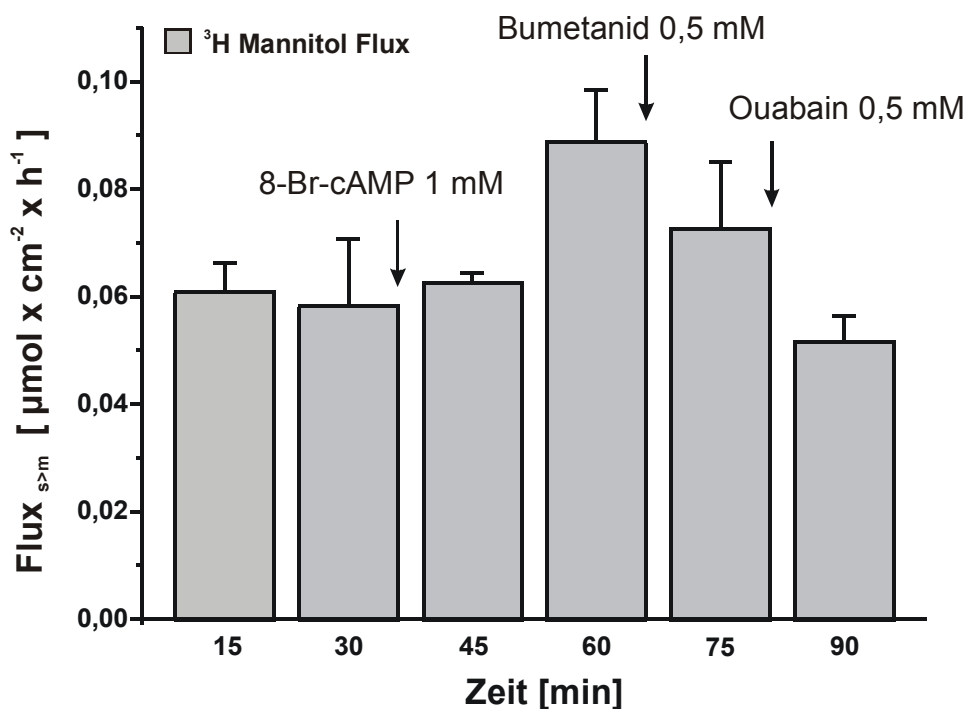


Abbildung 18: Effekt von 8-Br-cAMP [1 mM] auf den mittleren ^3H -Mannitol-Flux \pm SEM von serosal nach mukosal; Applikation von Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] nach 60 bzw. 75 min; $n=3$.

Die Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] ins serosale Perfusat ergab eine Steigerung des ^3H -Mannitol-Fluxes, wobei der Flux in der zweiten Hälfte des Messintervalls von 30 min nach Stimulation stärker anstieg als in der ersten; damit deutet dieses Ergebnis auf eine Erhöhung des parazellulären Shunts unter der Einwirkung cAMP-abhängiger Agonisten hin. Die Applikation von Bumetanid [0,5 mM] ins serosale Perfusat hatte eine Abnahme des ^3H -Mannitol-Fluxes von serosal nach mukosal zur Folge, ein noch deutlicherer Abfall war nach Ouabain-Applikation zu verzeichnen.

3.3.1.2 Vergleich der Bikarbonatsekretionsrate und des transepithelialen ^3H -Mannitol-Fluxes unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit 8-Br-cAMP

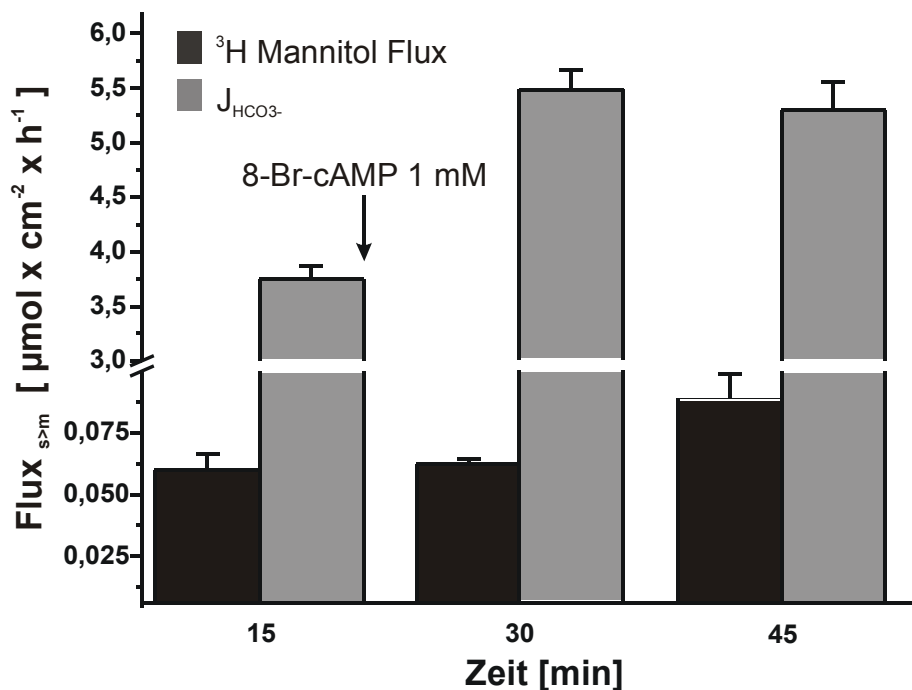


Abbildung 19: Quantitativer Vergleich des Effektes von 8-Br-cAMP [1 mM] auf den mittleren ^3H -Mannitol-Flux \pm SEM von serosal nach mukosal (schwarze Balken) und die mittlere Bikarbonatsekretion \pm SEM (graue Balken). Messung im Zeitintervall von 15 min; $n=3$.

Die gemessene Bikarbonatsekretion war im Schnitt hundertfach höher als der gleichzeitig stattfindende ^3H -Mannitol-Flux, was gut zu der Annahme passt, dass sich Mannitol nur parazellulär von der einen auf die andere Seite des Epithels bewegen kann. Die Bikarbonatsekretion nahm bereits im ersten Messintervall nach Stimulation mit 8-Br-cAMP zu, wogegen die Steigerung des ^3H -Mannitol-Fluxes nach mukosal erst im zweiten Messintervall, nämlich ab 15 min nach Stimulation eintrat.

3.3.2 Bidirektionale $^{36}\text{Cl}^-$ -Fluxe

Das radioaktive Chlorid-Isotop $^{36}\text{Cl}^-$ wurde eingesetzt, um die Sekretion und Absorption dieses Anions sowohl unter „open-circuit-current“- als auch unter „short-circuit-current“-Bedingungen zu quantifizieren und der Frage nachzugehen, ob die im vorangegangenen Versuch beobachtete Zunahme des parazellulären Shunts unter Stimulation mit cAMP-abhängigen Analoga auch eine Zunahme der transepithelialen Anionenleitfähigkeit zur Folge hat. Es wurden der $^{36}\text{Cl}^-$ -Flux von serosal nach mukosal und umgekehrt bestimmt.

3.3.2.1 Effekt von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den duodenalen bidirektionalen ^{36}Cl -Flux unter „open-circuit-current“-Bedingungen

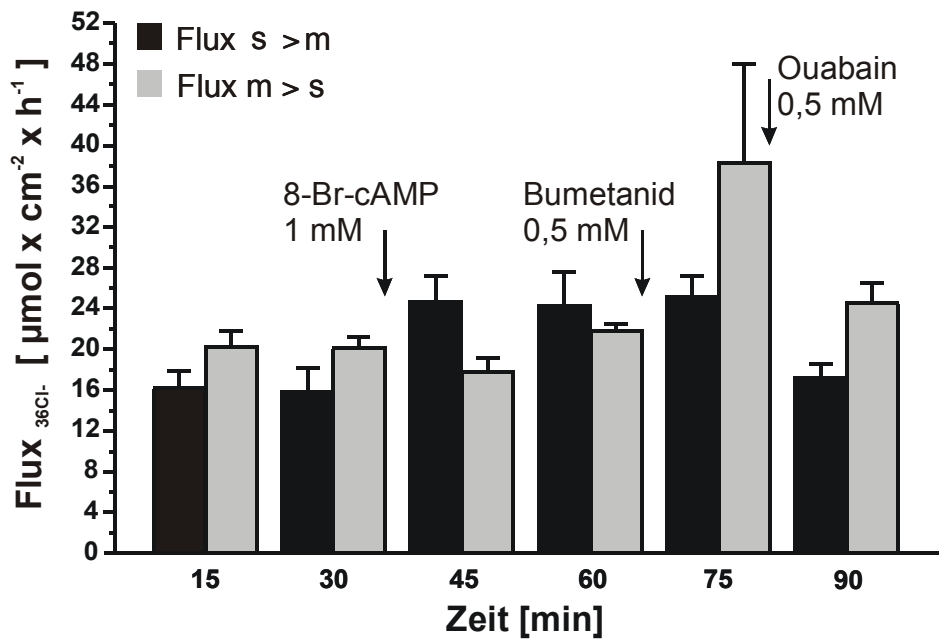


Abbildung 20A: Aufzeichnung der bidirektionalen Fluxraten für ^{36}Cl \pm SEM von serosal nach mukosal (schwarze Balken) und von mukosal nach serosal (graue Balken) unter basalen Bedingungen und nach basolateraler Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM]; $n=5$.

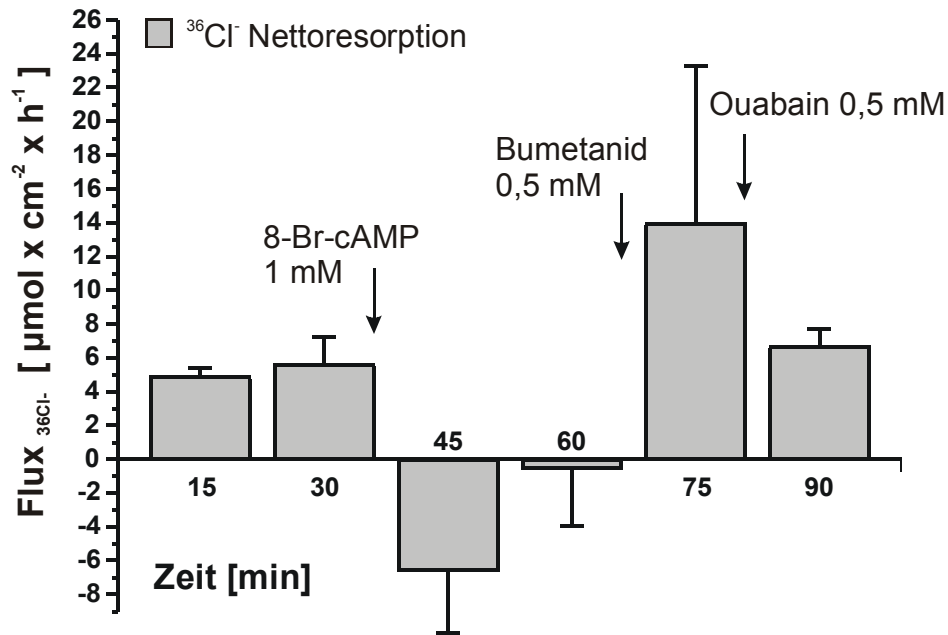


Abbildung 20B: Aufzeichnung der duodenalen $^{36}\text{Cl}^-$ -Nettoresorption \pm SEM unter Verwendung der in Abbildung 20A gezeigten Messwerte.

Der in Abbildung 20A und 20B gezeigte Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen wie der initial beschriebene Kontrollversuch (siehe Abbildung 3) durchgeführt, mit dem Unterschied, dass das Isotop $^{36}\text{Cl}^-$ zugegeben wurde und nach einer Äquilibrierungszeit von 30 min bilaterale Abnahmen im 15-min-Takt erfolgten.

Unter Basalbedingungen war eine Nettoresorption für Cl^- zu beobachten, die sich nach der Stimulation mit 8-Br-cAMP in eine Nettosekretion umwandelte und durch eine gleichzeitige signifikante Zunahme des $^{36}\text{Cl}^-$ -Fluxes nach mukosal und schwache Abnahme des $^{36}\text{Cl}^-$ -Fluxes nach serosal zustande kam (vergleiche Abbildung 20A). Auf die Applikation von Bumetanid [0,5 mM] war eine starke Zunahme der Nettoresorptionsrate zu beobachten, die auf die Gabe von Ouabain [0,5 mM] wieder abnahm, insgesamt fand dabei immer noch eine Nettoresorption statt.

3.3.2.2 Effekt von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den duodenalen bidirektionalen ^{36}Cl -Flux unter „short-circuit-current“-Bedingungen

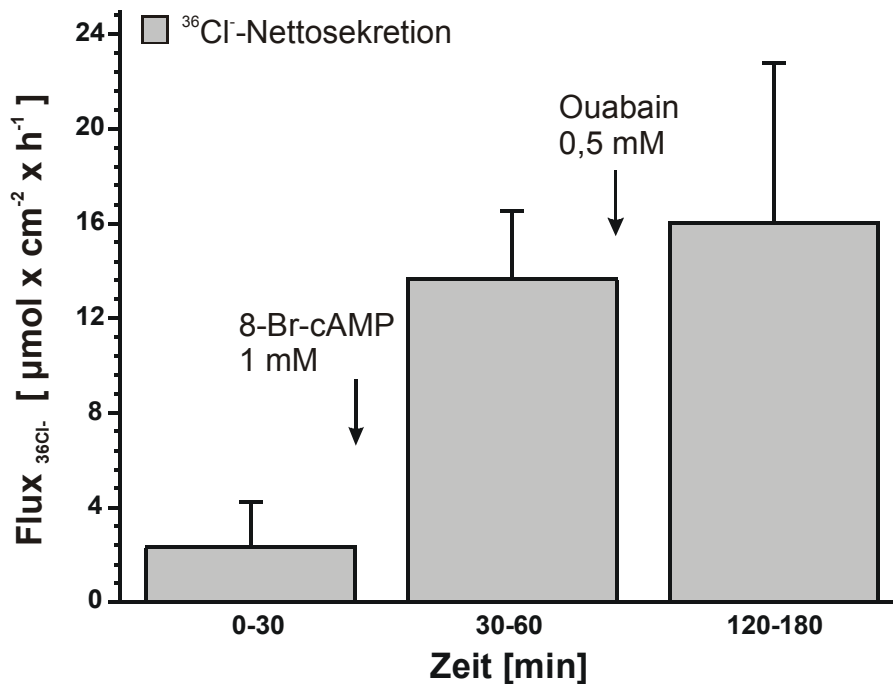


Abbildung 21: Effekt von 8-Br-cAMP [1 mM] auf den mittleren bidirektionalen ^{36}Cl -Flux \pm SEM; dargestellt ist der Nettoflux. Applikation von Ouabain [0,5 mM] 30 min nach Stimulation mit 8-Br-cAMP, nach 1h Wartezeit ohne Abnahmen erfolgten die letzten vier Abnahmen; $n=3$.

Unter „short-circuit-current“-Bedingungen hatte sich die ursprünglich unter „open-circuit-current“-Bedingungen beobachtete Nettoresorption für Cl^- -Ionen in eine Nettosekretion umgewandelt. Die Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] erbrachte jedoch eine Sekretionssteigerung für Cl^- , die vergleichbar war mit derjenigen unter „open-circuit-current“-Bedingungen gemessenen (vergleiche Abbildung 20B). Auf die Gabe von Bumetanid wurde in diesem Versuchansatz verzichtet. Um die Langzeitauswirkungen von Ouabain zu testen, wurde hier erst 1 h nach Applikation der Substanz mit den Abnahmen fortgefahren. Die verbleibende Nettosekretion zeigte ähnliche Werte wie

men fortgefahren. Die verbleibende Nettosekretion zeigte ähnliche Werte wie diejenigen, die kurz nach Stimulation gemessen worden waren.

3.3.3 Bidirektionale $^{22}\text{Na}^+$ Fluxe

Das radioaktive Natrium-Isotop $^{22}\text{Na}^+$ wurde eingesetzt, um die Sekretion und Absorption dieses Kations zu quantifizieren und um der Frage nachzugehen, ob die im vorangegangenen Versuch beobachtete Zunahme des parazellulären Shunts unter Stimulation mit cAMP-abhängigen Analoga eine Zunahme der transepithelialen Kationenleitfähigkeit zur Folge hat, was wiederum bei der Beurteilung des Isc-Anstiegs unter Stimulationsbedingungen zu bedenken ist. Es wurden der $^{22}\text{Na}^+$ -Flux von serosal nach mukosal und umgekehrt bestimmt.

3.3.3.1 Bidirektionaler $^{22}\text{Na}^+$ -Flux unter basalen Bedingungen und unter Einwirkung von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM]

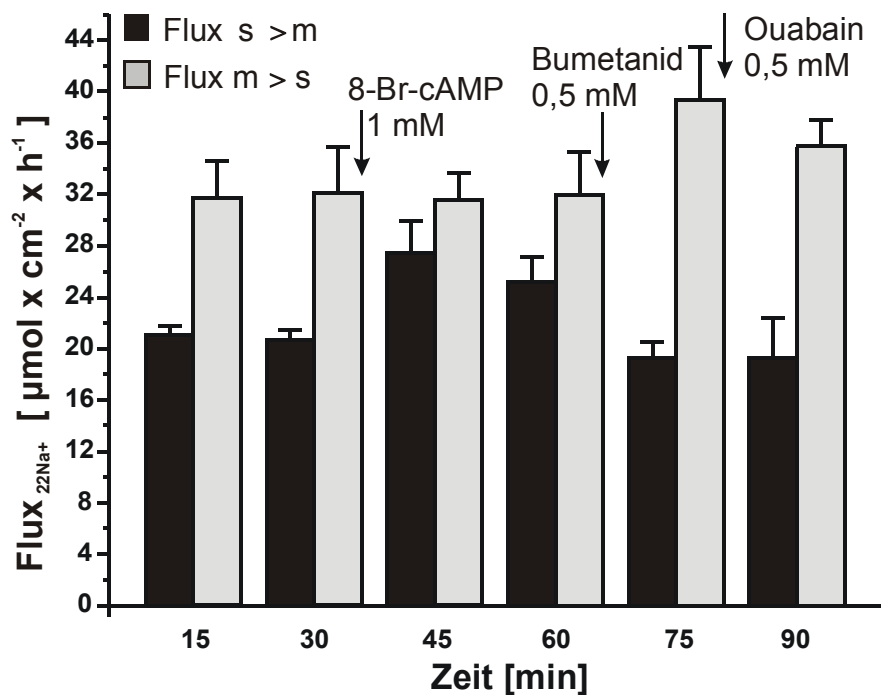


Abbildung 22A: Aufzeichnung der bidirektionalen Fluxraten für $^{22}\text{Na}^+ \pm \text{SEM}$ im Duodenum von serosal nach mukosal (schwarze Balken) und von mukosal nach serosal (graue Balken) unter basalen Bedingungen und nach basolateraler Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM]; $n=5$.

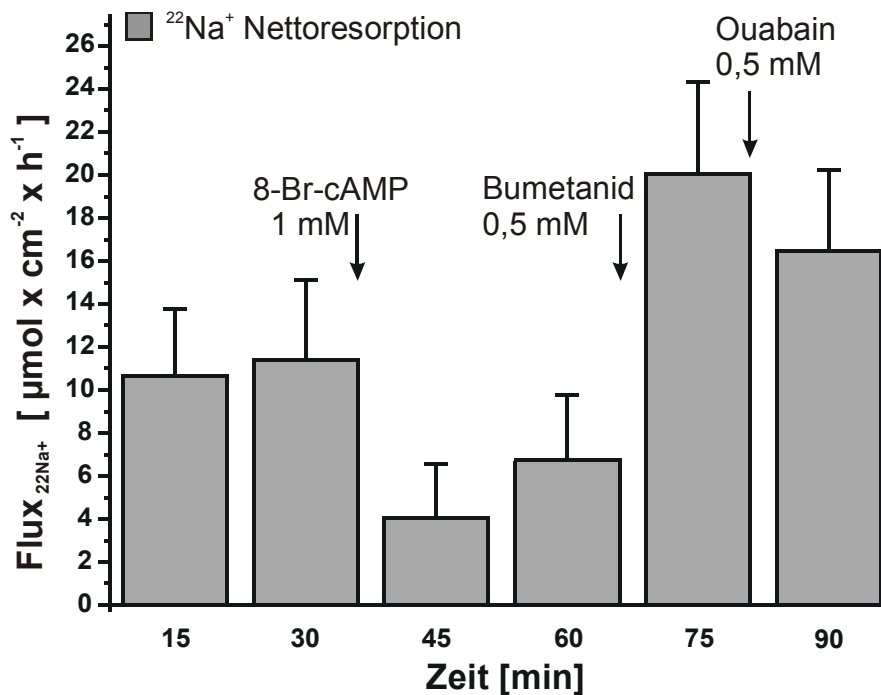


Abbildung 22B: Aufzeichnung der duodenalen $^{22}\text{Na}^+$ -Nettoresorption $\pm \text{SEM}$ unter Verwendung der in Abbildung 22A gezeigten Messwerte.

Während der gesamten Dauer des in Abbildung 22A und 22B gezeigten Versuches fand eine Nettoresorption für Na^+ -Ionen statt. Verglichen mit der Nettoresorption von Cl^- -Ionen im Basalzustand unter „open-circuit-current“-Bedingungen (siehe Figur 20B) war die hier gemessene Na^+ -Rückresorption ca. doppelt so hoch. Nach Stimulation mit 8-Br-cAMP [1 mM] nahm die Na^+ -Nettoresorption durch einen signifikanten Anstieg des $^{22}\text{Na}^+$ -Fluxes nach mukosal ab. Die serosale Applikation von Bumetanid [0,5 mM] hatte einen starken Anstieg der Nettoresorption von Na^+ zur Folge. Nach der Gabe von Ouabain [0,5 mM] ins serosale Perfusat war die Na^+ -Nettoresorption zwar noch höher als im

Basalzustand, jedoch im Vergleich zum gemessenen Wert 15 min nach Applikation von Bumetanid wieder abgefallen.

Tabelle 5: Vergleich von Bikarbonatsekretion, Isc und bilateralen Fluxraten für $^{36}\text{Cl}^-$ und $^{22}\text{Na}^+$ im Duodenalepithel des Kaninchens im Basalzustand und nach Stimulation mit 8-Br-cAMP [1 mM].

Messparameter	Basalwert	Messwert nach dem ersten 15-min-Intervall nach Stimulation**	Messwert nach dem zweiten 15-min- Intervall nach Stimulation
$J_{\text{HCO}_3^-}$ [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]	3,75 ± 0,12 SEM	5,48 ± 0,18 SEM	5,3 ± 0,25 SEM
Isc [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]	1,08 ± 0,16 SEM	2,92 ± 0,2 SEM	2,56 ± 0,18 SEM
$J_{\text{Cl}^- \text{ s>m}}$ [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]*	16,1 ± 1,96 SEM	24,68 ± 2,49 SEM	24,32 ± 3,26 SEM
$J_{\text{Cl}^- \text{ m>s}}$ [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]*	20,18 ± 1,31 SEM	17,83 ± 1,39 SEM	21,83 ± 0,56 SEM
Netto $J_{\text{Cl}^- \text{ s>m}}$ [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]*	-5,27 ± 0,91 SEM	6,57 ± 3,71 SEM	0,51 ± 3,48 SEM
$J_{\text{Na}^+ \text{ s>m}}$ [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]*	20,94 ± 0,63 SEM	27,51 ± 2,42 SEM	25,24 ± 1,9 SEM
$J_{\text{Na}^+ \text{ m>s}}$ [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]*	32 ± 3,13 SEM	31,56 ± 2,07 SEM	32 ± 3,35 SEM
Netto $J_{\text{Na}^+ \text{ m>s}}$ [$\mu\text{Eq} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$]*	11,06 ± 3,29 SEM	4,05 ± 2,52 SEM	6,76 ± 3,05 SEM

* 1 μEq entspricht 1 μmol eines univalenten Ions.

** Im Falle des Isc ist der Peakwert, der unmittelbar nach Stimulation gemessen worden war, angegeben.

4 Diskussion

4.1 Methode

4.1.1 Grundsätzliches

Die Messung zellulärer Funktionen in der Ussingkammer bezieht sich immer auf den Gewebeverband mit allen darin enthaltenen Zellspezies. Neben den Epithelzellen zwangsläufig mituntersucht werden bei der Präparation des Duodenums für die Ussingkammer Krypten-, Villus- und Enterochromaffine Zellen wie auch gleichermaßen submukosal gelegene Zellen wie zum Beispiel Teile von Brunner'schen Drüsen, die durch die Präparation nicht immer vollständig entfernt werden können. Ein wertvoller Vorteil der Ussingkammertechnik gegenüber verschiedenen Methoden der Einzelzelluntersuchung besteht jedoch in der erhaltenen Möglichkeit, parazellulärer Transportwege eines Nativgewebes unter annähernd physiologischen Bedingungen zu beurteilen.

4.1.2 Mukosapräparation

Das „stripping“ eines Darmstückes, also das Entfernen der bindegewebigen Serosa und der beiden Muskelzellschichten mittels geeigneter Präparationstechnik, stellt eine etablierte Methode dar, das Gewebe optimal für eine Messung in der Ussingkammer vorzubereiten. Während der Präparation des Gewebes unter dem Stereomikroskop ließen sich die einzelnen Schichten beim Ablösen erkennen, womit das Präparationsergebnis gut zu kontrollieren war. Nur Gewebe, die nach einer Regenerationszeit von 30 min nach dem Einspannen in die Ussingkammer stabile elektrophysiologische Parameter und eine stabile Bikarbonatsekretionsrate aufwiesen, wurden zum Versuch herangezogen. Durch die am Ende jeden Versuches stattfindende Applikation von Ouabain ins serosale Perfusat wurde die Vitalität des Gewebes überprüft, die durch den darauf folgenden Abfall der Bikarbonatsekretion und der elektrophysiologischen Parameter als vorher gegeben angenommen wurde.

4.1.3 Durchgeführte Messungen an der Ussingkammer

4.1.3.1 pH-stat-Titration

Prinzipiell existieren mehrere Möglichkeiten, die gastroduodenale Bikarbonatsekretion zu messen (57). Da sie auch die Bikarbonatsekretion im luminal sauren Milieu zu messen erlaubt, eignet sich zur Bestimmung der gastralen Bikarbonatsekretion besonders die pH/PCO₂ Methode, die auf der Messung der Bikarbonatkonzentration mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung $[pH = pK_a + \log(\frac{HCO_3^-}{\alpha PCO_2})]$ beruht.

Die Methode der Rücktitration wird häufig zur Messung der pankreatischen Bikarbonatsekretion *in vivo* angewendet, da diese ausreichend hoch ist, um ein befriedigendes Ergebnis hinsichtlich der Genauigkeit zu erlangen. Für säuresezernierende Epithelien ist sie ungeeignet, zudem wird sie beim Einsatz an Epithelien, die vergleichsweise wenig Bikarbonat sezernieren, wie es beim Duodenum der Fall ist, zu ungenau.

Eine weitere Methode zur Messung ausschließlich der gastralen Bikarbonatsekretion stellt die Osmolarität-[H⁺]-Methode dar, die auf der Annahme beruht, dass in der Anwesenheit von H⁺-Ionen für jedes sezernierte Mol HCO₃⁻ im Verlaufe seiner Dissoziation eine lineare Abnahme der Osmolalität erfolgt. Gemessen wird hierbei nicht das sezernierte HCO₃⁻, sondern die Osmolalität und H⁺-Ionen-Konzentration.

Zur Bestimmung der duodenalen Bikarbonatsekretion an der Ussingkammer hat sich die gleichzeitige Durchführung der kontinuierlichen Basentitration zusammen mit dem Kurzschlussstromexperiment als Standardmethode etabliert (141-143). Das Prinzip der pH-stat-Titration besteht darin, den durch die epitheliale Bikarbonatsekretion ansteigenden luminalen pH-Wert durch kontinuierliche Gegentitration mit einer starken Säure wie zum Beispiel HCl auf einem gewünschte Sollwert, meist pH 7 bis pH 8,5, zu halten. In der Annahme, dass ein zugegebenes Säureäquivalent ein Basenäquivalent neutralisiert, kann nun unter Kenntnis der Normalität der verwendeten Säure durch eine geeignete Umrechnung die epithelial sezernierte Bikarbonatmenge ermittelt werden. Das dabei entstehende CO₂, das einen ansäuernden Effekt hat, muss durch geeignete Begasung des luminalen Kompartiments entweder durch CO₂- freies O₂ oder N₂ entfernt werden.

4.1.3.2 Kurzschlussstromexperiment

Grundsätzlich kann das Kurzschlussstromexperiment nach H. P. Ussing in zwei verschiedenen Messmodi, die im Methodenteil (Kapitel 2.2.2.1) erläutert werden, durchgeführt werden. Wenn neben der Messung des Kurzschlussstromes gleichzeitig die Bikarbonatsekretion durch die pH-stat-Titration bestimmt werden soll, muss im „open circuit current“-Modus gemessen werden, da die Titration eine ungepufferte luminale Perfusatlösung erfordert, wie sie nur hier vorliegt; der Messmodus des „short circuit current“ hingegen verlangt bilaterale identische, gepufferte Perfusatlösungen, was wiederum die Möglichkeit der pH-stat-Titration ausschließt.

Da die Fragestellung der vorliegenden Arbeit die gleichzeitige Bestimmung von Bikarbonatsekretion und I_{sc} fordert, wurden sämtliche Versuche, von einer Ausnahme abgesehen, unter „open circuit current“-Bedingungen durchgeführt.

4.1.3.3 Radioaktive Fluxmessungen

Die Basentitration wie auch die Kurzschlussstrommessung sind lediglich dazu geeignet, eine Aussage über Nettoänderungen der transportierten Basenäquivalente beziehungsweise des Ionenfluxes zu treffen; einen Schluss auf die Richtung und Ladung einzelner Ionen lassen sie nicht zu. Um die Rolle bestimmter Ionen beim epithelialen Transport näher charakterisieren zu können, muss auf radioaktive Fluxmessungen für definierte Ionen zurückgegriffen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Isotope ^3H , $^{36}\text{Cl}^-$ und $^{22}\text{Na}^+$ gewählt.

4.2 Durchgeführte Versuche

4.2.1 Allgemeines

Das Kaninchen gehört zu den Spezies, die relativ hohe Bikarbonatsekretionsraten im Duodenum aufweisen und somit an die Verhältnisse im menschlichen Duodenum heranreichen (40;114), weshalb dieses Versuchstier für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurde. Wie bereits oben erwähnt, setzt sich die duodenale Bikarbonatsekretion aus aktiver Sekretion und passiver Diffusion ins Darmlumen zusammen. Untersuchungen, die

das Vorhandensein aktiver Bikarbonatsekretion ins Lumen des Dünndarms zeigten, wurden in verschiedenen Arbeiten sowohl unter einem HCO_3^- -Diffusionsgradienten (wie er auch in der Versuchsanordnung der vorliegenden Arbeit bestand) von serosal nach mukosal als auch unter Bedingungen, in denen bilateral die gleiche HCO_3^- -Konzentration herrschte, durchgeführt (114;141). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bikarbonatsekretion, die nach einer entsprechend langen Wartezeit nach Applikation von Ouabain noch verblieb, als passive Diffusion angesehen, da der aktive Transport durch diese Maßnahme weitgehend zum Erliegen gekommen sein musste.

4.2.2 Funktionelle Differenzierung der elektrogenen und elektroneutralen duodenalen Bikarbonatsekretion

4.2.2.1 Kontrollversuch

Das cAMP-Analogon 8-Br-cAMP stimulierte erwartungsgemäß die Bikarbonatsekretion, die sofort nach Applikation anstieg und ihren Peakwert nach 15 Minuten erreichte (siehe Abbildung 3). Auch der Kurzschlussstrom (Isc) reagierte mit einem deutlichen Anstieg, der steiler als die Steigerung der Bikarbonatsekretion ausfiel und seinen Peak noch früher erreichte. Zum Verständnis dieses Anstiegs sind einige Überlegungen notwendig: ein Ausstrom von Anionen aus dem Epithelzellverband verursacht eine transepitheliale Ladungsverschiebung. Jede Ladungsverschiebung über das Epithel wird durch die Isc-Veränderung angezeigt, allerdings handelt es sich hierbei immer um die Summe aller Ladungsverschiebungen über das Epithel. Gemessen wird folglich immer nur ein Nettoanstieg bzw. -abfall des Isc. Deshalb müssen folgende Möglichkeiten bei der Interpretation des Isc bedacht werden: Wenn eine Anionensekretion durch eine Leitfähigkeit, z.B. einen Cl^- -Kanal, stattfindet, wird der Isc geringer ausfallen, als es die Cl^- -Verschiebung eigentlich erwarten ließe, wenn gleichzeitig eine parazelluläre Kationenbewegung von serosal nach mukosal erfolgt. Auch ist es anhand dieser Messmethode nicht möglich, im Falle einer Koppelung eines elektrogenen mit einem elektroneutralen Transportmechanismus das Verhältnis, in dem beide zueinander stehen, zu ermitteln. Wenn allerdings unter stimulierten Bedingungen der Isc-Anstieg den der Bikarbonatsekretion übertrifft, kann man davon ausgehen, dass gleichzeitig eine elektrogene Cl^-

Sekretion stattgefunden hat, da im Dünndarm hauptsächlich Cl^- - und HCO_3^- -Ionen als sezernierte Anionen in Frage kommen. Der Anstieg der Bikarbonatsekretion und des Isc erfolgten simultan (siehe Abbildung 3). Daraus kann man zwar nicht ableiten, dass die stimulierte Bikarbonatsekretion ausschließlich elektrogener Natur sein muss, da sich der Isc, wie bereits angesprochen, aus mehreren Komponenten zusammensetzen kann; man kann jedoch davon ausgehen, dass ein elektrogener Mechanismus involviert ist, da es zu einer Ladungsverschiebung über das Epithel gekommen ist. Da sich aus dem Anstieg des Isc alleine nicht ableiten lässt, ob es sich hierbei um sezernierte HCO_3^- - oder Cl^- -Ionen (oder beide Ionenarten zusammen) handelt, besteht die Möglichkeit, dass durch cAMP-Analoga ein elektroneutraler Transportvorgang für Bikarbonat stimuliert wird und der Isc-Anstieg aus einer stimulierten Cl^- -Sekretion herrührt. Ein zu dieser Hypothese passendes gängiges Modell, allerdings im Zusammenhang mit der Bikarbonatsekretion pankreatischer Duktuszellen, wurde als erstes von Novak et al 1988 vorgeschlagen (112) und auch von weiteren Arbeitsgruppen unterstützt (145). Es beinhaltet folgende Überlegungen: aus dem Blut stammendes CO_2 diffundiert über die basolaterale Zellmembran, intrazellulär entsteht HCO_3^- im Rahmen der Karbonanhydrasereaktion. Durch einen stimulationsbedingten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (z.B. durch die Hormone Sekretin oder VIP) wird das CFTR-Protein, das in pankreatischen Duktuszellen exprimiert wird (69), aktiviert; dadurch kommt es zu einem Anstieg des Cl^- -Ausstroms nach luminal. Diese Ionen rezirkulieren über einen apikal befindlichen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher nach intrazellulär, durch dessen Austauschaktivität auch mehr Bikarbonat im Sinne einer gesteigerten Bikarbonatsekretion die Zelle verlässt. Das Ergebnis des durchgeführten Kontrollversuchs widerspricht diesem Modell nicht, schließt jedoch andere Möglichkeiten nicht aus.

Das Schleifendiuretikum Bumetanid, das in der angewendeten Konzentration von 0,5 mM den basolateral lokalisierten NKCC zuverlässig hemmt, hatte im Kontrollversuch (siehe Abbildung 3) keinen signifikanten Einfluss auf die Bikarbonatsekretion, jedoch sank der Isc ab, es muss folglich zu einer transepithelialen Ladungsverschiebung gekommen sein, verursacht durch den Wegfall eines wichtigen Weges des Cl^- -Imports durch die Zelle (132). Die gleiche Beobachtung haben Clarke et al. im Rahmen von pH-Stat-Messungen an Mäuseduodena gemacht: Bumetanid, das ebenfalls nach der Stimulation mit Forskolin (die Substanz führt zu einer intrazellulären cAMP-Erhöhung) appli-

ziert wurde, zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Bikarbonatsekretion, der Isc jedoch sank signifikant ab (28). Im Rahmen der Kommentierung eines später gezeigten Versuchs, bei dem die Bumetanid-Gabe vor der Stimulation durch 8-Br-cAMP erfolgte, wird noch einmal auf die mögliche Bedeutung des basolateral lokalisierten NKCC bei der duodenalen Bikarbonatsekretion eingegangen werden. Die Tatsache, dass präpariertes Duodenum aus dem Kaninchen unter den oben geschilderten Messbedingungen in der Lage war, über einen längeren Zeitraum hinweg sowohl eine gleichbleibende Bikarbonatsekretionsrate als auch eine konstante PD und Resistance aufrecht zu erhalten, und dass es auf einen 8-Br-cAMP-Stimulus mit einer simultanen Steigerung der Bikarbonatsekretion und des Isc bzw. auf die Ouabain-Gabe mit einem zuverlässigen Abfall aller Messparameter reagierte, stellte sicher, dass es sich hierbei um einen geeigneten Versuchsaufbau handelte, auf dessen Grundlage nun einzelne Transportvorgänge mit Hilfe der Applikation geeigneter Hemmstoffe und/oder Variation der ionalen Zusammensetzung der Perfusatlösungen untersucht werden konnten.

4.2.2.2 *Inhibition des apikalen Anionenaustauschers*

4.2.2.2.1 Das DRA-Protein

Bevor auf die im folgenden beschriebenen Versuche eingegangen wird, sollen einige neue Erkenntnisse zum apikal lokalisierten Anionenaustauscher vorangestellt werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielt das 1993 von Schweinfest et al. (136) entdeckte Membranprotein DRA als Anionenaustauscher im Darm offenbar eine wichtige Rolle. Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen haben ergeben, dass DRA in der Lage ist, die Anionen SO_4^{2-} , Oxalat, Cl^- und HCO_3^- zu transportieren, ein Vorgang, der sich durch DIDS hemmen ließ (105;106;140). Auch über die Membranlokalisierung des Proteins gibt es inzwischen Untersuchungen: Byeon et al. wiesen 1996 DRA im Kolon am apikalen Zellpol nach (23). Experimente, die sich ebenfalls auf die Membranlokalisierung und zusätzlich auf die Expression und auf funktionelle Aspekte des Proteins beziehen, wurden im Jahr 2001 von Jacob et al. an Gewebe von Ratte, Kaninchen und Mensch durchgeführt (81). Die mRNA-Expressionslevel für DRA, die mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR-Technik bestimmt worden waren, lagen im Verlauf des Gastrointestinaltraktes beim Kaninchen im Ileum, bei Ratte und Mensch hingegen im Kolon am höchsten. Das Duodenum aller untersuchten Spezies wies ebenfalls hohe Expressions-

level auf. Die Autoren vermuten, dass diese Tatsache mit den hohen Bikarbonatsekretionsraten des Duodenums im Basalzustand der genannten Spezies zusammenhängt, und dass weiterhin die hohen DRA-Expressionslevel im Kolon funktionelle Bedeutung für die NaCl-Resorption haben, da NHE3 ebenfalls hoch exprimiert ist. Die Kopplung von $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ bzw. Na^+/H^+ -Austausch bei diesem Vorgang war zuvor in mehreren Arbeiten nachgewiesen worden. Dagegen fand sich beim Kaninchen eine niedrige AE2-Expression im Duodenum und im Ileum, was entgegen früherer Annahmen nicht für eine entscheidende Bedeutung des AE2 bei der Bikarbonatsekretion spricht. Western-Blot-Untersuchungen, die mit Hilfe eines polyklonalen Anti-DRA-Antikörper aus dem Kaninchen durchgeführt worden waren, zeigten spezifische DRA-Banden in der Bürstensaummembran-Fraktion von Duodenum, Ileum und Kolon des Kaninchens, in der Basolateralmembran-Fraktion war hingegen kein Signal detektierbar. Mit Hilfe eines polyklonalen anti-AE2-Antikörper konnte in der Bürstensaummembran-Fraktion aus dem Duodenum und Ileum des Kaninchens kein AE2-Protein nachgewiesen werden. Immunhistochemische Experimente an verschiedenen Segmenten des Rattendarms zeigten eine apikale Lokalisation von DRA, wobei das Signal im Kolon am stärksten war. Studien an Basolateralmembran-Vesikeln aus dem Duodenum der Ratte und des Kaninchens zeigten einen DIDS-sensitiven Austausch von Cl^-/Cl^- , $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, $\text{SO}_4^{2-}/\text{Cl}^-$, und $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$. Insgesamt kann man aus dieser Datenkonstellation auf eine bedeutende Rolle des DRA-Proteins im apikalen elektroneutralen Anionenaustausch des Säugetierduodenums schließen, während AE2 als möglicher Kandidat in den Hintergrund tritt. Zur Interaktion von DRA mit anderen membranären Transportproteinen ist wenig bekannt, jedoch stellten Wheat et al im Jahr 2000 während Untersuchungen an trachealen Epithelzellen fest, dass CFTR die mRNA-Expression von DRA hochreguliert und die apikale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschaktivität steigert (155).

4.2.2.2.2 Hemmung des apikalen Anionenaustausches durch luminalen Cl^- -Ersatz

Zwar gab es nun überzeugende Hinweise darauf, dass es sich beim apikalen Anionenaustauscher im Duodenum sehr wahrscheinlich um das Protein DRA handelt (im folgenden wird weiterhin vom „apikalen Anionenaustauscher“ die Rede sein), jedoch gab es nach wie vor wenig Erkenntnisse über seine Rolle unter physiologischen Bedingun-

gen, sieht man einmal davon ab, dass bei fehlender DRA-Funktion die bereits in der Einleitung beschriebene schwere Symptomatik der kongenitalen Chlorid-Diarrhoe auftritt. Wir fragten uns nun, welche Bedeutung ein elektroneutraler Anionenaustauscher für die Bikarbonatsekretion im Duodenum bei der *in vitro*-Untersuchung eines zusammenhängenden Zellverbandes unter basalen und stimulierten Bedingungen haben könnte, und inwieweit er mit einer Anionenleitfähigkeit gekoppelt ist. Folgende Überlegungen führten zu den im weiteren Verlauf durchgeführten Versuchen: da ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher an der apikalen Zellmembran des Duodenozyten offenbar eine funktionelle Bedeutung besitzt, muss unter luminaler Cl^- -Freiheit, die im vorliegenden Fall durch die theoretisch komplette Entfernung aller Cl^- -Ionen aus dem luminalen Kompartiment erreicht wurde, die Bikarbonatsekretion abfallen. Dies war auch tatsächlich der Fall: nach Austausch der genannten Perfusatlösung fielen sowohl der *Isc* als auch die Bikarbonatsekretion dramatisch ab, um sich auf einem neuen Plateau zu stabilisieren, welches im Falle der Bikarbonatsekretion in seinem Niveau unter dem lag, das am Ende des Versuchs nach Ouabain-Applikation erreicht wurde (siehe Abbildung 4). Somit war nach Entfernung der luminalen Cl^- -Ionen die Ouabain-sensitive bzw. aktive Sekretion erloschen. Damit war gezeigt, dass der aktive Anteil der duodenalen Basalsekretion von der Anwesenheit von Cl^- -Ionen im luminalen Perfusat abhängt. Das Ergebnis passt zu der Annahme einer funktionellen Bedeutung des apikalen Anionenaustauschers unter basalen Bedingungen. Interessanterweise zeigte sich jedoch die 8-Br-cAMP stimulierte Sekretionsantwort gegenüber der Kontrolle nicht vermindert, sie war im Gegenteil sogar leicht erhöht. Unter Berücksichtigung des gleichzeitig erfolgenden *Isc*-Anstiegs, der den der Kontrolle noch übertraf, lässt dies vermuten, dass die stimulierte Bikarbonatsekretion im Gegensatz zur basalen hauptsächlich durch einen elektrogenen, Cl^- -unabhängigen Transportmechanismus bewerkstelligt wird. Der von uns beobachtete im Vergleich zur Kontrolle bedeutend stärkere *Isc*-Anstieg unter luminal Cl^- -freien Bedingungen hängt wahrscheinlich mit dem starken Cl^- -Gradienten von serosal nach mukosal zusammen. Der Anstieg wird, wie bereits erwähnt, hauptsächlich von Cl^- - und HCO_3^- -Ionen getragen, wobei zusätzlich die Möglichkeit der parazellulären Bewegung von Na^+ in die gleiche Richtung in Betracht gezogen werden muss, was einen entsprechend kleineren Anstieg zur Folge hätte. Das Verhältnis der genannten Ionen kann aus der reinen Mes-

sung des Isc nicht abgeleitet werden; bei der Besprechung der Fluxbestimmungen wird darauf zurückgekommen werden.

4.2.2.2.3 Hemmung des apikalen Anionenaustausches durch DIDS

Die Hemmung des apikalen Anionenaustauschers lässt sich auch durch die Applikation des Stilbenderivates DIDS erreichen. Die Substanz ist als Hemmstoff einiger Transportmechanismen bekannt geworden, wobei die erreichte maximale Hemmung von der Konzentration abhängig ist. Es handelt sich hierbei um mehrere Cl^- -Kanäle (wie z.B. den DIDS- bzw. SITS -sensitiven auswärts rektifizierenden ORCC (83), den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter und mehrerer für den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch zuständige Transportproteine. Vesikelstudien, die Petra Jacob aus unserer Arbeitsgruppe an apikalen und basolateralen Membranen aus dem Duodenum des Kaninchens durchgeführte, haben eine Zunahme der Hemmbarkeit in Abhängigkeit von steigenden DIDS-Konzentrationen ergeben: Eine maximale Hemmung des apikalen Anionenaustauschers konnte erst durch DIDS-Konzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-3}M erreicht werden. Er weist demnach, verglichen mit dem basolateralen Anionenaustauscher der Parietalzelle, bei dem es sich nachweislich um einen AE2 handelt (131), nur eine mäßige DIDS-Empfindlichkeit auf (79;81). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer DIDS-Konzentration von 10^{-3}M gearbeitet, um den vermuteten apikalen Anionenaustauscher zuverlässig zu hemmen. Das Absinken der Basalsekretion nach der luminalen Applikation von DIDS [1mM] (siehe Abbildung 5) wie auch die Sekretionsantwort auf 8-Br-cAMP [1mM] ist vergleichbar mit dem Ergebnis des vorangegangenen Versuchs, der unter luminal Cl^- -freien Bedingungen durchgeführt wurde (siehe Abbildung 4). Der Kurzschlussstromverlauf verhielt sich jedoch nach luminaler Cl^- -Entfernung bzw. luminaler Applikation von DIDS gegensätzlich, was erklärbar wird durch die Tatsache, dass im Cl^- -freien Versuch völlig andere Ionenverhältnisse in Hinsicht auf die Verteilung der Cl^- -Ionen vorlag, die einen wesentlichen Einfluss auf die Höhe des Kurzschlussstromes haben und DIDS sowohl Auswirkungen auf den intrazellulären pH als auch auf das Membranpotential zu haben scheint (6). Der Versuch zeigt, dass während der Hemmung des apikalen Anionenaustauschers durch DIDS die cAMP-induzierte Bikarbonatsekretionssteigerung nicht beeinträchtigt ist. Da DIDS auch ein bekannter Hemmstoff des ORCC ist, kann dieser Kanal unter der Voraussetzung, dass die angewandte DIDS-

Konzentration von 1 mM zu seiner Hemmung geführt hat, während der stimulierten Bikarbonatsekretion nur eine untergeordnete Rolle spielen. Obwohl aufgrund dieser Ergebnisse die Vermutung nahe liegt, dass durch die beiden unterschiedlichen Ansätze (luminale Cl^- -Freiheit gegenüber luminaler DIDS-Applikation) derselbe Ionentransportmechanismus, nämlich der apikale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch gehemmt wurde, muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das luminal applizierte DIDS auf die Gegenseite des Epithels diffundiert sein und dort zusätzlich den basolateral befindlichen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport gehemmt haben könnte, was, wie später noch gezeigt werden wird, ebenfalls ein Absinken der Basalsekretion zur Folge hat.

Zu den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen passt auch folgende Beobachtung, die Ishiguro et al. 1998 an interlobulären pankreatischen Duktuszellen des Meerschweinchens machten: Die basale (spontane) Bikarbonatsekretion ließ sich durch Verwendung einer Cl^- -freien Lösung, mit der die präparierten Pankreasgänge perfundiert wurden, deutlich reduzieren, ähnliche Ergebnisse ergab die Zugabe von DIDS [0,5 mM] zur Cl^- -haltigen Perfusatlösung. Hingegen zeigte sich die cAMP- bzw. Sekretin-stimulierte Sekretion weder DIDS- noch Cl^- -abhängig (75). Mit dem oben beschriebenen Modell der pankreatischen Bikarbonatsekretion (112) lassen sich diese Ergebnisse (und damit auch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen) nicht mehr vereinbaren. An dieser Stelle soll erwähnt sein, dass in der Literatur die Mechanismen der Bikarbonatsekretion im Pankreas betreffend kontroverse Standpunkte eingenommen werden, auf die in der vorliegenden Arbeit nur zum Teil eingegangen werden kann.

4.2.2.2.4 Die Rolle einer Leitfähigkeit für Cl^- -Ionen in der basalen und stimulierten Bikarbonatsekretion

An dieser Stelle kann man nun für das Duodenum postulieren, dass unter basalen Bedingungen ein apikaler Anionenaustauscher zumindest einen Großteil der aktiven Bikarbonatsekretion übernimmt, für die Agonisten-stimulierte, elektrogene Bikarbonatsekretion jedoch in erster Linie eine apikale Leitfähigkeit für HCO_3^- -Ionen in Frage kommt. Die Vermutung, dass die cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion zumindest teilweise über eine apikale Leitfähigkeit für HCO_3^- -Ionen stattfindet, wurde bereits von mehreren Autoren geäußert (7;72). Ob der CFTR- Kanal selber als funktionell bedeut-

samer Durchlass für die HCO_3^- -Ionen dient oder nur in die Regulation der Bikarbonatsekretion involviert ist, bleibt Gegenstand kontroverser Diskussion. Dass er jedoch im Rahmen der Agonisten-stimulierten Bikarbonatsekretion sowohl im Dünndarm als auch im Pankreas eine zentrale Rolle spielt, wird aus den Ergebnissen mehrerer Arbeitsgruppen ersichtlich (77;137). Die hohe CFTR-Expression im Duodenum weist zusätzlich auf seine offenbar funktionell bedeutsamen Rolle hin (37;126). Von Clarke et al im Jahre 1998 durchgeführte pH-stat-Messungen an Duodena von CFTR (+/+) und CFTR (-/-)-Mäusen haben zum einen die bereits bekannte Tatsache, dass der CFTR-Kanal für die cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion notwendig ist, ergeben, und zum andern, dass CFTR den apikalen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch während der Stimulation erleichtert. Folgende Versuchsergebnisse ließen sie darauf schließen: Die Applikation von Forskolin führte zwar in den Kontroll (+/+)-Duodena, jedoch weder in den CFTR (-/-)-Duodena, noch unter der Blockade des CFTR-Proteins durch den bekannten CFTR-Hemmstoff NPPB, in CFTR (+/+)-Duodena zu einem Anstieg der Bikarbonatsekretionsrate oder des Isc, was die oben beschriebene Theorie bestätigt. Zusätzlich stellten die Autoren fest, dass unter luminaler Abwesenheit von Cl^- -Ionen bzw. luminaler Anwesenheit von DIDS [0,03 M] sich die Bikarbonatsekretionssteigerung nur geringfügig erniedrigt zeigte, unter basolateraler Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ und luminaler Abwesenheit von Cl^- -Ionen bzw. Anwesenheit von DIDS die Bikarbonatsekretionssteigerung hingegen aufgehoben war, während der Isc-Anstieg nicht beeinträchtigt war. Daraus schlossen sie, dass das Duodenum unter Stimulationsbedingungen fähig ist, die Sekretion von HCO_3^- , das durch Katalyse des Enzyms Karboanhydrase entstanden ist, über durch CFTR erleichterten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausch zu steigern (28), analog zu dem Bikarbonatsekretionsmodell von Novak et al. halten sie also den elektroneutralen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausch auch unter stimulierten Bedingungen für funktionell bedeutsam. Die von Clarke et al. formulierte Schlussfolgerung lässt jedoch die Möglichkeit, dass die duodenale Bikarbonatsekretion auch durch basolaterale HCO_3^- -Aufnahmemechanismen limitiert werden könnte (siehe Abschnitt 4.2.3), unberücksichtigt. Dies könnte ein Grund sein, warum sich diese Versuchsergebnisse nur zum Teil mit den von uns erhobenen Daten, die eine Beteiligung des apikalen Anionenaustauschers während der Agonisten-stimulierten Bikarbonatsekretion unwahrscheinlich machen, vereinbaren lassen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird auch die Beteiligung auswärts gerichteter Cl^- -Kanäle (ORCC) an der epithelialen Bikarbonatsekretion diskutiert: zum einen wurde eine HCO_3^- -Permeabilität dieser Kanäle festgestellt (150), und zum anderen ist gezeigt worden, dass funktionell exprimiertes CFTR einen regulatorischen Einfluß auf ORCC besitzt (36;47). Das CFTR-Protein selber wird wahrscheinlich auch von extrazellulär her reguliert: O'Reilly et al veröffentlichten im Jahr 2000 eine Arbeit, die zeigt, dass extrazellulär vorhandene HCO_3^- -Ionen offenbar in der Lage sind, die vom CFTR (und einer weiteren Cl^- -Leitfähigkeit) getragenen cAMP-aktivierten Auswärts- und Einwärtsströme (wobei der Auswärtsstrom einem Cl^- -Influx entspricht und umgekehrt) deutlich zu reduzieren (113). Gemessen wurden Einzelzellströme an isolierten intra- und interlobulären Pankreasgängen des Meerschweinchens. Die pankreatischen Mechanismen der Bikarbonatsekretion lassen sich, wie bereits oben beschrieben, aufgrund ähnlicher Beobachtungen mit den Verhältnissen am Dünndarm vergleichen. Die Autoren vermuten aufgrund ihrer Ergebnisse eine direkte Interaktion des HCO_3^- -Ions mit dem CFTR-Protein und schlagen vor, dass die Inhibition den physiologischen Zweck erfüllt, als negativer Feedbackmechanismus die nach Aktivierung des CFTR-Kanals erfolgende Membrandepolarisation in Grenzen zu halten und eine gleichbleibende Triebkraft für die Bikarbonatsekretion aufrecht zu erhalten.

4.2.2.3 *Bilaterale Hemmung Cl^- -abhängiger Transportmechanismen*

Es stellte sich nun die Frage, ob die zusätzliche Entfernung auch der basolateralen Cl^- -Ionen eine Auswirkung auf die basale und stimulierte Bikarbonatsekretion haben kann. Die theoretisch völlige Abwesenheit aller extrazellulären Cl^- -Ionen muss zu einem Erliegen des Cl^- -Transportes durch unterschiedliche Mechanismen nach intrazellulär führen, gleichzeitig besteht durch den hohen Cl^- -Gradienten von intra- nach extrazellulär eine Erhöhung der Triebkraft für diese Ionen.

Analog zum Ergebnis des Versuches, bei dem unter luminal Cl^- -freien Bedingungen gearbeitet worden war, fiel die basale Bikarbonatsekretion entsprechend tief aus (siehe Abbildung 6), was wiederum als Hinweis auf die funktionelle Bedeutung des apikalen Anionenaustauschers für die Bikarbonatsekretion im Basalzustand zu werten ist. Erneut war die Bikarbonatsekretionsantwort auf den 8-Br-cAMP-Stimulus hin gegenüber der Kontrolle nicht vermindert, in diesem Fall ließ sich sogar eine Erhöhung feststellen.

Offenbar ist die stimulierte Bikarbonatsekretion weder von lumenalem noch von serosal befindlichen Cl^- -Ionen abhängig. Das Epithel hatte aufgrund der veränderten ionalen Zusammensetzung beider Perfusatlösungen eine vom Kontrollversuch abweichende Potentialdifferenz aufgebaut, infolgedessen fiel der I_{sc} höher aus. Wenn lumenales DIDS [1mM] und die Entfernung von Cl^- -Ionen aus beiden Perfusatlösungen zum gleichen Effekt, nämlich dem der Hemmung hauptsächlich des apikalen Anionenaustauschers führen, so muss das Ergebnis aus Abbildung 6 auch unter Anwesenheit von DIDS [1mM] im lumenalen Kompartiment bei gleichzeitiger bilateraler Abwesenheit von Cl^- -Ionen in dieser Form reproduzierbar sein. Abbildung 7 zeigt den dazu durchgeführten Versuch. Zwar führte die lumenale DIDS-Applikation zu einem weiteren Abfall sowohl der Bikarbonatsekretion als auch des Kurzschlussstromes, was jedoch in keinem der beiden Fälle signifikant war und auf eine Restaktivität des apikalen Anionenaustauschers unter nur theoretisch bilateral Cl^- -freien Bedingungen hinweist. In beiden Versuchsansätzen (Abbildung 6 und 7) hatte die Applikation von 8-Br-cAMP eine im Vergleich zur Kontrolle stark erhöhte Bikarbonatsekretionsantwort zur Folge. Eine Erklärung für diese Beobachtung lässt sich aus den vorliegenden Versuchen nicht ableiten, da mehrere, nur mit Hilfe des Ussingkammer-Experimentes nicht weiter differenzierbare Mechanismen dafür verantwortlich sein können. Durch das (theoretisch) völlige Fehlen von extrazellulären Cl^- -Ionen und die Anwesenheit von DIDS verändern sich die Verhältnisse an der Zellmembran, was zu einer Involvierung auch Cl^- -unabhängiger Transportmechanismen führen kann. Festzuhalten wäre hierzu noch, dass die Cl^- -freien Versuche vor Stimulation im Vergleich zur Kontrolle stark erniedrigte basale Bikarbonatsekretionsraten aufwiesen, und der erreichte Peakwert letztendlich in allen drei Versuchen (Kontrolle, bilateral Cl^- -frei und bilateral Cl^- -frei plus DIDS luminal, vergleiche Abbildungen 3, 6 und 7) sehr ähnlich ausfiel. In allen Versuchen, in denen bilateral Cl^- -frei gearbeitet worden war, fiel die erhöhte Restsekretion nach Ouabain-Gabe (gleichbedeutend mit passiver Diffusion) auf; welche die Sekretionsraten unter luminal Cl^- -freien Bedingungen bzw. luminal Cl^- -freien Bedingungen plus DIDS in ihrer Höhe übertraf. Da sich das durch passive Diffusion auf die andere Seite des Epithels gelangte Bikarbonat zu dem aktiv sezernierten addiert, musste es im Verlauf des Versuches zu einer deutlichen Erhöhung der parazellulären Permeabilität gekommen sein. Guba et al stellten 1996 anhand von Ussingkammer-Untersuchungen am Duodenum der Ratte fest,

dass nach einem PGE₂- bzw. 8-Br-cAMP-Stimulus der Netto-³H-Mannitol-Flux zunahm, ein Effekt, der durch Guanylin, STa und 8-Br-cAMP nicht auszulösen war. Die Autoren schlossen daraus, dass cAMP- im Gegensatz zu cGMP-Stimuli in der Lage sind, die parazelluläre Permeabilität zu erhöhen (54). In jedem der von uns durchgeführten Versuche war das untersuchte Epithel einem 8-Br-cAMP-Stimulus ausgesetzt worden, doch sank die Bikarbonatsekretion außer in den Versuchen, in denen Cl⁻-frei gearbeitet worden war, immer entweder auf das Ausgangsniveau vor Stimulation oder sogar weit unter die initial gemessene Basalsekretion. Damit müssen bei den Versuchen, in denen mit Cl⁻-freien Lösungen gearbeitet worden war, zusätzliche Faktoren, die einen weit größeren Einfluss als cAMP-Agonisten auf die parazelluläre Permeabilität hinsichtlich einer Erhöhung besitzen könnten, eine Rolle spielen.

4.2.2.4 Blockade des basolateral gelegenen NKCC

Inwieweit spielt die basolaterale Cl⁻-Aufnahme des Duodenozyten eine Rolle in der Bikarbonatsekretion? Dies sollte durch die Bumetanid [0,5 mM]-induzierte Blockade des basolateral gelegenen NKCC, dessen Funktion im Darm als einer der Hauptaufnahme-mechanismen für Cl⁻ gilt (132), und die anschließende Stimulation durch 8-Br-cAMP [1 mM] geklärt werden. Der Duodenozyt muss nach Hemmung des genannten Transportmechanismus intrazellulär an Cl⁻-Ionen verarmen. Er könnte diesen Mangel durch eine Stimulation des apikal gelegenen Anionenaustausches ausgleichen, was zu einer Zunahme der Bikarbonatsekretion führen müsste. Clarke et al. stellten 1992 fest, dass Bumetanid den cAMP-stimulierten Isc im Darm von Normalmäusen signifikant reduzierte, die Substanz jedoch im Darm von CFTR (-/-) Mäusen keinen Effekt hervorrief, woraus sie eine wichtige Rolle des NKCC in der cAMP-stimulierten Anionensekretion via CFTR-Kanal ableiten (27). Michael Walter aus unserer Arbeitsgruppe hat mit Hilfe von Ussingkammer-Experimenten am Duodenum der Ratte gezeigt, dass eine Reduktion der intrazellulären Cl⁻-Konzentration durch Hemmung des basolateral lokalisierten NKCC mittels Bumetanid [0,5mM] zu einer Zunahme der basalen Bikarbonatsekretion führt; dieser Effekt war unter luminal Cl⁻-freien Bedingungen aufgehoben. Auf die Stimulation mit Forskolin (führt zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP) unter basolateraler Anwesenheit von Bumetanid und luminaler Cl⁻-haltiger Lösung reagierte das Duodenum mit einer 20-30% höheren Bikarbonatsekretionsrate, während der Isc nur um die Hälfte des Anstiegs in der Kon-

Isc nur um die Hälfte des Anstiegs in der Kontrolle stieg. Aus diesen Ergebnissen leitete er ab, dass die Zelle unter der Blockade des NKCC versucht, vermehrt Cl^- über eine gesteigerte Aktivität des apikalen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers zu importieren (154). In den von uns durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass der oben beschriebene Mechanismus in der Spezies Kaninchen wahrscheinlich keine Rolle spielt, da die basale Bikarbonatsekretionsrate durch die Blockade des basolateral gelegenen NKCC nicht steigerbar war und die Anstiege der Messparameter nach Stimulation vergleichbar waren mit denen, die unter Kontrollbedingungen gemessen worden waren (siehe Abbildung 8). Hier müssen offenbar noch andere Transportmechanismen, die für die intrazelluläre Cl^- -Homöostase verantwortlich sind, funktionell bedeutsam sein.

4.2.2.5 Bidirektionale Fluxstudien für ^3H -Mannitol, $^{36}\text{Cl}^-$ und $^{22}\text{Na}^+$ unter Kontrollbedingungen

Da es die Fragestellung erforderte, die Bikarbonatsekretion und die Fluxraten parallel zu messen, wurden zunächst Fluxe für die genannten Ionen unter „open circuit current“-Bedingungen durchgeführt. Unvermeidbar waren damit Ionengradienten, die durch die Notwendigkeit des Einsatzes einer ungepufferten Lösung (0,9%ige NaCl) auf der luminalen Seite entstanden. In die Interpretation der Fluxe muss besonders der vorhandene Cl^- -Gradient von mukosal (154 mmol/l) nach serosal (115 mmol/l) einbezogen werden. Der Gradient für Na^+ fiel etwas geringer aus (serosal 140 mmol/l gegenüber luminal 154 mmol/l). So fällt bei Betrachtung sowohl der $^{36}\text{Cl}^-$ -Fluxe, die unter „open circuit current“-Bedingungen gemessen worden waren (siehe Abbildung 20A, B), als auch der $^{22}\text{Na}^+$ -Fluxe (siehe Abbildung 22A, B) eine Nettoresorption unter basalen Bedingungen auf, die, quantitativ betrachtet, im Falle der Cl^- -Ionen höher lag als im Falle der Na^+ -Ionen.

Nach Stimulation schlug die Nettoresorption für die Cl^- -Ionen in eine Nettosekretion um, was bedeutet, dass das Epithel nun gegen einen Konzentrationsgradienten Cl^- transportierte. Gleichzeitig erfolgte der bereits besprochene Isc-Anstieg. Es ist bekannt, dass die intrazelluläre Konzentrationserhöhung von cAMP zu einer elektrogenen Cl^- - und HCO_3^- -Sekretion und einer nachfolgenden Depolarisation der Zellmembran führt (145), eine Tatsache, die wir nun für beide genannten Anionen experimentell nachvollzogen hatten. Größenordnungsmäßig lag der Nettotransport für Cl^- nach Stimulation mit 8-Br-

cAMP um ein Vielfaches über dem Anstieg des Isc (siehe Abbildung 3 und 20A), was nur bedeuten kann, dass der Isc nicht das wahre Ausmaß der elektrogener transportierten Anionen widerspiegelt. Die naheliegendste Möglichkeit für diese „Maskierung“ des Isc ist ein gleichzeitig erfolgendes, aus Gründen der Elektroneutralität verstärktes Mitgehen von Kationen in die gleiche Richtung, wobei an einen parazellulären Shunt von Na^+ -Ionen am ehesten in Frage kommt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden für das Isotop $^{22}\text{Na}^+$ bilaterale Fluxstudien unter „open circuit current“-Bedingungen durchgeführt. Wahrscheinlich aufgrund des oben beschriebenen Konzentrationsgradienten war in allen Phasen des Versuchs eine Na^+ -Nettoresorption zu verzeichnen. Wenn man jedoch die einzelnen Fluxraten (das heißt den Flux von serosal nach mukosal bzw. den Flux von mukosal nach serosal) betrachtet, ist ein Zunahme des $^{22}\text{Na}^+$ -Fluxes von serosal nach mukosal auf Stimulation hin zu verzeichnen (siehe Abbildung 22A). Auf die Berechnung des Netto- $^{22}\text{Na}^+$ -Fluxes wirkte sich diese Zunahme insofern aus, als die Nettoresorption nach Stimulation abnahm (siehe Abbildung 22B). Man kann davon ausgehen, dass die Zunahme des $^{22}\text{Na}^+$ -Fluxes nach Stimulation über eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität zustande kommt. Da Enterozyten über keinen aktiven Transportmechanismus für den Zucker Mannitol verfügen, wurden zur Überprüfung der parazellulären Permeabilität Fluxstudien für ^3H -Mannitol durchgeführt. Wie bereits im Abschnitt 4.2.2.3 beschrieben, hatten Guba et al 1996 eine Zunahme der parazellulären Permeabilität im Duodenum der Ratte nach einem PGE_2 - bzw. 8-Br-cAMP-Stimulus festgestellt (54). Dieses Ergebnis ließ sich von uns insofern nachvollziehen, als der ^3H -Mannitol-Flux im Duodenum des Kaninchens von serosal nach mukosal nach dem 8-Br-cAMP-Stimulus zunahm, allerdings erst im zweiten 15-min-Intervall nach Applikation der Substanz. Wenn man die Bikarbonatsekretionsrate mit dem ^3H -Mannitol-Flux von serosal nach mukosal vergleicht (siehe Abbildung 19), so fällt auf, dass erstere den ^3H -Mannitol-Flux um mehr als das hundertfache übertrifft. Daraus kann man ableiten, dass die Bikarbonatsekretion zum großen Teil transzellulär (und damit über aktiven Transport) stattfindet und vergleichsweise wenig HCO_3^- -Ionen über parazellulären Shunt (und damit über passive Diffusion) auf die entgegengesetzte Seite gelangen. Um schließlich abzuschätzen, welchen Einfluss der stärkste Ionengradient unter „open circuit current“-Bedingungen, nämlich der für die Cl^- -Ionen, auf deren Nettobewegung hat, wurde eine Versuchsreihe für den $^{36}\text{Cl}^-$ -Flux unter „short circuit current“-

Bedingungen durchgeführt (siehe Abbildung 21). Da unter diesen Messbedingungen bilateral die gleiche Lösung (Basallösung unter Carbogen-Begasung, siehe Abschnitt 2.3 7, Tabelle 3) vorliegt, existieren hier keinerlei Ionengradienten. Unter Basalbedingungen war nun eine Nettosekretion für Cl^- zu verzeichnen. Erwartungsgemäß kam es nach Stimulation mit 8-Br-cAMP zu einem Anstieg der Nettosekretion, die in ihrer Größenordnung ungefähr dem stimulationsbedingten Anstieg der Cl^- -Sekretion unter „open circuit current“-Bedingungen entsprach. Aus diesem Ergebnis kann man ableiten, dass ein vorhandener Konzentrationsgradient für Cl^- einen Einfluss auf die Nettobewegung dieser Ionen im Basalzustand besitzt, wobei passive Ionenbewegungen beteiligt sein dürften, dass jedoch unter Stimulationsbedingungen Cl^- unabhängig vom Konzentrationsgradienten und auch gegen ihn in einer bestimmten Größenordnung sezerniert wird, was als Indiz dafür zu werten ist, dass es sich um aktiven Transport handelt.

Sowohl bei dem $^{36}\text{Cl}^-$ -Flux unter „open circuit current“-Bedingungen (siehe Abbildung 20A, B) als auch dem $^{22}\text{Na}^+$ -Flux (siehe Abbildung 22A, B) war eine bedeutende Zunahme der Nettoresorption für die untersuchten Ionen nach Bumetanid-Applikation aufgefallen. In beiden Fällen hatte der Flux von mukosal nach serosal stark zugenommen. Der Flux von serosal nach mukosal zeigte sich im Falle des $^{36}\text{Cl}^-$ unverändert und im Falle des $^{22}\text{Na}^+$ hatte er bereits im zweiten 15-min-Messintervall abgenommen, was sich nach Bumetanid-Gabe fortsetzte. Obwohl es nahe liegt anzunehmen, dass die Zelle, die durch Hemmung des NKCC auf einen Hauptmechanismus für den basolateralen Cl^- -Import verzichten muss, den entstehenden intrazellulären Cl^- -Mangel durch erhöhte Aktivität apikaler Mechanismen für den Cl^- -Import auszugleichen versucht, kann man aufgrund dieser Beobachtung auf diese Annahme nicht schließen, da die Fluxbestimmungen an der Ussingkammer allenfalls geeignet ist, transepitheliale Ionenverschiebungen und keinesfalls intrazelluläre Konzentrationsveränderungen zu erfassen.

4.2.3 Untersuchung unterschiedlicher Systeme zur duodenalen epithelialen Bikarbonatbereitstellung und deren Regulation

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass an der duodenalen Bikarbonatsekretion unterschiedliche, am apikalen Zellpol befindliche Transportme-

chanismen beteiligt sind. Als nächstes interessierten uns die Wege der Bikarbonatbereitstellung des Duodenozyten und ihre Verknüpfung mit der basalen und stimulierten Bikarbonatsekretion. Mehrere Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie zu einer pathologischen Bikarbonatsekretionsverminderung im Duodenum führen, bedingen andererseits die Ausschüttung sekretionssteigernder Substanzen durch den Organismus, was jedoch das Endergebnis der verminderten Bikarbonatsekretion nicht zu beeinflussen scheint. Diese Tatsache weist auf die Möglichkeit hin, dass unter derartigen pathophysiologischen Bedingungen das Ausmaß der zellulären Bereitstellung von HCO_3^- -Ionen die zelluläre Fähigkeit der Sekretionssteigerung limitieren könnte. Für diese Bereitstellung in Frage kommen zum einen das zelleigene Enzym Karboanhydrase (im Gastrointestinaltrakt hauptsächlich durch die Isoform CA II vertreten), welches die Reaktion $[\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+]$ katalysiert und im Konzert mit dem basolateral lokalisiertem Na^+/H^+ -Austausch arbeitet, zum anderen basolateral lokalisierte HCO_3^- -Aufnahmemechanismen, insbesondere der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter. In Abbildung 1 (Abschnitt 1.2.1 in der Einleitung) sind die heute bekannten Transporter der basolateralen Zellmembran und einige für die Bikarbonatsekretion wichtige intrazelluläre Vorgänge stark vereinfacht dargestellt.

Anhand der durchgeführten Ussingkammer-Untersuchungen sollte nun geklärt werden, ob die angeführten Mechanismen, isoliert oder im Zusammenspiel betrachtet, einen limitierenden Faktor für die Bikarbonatsekretion darstellen. Zu dieser Thematik waren in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe von Vesikelstudien und molekularbiologischer Experimenten wertvolle Erkenntnisse gewonnen worden (80), auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

Vesikelpräparationen aus Epithelzellen sind geeignet, die Lokalisation und Funktion einzelner Transporter zu untersuchen. Bei dieser Methode werden die Zellen mechanisch aufgebrochen, wobei sich Vesikel aus den apikalen (BBM) und dem basolateralen Membranen (BLM) bilden. Um zwischen dem Ausschleusen von H^+ durch einen Na^+/H^+ -Austauscher zum einen und der Aufnahme von HCO_3^- durch den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter zum anderen zu differenzieren, wurde die pH-getriebene Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in BLM-Vesikel aus dem Duodenum des Kaninchens in An- und Abwesenheit eines einwärts gerichteten Bikarbonatgradienten und dessen Hemmbarkeit durch DMA [0,5 mM] und DIDS [3 mM] überprüft. Als Negativkontrolle wurde die $^{22}\text{Na}^+$ -

Aufnahme in die BLM-Vesikel unter gleichem pH-Wert von Außen- und Innenpuffer bestimmt. Die Experimente ergaben, dass eine intravesikale Ansäuerung die Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ sowohl in An- als auch in Abwesenheit von HCO_3^- stark stimulierte. Diese Stimulation ließ sich in Abwesenheit von HCO_3^- durch DMA komplett inhibieren, was dafür spricht, dass sie durch Na^+/H^+ -Austausch zustande gekommen war. Unter Anwesenheit von HCO_3^- im Außenpuffer zeigte sich eine DMA-insensitive zusätzliche Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in die Vesikel, was eine Aufnahme durch einen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter wahrscheinlich macht (siehe Abbildung 23A). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist im Darm der Spezies Kaninchen und Mensch ein $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Aufnahmemechanismus beschrieben worden. Um den vermuteten $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport-Mechanismus im Duodenum des Kaninchens näher zu beleuchten, wurde DIDS [3 mM] dem Außenpuffer zugegeben und die $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme in An- und Abwesenheit von HCO_3^- gemessen. Die $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme war unter DIDS-Einwirkung in Anwesenheit von HCO_3^- im Außenpuffer deutlich gehemmt (siehe Abbildung 23B), hingegen ließ sich unter Abwesenheit von HCO_3^- keine Inhibition erkennen (nicht gezeigt). Damit war gezeigt worden, dass sich auf der Basolateralmembran des Duodenozyten tatsächlich ein funktionell bedeutsamer $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter befindet.

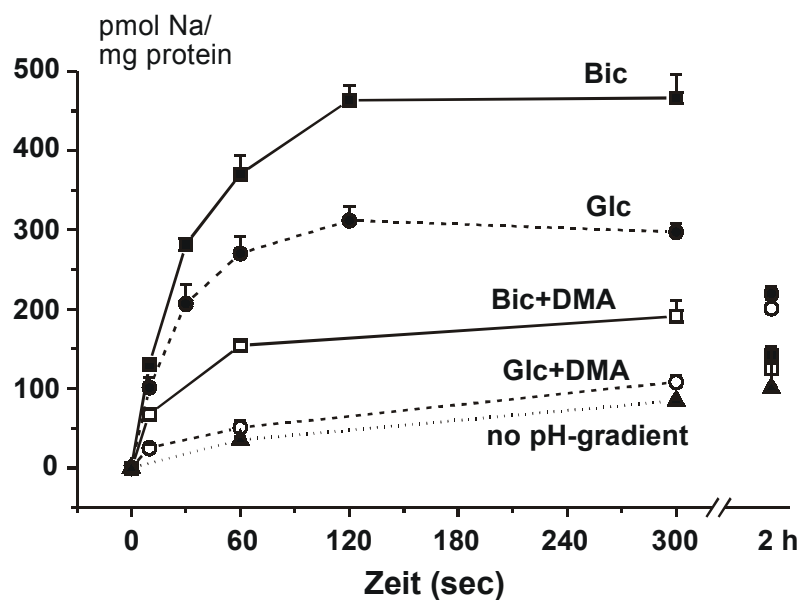


Abbildung 23A: Zeitverlauf der pH-getriebenen Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in BLM-Vesikel aus dem Duodenum in An- und Abwesenheit eines einwärts gerichteten HCO_3^- -Gradienten und der Einfluss von DMA [0,5 mM]; n=5.

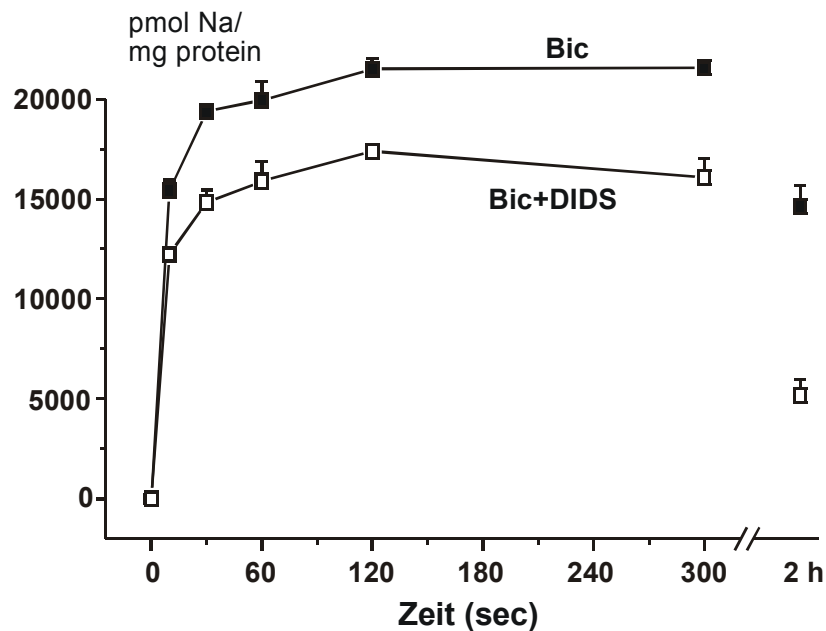


Abbildung 23B: Zeitverlauf der pH-getriebenen Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in BLM-Vesikel aus dem Duodenum in Anwesenheit eines einwärts gerichteten Bikarbonat-Gradienten und der Einfluss von DIDS [3 mM]; n=2.

Um festzustellen, welche NHE-Isoform an dem gemessenen DMA-inhibierbaren Na^+/H^+ -Austausch beteiligt ist, wurde nachfolgend die pH-Gradienten-getriebene Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in An- und Abwesenheit von Hoechst 642 jeweils in Konzentrationen von 1 μM (hemmt selektiv den NHE1) und 25 μM (hemmt NHE1 und NHE2) sowie von DMA in einer Konzentration von 0,5 mM (Inhibition von NHE1-NHE4) in BLM-Vesikel bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ durch DMA [0,5 mM] bzw. Hoechst 642 [25 μM] komplett inhibieren ließ; Hoechst 642 [1 μM] alleine hingegen hemmte über 80% der pH-Gradienten-getriebenen bzw. DMA-sensitiven $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme (siehe Abbildung 23C). Damit war gezeigt

sensitiven $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme (siehe Abbildung 23C). Damit war gezeigt worden, dass die Isoform NHE1 hauptverantwortlich für den duodenalen basolateralen Na^+/H^+ -Austausch ist.

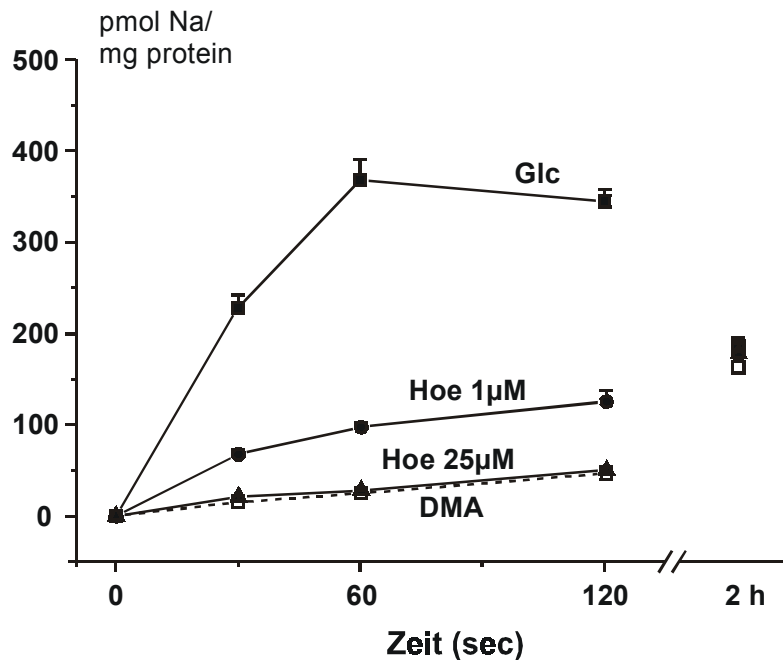


Abbildung 23C: Zeitverlauf der pH-getriebenen Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in BLM-Vesikel aus dem Duodenum, der Einfluss von DMA [0,5 mM] und von Hoechst 642 [1 μM] bzw. [25 μM]; $n=2$.

Die obenstehenden Vesikelstudien hatten gezeigt, dass sich auf der Basolateralmembran von Duodenozyten des Kaninchens ein $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter mit ungeklärter molekularer Identität sowie die Isoform NHE1 aus der Genfamilie der Na^+/H^+ -Austauscher befinden, die dort eine funktionell bedeutsame Rolle im Basenimport und der H^+ -Extrusion spielen. Im Pankreas, in dem ebenfalls basolateraler $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Import mittels fluorometrischer Messungen funktionell charakterisiert worden ist (76), ist die Isoform NBC1 aus der Genfamilie der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter hoch exprimiert (1). Um zu überprüfen, ob dies im Gastrointestinaltrakt und insbesondere im Duodenum ebenfalls zutrifft, wurde der NBC1 des Kaninchens aus dem Duodenum kloniert und die mRNA-Expression in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes mittels

Northern-Blot und semiquantitativer RT-PCR überprüft. Es zeigte sich eine starke NBC1-Expression im Duodenum, Kolon und Niere. Ein weiterer Northern-Blot zur Überprüfung der Expression von NHE1 ergab eine starke Expression in Magen, Duodenum und Kolon (siehe Abbildung 24)

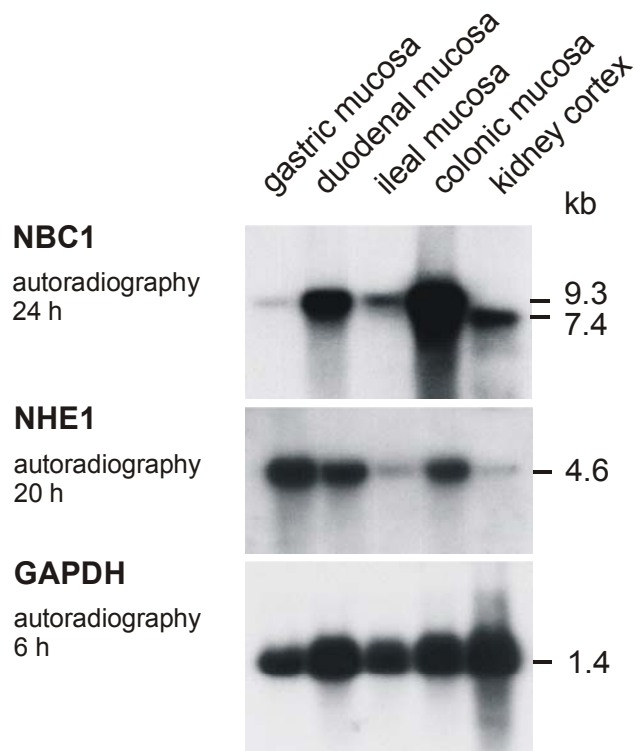


Abbildung 24: Poly (A)⁺-RNA Northern Blot: Expression des NBC1 und NHE1 in Magen, Duodenum, Ileum, Kolon und Nierenrinde des Kaninchens.

Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR bestätigt werden: Abbildungen 25 und 26 zeigen die mRNA-Expression von NBC1 und NHE1 im Magen, unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes und der Nierenrinde des Kaninchens im Verhältnis zum Histon 3.3a, das als interne Kontrolle diente.

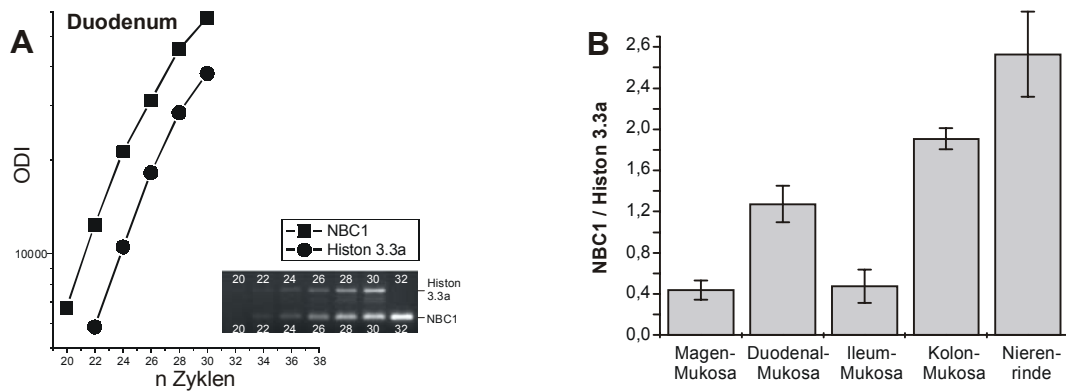


Abbildung 25: Semiquantitative RT-PCR von *NBC1*. Parallele Kurven für *NBC1* (263 bp) und *Histon 3.3a* (523 bp). Das Verhältnis von *NBC1* zu *Histon 3.3a* wurde während der exponentiellen Phase beider Reaktionen bestimmt (A). Relative Expressionslevel von *NBC1* versus *Histon 3.3a* in Magen, Duodenum, Ileum, Kolon und Nierenrinde des Kaninchens; $n=3$.

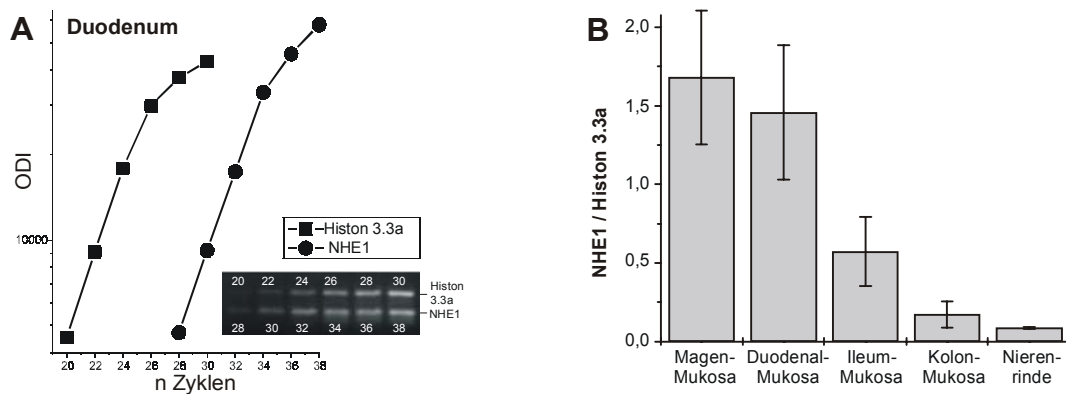


Abbildung 26: Semiquantitative RT-PCR von *NHE1*. Parallele Kurven für *NHE1* (356 bp) und *Histon 3.3a* (523 bp). Das Verhältnis von *NHE1* zu *Histon 3.3a* wurde während der exponentiellen Phase beider Reaktionen bestimmt (A). Relative Expressionslevel von *NHE1* versus *Histon 3.3a* in Magen, Duodenum, Ileum, Kolon und Nierenrinde des Kaninchens (B); $n=3$.

NBC1 ist im Duodenum, Kolon und in der Niere, NHE1 im Duodenum und im Magen hoch exprimiert. Die Durchführung der gleichen Experimente unter Nutzung von 18sRNA anstelle von Histon 3.3a als Kontrollgen hatten vergleichbare Ergebnisse ergeben. Die auf molekularbiologischem Wege gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen somit noch einmal die Hypothese, dass NBC1 und NHE1 für den Basenimport des Duodenozyten des Kaninchens eine tragende Rolle spielen. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse konnten die erhobenen Ussingkammerdaten, die nun im folgenden diskutiert werden sollen, zu einer weiteren Klärung der funktionellen Rolle der untersuchten Transportproteine beitragen.

4.2.3.1 Versuchsdurchführung in serosaler Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$

Zunächst einmal stellte sich die Frage, in wieweit die Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ im serosalen Perfusat für eine unverminderte basale und stimulierte Bikarbonatsekretion notwendig ist. An Ochsenfroschduodena ist ein Erlöschen der Bikarbonatsekretion und eine Umkehr der PD unter Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ und Na^+ im serosalen Perfusat beschrieben worden (141). Die in Abbildung 9 gezeigte starke Reduktion der HCO_3^- -Basalsekretion auf ca. 10% und der stimulierten Sekretion auf 20% der unter Kontrollbedingungen gemessenen Werte weist darauf hin, dass das sezernierte Bikarbonat nur zu maximal 20% aus der intrazellulären CO_2 -Hydratation stammen kann. Der hier gemessene Isc war mehr als doppelt so hoch wie in der Kontrolle (siehe Abbildung 3), was sich mit der von Macherey et al. (100) gefundenen höheren Leitfähigkeit des Duodenums des Kaninchens unter Abwesenheit von HCO_3^- vereinbaren lässt. Die im Vergleich zur Kontrolle kürzer dauernde und kleinere Isc-Antwort auf den 8-Br-cAMP-Stimulus lässt den bereits oben erwähnten Schluss zu, dass unter Normalbedingungen ein großer Teil der messbaren Isc-Antwort von sezerniertem HCO_3^- getragen wird. Unter Normalbedingungen wird im basalen und stimulierten Zustand erheblich mehr Cl^- als HCO_3^- sezerniert (siehe Tabelle 5). Diese Cl^- -Sekretion wird jedoch nur zu einem kleinen Anteil durch den Isc gezeigt, da wahrscheinlich gleichzeitig parazelluläres Na^+ nach mukosal gelangt und auf diese Weise diese Ladung neutralisiert (vergleiche die Bemerkungen zu den $^{22}\text{Na}^+$ -Fluxen in Abschnitt 4.2.2.5). Zusammenfassend ist zu diesem Versuchsergebnis zu bemerken, dass die basale Bikarbonatsekretion im Duodenum des Kaninchens zum Großteil von der Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ im serosalen Perfu-

sat abhängt. Die geringe Isc-Antwort auf Stimulation impliziert, dass ein Großteil der Isc-Antwort unter Stimulation durch ausströmende HCO_3^- -Ionen getragen wird.

4.2.3.2 *Inhibition des basolateral gelegenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporters*

Die oben gezeigten Studien an BBM-Vesikeln aus dem Duodenum des Kaninchens und die Ergebnisse der molekularbiologischen Experimente deuten darauf hin, dass für den duodenalen Basenimport NBC1 und NHE1 hauptverantwortlich sind. NBC1 transportiert elektrogen Na^+ und HCO_3^- in die Zelle hinein und ist durch die Stilbenderivate DIDS und SITS inhibierbar (127). Zu der in der vorliegenden Arbeit erfolgten Anwendung von DIDS mit dem Ziel der Blockade des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporters ist folgendes zu bemerken: Studien aus unserer Arbeitsgruppe an basolateralen Duodenalvesikeln haben eine inkomplette Hemmbarkeit des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransports durch DIDS [1mM] gezeigt, die optimale Hemmkonzentration betrug 3 mM und bei höheren DIDS-Konzentrationen (ab 5 mM) nahm die Hemmung sogar wieder ab (79). Die Konzentration wurde für die folgenden Versuche mit einer Ausnahme (siehe Abbildung 11) jedoch trotzdem nicht höher gewählt, um unerwünschte toxische Effekte möglichst gering zu halten. Die Tatsache, dass die Bikarbonatsekretion unter der basolateralen Einwirkung von DIDS [1mM] deutlich reduziert wurde, weist darauf hin, dass im Basalzustand ein großer Teil des aktiv sezernierten HCO_3^- vom $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter aufgenommen wird (siehe Abbildung 10). Man würde nun erwarten, dass die Sekretionsrate auch unter stimulierten Bedingungen kleiner ausfiele; dies war jedoch nicht der Fall: der Anstieg der Bikarbonatsekretion nach Stimulation durch 8-Br-cAMP war mit dem unter Kontrollbedingungen gemessenen vergleichbar. Offenbar werden unter stimulierten Bedingungen andere Mechanismen der Bikarbonatbereitstellung aktiviert. Darauf weist ebenfalls das Ergebnis des in Abbildung 11 gezeigten Versuchs hin: selbst eine DIDS-Konzentration von 3 mM, zugegeben nach der Stimulation mit 8-Br-cAMP, vermochte die HCO_3^- -Sekretion nicht auf das Plateau abzusenken, das bei dem in Abbildung 10 gezeigten Versuch erreicht worden war, es lag deutlich höher. Hier muss also ein weiterer Mechanismus der Bikarbonatbereitstellung aktiviert worden sein. Aus der Tatsache, dass die jeweils am Ende dieser beiden Versuchsreihen (Abbildung 10 und 11) gemessenen Bikarbonatsekretionswerte, die an dieser Stelle ein Plateau erreicht hatten, sehr ähnlich waren, kann man zum einen ableiten, dass nach Applikation von

DIDS sogar in einer Konzentration von 3 mM immer noch eine aktive Sekretion vorlag, zum anderen sind die beiden Versuchsansätze durch die fast identische Restsekretion unter Ouabain-Einwirkung gut vergleichbar.

4.2.3.3 Hemmung der intrazellulären Karboanhydrase

Die nach der Entfernung von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ aus dem basolateralen Perfusat verbleibende aktive Bikarbonatsekretion muss aus intrazellulären Quellen stammen (siehe Abbildung 9). In Frage hierfür kommt die durch die Karboanhydrase katalysierte Reaktion $[\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+]$ und die anschließende Extrusion der anfallenden H^+ -Ionen durch basolateralen Na^+/H^+ -Austausch. Azetazolamid, ein nicht kompetitiver Inhibitor der Karboanhydrase, hemmt das Enzym in einer Konzentration von 1 mM komplett. Die Literatur ist sich uneins über die Bedeutung der Karboanhydrase für die duodenale Bikarbonatsekretion. Auf Amphibienduodena hatte Azetazolamid *in vitro* keinen signifikanten Effekt (141). Messungen an menschlichem proximalem Duodenum ergaben hingegen eine durch Azetazolamid hervorgerufene Senkung der basalen und der PGE_2 -stimulierten, jedoch nicht der durch einen Säurereiz induzierten Bikarbonatsekretionssteigerung (91;92). Flemström et al. hatten 1983 ähnliches an Rattenduodena gemessen: Hier hemmte Azetazolamid ebenfalls sowohl die basale als auch die PGE_2 - und säurestimulierte Bikarbonatsekretion *in vivo* (43). Auch an Duodena von Kaninchen wurde gezeigt, dass die Karboanhydrasereaktion bei der Bikarbonatsekretion eine bedeutende Rolle spielt. Im Rahmen dieser Arbeit war ebenfalls mit dem Inhibitor Azetazolamid *in vivo* gearbeitet worden (65).

Im nächsten Versuch sollten die Auswirkungen der Hemmung der Karboanhydrase unter basalen und 8-Br-cAMP-stimulierten Bedingungen untersucht werden (siehe Abbildung 12). Die Substanz Azetazolamid wurde bilateral appliziert, nach 15 min jedoch luminal ein Mediumswechsel vorgenommen, um mögliche toxische Effekte zu vermeiden. Die Basalsekretion senkte sich auf ganz ähnliche Werte wie nach der serosalen Applikation von DIDS [1mM] ab (siehe Abbildung 10). Entgegen den oben erwähnten Erkenntnissen aus der Literatur zeigt sich hier die 8-Br-cAMP-stimulierte Sekretionsantwort (wie auch schon in dem Versuch, in dem DIDS basolateral appliziert worden war, beobachtet) unvermindert gegenüber der Kontrolle. Da im Prinzip nur zwei Wege der Bikarbonatbereitstellung durch den Duodenozyten in Frage kommen, impliziert die-

ses Ergebnis, dass unter Hemmung der intrazellulären Karboanhydrasereaktion durch Azetazolamid eine Hochregulierung des durch den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter mediierten basolateral lokalisierten $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Imports während der 8-Br-cAMP-Stimulation stattfindet, die theoretisch auf unterschiedliche Art und Weise zustande kommen kann: zum einen durch eine veränderte Triebkraft von extra- nach intrazellulär für HCO_3^- -Ionen (da durch die fehlende Herstellung die intrazelluläre HCO_3^- -Konzentration abnimmt), zum anderen durch einen vermehrten Einbau von NBC-Proteinen in die Zellmembran infolge eines cAMP-abhängigen Signaltransduktionsmechanismus. Natürlich können auch beide Mechanismen gleichzeitig eine Rolle spielen. Shumaker et al. führten 1999 Untersuchungen an den menschlichen pankreatischen Duktus-Zelllinien CAPAN-1 (aus humanem pankreatischen Adenokarzinom), CFPAC-1 (aus humanem pankreatischem Adenokarzinom eines CF-Patienten mit der Mutation F508) und CFPAC-WT (stabil mit CFTR transfizierte CFPAC-1 Zelllinie) durch. Sie stellten fest, dass sich auf der basolateralen Zellmembran der pankreatischen Duktuszelle ein elektrogen arbeitender $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter befindet, dessen Aktivität sich durch cAMP-Analoga steigern lässt, allerdings nur in Zellen mit intakter und funktionell bedeutsamer CFTR-Expression. Der vermutete Mechanismus ist eine Aktivierung des CF-Kanals via cAMP mit nachfolgender Depolarisation der Zellmembran, was die Aktivität des NBC durch Veränderung der Triebkraft steigert. Aus ihren Untersuchungen leitet die Arbeitsgruppe ab, dass die pathologisch veränderte Bikarbonatsekretion im pankreatischen Gangsystem des CF-Patienten nicht durch einen aufgrund des Defektes in der Cl^- -Sekretion beeinträchtigten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch zustande kommt, sondern eine Folge des gestörten HCO_3^- -Importes durch die basolaterale Zellmembran aufgrund der fehlenden CFTR-Funktion ist (139). Da unsere Daten implizieren, dass unter cAMP-stimulierten Bedingungen und gleichzeitiger Hemmung der Karboanhydrase eine Hochregulierung des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransportes stattfindet und die entscheidende Rolle der CFTR-Funktion in der Bikarbonatsekretion im Duodenum schon seit längerem feststeht (siehe Abschnitt 4.2.2), wäre die von Shumaker et al. gestellte Forderung einer Beteiligung des CFTR-Proteins an diesem Hochregulationsmechanismus auch für das Duodenum denkbar. Während der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten molekularbiologischen Charakterisierung des NBC1-Proteins hatte sich herausgestellt, dass der intestinale Subtyp vom NBC1 des Menschen und des Kaninchens eine Konsensussequenz für

die Proteinkinase A besitzt, was einen Hinweis auf ein strukturelles Korrelat für eine cAMP-medierte Aktivierung des Proteins darstellt. Wurden nun im Rahmen der von uns durchgeführten Ussingkammer-Versuche die Substanzen DIDS und Azetazolamid gleichzeitig appliziert (Abbildung 13), senkte sich die Basalsekretion wie erwartet ab, wobei das erreichte Plateau wieder vergleichbar war mit dem, das auch bei Einzelgabe der jeweiligen Substanz DIDS oder Azetazolamid gemessen worden war. Offenbar hatte die Hemmung beider Systeme der Bikarbonatbereitstellung keinen additiven Effekt auf die Basalsekretion. Ganz anders stellte sich die Sekretionsantwort nach 8-Br-cAMP-Applikation dar: sie fiel im Vergleich zur Kontrolle sowohl in ihrer Höhe als auch in der Dauer deutlich geringer aus. Die gleichzeitige Inhibition beider Bikarbonatbereitstellungssysteme hatte sich nun auf die stimulierte Sekretionsleistung ausgewirkt, was noch einmal die Hypothese unterstreicht, dass diese beiden Mechanismen den Hauptanteil der zellulären Bikarbonatbereitstellung im Duodenum sowohl unter basalen als auch unter stimulierten Bedingungen tragen.

Die Tatsache, dass das Epithel trotz Hemmung unterschiedlicher Mechanismen zur HCO_3^- -Aufnahme oder seiner Herstellung durch die Karboanhydrase in der Lage war, auf einen Stimulus mit 8-Br-cAMP mit einer im Vergleich zur Kontrolle uneingeschränkten Bikarbonatsekretionssteigerung zu reagieren, spricht für eine unabhängige und starke Hochregulation für den jeweiligen Mechanismus der zellulären Bikarbonatbereitstellung während der Stimulation.

4.2.3.4 *Selektive Blockade verschiedener Isoformen des Na^+/H^+ -Austauschers*

Während der Karboanhydrasereaktion entsteht für jedes HCO_3^- -Ion entsprechend ein H^+ -Ion, das für jedes sezernierte HCO_3^- -Ion über die basolaterale Zellmembran zur Erhaltung des pH_i der Zelle abgegeben werden muss. Die vermuteten Mechanismen hierfür sind entweder Na^+/H^+ -Austausch über die basolaterale Zellmembran und/oder eine H^+ -ATPase (7).

Es liegt nahe anzunehmen, dass der Na^+/H^+ -Austausch und die Karboanhydrasereaktion in ihrer Funktion voneinander abhängig sind, da die Zelle ihren pH_i aufrecht erhalten muss. Demzufolge müssten die Ergebnisse einer Hemmung des Na^+/H^+ -Austausches mit dem Effekt der Hemmung der Karboanhydrase vergleichbar sein. Da die bedeutende Rolle der Isoform NHE1 aus der Familie der Na^+/H^+ -Austauscher gezeigt worden

war (siehe Abbildungen 23A, 23C, 24, 26), wurde der in Abbildung 14 gezeigte Versuch unter Einsatz der Substanz Hoechst 642 in einer Konzentration von 1 μM , in der dieser Hemmstoff selektiv die genannte Isoform hemmen soll, durchgeführt. Eine Verminderung der basalen und stimulierten Bikarbonatsekretionsrate gegenüber der Kontrolle ließ sich nicht feststellen. Ob die weitgehend fehlende Beeinträchtigung der Sekretionsleistung während der Hemmung des NHE1 durch seine fehlende funktionelle Bedeutung oder durch kompensatorische Mechanismen von seiten der Zelle verursacht war, sollte durch die nun folgenden Versuche abgeklärt werden. Mit dem Ziel, sowohl NHE1 als auch den basolateral lokalisierten $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter zu inhibieren, wurde nun nach der Applikation von Hoechst 642 [1 μM] zusätzlich DIDS [1mM] ins serosale Perfusat gegeben (Abbildung 15). Wie auch schon im vorangegangenen Versuch beobachtet (siehe Abbildung 14), reagierte das Epithel auf die alleinige Gabe von Hoechst 642 mit einer nicht signifikant veränderten HCO_3^- -Sekretionsrate. Auch der Abfall der Sekretionsleistung nach serosaler Applikation von DIDS [1mM] trat erwartungsgemäß so ein, wie er bereits in einem früheren Versuch beobachtet worden war (siehe Abbildung 10). Erst nach Stimulation mit 8-Br-cAMP machte sich die gleichzeitige Hemmung von NHE1 und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport bemerkbar: die Sekretionsantwort war um ca. 60% gegenüber der Kontrolle vermindert. Der Hemmung dieser beiden Wege zur duodenalen Bikarbonatbereitstellung hatten die Zellen keinen Kompensationsmechanismus mehr entgegenzusetzen. Dass diese Verminderung der Sekretionsantwort nicht etwa auf eine verminderte aktive Sekretionsleistung beispielsweise als Folge einer Schädigung zurückzuführen war, zeigte der starke Abfall der beiden Messparameter Bikarbonatsekretion und Kurzschlussstrom nach serosaler Applikation von Ouabain. Das am Ende des Versuchs erreichte Plateau war mit dem vergleichbar, das unter Kontrollbedingungen gemessen worden war.

Die in Abbildung 16 gezeigte gleichzeitige Hemmung von $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport durch DIDS [1mM] und des gesamten basolateral befindlichen Na^+/H^+ -Austausches durch Hoechst 642 [1 μM], welches durch die selektive Hemmung von NHE1 am Duodenozyten des Kaninchens ca. 80% des gesamten hier gelegenen Na^+/H^+ -Austausches hemmt, und DMA [0,5 mM], welches den verbleibenden nicht durch NHE1 mediierten Na^+/H^+ -Austausch inhibiert, hatte dramatische Auswirkungen auf die basale und stimulierte Bikarbonatsekretion: Die Basalsekretion fiel in den Bereich, der unter Ouabain-

Einwirkung nach Erreichen des Plateaus gemessen worden war, das heißt, die Ouabain-sensitive bzw. aktive Sekretion war zum Erliegen gekommen. Die durch 8-Br-cAMP stimulierte Sekretionsantwort war mit der unter serosal $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -freien Bedingungen gemessenen vergleichbar (siehe Abbildung 9). Zusammen mit den Beobachtungen aus dem in Abbildung 15 dargestellten Versuch impliziert dieses Ergebnis, dass basolateraler Na^+/H^+ -Austausch, für den zu einem erheblichen Anteil die Isoform NHE1 verantwortlich ist, eine entscheidende Komponente der HCO_3^- -Generierung durch die Karboanhydrase-Aktivität darstellt. Wenn die beiden Systeme Karboanhydrasereaktion und basolateral lokalisierte Na^+/H^+ -Austausch so eng wie vermutet zusammenarbeiten, so darf ihre gleichzeitige Hemmung keinen Unterschied zum Ergebnis nach ihrer jeweils einzelnen Inhibition im Sinne eines additiven Effektes ergeben. Um dies zu überprüfen, wurde die basale und stimulierte Bikarbonatsekretion unter der gleichzeitigen Hemmung von Karboanhydrase und der NHE1-Isoform gemessen (Abbildung 17). Wie erwartet, war kein zusätzlicher Effekt im Vergleich zu den in Abbildungen 12 und 14 dargestellten Versuchen zu erkennen.

Die Versuchsergebnisse zur duodenalen Bikarbonatbereitstellung implizieren nicht nur, dass während der cAMP-stimulierten Bikarbonatsekretionssteigerung bei gleichzeitiger Hemmung des Karboanhydrasesystems der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport hochreguliert wird, sondern auch, dass im umgekehrten Fall unter Stimulationsbedingungen nach Applikation von cAMP-Analoga bei gleichzeitiger Hemmung des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporters offenbar das Karboanhydrasesystem hochreguliert wird. Für die Organe Gehirn (38), Knochen (55) und für Erythrozyten (49) ist eine cAMP-abhängige Karboanhydraseaktivierung beschrieben worden. Eine Arbeit beschreibt die cAMP-induzierte Aktivitätssteigerung des Promoters für das CAII-Gen (102). Natürlich stellt die Hochregulation der Karboanhydrase nur eine von mehreren denkbaren Möglichkeiten dar, wie cAMP die intrazelluläre Generierung von HCO_3^- -Ionen steigern könnte. Denkbar wäre auch eine cAMP-induzierte Steigerung H^+ -Extrusion während der Bikarbonatsekretion.

Bachmann et al. beschrieben 1998 eine cAMP-induzierte NHE1-Aktivierung (neben einer NHE4-Aktivierung) für die Parietalzelle des Kaninchenmagens (13;102). Da die am Anfang des Kapitels 4.2.3 vorgestellten Daten aus unserer Arbeitsgruppe und die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten darauf hinweisen, dass NHE1 hauptverantwortlich für die H^+ -Extrusion während der Bikarbonatsekretion ist, wäre eine

solche Aktivierung auch im Duodenum denkbar. Welche Mechanismen nun tatsächlich bei der Hochregulierung der beiden beschriebenen Wege ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport und Na^+/H^+ -Austausch) der Bikarbonatbereitstellung durch den Duodenozyten eine Rolle spielen, wird in Zukunft weiterer Abklärung bedürfen.

5 Zusammenfassung

Die Bikarbonatsekretion zählt zu den wichtigsten Schutzmechanismen der duodenalen Mukosa gegen die luminale Säurebelastung. Ihr ungestörtes Funktionieren ist eine unabdingbare Voraussetzung für eine intakte Schleimhautoberfläche und ein gesundes Organ.

Ziel der Arbeit war es, die an der Bikarbonatsekretion beteiligten zellulären Ionentransportmechanismen funktionell näher zu charakterisieren und Aspekte ihrer Regulation zu klären. Zu diesem Zweck wurde proximales Kaninchenduodenum, das zuvor von Serosa- und Muskelschichten befreit worden war, in einen Ussingkammer-Aufbau verbracht und simultan mit dem Kurzschlussstromexperiment die Messung der Bikarbonatsekretion unter Anwendung der pH-stat-Methode durchgeführt.

Im ersten Teil der Arbeit sollte geklärt werden, welche am apikalen Zellpol lokalisierten Transportproteine unter basalen und stimulierten Bedingungen für die Bikarbonatsekretion eine Rolle spielen und in welcher funktionellen Beziehung sie zueinander stehen. Das untersuchte Gewebe zeigte unter basalen Bedingungen konstante Bikarbonatsekretionsraten und elektrophysiologische Parameter. Die Stimulation mit 8-Br-cAMP hatte eine signifikante Steigerung sowohl der Bikarbonatsekretionsrate als auch des Kurzschlussstromes zur Folge. Der Abfall sämtlicher Messparameter nach Ouabain-Applikation zeigte zum einen die vorher vorhandene Vitalität des Gewebes und zum anderen das Ausmaß der aktiven Sekretionsleistung an. Die Hemmung des apikalen Anionenaustauschers, von dem bekannt ist, dass er eine funktionelle Bedeutung im Duodenum besitzt, entweder durch Ersatz der Cl⁻-Ionen des luminalen Perfusates oder durch die Applikation von DIDS [1 mM], führte zu einem deutlichen Abfall der basalen Bikarbonatsekretion, die durch 8-Br-cAMP hervorgerufene Sekretionsantwort zeigte sich jedoch nicht beeinträchtigt. Bilateraler Ersatz der Cl⁻-Ionen in luminaler Ab- und Anwesenheit von DIDS [1 mM] führte zu vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich der Bikarbonatsekretion. Die Hemmung des basolateral lokalisierten NKCC wirkte sich nicht auf das Ausmaß der Bikarbonatsekretionssteigerung nach Stimulation aus. Die durchgeführten radioaktive Fluxstudien ergaben einen erhöhten ³H-Mannitol, ³⁶Cl⁻- und ²²Na⁺-Flux von serosal nach mukosal unter Stimulationsbedingungen durch 8-Br-

cAMP. Insgesamt lagen die Fluxraten für $^{36}\text{Cl}^-$ und $^{22}\text{Na}^+$ um ein Vielfaches höher als die Bikarbonatsekretion, die Fluxraten für ^3H -Mannitol betragen hingegen nur ca. $1/100$ der Bikarbonatsekretion.

Zusammengefasst haben die Experimente des ersten Teils der Arbeit gezeigt, dass ein apikaler Anionenaustauscher im Duodenum des Kaninchens einen deutlichen Anteil an der aktiven basalen Bikarbonatsekretion besitzt, die HCO_3^- -Ionen nach Stimulation durch cAMP-Analoga jedoch über eine Leitfähigkeit sezerniert werden, wobei der Anionenaustauscher in den Hintergrund tritt. Aufgrund der allgemeinen Erkenntnisse über das CFTR-Protein muss dieses entweder in die cAMP-gesteuerte Regulation einer solchen Leitfähigkeit involviert sein oder sogar selber als cAMP-regulierter Cl^- - und HCO_3^- -Kanal fungieren.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit den Mechanismen der duodenalen Bikarbonatbereitstellung, die wahrscheinlich einen limitierenden Faktor für die Bikarbonatsekretion darstellt. Die Entfernung von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ aus dem serosalen Perfusat reduzierte die basale und stimulierte Bikarbonatsekretion auf 10 bzw. 20 % der Kontrolle. Die Hemmung des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporters durch serosale Anwesenheit von DIDS [1 mM] führte zwar zu einem deutlichen Absinken der basalen, jedoch zu keiner Beeinträchtigung der 8-Br-cAMP-stimulierten Bikarbonatsekretion. Ein vergleichbares Ergebnis hinsichtlich der Bikarbonatsekretion erbrachte die Hemmung der Karboanhydrase mittels Azetazolamid [1 mM]. Wurden nun die beiden Systeme $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport und Karboanhydrase gleichzeitig gehemmt, zeigte sich neben der schon bei den vorangegangenen Versuchen beobachtete Rückgang der Basalsekretion zusätzlich eine in ihrem Ausmaß verringerte und in ihrer Dauer verkürzte Bikarbonatsekretionsantwort auf den 8-Br-cAMP-Stimulus. Die selektive Hemmung der Isoform NHE1 aus der Genfamilie der Na^+/H^+ -Austauscher, für die eine bedeutende Rolle im Duodenalepithel des Kaninchens beschrieben worden ist, mittels der Substanz Hoechst 642 [1 μM], hatte weder auf die basale noch auf die stimulierte Bikarbonatsekretion einen signifikanten Effekt, wurde jedoch in einem anderen Versuchansatz nach der Hoechst-Applikation dem serosalen Perfusat die Substanz DIDS [1 mM] zugesetzt, sank zum einen die basale Bikarbonatsekretionsrate ab, zum andern zeigte sich die stimulierte Sekretionsantwort deutlich reduziert. Wirkten nun die Substanzen DIDS [1 mM],

Hoechst 642 [$1 \mu\text{M}$] und DMA [$0,5 \text{ mM}$] gleichzeitig auf das Epithel ein, was bedeutet, dass sowohl der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport als auch sämtliche im Dünndarm funktionell bedeutsame Isoformen des Na^+/H^+ -Austauschers gehemmt waren, erlosch die Ouabain-sensitive bzw. aktive Basalsekretion; die 8-Br-cAMP-induzierte Sekretionsantwort lag größenordnungsmäßig in dem Bereich der in serosaler Abwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ gemessenen Sekretionsantwort. Wurde schließlich die Karboanhydrase (mittels Azetazolamid [1 mM]) gleichzeitig mit der Isoform NHE1 (mittels Hoechst 642 [$1 \mu\text{M}$]) gehemmt, ließ sich aus dem Versuchsergebnis kein additiver Effekt auf die basale und stimulierte Bikarbonatsekretion, verglichen mit der alleinigen Verwendung der genannten Substanzen, erkennen.

Zusammengefasst haben die Experimente des zweiten Teils der Arbeit folgendes gezeigt: Im Duodenalepithel des Kaninchens sind unter nicht-stimulierten Bedingungen sowohl basolateral lokalisierter $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport als auch intrazelluläre HCO_3^- -Generierung (die über die Karboanhydrasereaktion gekoppelt mit Na^+/H^+ -Austausch zustande kommt), für die Bereitstellung von HCO_3^- -Ionen, die ins Darmlumen sezerniert werden, verantwortlich. Die Anwesenheit von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ im serosalen Perfusat ist dabei unbedingt erforderlich. Diese beiden Wege der Bikarbonatbereitstellung können während einer Stimulation durch cAMP-Analoga unter Hemmung jeweils des einen Weges so wirksam hochreguliert werden, dass die Sekretionsantwort nicht beeinträchtigt ist.

6 Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Schemazeichnung eines Duodenozyten

Abbildung 2: Ussingkammer-Setup

Abbildung 3: Reaktion des Duodenalepithels auf Stimulation mit 8-Br-cAMP [1 mM] (serosal appliziert) hinsichtlich der Bikarbonatsekretions- (■) und der Isc-Veränderung (Δ), nach 40 min Bumetanid-Applikation [0,5 mM] (serosal appliziert) und nach 55 min Zugabe von Ouabain [0,5 mM] (serosal appliziert); n=14.

Abbildung 4: Reaktion des Duodenalepithels hinsichtlich der Bikarbonatsekretion (■) und des Kurzschlussstromverlaufes (Δ) auf verschiedene Stimulantien unter luminal Cl⁻-freien Bedingungen. Zugabe von 8-Br-cAMP [1 mM] serosal 50 min nach Erreichen stabiler Messparameter bzw. 40 min nach Umstellen des luminalen Perfusats auf eine Cl⁻-freie Lösung. Bumetanid wurde wie unter Kontrollbedingungen 30 min nach Zugabe von 8-Br-cAMP in einer Konzentration von 0,5 mM serosal zugegeben, und nach weiteren 15 Minuten Wartezeit Ouabain [0,5 mM] serosal appliziert; n=5.

Abbildung 5: Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ) in Anwesenheit von DIDS [1 mM] (appliziert nach 10 min stabil gemessenen Basalparametern) im luminalen Perfusat. Applikation der übrigen Substanzen wie in den vorangegangenen Versuchen; n=6.

Abbildung 6: Duodenale Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ) unter bilateral Cl⁻-freien Bedingungen. Die beiden Cl⁻-freien Perfusionslösungen (basolateral und luminal) wurden von Versuchsbeginn an verwendet. Die Stimulantien wurden entsprechend dem bereits beschriebenen Versuchsschema der Kontrolle appliziert; n=5.

Abbildung 7: Verlauf der Bikarbonatsekretion (■) und des Kurzschlussstromes (Δ) unter bilateral Cl⁻-freien Bedingungen. Nach Erreichen stabiler Basalparameter Applikati-

on von DIDS [1 mM] ins luminale Perfusat. Stimulation mit 8-Br-cAMP [1 mM] 10 min nach Einstellung eines neuen Plateaus (45 min nach Applikation von DIDS). Stimulation mit Bumetanid [0,5 mM] 85 min und Ouabain [0,5 mM] 100 min nach Versuchsbeginn; n=4.

Abbildung 8: Effekt von 8-Br-cAMP[1 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf die Bikarbonatsekretion (■) und den Isc (Δ) in Anwesenheit von Bumetanid [0,5 mM] im basolateralen Perfusat; n=6.

Abbildung 9: Verlauf von Bikarbonatsekretion (■) und Isc(Δ) unter serosal $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ freien Bedingungen. Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] 10 min nach Erreichen stabiler Basalparameter. Zugabe von Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] nach weiteren 30 bzw. 45 min; n=5.

Abbildung 10: 8-Br-cAMP stimulierte Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ) in Anwesenheit von DIDS [1 mM] im basolateralen Perfusat; anschließende Applikation von Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM]; n=3.

Abbildung 11: Stimulation des Duodenalepithels mit 8-Br-cAMP und darauffolgende serosale Applikation von DIDS [3 mM]. Vor Zugabe von Bumetanid 1h Wartezeit. Ouabain-Applikation nach weiteren 15 min. Verlauf von Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ); n=4.

Abbildung 12: Effekt von bilateral appliziertem Azetazolamid [1 mM] auf die 8-Br-cAMP-stimulierte Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ). Applikation von 8-Br-cAMP, Bumetanid und Ouabain im selben zeitlichen Schema wie in den vorangegangenen Versuchen. Mediumswechsel luminal 15 min nach Azetazolamid- Applikation; n=3.

Abbildung 13: Effekt der serosalen Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] , Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den Verlauf von Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ) unter Einwirkung von serosal appliziertem DIDS [1 mM] und bilateral appliziertem

Azetazolamid [1 mM]. Mediumswechsel luminal 15 min nach Azetazolamid- und DIDS -Applikation. Achse ist von 10 bis 35 min unterbrochen; n=4.

Abbildung 14: Effekt von serosal appliziertem Hoechst 642 [1 μ M] auf die 8-Br-cAMP- stimulierte Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ). Applikation von 8-Br-cAMP, Bumetanid und Ouabain nach dem bereits beschriebenen Schema; n=3.

Abbildung 15: Effekt der serosalen Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] , Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den Verlauf von Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ) unter serosaler Einwirkung von Hoechst [1 μ M] und DIDS [1 mM]; n=4.

Abbildung 16: Zeitverlauf der Bikarbonatsekretion (■) und des Isc (Δ) unter der serosalen Einwirkung von nacheinander appliziertem DIDS [1 mM], Hoechst 642 [1 μ M] und DMA [0,5 mM], anschließend serosale Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] und Ouabain [0,5 mM]; n=4.

Abbildung 17: Effekt der serosalen Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM] , Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] auf den Verlauf von Bikarbonatsekretion (■) und Isc (Δ) unter der Einwirkung von serosal appliziertem Hoechst [1 μ M] und bilateral appliziertem Azetazolamid [1 mM]. Mediumswechsel luminal 15 min nach Applikation von Hoechst 642 und Azetazolamid; n=4.

Abbildung 18: Effekt von 8-Br-cAMP [1 mM] auf den mittleren 3 H-Mannitol-Flux \pm SEM von serosal nach mukosal; Applikation von Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM] nach 60 bzw. 75 min; n=3

Abbildung 19: Quantitativer Vergleich des Effektes von 8-Br-cAMP [1 mM] auf den mittleren 3 H-Mannitol-Flux \pm SEM von serosal nach mukosal (dunkle Balken) und die mittlere Bikarbonatsekretion \pm SEM (helle Balken). Messung im Zeitintervall von 15 min; n=3.

Abbildung 20A: Aufzeichnung der bidirektionalen Fluxraten für $^{36}\text{Cl}^- \pm \text{SEM}$ von serosal nach mukosal (schwarze Balken) und von mukosal nach serosal (graue Balken) unter basalen Bedingungen und nach basolateraler Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM]; n=5.

Abbildung 20B: Aufzeichnung der duodenalen $^{36}\text{Cl}^-$ -Nettoresorption $\pm \text{SEM}$ unter Verwendung der in Abbildung 20A gezeigten Messwerte.

Abbildung 21: Effekt von 8-Br-cAMP [1 mM] auf den mittleren bidirektionalen $^{36}\text{Cl}^-$ -Flux $\pm \text{SEM}$; dargestellt ist der Nettoflux. Applikation von Ouabain [0,5 mM] 30 min nach Stimulation mit 8-Br-cAMP, nach 1h Wartezeit ohne Abnahmen erfolgten die letzten vier Abnahmen; n=3.

Abbildung 22A: Aufzeichnung der bidirektionalen Fluxraten für $^{22}\text{Na}^+ \pm \text{SEM}$ im Duodenum von serosal nach mukosal (schwarze Balken) und von mukosal nach serosal (graue Balken) unter basalen Bedingungen und nach basolateraler Applikation von 8-Br-cAMP [1 mM], Bumetanid [0,5 mM] und Ouabain [0,5 mM]; n=5.

Abbildung 22B: Aufzeichnung der duodenalen $^{22}\text{Na}^+$ Nettoresorption $\pm \text{SEM}$ unter Verwendung der in Abbildung 22A gezeigten Messwerte.

Abbildung 23A: Zeitverlauf der pH-getriebenen Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in BLM-Vesikel aus dem Duodenum in Anwesenheit eines einwärts gerichteten HCO_3^- -Gradienten und der Einfluss von DMA [0,5 mM]; n=5.

Abbildung 23B: Zeitverlauf der pH-getriebenen Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in BLM-Vesikel aus dem Duodenum in Anwesenheit eines einwärts gerichteten Bikarbonat-Gradienten und der Einfluss von DIDS [3 mM]; n=2.

Abbildung 23C: Zeitverlauf der pH-getriebenen Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in BLM-Vesikel aus dem Duodenum, der Einfluss von DMA [0,5 mM] und von Hoechst 642 [1 μM] bzw. [25 μM]; n=2.

Abbildung 24: Poly (A)⁺-RNA Northern Blot: Expression des NBC1 und NHE1 in Magen, Duodenum, Ileum, Kolon und Nierenrinde des Kaninchens.

Abbildung 25: Semiquantitative RT-PCR von NBC1. Parallele Kurven für NBC1 (263 bp) und Histon 3.3a (523 bp). Das Verhältnis von NBC1 zu Histon 3.3a wurde während der exponentiellen Phase beider Reaktionen bestimmt (A). Relative Expressionslevel von NBC1 versus Histon 3.3a in Magen, Duodenum, Ileum, Kolon und Nierenrinde des Kaninchens; n=3.

Abbildung 26: Semiquantitative RT-PCR von NHE1. Parallele Kurven für NHE1 (356 bp) und Histon 3.3a (523 bp). Das Verhältnis von NHE1 zu Histon 3.3a wurde während der exponentiellen Phase beider Reaktionen bestimmt (A). Relative Expressionslevel von NHE1 versus Histon 3.3a in Magen, Duodenum, Ileum, Kolon und Nierenrinde des Kaninchens (B); n=3.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, deren Abkürzung und jeweilige Bezugsquelle; bei den mit * gekennzeichneten Substanzen ist unter „Abkürzung“ der Handelsname angegeben.

Tabelle 2: Auflistung der für die durchgeführten Experimente verwendeten Geräte. Als standardisiert geltende Geräte sind nicht enthalten.

Tabelle 3: Ionale Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Tabelle 4: Basalparameter des Duodenums verschiedener Spezies, Daten an der Us-singkammer erhoben.

Tabelle 5: Vergleich von Bikarbonatsekretion, Isc und bilateralen Fluxraten für $^{36}\text{Cl}^-$ und $^{22}\text{Na}^+$ im Duodenalepithel des Kaninchens im Basalzustand und nach Stimulation mit 8-Br-cAMP [1 mM].

7 Literatur

1. Abuladze N., Lee I., Newman D., Hwang J., Boorer K., Pushkin A. & Kurtz I. (1998): Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem*, 273, 17689-17695
2. Ainsworth M.A., Amelsberg M., Hogan D.L. & Isenberg J.I. (1996): Acid-base transport in isolated rabbit duodenal villus and crypt cells. *Scand J Gastroenterol*, 31, 1069-1077
3. Ainsworth M.A., Hogan D.L., Rapier R.C., Amelsberg M., Dreilinger A.D. & Isenberg J.I. (1998): Acid/base transporters in human duodenal enterocytes. *Scand J Gastroenterol*, 33, 1039-1046
4. Ainsworth M.A., Koss M.A., Hogan D.L. & Isenberg J.I. (1995): Higher proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion is independent of Brunner's glands in rats and rabbits. *Gastroenterology*, 109, 1160-1166
5. Akabas M.H. (2000): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem*, 275, 3729-3732
6. Akiba Y. & Kaunitz J.D. (1999): Regulation of intracellular pH and blood flow in rat duodenal epithelium in vivo. *Am J Physiol*, 276, G293-G302
7. Allen A., Flemstrom G., Garner A. & Kivilaakso E. (1993): Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev*, 73, 823-857
8. Alper S.L., Rossmann H., Wilhelm S., Stuart T., Shmukler B.E. & Seidler U. (1999): Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine. *Am J Physiol*, 277, G321-G332
9. Alper S.L., Stuart T., Biemesderfer D., Shmukler B.E. & Brown D. (1997): Immunolocalization of AE2 anion exchanger in rat kidney. *Am J Physiol*, 273, F601-F614
10. Alper S.L., Stuart T., Simmons C.F., Brown D. & Drenckhahn D. (1994): The fodrin-ankyrin cytoskeleton of choroid plexus preferentially colocalizes with apical Na⁺K⁺-ATPase rather than with basolateral anion exchanger AE2. *J Clin Invest*, 93, 1430-1438
11. Amlal H., Burnham C.E. & Soleimani M. (1999): Characterization of Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter isoform NBC-3. *Am J Physiol*, 276, F903-F913

12. Anderson M.P., Gregory R.J., Thompson S., Souza D.W., Paul S., Mulligan R.C., Smith A.E. & Welsh M.J. (1991): Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*, 253, 202-205
13. Bachmann O., Sonnentag T., Siegel W.K., Lamprecht G., Weichert A., Gregor M. & Seidler U. (1998): Different acid secretagogues activate different Na⁺/H⁺ exchanger isoforms in rabbit parietal cells. *Am J Physiol*, 275, G1085-G1093
14. Ballesteros M.A., Wolosin J.D., Hogan D.L., Koss M.A. & Isenberg J.I. (1991): Cholinergic regulation of human proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Am J Physiol*, 261, G327-G331
15. Biemesderfer D., Pizzonia J., Abu A., Exner M., Reilly R., Igarashi P. & Aronson P.S. (1993): NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol*, 265, F736-F742
16. Bookstein C., DePaoli A.M., Xie Y., Niu P., Musch M.W., Rao M.C. & Chang E.B. (1994): Na⁺/H⁺ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine. Expression and localization. *J Clin Invest*, 93, 106-113
17. Bookstein C., Musch M.W., DePaoli A., Xie Y., Rabenau K., Villereal M., Rao M.C. & Chang E.B. (1996): Characterization of the rat Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus. *Am J Physiol*, 271, C1629-C1638
18. Boron W.F. & Boulpaep E.L. (1983): Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO₃⁻ transport. *J Gen Physiol*, 81, 53-94
19. Boucher R.C., Stutts M.J., Knowles M.R., Cantley L. & Gatzky J.T. (1986): Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest*, 78, 1245-1252
20. Brant S.R., Yun C.H., Donowitz M. & Tse C.M. (1995): Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/N⁺ exchanger isoform, NHE3. *Am J Physiol*, 269, C198-C206
21. Brown C.D., Dunk C.R. & Turnberg L.A. (1989): Cl-HCO₃ exchange and anion conductance in rat duodenal apical membrane vesicles. *Am J Physiol*, 257, G661-G667
22. Burnham C.E., Amlal H., Wang Z., Shull G.E. & Soleimani M. (1997): Cloning and functional expression of a human kidney Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter. *J Biol Chem*, 272, 19111-19114
23. Byeon M.K., Westerman M.A., Maroulakou I.G., Henderson K.W., Suster S., Zhang X.K., Papas T.S., Vesely J., Willingham M.C., Green J.E. & Schweinfest C.W. (1996): The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. *Oncogene*, 12, 387-396

24. Cabantchik Z.I. & Rothstein A. (1974): Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. II. Effects of proteolytic enzymes on disulfonic stilbene sites of surface proteins. *J Membr Biol*, 15, 227-248
25. Cano M. & Ilundain A. (1994): Kinetics of the chloride-anion exchanger of brush-border membrane vesicles isolated from chicken jejunum. *Biochim Biophys Acta*, 1193, 138-142
26. Chow A., Dobbins J.W., Aronson P.S. & Igarashi P. (1992): cDNA cloning and localization of a band 3-related protein from ileum. *Am J Physiol*, 263, G345-G352
27. Clarke L.L., Grubb B.R., Gabriel S.E., Smithies O., Koller B.H. & Boucher R.C. (1992): Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science*, 257, 1125-1128
28. Clarke L.L. & Harline M.C. (1998): Dual role of CFTR in cAMP-stimulated HCO₃⁻ secretion across murine duodenum. *Am J Physiol*, 274, G718-G726
29. Counillon L. & Pouyssegur J. (2000): The expanding family of eucaryotic Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers. *J Biol Chem*, 275, 1-4
30. Crawford I., Maloney P.C., Zeitlin P.L., Guggino W.B., Hyde S.C., Turley H., Gatter K.C., Harris A. & Higgins C.F. (1991): Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9262-9266
31. Cremaschi D., Henin S. & Meyer G. (1979): Stimulation by HCO₃⁻ of Na⁺ transport in rabbit gallbladder. *J Membr Biol*, 47, 145-170
32. Currie M.G., Fok K.F., Kato J., Moore R.J., Hamra F.K., Duffin K.L. & Smith C.E. (1992): Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 947-951
33. Cuthbert A.W., Hickman M.E., MacVinish L.J., Evans M.J., Colledge W.H., Ratcliff R., Seale P.W. & Humphrey P.P. (1994): Chloride secretion in response to guanylin in colonic epithelial from normal and transgenic cystic fibrosis mice. *Br J Pharmacol*, 112, 31-36
34. Dharmasathaphorn K. & Pandol S.J. (1986): Mechanism of chloride secretion induced by carbachol in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest*, 77, 348-354
35. Drenckhahn D. & Fleischhauer K. (1994): Dünndarm. In: Benninghoff Anatomie, Anonymouspp. 866-885.
36. Egan M., Flotte T., Afione S., Solow R., Zeitlin P.L., Carter B.J. & Guggino W.B. (1992): Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature*, 358, 581-584

37. Eggermont E. (1996): Gastrointestinal manifestations in cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 8, 731-738
38. Endroczi E., Sasvary M. & Simon J. (1994): Effects of glucocorticoid treatment of the carbonic anhydrase activity of brain tissue in the early postnatal age in the rat. *Acta Physiol Hung*, 82, 195-200
39. Flemstrom G. & Garner A. (1982): Gastroduodenal HCO₃(-) transport: characteristics and proposed role in acidity regulation and mucosal protection. *Am J Physiol*, 242, G183-G193
40. Flemstrom G., Garner A., Nylander O., Hurst B.C. & Heylings J.R. (1982): Surface epithelial HCO₃(-) transport by mammalian duodenum in vivo. *Am J Physiol*, 243, G348-G358
41. Flemstrom G., Hallgren A., Nylander O., Engstrand L., Wilander E. & Allen A. (1999): Adherent surface mucus gel restricts diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. *Am J Physiol*, 277, G375-G382
42. Flemstrom G., Heylings J.R. & Garner A. (1982): Gastric and duodenal HCO₃-transport in vitro: effects of hormones and local transmitters. *Am J Physiol*, 242, G100-G110
43. Flemstrom G. & Kivilaakso E. (1983): Demonstration of a pH gradient at the luminal surface of rat duodenum in vivo and its dependence on mucosal alkaline secretion. *Gastroenterology*, 84, 787-794
44. Flemstrom G. & Safsten B. (1994): Role of dopamine and other stimuli of mucosal bicarbonate secretion in duodenal protection. *Dig Dis Sci*, 39, 1839-1842
45. Forth W., Henschler D., Rummel W. & Starke K. (1996): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford.
46. Fuller C.M. & Benos D.J. (1992): CFTR! *Am J Physiol*, 263, C267-C286
47. Gabriel S.E., Clarke L.L., Boucher R.C. & Stutts M.J. (1993): CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature*, 363, 263-268
48. Giannella R.A. (1995): Escherichia coli heat-stable enterotoxins, guanylin, and their receptors: what are they and what do they do? *J Lab Clin Med*, 125, 173-181
49. Glombitza S., Dragon S., Berghammer M., Pannermayr M. & Baumann R. (1996): Adenosine causes cAMP-dependent activation of chick embryo red cell carbonic anhydrase and 2,3-DPG synthesis. *Am J Physiol*, 271, R973-R981
50. Gray M.A., Harris A., Coleman L., Greenwell J.R. & Argent B.E. (1989): Two types of chloride channel on duct cells cultured from human fetal pancreas. *Am J Physiol*, 257, C240-C251

51. Gray M.A., Plant S. & Argent B.E. (1993): cAMP-regulated whole cell chloride currents in pancreatic duct cells. *Am J Physiol*, 264, C591-C602
52. Gray M.A., Pollard C.E., Harris A., Coleman L., Greenwell J.R. & Argent B.E. (1990): Anion selectivity and block of the small-conductance chloride channel on pancreatic duct cells. *Am J Physiol*, 259, C752-C761
53. Greger R., Mall M., Bleich M., Ecke D., Warth R., Riedemann N. & Kunzelmann K. (1996): Regulation of epithelial ion channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Mol Med*, 74, 527-534
54. Guba M., Kuhn M., Forssmann W.G., Classen M., Gregor M. & Seidler U. (1996): Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO₃⁻ secretion: proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology*, 111, 1558-1568
55. Gunasekaran S., Hall G.E. & Kenny A.D. (1986): Forskolin-induced bone resorption in neonatal mouse calvaria in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*, 181, 438-442
56. Hallgren A., Flemstrom G., Hellstrom P.M., Lordal M., Hellgren S. & Nylander O. (1997): Neurokinin A increases duodenal mucosal permeability, bicarbonate secretion, and fluid output in the rat. *Am J Physiol*, 273, G1077-G1086
57. Hogan D.L., Ainsworth M.A. & Isenberg J.I. (1994): Review article: gastroduodenal bicarbonate secretion. *Aliment Pharmacol Ther*, 8, 475-488
58. Hogan D.L., Crombie D.L., Isenberg J.I., Svendsen P., Schaffalitzky d. & Ainsworth M.A. (1997): Acid-stimulated duodenal bicarbonate secretion involves a CFTR-mediated transport pathway in mice. *Gastroenterology*, 113, 533-541
59. Hogan D.L., Crombie D.L., Isenberg J.I., Svendsen P., Schaffalitzky d. & Ainsworth M.A. (1997): CFTR mediates cAMP- and Ca²⁺-activated duodenal epithelial HCO₃⁻ secretion. *Am J Physiol*, 272, G872-G878
60. Hogan D.L., Yao B. & Isenberg J.I. (1998): Modulation of bicarbonate secretion in rabbit duodenum: the role of calcium. *Dig Dis Sci*, 43, 120-125
61. Hogan D.L., Yao B., Steinbach J.H. & Isenberg J.I. (1993): The enteric nervous system modulates mammalian duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Gastroenterology*, 105, 410-417
62. Høglund P., Haila S., Gustavson K.H., Taipale M., Hannula K., Popinska K., Holmberg C., Socha J., Chapelle d.I. & Kere J. (1998): Clustering of private mutations in the congenital chloride diarrhea/down-regulated in adenoma gene. *Hum Mutat*, 11, 321-327
63. Høglund P., Haila S., Scherer S.W., Tsui L.C., Green E.D., Weissenbach J., Holmberg C., Chapelle d.I. & Kere J. (1996): Positional candidate genes for

- congenital chloride diarrhea suggested by high-resolution physical mapping in chromosome region 7q31. *Genome Res*, 6, 202-210
64. Høglund P., Haila S., Socha J., Tomaszewski L., Saarialho K., Karjalainen L., Airola K., Holmberg C., Chapelle d.l. & Kere J. (1996): Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nat Genet*, 14, 316-319
 65. Holm L., Flemstrom G. & Nylander O. (1990): Duodenal alkaline secretion in rabbits: influence of artificial ventilation. *Acta Physiol Scand*, 138, 471-478
 66. Holmberg C. (1986): Congenital chloride diarrhoea. *Clin Gastroenterol*, 15, 583-602
 67. Holmberg C., Perheentupa J. & Launiala K. (1975): Colonic electrolyte transport in health and in congenital chloride diarrhea. *J Clin Invest*, 56, 302-310
 68. Hoogerwerf W.A., Tsao S.C., Devuyst O., Levine S.A., Yun C.H., Yip J.W., Cohen M.E., Wilson P.D., Lazenby A.J., Tse C.M. & Donowitz M. (1996): NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol*, 270, G29-G41
 69. Hyde K., Reid C.J., Tebbutt S.J., Weide L., Hollingsworth M.A. & Harris A. (1997): The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator as a marker of human pancreatic duct development. *Gastroenterology*, 113, 914-919
 70. Illek B., Yankaskas J.R. & Machen T.E. (1997): cAMP and genistein stimulate HCO₃⁻ conductance through CFTR in human airway epithelia. *Am J Physiol*, 272, L752-L761
 71. Isenberg J.I., Hogan D.L. & Thomas F.J. (1986): Duodenal mucosal bicarbonate secretion in humans: a brief review. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 125, 106-109
 72. Isenberg J.I., Ljungstrom M., Safsten B. & Flemstrom G. (1993): Proximal duodenal enterocyte transport: evidence for Na⁽⁺⁾-H⁺ and Cl⁽⁻⁾-HCO₃⁻ exchange and NaHCO₃ cotransport. *Am J Physiol*, 265, G677-G685
 73. Isenberg J.I., Selling J.A., Hogan D.L. & Koss M.A. (1987): Impaired proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in patients with duodenal ulcer. *N Engl J Med*, 316, 374-379
 74. Ishibashi K., Sasaki S. & Marumo F. (1998): Molecular cloning of a new sodium bicarbonate cotransporter cDNA from human retina. *Biochem Biophys Res Commun*, 246, 535-538
 75. Ishiguro H., Naruse S., Steward M.C., Kitagawa M., Ko S.B., Hayakawa T. & Case R.M. (1998): Fluid secretion in interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol*, 511 (Pt 2), 407-422

76. Ishiguro H., Steward M.C., Lindsay A.R. & Case R.M. (1996): Accumulation of intracellular HCO₃⁻ by Na⁽⁺⁾-HCO₃⁻ cotransport in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol*, 495 (Pt 1), 169-178
77. Ishiguro H., Steward M.C., Wilson R.W. & Case R.M. (1996): Bicarbonate secretion in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol*, 495 (Pt 1), 179-191
78. Ismailov I.I., Awayda M.S., Jovov B., Berdiev B.K., Fuller C.M., Dedman J.R., Kaetzel M. & Benos D.J. (1996): Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 271, 4725-4732
79. Jacob P. (2000): Funktionelle Charakterisierung der Säure-Basen-Transporter im Duodenum des Kaninchens. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
80. Jacob P., Christiani S., Rossmann H., Lamprecht G., Vieillard B., Muller R., Gregor M. & Seidler U. (2000): Role of Na⁽⁺⁾HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter NBC1, Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE1, and carbonic anhydrase in rabbit duodenal bicarbonate secretion. *Gastroenterology*, 119, 406-419
81. Jacob P., Rossmann H., Lamprecht G., Kretz A., Neff C., Lin-Wu E., Gregor M., Groneberg D.A., Kere J. & Seidler U. (2002): (DRA) Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology*, (in press)
82. Jenkins H.R. & Milla P.J. (1997): Congenital chloride-losing diarrhoea: absence of the anion-exchange mechanism in the rectum. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 24, 518-521
83. Julien M., Verrier B., Cerutti M., Chappe V., Gola M., Devauchelle G. & Becq F. (1999): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) confers glibenclamide sensitivity to outwardly rectifying chloride channel (ORCC) in Hi-5 insect cells. *J Membr Biol*, 168, 229-239
84. Kapus A., Grinstein S., Wasan S., Kandasamy R. & Orłowski 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, 23544-23552
85. Kere J., Sistonen P., Holmberg C. & de la Chapelle A. (1993): The gene for congenital chloride diarrhea maps close to but is distinct from the gene for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10686-10689
86. Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M. & Tsui L.C. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245, 1073-1080

87. Kivilaakso E. & Flemstrom G. (1984): Surface pH gradient in gastroduodenal mucosa. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 105, 50-52
88. Knickelbein R., Aronson P.S., Atherton W. & Dobbins J.W. (1983): Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. *Am J Physiol*, 245, G504-G510
89. Knickelbein R., Aronson P.S., Schron C.M., Seifter J. & Dobbins J.W. (1985): Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO₃ exchange and mechanism of coupling. *Am J Physiol*, 249, G236-G245
90. Knickelbein R.G. & Dobbins J.W. (1990): Sulfate and oxalate exchange for bicarbonate across the basolateral membrane of rabbit ileum. *Am J Physiol*, 259, G807-G813
91. Knutson T.W., Knutson L.F., Hogan D.L., Koss M.A. & Isenberg J.I. (1995): Human proximal duodenal ion and water transport. Role of enteric nervous system and carbonic anhydrase. *Dig Dis Sci*, 40, 241-246
92. Knutson T.W., Koss M.A., Hogan D.L., Isenberg J.I. & Knutson L. (1995): Acetazolamide inhibits basal and stimulated HCO₃⁻ secretion in the human proximal duodenum. *Gastroenterology*, 108, 102-107
93. Kockskamper J., Sendhoff K., Erlenkamp S., Bordusa F., Cerovsky V. & Glitsch H.G. (2001): Differences in the protein-kinase-A-dependent regulation of CFTR Cl⁻ channels and Na⁺-K⁺ pumps in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch*, 441, 807-815
94. Konturek S.J., Thor P., Bilski J., Tasler J. & Cieszkowski M. (1987): Cephalic phase of gastroduodenal alkaline secretion. *Am J Physiol*, 252, G742-G747
95. Kopito R.R., Lee B.S., Simmons D.M., Lindsey A.E., Morgans C.W. & Schneider K. (1989): Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell*, 59, 927-937
96. Kopito R.R. & Lodish H.F. (85 A.D.): Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature*, 316, 234-238
97. Kudrycki K.E., Newman P.R. & Shull G.E. (1990): cDNA cloning and tissue distribution of mRNAs for two proteins that are related to the band 3 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. *J Biol Chem*, 265, 462-471
98. Levine S.A., Donowitz M., Watson A.J., Sharp G.W., Crane J.K. & Weikel C.S. (1991): Characterization of the synergistic interaction of Escherichia coli heat-stable toxin and carbachol. *Am J Physiol*, 261, G592-G601
99. Liedtke C.M. & Hopfer U. (1982): Mechanism of Cl⁻ translocation across small intestinal brush-border membrane. II. Demonstration of Cl⁻-OH⁻ exchange and Cl⁻ conductance. *Am J Physiol*, 242, G272-G280

100. Macherey H.J., Sprakties G. & Petersen K.U. (1993): HCO₃⁻ reduces paracellular permeability of guinea pig duodenal mucosa by a Ca²⁺ (prostaglandin)-dependent action. *Am J Physiol*, 264, G126-G136
101. Mall M., Bleich M., Kuehr J., Brandis M., Greger R. & Kunzelmann K. (1999): CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am J Physiol*, 277, G709-G716
102. Marino L.R. (1993): Characterization of the mouse carbonic anhydrase II gene promoter. *J Biol Chem*, 268, 7081-7089
103. Marshall D.G., Dundon W.G., Beesley S.M. & Smyth C.J. (1998): Helicobacter pylori--a conundrum of genetic diversity. *Microbiology*, 144 (Pt 11), 2925-2939
104. McCarty N.A. (2000): Permeation through the CFTR chloride channel. *J Exp Biol*, 203 Pt 13, 1947-1962
105. Melvin J.E., Park K., Richardson L., Schultheis P.J. & Shull G.E. (1999): Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. *J Biol Chem*, 274, 22855-22861
106. Moseley R.H., Hoglund P., Wu G.D., Silberg D.G., Haila S., de la Chapelle A., Holmberg C. & Kere J. (1999): Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol*, 276, G185-G192
107. Murer H., Hopfer U. & Kinne R. (1976): Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J*, 154, 597-604
108. Myers C.P., Hogan D., Yao B., Koss M., Isenberg J.I. & Barrett K.E. (1998): Inhibition of rabbit duodenal bicarbonate secretion by ulcerogenic agents: histamine-dependent and -independent effects. *Gastroenterology*, 114, 527-535
109. Nielsen A.M. (1997): Gastroduodenal bicarbonate secretion and its modulation by antisecretory drugs and mucosal prostaglandin E₂ in man. With special reference to methodological, physiological and pathophysiological aspects. *Dan Med Bull*, 44, 425-435
110. Noel J. & Pouyssegur J. (1995): Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Am J Physiol*, 268, C283-C296
111. Norio R., Perheentupa J., Launiala K. & Hallman N. (1971): Congenital chloride diarrhea, an autosomal recessive disease. Genetic study of 14 Finnish and 12 other families. *Clin Genet*, 2, 182-192

112. Novak I. & Greger R. (1988): Properties of the luminal membrane of isolated perfused rat pancreatic ducts. Effect of cyclic AMP and blockers of chloride transport. *Pflugers Arch*, 411, 546-553
113. O'Reilly C.M., Winpenny J.P., Argent B.E. & Gray M.A. (2000): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator currents in guinea pig pancreatic duct cells: inhibition by bicarbonate ions. *Gastroenterology*, 118, 1187-1196
114. Odes H.S., Hogan D.L., Ballesteros M.A., Wolosin J.D., Koss M.A. & Isenberg J.I. (1990): Human duodenal mucosal bicarbonate secretion. Evidence suggesting active transport under basal and stimulated conditions. *Gastroenterology*, 98, 867-872
115. Orłowski J. & Grinstein S. (1997): Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem*, 272, 22373-22376
116. Orsenigo M.N., Tosco M. & Faelli A. (1991): Cl/HCO₃ exchange in the basolateral membrane domain of rat jejunal enterocyte. *J Membr Biol*, 124, 13-19
117. Park R.W. & Grand R.J. (1981): Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis: a review. *Gastroenterology*, 81, 1143-1161
118. Parkkila S. & Parkkila A.K. (1996): Carbonic anhydrase in the alimentary tract. Roles of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. *Scand J Gastroenterol*, 31, 305-317
119. Pizzonia J.H., Biemesderfer D., Abu A., Wu M.S., Exner M., Isenring P., Igarashi P. & Aronson P.S. (1998): Immunochemical characterization of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4. *Am J Physiol*, 275, F510-F517
120. Poulsen J.H., Fischer H., Illek B. & Machen T.E. (1994): Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 5340-5344
121. Poulsen J.H. & Machen T.E. (1996): HCO₃-dependent pHi regulation in tracheal epithelial cells. *Pflugers Arch*, 432, 546-554
122. Praetorius J., Andreasen D., Jensen B.L., Ainsworth M.A., Friis U.G. & Johansen T. (2000): NHE1, NHE2, and NHE3 contribute to regulation of intracellular pH in murine duodenal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278, G197-G206
123. Pratha V.S., Hogan D.L., Martensson B.A., Bernard J., Zhou R. & Isenberg J.I. (2000): Identification of transport abnormalities in duodenal mucosa and duodenal enterocytes from patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology*, 118, 1051-1060
124. Pushkin A., Abuladze N., Lee I., Newman D., Hwang J. & Kurtz I. (1999): Cloning, tissue distribution, genomic organization, and functional characterization of NBC3, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *J Biol Chem*, 274, 16569-16575

125. Rajendran V.M. & Binder H.J. (1993): Cl-HCO₃ and Cl-OH exchanges mediate Cl uptake in apical membrane vesicles of rat distal colon. *Am J Physiol*, 264, G874-G879
126. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N. & Chou J.L. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245, 1066-1073
127. Romero M.F. & Boron W.F. (1999): Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu Rev Physiol*, 61, 699-723
128. Romero M.F., Fong P., Berger U.V., Hediger M.A. & Boron W.F. (1998): Cloning and functional expression of rNBC, an electrogenic Na⁽⁺⁾-HCO₃⁻ cotransporter from rat kidney. *Am J Physiol*, 274, F425-F432
129. Romero M.F., Hediger M.A., Boulpaep E.L. & Boron W.F. (1997): Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *Nature*, 387, 409-413
130. Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D. & Hidaka N. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245, 1059-1065
131. Rossmann H., Alper S.L., Nader M., Wang Z., Gregor M. & Seidler U. (2000): Three 5'-variant mRNAs of anion exchanger AE2 in stomach and intestine of mouse, rabbit, and rat. *Ann N Y Acad Sci*, 915, 81-91
132. Russell J.M. (2000): Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev*, 80, 211-276
133. Scholz W., Albus U., Counillon L., Gogelein H., Lang H.J., Linz W., Weichert A. & Scholkens B.A. (1995): Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 29, 260-268
134. Schultheis P.J., Clarke L.L., Meneton P., Miller M.L., Soleimani M., Gawenis L.R., Riddle T.M., Duffy J.J., Doetschman T., Wang T., Giebisch G., Aronson P.S., Lorenz J.N. & Shull G.E. (1998): Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet*, 19, 282-285
135. Schwarz H.P., Kraemer R., Thurnheer U. & Rossi E. (1978): Liver involvement in cystic fibrosis. A report of 9 cases. *Helv Paediatr Acta*, 33, 351-364
136. Schweinfest C.W., Henderson K.W., Suster S., Kondoh N. & Papas T.S. (1993): Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 4166-4170
137. Seidler U., Blumenstein I., Kretz A., Viellard B., Rossmann H., Colledge W.H., Evans M., Ratcliff R. & Gregor M. (1997): A functional CFTR protein is required

- for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent HCO₃⁻ secretion. *J Physiol*, 505 (Pt 2), 411-423
138. Shull G.E., Miller M.L. & Schultheis P.J. (2000): Lessons from genetically engineered animal models VIII. Absorption and secretion of ions in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278, G185-G190
 139. Shumaker H., Amlal H., Frizzell R., Ulrich C.D. & Soleimani M. (1999): CFTR drives Na⁺-nHCO₃⁻ cotransport in pancreatic duct cells: a basis for defective HCO₃⁻ secretion in CF. *Am J Physiol*, 276, C16-C25
 140. Silberg D.G., Wang W., Moseley R.H. & Traber P.G. (1995): The Down regulated in Adenoma (dra) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein. *J Biol Chem*, 270, 11897-11902
 141. Simson J.N., Merhav A. & Silen W. (1981): Alkaline secretion by amphibian duodenum. I. General characteristics. *Am J Physiol*, 240, G401-G408
 142. Simson J.N., Merhav A. & Silen W. (1981): Alkaline secretion by amphibian duodenum. II. Short-circuit current and Na⁺ and Cl⁻ fluxes. *Am J Physiol*, 240, G472-G479
 143. Simson J.N., Merhav A. & Silen W. (1981): Alkaline secretion by amphibian duodenum. III. Effect of DBcAMP, theophylline, and prostaglandins. *Am J Physiol*, 241, G528-G536
 144. Smith J.J. & Welsh M.J. (1992): cAMP stimulates bicarbonate secretion across normal, but not cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Invest*, 89, 1148-1153
 145. Sohma Y., Gray M.A., Imai Y. & Argent B.E. (1996): A mathematical model of the pancreatic ductal epithelium. *J Membr Biol*, 154, 53-67
 146. Soleimani M., Singh G., Bizal G.L., Gullans S.R. & McAteer J.A. (1994): Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE-2 and NHE-1 in inner medullary collecting duct cells. Expression, functional localization, and differential regulation. *J Biol Chem*, 269, 27973-27978
 147. Stuart-Tilley, Sardet C., Pouyssegur J., Schwartz M.A., Brown D. & Alper S.L. (1994): Immunolocalization of anion exchanger AE2 and cation exchanger NHE-1 in distinct adjacent cells of gastric mucosa. *Am J Physiol*, 266, C559-C568
 148. Stuart-Tilley, Shmukler B.E., Brown D. & Alper S.L. (1998): Immunolocalization and tissue-specific splicing of AE2 anion exchanger in mouse kidney. *J Am Soc Nephrol*, 9, 946-959
 149. Stutts M.J., Canessa C.M., Olsen J.C., Hamrick M., Cohn J.A., Rossier B.C. & Boucher R.C. (1995): CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*, 269, 847-850

150. Tabcharani J.A., Jensen T.J., Riordan J.R. & Hanrahan J.W. (1989): Bicarbonate permeability of the outwardly rectifying anion channel. *J Membr Biol*, 112, 109-122
151. Takeuchi K., Furukawa O., Tanaka H., Nishiwaki H. & Okabe S. (1987): Impairment of acid-neutralizing capacity and lesion formation in the rat duodenum during hemorrhagic shock: comparative study with indomethacin. *Jpn J Pharmacol*, 44, 163-170
152. Tanner M.J. (1993): Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE1). *Semin Hematol*, 30, 34-57
153. Ussing H.P. & Zerahn K. (1951): Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*, 23, 111-127
154. Walter M. (2000): Untersuchungen über die Rolle einer Anionenleitfähigkeit und des apikalen Anionenaustauschers bei der Bikarbonatsekretion im proximalen Duodenum der Ratte. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
155. Wheat V.J., Shumaker H., Burnham C., Shull G.E., Yankaskas J.R. & Soleimani M. (2000): CFTR induces the expression of DRA along with Cl(-)/HCO(3)(-) exchange activity in tracheal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C62-C71
156. White J.F. & Imon M.A. (1983): A role for basolateral anion exchange in active jejunal absorption of HCO-3. *Am J Physiol*, 244, G397-G405
157. Wormmeester L., Sanchez d., Kokke F., Tse C.M., Khurana S., Bowser J., Cohen M.E. & Donowitz M. (1998): Quantitative contribution of NHE2 and NHE3 to rabbit ileal brush-border Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol*, 274, C1261-C1272
158. Yao B., Hogan D.L., Bukhave K., Koss M.A. & Isenberg J.I. (1993): Bicarbonate transport by rabbit duodenum in vitro: effect of vasoactive intestinal polypeptide, prostaglandin E2, and cyclic adenosine monophosphate. *Gastroenterology*, 104, 732-740
159. Yun C.H., Tse C.M., Nath S., Levine S.L. & Donowitz M. (1995): Structure/function studies of mammalian Na-H exchangers--an update. *J Physiol*, 482, 1S-6S
160. Yun C.H., Tse C.M., Nath S.K., Levine S.A., Brant S.R. & Donowitz M. (1995): Mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family: structure and function studies. *Am J Physiol*, 269, G1-11

8 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit und ihrem erfolgreichen Abschluss beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Ursula Seidler – ehemals Abteilung für Innere Medizin I der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, nun Zentrum Innere Medizin, Abteilung IV der Medizinischen Hochschule Hannover – ganz herzlich danken, die mir das interessante Thema überlassen hat und mich die ganze Zeit über hervorragend betreut hat. Sie hatte immer Zeit für Fragen und Probleme und half mir mit konstruktiver Kritik und tatkräftiger Hilfe über manche „Krisen“ hinweg.

Herrn Prof. Dr. M. Gregor, Ärztlicher Direktor der Abteilung Innere Medizin I der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, danke ich für die Möglichkeit, eine wissenschaftliche Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Wahl, Leiter des Isotopenlabors der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen, und Frau Benz danke ich für die Möglichkeit der Nutzung von Räumen im Isotopenlabor und für die Unterstützung, die sie mir zukommen ließen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die durch ihre Freundlichkeit, Kooperativität und nicht zuletzt tatkräftige Hilfe am Gelingen der Doktorarbeit einen großen Anteil hatten, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen. Frau Dr. Heidi Roßmann und Frau Dr. Irina Blumenstein danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft in allen fachlichen und allen anderen erdenklichen Fragen und insbesondere für das engagierte Korrekturlesen der Arbeit. Herrn Dr. Georg Lamprecht danke ich für die große Zeitinvestition, ein später von mir genutztes Messprogramm am Computer zu programmieren. Erwähnt sein sollen auch Frau Dr. Petra Jacob und Herr Dr. Oliver Bachmann, die mir sehr oft bei unterschiedlichsten Problemen zur Seite standen und mir halfen, Anfangshürden im Labor zu überwinden.

Meinem Mann Dr. Martin Spiegel danke ich für seine immerwährende Aufmunterung und tatkräftige Hilfe sowie für seine moralische und computertechnische Unterstützung besonders während der Endphase der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir zu jeder Zeit unterstützend zur Seite standen.

9 Lebenslauf

Name	Stefanie Spiegel, geb. Christiani
Geburtsdatum	12. August 1976
Geburtsort	Aachen
Familienstand	verheiratet mit Dr. rer. nat. Martin Spiegel
Eltern	Dr. ing. Peter Christiani, Diplom-Ingenieur, und Ulrike Christiani, Bewegungsfachkraft
Schulbildung	
1984-1987	Grund- und Hauptschule Neuffen
1987-1996	Hölderlin-Gymnasium Nürtingen, Abitur
Studium	
WS 1996/97 - SS 1998	Vorklinischer Studienabschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Universität Rostock
4. September 1998	Ärztliche Vorprüfung
WS 1998/99 - WS 2001/02	Klinischer Studienabschnitt an der Eberhard- Karls-Universität Tübingen
23. März 2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
28. März 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
SS 2002 - WS 2002/03	Praktisches Jahr am Diakonie-Krankenhaus Freiburg (Lehrkrankenhaus der Universität Freiburg)
6. Mai 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote „sehr gut“
Stipendien	
1999 - 2000	Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“ der Universität Tübingen

Wissenschaftliche Tätigkeit

November 1998

Beginn der Labortätigkeit im Labor von
Dr. U. Seidler, Abteilung I der Medizinischen
Universitätsklinik Tübingen, Ärztlicher
Direktor: Prof. Dr. M. Gregor

April 1999

Beginn der experimentellen Doktorarbeit im
Labor von Dr. U. Seidler